

Felix Bollenbeck

**Ein System zur automatischen Erstellung
interindividueller 3-D Modelle biologischer Objekte
aus 2-D Schnittbildern**

Ein System zur automatischen Erstellung
interindividueller 3-D Modelle biologischer Objekte
aus 2-D Schnittbildern

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

von Dipl.-Bioinformatiker Felix Bollenbeck

geb. am 11.02.1980 in Bonn

genehmigt durch

die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. habil. Bernd Michaelis

Hon.-Prof. Dr.-Ing. Udo Seiffert

Prof. Dr. Michael Biehl

Promotionskolloquium am 12.07.2011

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit am Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben und am Fraunhofer Institut für Fabrikbetrieb und -automatisierung (IFF) in Magdeburg.

Für die Betreuung der Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. Bernd Michaelis vom Institut für Elektrotechnik, Signalverarbeitung und Kommunikationstechnik (IESK) der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. Ganz herzlich möchte ich auch Prof. Dr. Michael Biehl, Johann Bernoulli Institut für Mathematik, Universität Groningen für seine Begutachtung der Arbeit danken.

Die Entstehung der Arbeit selbst wurde ganz maßgeblich durch Herrn Hon.-Prof. Dr.-Ing. Udo Seiffert ermöglicht. Durch die sehr guten Arbeitsbedingungen in der von ihm geleiteten Abteilung Biosystems Engineering am Fraunhofer IFF, wie auch durch zahlreiche fachliche Hinweise und Diskussionen hat die Erstellung dieser Dissertation mir große Freude bereitet.

Große Freude hat mir auch die interdisziplinäre Zusammenarbeit im Rahmen der Arbeit bereitet, was sicherlich in der fachlichen Kompetenz und angenehmen Umgang von Dr. Winfriede Weschke und Dr. Diana Weier, sowie Uta Siebert und Birgit Zeike vom IPK in Gatersleben begründet ist.

Großer Dank gebührt auch meinen ehemaligen Kollegen vom Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Tobias Czuderna, Dr. Rainer Pielot und Dr. Alexander Ihlow für interessante Diskussionen und wertvolle Hinweise sowie Dr. Andreas Backhaus und Dr. Andreas Herzog vom Fraunhofer IFF.

Für die vielfältige Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Vertrauten und Freunden bedanken, bei Irmela Bartsch, bei meinen Eltern und nicht zuletzt auch bei meinen ehemaligen Kommilitonen für die fachlichen Horizonterweiterungen am donnerstäglichen Bioinformatiker-Stammtisch.

Zusammenfassung

Die vorgelegte Dissertation beschreibt ein System zur automatischen Erzeugung dreidimensionaler individueller Modelle biologischer Objekte aus zweidimensionalen Bilddaten. Neben der grundlegenden wissenschaftlichen Relevanz, Morphologie und Histologie von pflanzlichen oder tierischen Proben in ihrer räumlichen Zusammensetzung untersuchen zu können, steht im Rahmen dieser Arbeit die technische Problemlösung zur Steuerung einer vollautomatischen Probenpräparation mittels dreidimensionaler Laser-Mikrodissektion tiefgefrorener mikroskopischer Probeobjekte im Vordergrund. Mit der Entwicklung dieses neuen Verfahrens werden die Limitationen bestehender Ansätze aufgehoben, und so die Untersuchung gewebereiner Präparate mit dem gesamten heute verfügbaren Stand molekularbiologischer Analysemethoden ermöglicht. Für die biologische Forschung liefert dies die Möglichkeit, vor allem die Beziehung von Funktion und Struktur in Organismen sehr viel gezielter zu untersuchen als mit bestehenden Methoden.

Aus Sicht der Automatisierung und Informationsverarbeitung ist hierbei vor allem die Steuerung der automatischen Dissektion relevant. Die automatische Erstellung der dazu notwendigen Gewebemodelle auf Basis hochaufgelöster Schnittbilder und deren Integration in das technische System sind Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Die dazu entwickelten Methoden befassen sich daher mit der Rekonstruktion und Segmentierung von Bildstapeln, daß heißt mit der Wiederherstellung des räumlichen Zusammenhangs und der Erkennung unterschiedlicher Gewebetypen darin. Eingangs werden dazu die Eigenschaften des Bildmaterials untersucht und Ansätze zur notwendigen Qualitätsverbesserung und Standardisierung beschrieben. Für die dreidimensionale Rekonstruktion der Probeobjekte werden Methoden der Bildregistrierung entwickelt. Um die für die Rekonstruktion mehrere tausend Einzelbilder umfassenden Datensätze nötige Fehlerrobustheit sicherzustellen, wird ein rekursiver Algorithmus zur Bildstapelregistrierung entwickelt, der eine statistische Rückweisung fehlerhafter Registrierungen liefert.

Die Erkennung der vorliegenden Gewebetypen in Bilddaten erfordert biologisches Expertenwissen. Zentrale Herausforderung für das Gesamtsystem ist daher die Abbildung der menschlichen Kognition in numerisch effizienten Segmentierungsalgorithmen. Dazu wird ein neuer Algorithmus vorgestellt, welcher auf einer wechselseitigen Registrierung und Segmentierung von Bildstapeln basiert, und beide Teilaufgaben iterativ optimiert. Im Vergleich zu bestehenden Ansätzen wird damit eine signifikant höhere Segmentierungsgenauigkeit von über 95% bei gleichzeitiger Reduzierung der Laufzeitkomplexität erreicht. Der Ansatz basiert unter anderem auf der Lösung eines regularisierten Deformationsproblems, durch Approximation der Ableitungsmatrix als Bandmatrix wird dabei eine Komplexität von $\mathcal{O}(n)$ je Iteration erhalten, was den Ansatz für die Verarbeitung mehrere Gigabyte großer Bildstapel besonders eignet.

Auf Segmentierungsebene erfolgt die Bildung statistischer Durchschnittsmodelle, welche sowohl aus

biologischer Sicht, als auch für die technische Aufgabenstellung eine geeignete Modellierung als stochastische Bildvolumen liefern. Für die im biologischen Kontext relevante Funktion von Strukturmodellen als Rahmenwerk für die Integration funktionaler Messdaten wird eine neue Methode zur inter-modalen Registrierung vorgestellt, welche in Experimenten eine wesentliche Verbesserung von Laufzeit und Robustheit gegenüber dem Standardverfahren liefert. Der letztenendliche Brückenschlag zurück zu realen Probeobjekten in der Dissektionsanwendung wird mittels Structure-from-Motion Verfahren und Oberflächenregistrierung der Zielvolumina aus Modelldaten als Anfahrkoordinaten für das technische System erhalten.

Die damit geschaffene Möglichkeit zur vollautomatischen mikroskopischen Probenpräparation liefert damit einen wichtigen ingenieurtechnischen Beitrag zur Methodenentwicklung in den Lebenswissenschaften. Die vorgeschlagenen Methoden sind dabei allgemeingültig und stellen einen Beitrag zum Stand der Technik in der Bild- und Informationsverarbeitung dar.

Abstract

This thesis describes a system for the automatic generation of three-dimensional inter-individual models of biological objects based on two-dimensional image data. The foremost interest of this work, besides the scientific relevance of observing morphology and histology of either plant or animal specimen in its natural spatial extension, is to provide a technical solution for automatic sample preparation by means of three-dimensional laser-microdissection of deep-frozen microscopic objects. The development of this new preparation technique addresses the shortcomings of existing approaches towards the applicability of state-of-the-art biochemical assays for pure tissue material. Regarding data processing, steering the dissection process is the most relevant task. The work presented here describes generation of three-dimensional tissue-models based on high-resolution two-dimensional images and integration of these into the technical system, necessary for controlling automated preparation. Developed methods address the reconstruction and segmentation of image-stacks, for restoration of spatially intact volume data and recognition of different tissues therein. Properties of the prevailing image data and methods for enhancement and standardization are investigated initially. Images registration methods are employed for three-dimensional reconstruction of specimen. To provide a high degree of robustness for the task at hand, reconstructing stack of several thousand images, a recursive reconstruction algorithm was developed, which allows the statistical rejection of registration errors.

The recognition of prevailing tissue types in image data requires biological expert-knowledge. The fundamental problem for the model-generation therefore is the replication of human cognition with numerical efficient segmentation algorithms. This is achieved with a novel algorithm for interleaved registration and segmentation, which iteratively optimizes both sub-tasks. In benchmarks against existing approaches a significantly higher segmentation accuracy of more than 95% is achieved along with reduced runtime. The approach is based on solving a regularized deformation formulation, by employing a band-structure approximation of the differential, a numerical complexity of $\mathcal{O}(n)$ per iteration is achieved, which makes the algorithm particularly applicable for the processing of gigabyte-sized datasets.

Average-models are based on the computed tissue-maps, where stochastic images-volumes provide a representation advantageous for both biologically inspired question and visualization, and technical necessities. For the biological relevance of investigating structure-function relationships, averaging models can serve as a framework for the integration of functional data. Here, a new algorithm for inter-modal registration of images is presented. In experiments, superior performance regarding robustness and runtime compared to standard methods is observed. The connection to physical specimen in the dissection-application is accomplished by structure-from-motion and surface registration methods for registering target volumes and export of coordinates for the steering the technical system. In summary, this work

provides the preliminaries for fully automatic sample dissection, and thereby delivers a significant contribution for the development and engineering of new methods in life-sciences. The proposed methods and algorithms are universal and contribute to the state-of-art in signal- and image-processing.

Meinen lieben Eltern, Georg und Ida Bollenbeck.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Fragestellung und wissenschaftlicher Ansatz	1
1.2	Technische Problemstellung	5
1.2.1	Dreidimensionale Bildgebung in der Biologie	5
1.2.2	Histologische Bilddaten sich entwickelnder <i>Hordeum vulgare</i> Karyopsen	7
1.3	Zielstellung und Lösungsansatz	9
I	Vorverarbeitung und Rekonstruktion	13
2	Vorverarbeitung und Standardisierung von Mikroskopbildern	15
2.1	Abbildung und Ausgleich von <i>RGB</i> -Bildern	16
2.1.1	Farbraumanalyse	17
2.1.2	Intensitätsausgleich	19
2.2	Bildkomposition aus Teilbildern	22
2.2.1	Phasenkorrelation und <i>Shift-Peak</i> Findung	23
2.2.2	Bildfusion und Komposition von Mikroskopbildern mittels PCM	24
2.3	Hintergrundbereinigung	27
2.3.1	Segmentierung der <i>Regions of Interest</i>	27
2.3.2	Segmentierung mit morphologischen Operatoren	28
2.3.3	Segmentierung mit geometrischen aktiven Konturmodellen	33
2.4	Geometrische Standardisierung	37
2.4.1	Momente	38
2.4.2	Schätzung und Transformation	39
2.5	Ergebnisse und Diskussion	40
3	Registrierung und Rekonstruktion von Bildstapeln	43
3.1	Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder aus seriellen Schnittbildern	43
3.2	Das Registrierungsproblem	45
3.2.1	Intensitätsbasierte Bildmetrik	49
3.2.2	Erweiterung der Bildmetrik	50
3.2.3	Numerische Optimierung im Transformationsraum	51
3.2.4	Multiskalenansatz zur effizienten Lösung	54

3.2.5	Divide-and-conquer Formulierung zur Fehlerrückweisung	55
3.3	Ergebnisse und Diskussion	56

II Segmentierung relevanter Gewebe in biomedizinischen Bilddaten 61

4 Segmentierung durch überwachte Klassifikation 63

4.1	Merkmalsraum für das Mehrklassenproblem	63
4.1.1	Statistische Merkmale	64
4.1.2	<i>Gabor</i> -Filter und -Merkmale	66
4.1.3	<i>Wavelet-Paket</i> Analyse und Merkmale	67
4.1.4	Analyse und Transformation des Merkmalsraums	68
4.2	Klassifikatoren zur merkmalsbasierten Segmentierung	71
4.2.1	Mehrschichtperzeptren	72
4.2.2	Mehrklassen <i>Support Vektor Maschinen</i>	73
4.2.3	Merkmalsbasierte Segmentierung von Gewebetypen	75
4.3	Diskussion	76

5 Segmentierung als Registrierungsproblem 81

5.1	Deformierbare Registrierung	82
5.1.1	Regularisierung durch Diffusionstern	84
5.1.2	Lösung der diffusionsbasierten Registrierung	84
5.2	Segmentierung durch deformierbare Registrierung	86
5.2.1	Deformationsfeld und Transformation	86
5.2.2	Einfluss und Wahl der Parameter für die Lösung	87
5.3	Ein Mischmodell für die Segmentierung	88
5.3.1	Globale und lokale Segmentierung	89
5.3.2	Annahmen (<i>Prior</i>) und Modellselektion	90
5.4	Simultane Rekonstruktion und Segmentierung	93
5.4.1	Wechselseitige Formulierung von Registrierung und Segmentierung	93
5.4.2	Iterative Optimierung im Skalenraum	95
5.5	Segmentierungsergebnisse	96
5.5.1	Konfusionsmatrix	96
5.5.2	<i>Hausdorff-Distanz</i> gewichteter Fehler	98
5.6	Diskussion	99

III 3-D Modellierung und Integration funktionaler Daten 103

6 Geometrische Modelle und interindividuelle 3-D Modellierung 105

6.1	Modellerstellung aus segmentierten Daten	105
6.1.1	Extraktion von <i>Iso</i> -Oberflächen aus Voxeldaten	106
6.1.2	Gitterdarstellung und -reduktion	108

6.2	Statistische dreidimensionale Modellierung von Gewebestrukturen	109
6.2.1	Interindividuelle Atlanten zur Gewebevorhersage	109
6.2.2	Abbildung in ein gemeinsames Koordinatensystem	110
6.2.3	Statistische Modellierung der interindividuellen Streuung	111
6.3	Integration der geometrischen Modelle in ein automatisches Mikrodisektionssystem . .	112
6.4	Ergebnisse und Darstellung	114
7	Automatische Integration funktionaler Daten	119
7.1	Inter-Modale Registrierung durch informationsbasierte Bildmetriken	119
7.1.1	Integration von <i>Mass Spectrometric Imaging</i> (MSI) Daten	120
7.1.2	2-D-3-D Registrierung durch <i>Mutual Information</i>	121
7.2	Inter-Modale Registrierung durch Regression im Merkmalsraum	122
7.2.1	Intensitätsvorhersage aus <i>Gabor</i> -Bildrepräsentationen durch neuronale Netze . .	122
7.2.2	Integration von <i>NMRi</i> Daten	124
7.3	Diskussion	125
8	Zusammenfassung und Ausblick	129
	Anhang	135
A	Multiskalenanalyse mittels Wavelettransformation	135
B	Datensätze	139
C	Laufzeiten und Numerische Experimente	143
	Literaturverzeichnis	162

Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersicht zur Cryo 3-D Lasermikrodissektion	4
1.2	Probeobjekte, Präparation und Stichprobenzusammenstellung	8
1.3	Rohbildansichten von <i>Hordeum</i> Durchlichtmikrographen	9
1.4	Übersicht des gesamten Verarbeitungflusses	10
2.1	Unterschiedlich spektrale Leistungsdichten als Phänomen „Farbe“	17
2.2	Scatterplot der RGB-Werte in der Farbraumanalyse	19
2.3	Betrachtung unterschiedlicher Ansätze zum Intensitätsausgleich	21
2.4	Komposition des vollständigen Probeobjektes aus Mosaikbildern	23
2.5	Phasenkorrelation zur Bestimmung des <i>shifts</i> zwischen Teilbildern	24
2.6	<i>Blending</i> von Grauwerten mittels Waveletzerlegung	27
2.7	Rohbildansichten Durchlichtmikrograph <i>Hordeum</i> , Autoradiogramm Maus, Konfokal- aufnahme <i>Nicotiana</i>	28
2.8	Skalenabhängigkeit der Bildableitung und Kantendetektion	29
2.9	Morphologische Segmentierung, Kantenbild, Zusammenhangskomponenten und Objekt- merkmale	31
2.10	Entwicklung der <i>Level Set</i> Funktion ϕ im Mehrskalenansatz	37
2.11	Entwicklung der Kontur $\phi = 0$ im Mehrskalenansatz	38
2.12	Hauptachsengeometrie und Schwerpunkte unterschiedlicher Bilddaten	40
3.1	Realisierung der Bildtransformation auf diskreten Punktgittern	49
3.2	Schematischer Ablauf der Parameterschätzung in der Registrierung anhand der Multis- kalendarstellung der Eingangsbilder	54
3.3	Ablaufschema des rekursiven Ansatzes zur Bildstapelregistrierung	55
3.4	Rekonstruierte <i>Hordeum</i> Karyopse (10 DAF) in virtuellen Schnitten	58
3.5	Rekonstruierte <i>Hordeum</i> Karyopse (3 DAF) in virtuellen Schnitten	58
3.6	Mittlerer quadratischer Abstand in einem Bildstapel (<i>Hordeum</i> 10 DAF) vor und nach Registrierung	59
3.7	Automatische Fehlerrückweisung im rekursiven Ansatz	59
3.8	Rekonstruktion eines konfokales Volumens von <i>Nicotiana</i>	60
4.1	Textur und Orientierung durch Histogramm- und Kookurenzmerkmale	65
4.2	Analyse des Merkmalsraums durch PCA und LDA	71

4.3	Untersuchung der überwachten Klassifikationsleistung auf dem Referenzdatensatz	78
4.4	ROC-Verlauf der Klassifikation auf dem Referenzdatensatz	79
4.5	Segmentierungsergebnisse eines Schnittes aus dem Referenzdatensatz	80
5.1	Bestimmung der Deformation mittels Diffusionsregistrierung zwischen Intensitätsbildern	88
5.2	Einfluss der Parameter τ, α für die Minimierung des Diffusionsansatzes	89
5.3	Konnektionismus im Mischmodell	90
5.4	Entropie der MLP-Ausgaben aus der überwachten Klassifikation der Merkmalsdaten und Betrag der Koordinatenverschiebung	92
5.5	Iterative Rekonstruktion und Segmentierung im Mehrskalensatz	97
5.6	Rekonstruktion der Intensitätsvolumen durch den DIF-Ansatz	98
5.7	Konfusionsmatrizen für DIF und Mischmodell	99
5.8	Verteilung der durchschnittlichen DCP-Werte falschklassifizierter Bildpunkte	100
6.1	Primitive der Oberflächenextraktion	107
6.2	Kontraktion von Dreiecksknoten zur Oberflächenreduktion	108
6.3	SFM-Bildsequenz aus der LMD Anwendung	112
6.4	Integration der Modelldaten in die Life-Geometrien zur Ablationssteuerung	115
6.5	Visualisierung der statistischen Gewebeverteilungen durch Volumenrendering im Inter-individualmodell	117
7.1	Integration von MALDI-IMS in Gewebedaten durch Maximierung der Mutual Information	126
7.2	Multimodale Registrierung durch Regression im Merkmalsraum	127
A.1	Schema Unterraumschachtelung 2-D DWT	138
B.1	3-D Rendering <i>Hordeum</i> Gewebemodell 7-DAF, 17.4mg	140
B.2	<i>Nicotiana</i> Gewebemodell	141
B.3	Mausautoradiogramme	141
C.1	Betrachtung verschiedener Optimierungsverfahren	144
C.2	Verhalten verschiedener Optimierungsverfahren im Transformationsraum	145
C.3	Deformationsverhalten DIF im Detail für unterschiedliche Parameter	148
C.4	NMR Registrierung mit 3-D BSplines	149

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht von Optimierungsverfahren zur Bestimmung der optimalen Transformationsparameter	51
4.1	Übersicht der extrahierten Merkmale zur Gewebeklassifikation und Streuung der Klassen	66
4.2	Laufzeiten der merkmalsbasierten Segmentierung des Referenzdatensatzes	76
C.1	Vergleich der Laufzeiten der AOS-Approximation gegen direkte Inversion	144
C.2	Gewebesegmentierung zur Rekonstruktion in der simultanen Registrierung und Gewebesegmentierungen (DIF)	144
C.3	Verschiebung $\ U\ $ für unterschiedliche Parameter.	148
C.4	Untersuchung der regressionsbasierten Registrierung im Vergleich zur MI-Metrik	150

Abkürzungen und Schreibweise

Variablen

$a, b, c \in \mathbb{R}$	Skalare in <i>kursiven</i> Kleinbuchstaben
$\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}, \boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\phi} \in \mathbb{R}^n$	Vektoren in fetten deutschen Buchstaben oder Symbolen
$A, B \in \mathbb{R}^{m \times n}$	Matrizen in deutschen Großbuchstaben
\mathcal{A}, \mathcal{B}	Definierte Mengen in <i>kursiven</i> Großbuchstaben
1, 000.00	Dezimalzahlen in angelsächsischer Schreibweise

Vereinbarung einiger Operatoren

\circ	Komposition von Abbildungen
$\downarrow t$	Unterabtastung Faktor t
$*$	Faltungsoperator
$A \oplus B$	innere Summe
$\langle \cdot, \cdot \rangle$	Skalarprodukt
$ A = \det A$	Determinante von $A \in \mathbb{R}^{m \times n}$
$ \mathcal{A} \in \mathbb{N}$	Kardinalität der Menge \mathcal{A}
$\ \cdot \ $	Betrag, L_2 -Norm
A^{-1}, f^{-1}	Inverse Matrix, Umkehrfunktion
E_i	i -te Einheitsmatrix
\mathbf{F}_I	Fourierdarstellung von I
G_t	<i>Gausscher</i> -Faltungskern mit $\sqrt{\sigma} = t$
$\partial x_i, \partial M$	Partielle Ableitung nach i -ter Komponente, Rand einer Menge M
mod	Teilerrest
∇S	Nabla-Operator, Gradient des Skalarfelds
ΔV	Laplace Operator, Divergenz des Gradientenfelds, ganzzahlige Translation
$\operatorname{div} \vec{F}$	Divergenz des Vektorfeldes F
$\mathcal{O}(\cdot)$	\mathcal{O} -Notation, <i>Landau</i> -Symbol, asymptotische Schranke
\mathbb{N}	natürliche Zahlen $\mathbb{N} \cup \{0\}$
\mathbf{p}, φ	Transformationsparameter parametrischer Transformationen
p	Wahrscheinlichkeitsdichte

$\delta(i, j)$
 Ω

KRONECKER-*delta*, Identitätsfunktion, nicht *Dirac*-Delta
Bildbereich

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Biologische Fragestellung und wissenschaftlicher Ansatz

Wachstum und Entwicklung von Organismen basieren auf dem Zusammenspiel unterschiedlicher Gewebe mit unterschiedlichen Funktionen, dabei werden die Eigenschaften des adulten Organismus beziehungsweise das weitere Wachstum bereits in frühen Entwicklungsphasen festgelegt. Aus biologischer Sicht ist die Untersuchung solcher Prozesse von großem Interesse, besonders vor dem Hintergrund, genetische oder physiologische Einflussgrößen zu finden, die Art und Gestalt der Entwicklung steuern und letztlich den adulten Phänotyp bestimmen. Dies kann jedoch auch Überdauerungsformen eines Entwicklungszustandes betreffen, wie beispielsweise Getreidekörner (Karyopsen) als die Nachkommen der Getreidepflanze, deren Gestalt und chemische Zusammensetzung wiederum für Grundlagenforschung, Züchtung und Landwirtschaft von großer Bedeutung ist. Unabhängig vom tatsächlich beobachteten Probeobjekt und Entwicklungszeitpunkt stellt sich daher bei der biologischen Untersuchung von Entwicklungsprozessen immer die Frage nach dem Zusammenhang von Funktion und Struktur im Organismus. Das heißt auf der einen Seite *Morphologie* und *Histologie* von Organen und Zellen und auf der anderen Seite genetische und biochemische Funktionen und Eigenschaften. Eine wichtige Grundlage für das Verständnis von Wachstum und Entwicklung ist daher die Zuordnung von Vorgängen auf molekularer Ebene zu unterschiedlichen Zellen, Strukturen oder Geweben. Dafür stehen der Biologie leistungsfähige Werkzeuge zur Verfügung, die eine quantitative Bestimmung der vorliegenden Transkripte, Proteine und Metaboliten ermöglichen und dabei auf der Analyse von aufgeschlossenem Zellmaterial beruhen. Parallel dazu können unterschiedliche Zell- und Gewebetypen vom biologischen Experten in Präparaten und Bildgebungen des Probeobjekts identifiziert werden. Eine ideale Funktion-Struktur-Untersuchung würde daher die Klassifizierung und funktionale Charakterisierung aller im Organismus vorliegenden Zellen darstellen. Um eine solche Untersuchung zu vereinfachen, können nun Zellen zu Gewebeklassen in einem histologischen Modell zur Untersuchung der Morphologie zusammengefasst und funktionelle Untersuchungen für die unterschiedlichen Gewebetypen anhand von gewebereinen Zellaufschlüssen ausgeführt werden.

Auf Basis dieser Betrachtungen sind zunächst zwei Dinge wünschenswert:

Strukturmodelle, die sich differenzierende Gewebe und biologischen Materialien abbilden. Diese Untersuchung der Struktur sollte in ihrer natürlichen räumlichen Ausdehnung erfolgen, also anhand dreidimen-

1.1 Biologische Fragestellung und wissenschaftlicher Ansatz

sionaler Modelle, und dabei unterschiedliche Entwicklungszeitpunkte berücksichtigen. Die Möglichkeit, strukturelle Veränderung und Entwicklung zu beobachten, liefert letztlich die Grundlage für eine gezielte biochemische Untersuchung auf molekularer Ebene.

Die Entnahme beziehungsweise Dissektion von Gewebematerial eines bestimmten Typs ist bei makroskopischen Untersuchungsobjekten unproblematisch und kann am toten oder lebenden Probeobjekt manuell erfolgen. Für mikroskopische Objekte ist dies im Allgemeinen nicht manuell möglich und muss mit technischen Hilfsmitteln gelöst werden. Mechanische Verfahren scheiden für die mikroskopische Materialbearbeitung und -entnahme aus, Dissektion auf mikroskopischer Ebene hat sich daher in der jüngeren Vergangenheit als Lasermikrodissektion (LMD) [EMMERT-BUCK et al., 1996] etabliert; Materialbearbeitung und -entnahmen erfolgen dabei mittels Licht. Die Verwendung von gepulstem Laserlicht ermöglicht dabei eine präzise Gewebeerstörung und -manipulation beziehungsweise Bewegung ausgeschnittener Objekte im Mikrometerbereich, das heißt auch einzelner Zellen. In bestehenden Systemen werden entsprechende Laserlichtquellen in Mikroskopsysteme integriert (*Leica LMD 7000*, *Zeiss PALM Systeme*, *MMI CellCut*). Die Auswahl der Dissektionsobjekte kann dann direkt anhand des Livebilds der Mikroskopkamera erfolgen. Die eigentliche Dissektion erfolgt dann automatisiert durch Bewegung des Probeobjektes mittels motorisiertem Translationstisch gegenüber der Laserlichtquelle, die Entnahme des Probematerials über Fixierung an eine Membran oder Aufnahme in ein Probegefäß. Durch die Verwendung sehr kurzer, hochenergetischer Pulse wird beim Ausschneiden das Probematerial nicht carbonisiert, sondern Valenzbindungen durch Einbringen entsprechender Energiemengen direkt ionisiert.

Der so erhaltene Ansatz ermöglicht zunächst die Erstellung gewebereiner Proben für weitere Analysen, dabei werden neben der notwendigen manuellen Interaktion jedoch zwei gravierende Nachteile erhalten: Die Dissektion erfolgt aus einem flächigen Präparat im Lichtmikroskop, um einerseits anhand des Mikroskopbildes die Gewebeidentifizierung und -markierung zu gestatten und andererseits um ein „Durchschneiden“ mittels Lichtpulsen bis zu einer bestimmten Dicke zu ermöglichen.

In dieser technischen Konfiguration kann Probenmaterial lediglich bei Raumtemperatur entnommen werden. Bei Probevolumina von wenigen μl ist damit durch unweigerliches Auftauen des Präparats keine anschließende biochemische Quantifizierung von flüchtigen Molekülen, beispielsweise bestimmter Metaboliten möglich. Die nachfolgenden Analysen sind auf Transkriptomuntersuchungen und bestimmte Proteinassays beschränkt [THIEL et al., 2010, KASPAR et al., 2010]. Durch das Vorliegen von Dünnschnittpräparaten werden ferner geringe Probenmengen erhalten, besonders bei Pflanzenmaterial ($\sim 50\mu\text{m}$), was beispielsweise für quantitativen Transkript- und vor allem Metabolituntersuchungen limitierend sein kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden zur automatischen 3-D Modellerstellung dienen unter anderem zur Erstellung von Anfahrkoordinaten beziehungsweise Zielvolumina für ein neues, vollautomatisches Verfahren zur Lasermikrodissektion (*Cryo 3D-LMD*, *MMI Molecular Machines & Industries AG*, Glattbrugg, CH, Schutzrechte [MMI, 2006, MMI, 2008]), welches die oben beschriebenen Schwachstellen adressiert: Die Dissektion findet als *Ablation* am intakten, während des Prozesses vollständig tiefgefroren gehaltenen Objektes statt. Die Bewegung der Probe relativ zum Laser erfolgt dabei in Raumkoordinaten, das heißt dreidimensional und vollautomatisch: Die Markierung von Zielgeweben durch den Nutzer entfällt und wird stattdessen auf Basis bestehender Modelldaten für die vorliegenden

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Objekte und daraus erstellten Vorhersagen der Gewebeverteilung relativ zur (äußeren) Geometrie des Probeobjektes erhalten.

Anhand dessen sollen die Limitationen der herkömmlichen 2-D LMD aufgehoben werden, insbesondere soll durch die automatische Cryo-3D-LMD

- die Entnahme von ausreichend Probematerial aus einem Präparat ermöglicht werden und
- der gesamte Dissektionsprozess im tiefgekühlten Zustand erfolgen.

Damit wird für die nachfolgenden (sog. *Downstream*-) Analysen der gewebereinen Dissektate die volle Sensitivität, insbesondere für schnell umgesetzte Metabolite und instabile Proteine usw., der chemischen Analytik, etwa Massenspektrometrie oder Flüssigchromatographie, erhalten; durch die ununterbrochene Tiefkühlung also eine „Aufnahme“ des *in vivo* Zustandes der Probe erhalten.

Im Rahmen der Entwicklung und Validierung des Verfahrens werden dazu als Untersuchungsobjekt Karyopsen der Kulturgerste (*Hordeum vulgare*) an unterschiedlichen Zeitpunkten (Tage nach der Bestäubung, *days after flowering*, DAF) in ihrer Entwicklung zur Reife betrachtet. *Hordeum* besitzt zum einen eine große wirtschaftliche Bedeutung als Nutzpflanze und ist daneben ein gut untersuchtes System in der Pflanzenbiologie [SREENIVASULU et al., 2010].

Zur Anwendung der Cryo-3D-LMD Methodik müssen neben einer grundlagenwissenschaftlichen Fragestellung Methoden zur Erstellung von dreidimensionalen Gewebemodellen für mikroskopische Objekte zur Verfügung stehen. Diese Modelle müssen dabei die phänotypischen Varianzen innerhalb einer Menge von Individuen eines Entwicklungszeitpunktes berücksichtigen und werden dementsprechend als *inter-individuelle* Modelle bezeichnet.

Aufgrund der Notwendigkeit, einerseits genaue Gewebeschreibungen für die Steuerung des LMD Systems im Mikrometerbereich zu erhalten und gleichzeitig eine Stichprobe mehrerer Individuen je Zeitpunkt zur Abbildung der Varianz zu erhalten, werden für solche Strukturmodelle Datenmengen erhalten, für die eine automatische Verarbeitung verpflichtend ist. Daneben ist eine automatische Modellerstellung aus Gründen der Objektivität und Reproduzierbarkeit vorteilhaft, eine manuelle Interaktion in das Gesamtsystem soll auf ein Minimum reduziert werden. Die Basis für die Erstellung von interindividuellen Modellen sind dann beispielsweise Hellfeld-Mikroskopbilder. Diese liefern, mit entsprechenden histologischen Färbungen, die notwendige Auflösung der vorliegenden Zell- beziehungsweise Gewebestrukturen, das heißt der Histologie der Probe [GUBATZ et al., 2007]. Um ein dreidimensionales, annähernd isotropes Bildvolumen zu erhalten, werden serielle Dünnschnitte mittels eines Mikrotoms erstellt, das Probeobjekt wird zur Digitalisierung vollständig zerstört. Für Durchlichtaufnahmen kann dabei nicht die am Objekt verbleibende Schnittfläche aufgenommen (sog. Blockface-Methoden) werden, sondern es müssen einzelne Schnitte auf Objektträger aufgebracht und digitalisiert werden. Das so erhaltene Bildmaterial liefert dabei einen sehr hohen Detailgrad und im Rahmen der Mikroskopoptik eine hohe räumliche Auflösung. Durch diese Präparation und Digitalisierung geht der dreidimensionale Zusammenhang konsekutiver Schnitte vollständig verloren, das Bildvolumen des ursprünglichen Objekts muss anhand der Bildinhalte rekonstruiert werden. Dass anhand dieses Verfahrens qualitativ hochwertige Bildvolumen und Gewebemodelle individueller Probeobjekte erstellt werden können, ist gezeigt worden [GUBATZ et al., 2007], allerdings mit einem sehr zeitaufwendigen manuellen Ansatz.

1.1 Biologische Fragestellung und wissenschaftlicher Ansatz

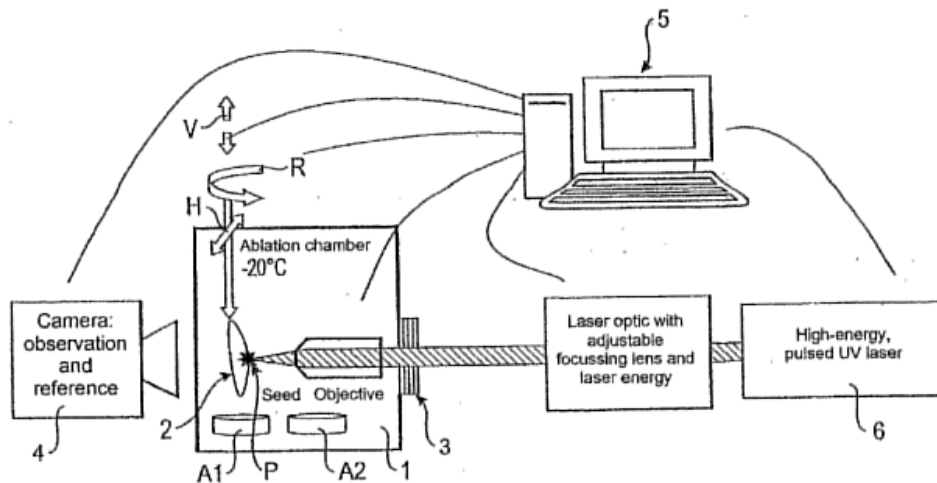


Abbildung 1.1: Übersicht Cryo-3-D-LMD Verfahren (aus [MMI, 2008]): Die Steuerung der xyz -Bewegung (V,H,R) und Ablation der Probe (*Seed*) mittels eingekoppelter Laserspuls (6) findet anhand der Modelldaten in Bezug zum 2-D Livebild (4) statt.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Entwicklung eines *automatischen* Systems zur Erstellung dreidimensionaler interindividueller Modelle aus Schnittbildaufnahmen.

Die Entwicklung der Methoden wurde dabei primär anhand von Bilddaten von *Hordeum* Karyopsen durchgeführt. Dabei werden unterschiedliche Zeitpunkte in der frühen Entwicklung der Gerstenkörner betrachtet, der Phase, in der der pflanzliche Stoffwechsel die Akkumulation der Speicherstoffe, Stärke und Proteine determiniert. Für die betrachteten Zeitpunkte und unterschiedliche, als biologisch relevant eingestuftes Gewebe sollten nun dreidimensionale Interindividualmodelle erstellt werden. Gewebetypen stehen in Bezug zum Wachstum und Speicherstoffaggregation in der Karyopse, wie Leit- und Speichergewebe, dabei liegen innerhalb der Karyopse Zellen zwei grundlegend unterschiedlicher Genotypen vor, die der Mutterpflanze (maternal) und des Embryos und augmentierender Strukturen (filial) als neue Generation.

Darüber hinaus werden im Rahmen der Arbeit weitere Probeobjekte und Bildgebungen untersucht, um eine allgemeinere Anwendbarkeit der entwickelten Methoden sicherzustellen. Als weiterer pflanzlicher Vertreter werden Tabakpflanzen (*Nicotiana benthamiana*) betrachtet. *Nicotiana* ist eine gebräuchliche Modellpflanze in der Biologie und damit auch für die Anwendung der beschriebenen LMD-Methodik von großem Interesse für die Wissenschaft. Untersucht werden dabei die Organisation der Leitgewebe in Blattstielen und die darin organisierten Gewebestrukturen zum Transport von Nähr- und Speicherstoffen. Dabei werden unterschiedliche Mikroskopieverfahren, Hellfeld- und Konfokalmikroskopie benutzt, um die Eignung zur Struktur- beziehungsweise Histologiebeschreibung zu untersuchen und entwickelte Methoden an unterschiedlichem Bildmaterial zu validieren.

Als tierische Präparate werden Mausgehirne untersucht. Hier werden biologisch relevante Strukturen beziehungsweise Zielgewebe nicht anhand ihrer Zellstruktur oder Histologie sichtbar gemacht, sondern durch das Vorliegen bestimmter Metabolite im Stoffwechsel. Die räumliche Verteilung wird dabei durch

Einbringen von isotopendotierten Molekülen in den lebenden Organismus und Detektion der emittierten α -Strahlung vom seriell geschnittenen Präparaten als Autoradiogramm erhalten.

Im Sinne der wissenschaftlichen Fragestellung ist es daher das Ziel, ein System zu entwickeln, welches eine automatische Erzeugung geometrischer, dreidimensionaler Durchschnittsmodelle aus zweidimensionalen Schnittbildern realisiert. Die Verarbeitung soll dabei automatisch erfolgen, die Rekonstruktion des Probeobjektes und die Erkennung der darin vorliegenden Gewebe und Strukturen ermöglichen und dabei robust gegenüber Störungen und Artefakten aus Bildgebung und Präparation sein.

1.2 Technische Problemstellung

Aus der Serienschichtbildgebung werden zunächst Stapel konsekutiver, zweidimensionaler Aufnahmen der jeweiligen Schnittebene erhalten. Um eine parallele Schnitttrichtung zu erhalten und entsprechende Schnittdicken zu realisieren, erfolgt die Bearbeitung der fixierten Probe in einem Mikrotom. Die erhaltenen Bildaten sollen im Sinne einer dreidimensionalen Rekonstruktion isotrop in der räumlichen Auflösung sein, das heißt, die Schnittdicke richtet sich nach der räumlichen Auflösung der anschließenden Bildaufnahme. Dies können dann, wie beispielsweise bei Mäuseradiogrammen, mit einer lateralen räumlichen Auflösung im Bereich von $\sim 100\mu\text{m}/px$ lediglich wenige hundert bis hin zu einigen tausend Schnitten bei detaillierten Hellfeldmikrographen, wie beispielsweise bei Karyopsen sein.

Die erhaltenen Einzelbilder erhalten nun in der Summe zwar ein vollständiges Abbild des dreidimensionalen Objektes, jedoch ist die räumliche Korrespondenz der Bildinhalte nicht mehr gegeben. Daneben werden durch manuellen Proben transfer und Bildaufnahme Störungen und Artefakte jeweils unabhängig in einzelne Aufnahmen eingebracht. Daraus entsteht vor der eigentlichen Gewebeerkennung und -modellierung ein komplexeres Problem für die Rekonstruktion der Objekte. Dies gilt insbesondere bei großen Datensätzen mit mehreren tausend Einzelschnitten, nicht notwendigerweise aufgrund der zu prozessierenden Datenmengen, sondern durch die intrinsische Abhängigkeit der Einzelbilder in der Rekonstruktion. Für eine systematische Problembearbeitung muss daher zunächst geprüft werden, ob auf die „destruktive“ Schnittbildgebung zugunsten eines nativ dreidimensionalen Bildgebungsverfahrens verzichtet und damit das Problem der Rekonstruktion umgangen werden kann.

1.2.1 Dreidimensionale Bildgebung in der Biologie

Dem Leser soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über bestehende Methoden zur (zerstörungsfreien) dreidimensionalen Bildgebung in der Biologie gegeben werden, im Sinne einer skizzenhaften Beschreibung, um die Notwendigkeit der mikroskopischen Schnittbildgebung zu motivieren und sowohl den präparativ als auch rechnerisch hohen Aufwand zu begründen.

Um ein dreidimensionales Bildvolumen eines Objekts zu erhalten, sind prinzipiell zwei Ansätze möglich:

- *Tomographische* Verfahren, das heißt die Rücktransformation aus Projektionen durch einzelne Ebenen
- *Scanning*-Verfahren, das heißt die sequentielle Abtastung von Punkten im Raum.

Zur ersten Kategorie zählen zum Beispiel *OPT*, Röntgen-*CT*, (*f*)*MRT*, *PET* als tomographische Verfahren, basierend auf Licht- und β -Strahlung, *Magnetresonanz*(feldern), und α -Strahlung, aufgezählt nach

ungefährer, absteigender räumlicher Auflösung [KRAMME, 2002]. Dabei stellt sich für eine gegebene Klasse von Probeobjekten, Organismen oder Organen neben der Frage, wie detailliert aufgelöst werden kann, das Problem, *was* anhand der jeweiligen physikalische Größe in der Probe beobachtet wird. Bei höheren Tieren oder Menschen wird, beispielsweise mittels *MRT* oder *CT* der durch die Skelettstruktur gegebene hohe Organisationsgrad des Organismus abgebildet, die Darstellung von Organen (-teilen), Muskulatur, Knochen usw., resultierend aus unterschiedlichen Bindungen und Mengen von Atomen beziehungsweise unterschiedlicher Absorption von γ -Strahlen. Unterschiedliche Gewebe oder Materialien werden also indirekt mittels in größeren Bereichen einheitlichen Eigenschaften erkannt und nicht über eine Bestimmung, ob nun tatsächlich Zellen des jeweiligen Gewebes vorliegen.

Die Organisation und Strukturbildung bei Pflanzen basiert auf Zellwänden, die Erkennung unterschiedlicher Gewebetypen mittels tomographischer Verfahren ist daher prinzipiell anders gelagert. Dabei ist vor allem die zu geringe Ortsauflösung für die *MRT* limitierender Faktor (ca. 10-fach über der Größe einzelner Zellen), so dass keine Darstellung einzelner Zellen und damit auch keine Gewebespezifika erhalten werden. Dies gilt auch für die Verwendung spezieller Geräte für kleine Objekte wie beispielsweise *Hordeum* Karyopsen [GLIDEWELL, 2006]. Gleiches gilt für Röntgen-*CT*-Verfahren, für die *hochauflösende Röntgentomographie* (HCRT) wird beispielsweise eine Auflösung von $50\mu\text{m}$ bei der Untersuchung von Pflanzenorganen erhalten [STUPPY et al., 2003].

Interessante Neuentwicklungen stellen die optischen Tomographieverfahren OPT (*optical projection tomography*) und OCT (*optical coherence tomography*) dar: Für die Untersuchung von Entwicklungsprozessen in Pflanzen ist dabei insbesondere Transmissions-OPT [LEE et al., 2006] mit sichtbarem Licht geeignet. Dabei muss jedoch eine bestimmte Lichtdurchlässigkeit des Probeobjektes gegeben sein, was auch für optische Kohärenztomographie gilt. Die optische Tomographie liefert dabei eine wesentlich höhere Auflösung als beispielsweise *MRT*, bis hin zu wenigen μm . Verschiedene Implementierungen sind dabei noch in der Entwicklung.

Die zweite Klasse bilden Scanning-Methoden, in erster Linie optische Messungen beziehungsweise Exzitation des Probenmaterials zur Fluoreszenzbestimmung. Ein etabliertes Verfahren ist die *konfokale Laserscanning-Mikroskopie* (CLSM): Mittels einer konfokalen Optik wird die Fokustiefe der Aufnahme festgelegt, die punktweise Beleuchtung durch eine Laserlichtquelle wird nun durch das Probeobjekt bewegt, um ein Volumenbild zu erhalten. Dabei kann sowohl die Autofluoreszenz der vorliegenden Strukturen detektiert werden als auch differentielle Färbungen mit definierten Exzitationsbanden. Die dabei erhaltene Auflösung kann bis in den Sub-Mikrometerbereich gesenkt werden, limitierend für die Aufnahme vollständiger Probeobjekte ist dabei jedoch die Eindringtiefe der Beleuchtung. Besonders die Autofluoreszenz der Zellwände bei Pflanzenproben für bestimmten Wellenlängenbereiche gestattet dabei lediglich wenige $100\mu\text{m}$ „Reichweite“. Dazu kommt es bei tiefen Fokusebenen verstärkt zu einem „Ausbleichen“ (*photobleaching*) der Probe, da die höheren Fokusebenen wiederholt (mit)belichtet werden, was in der Summe die Darstellung histologischer Details schwierig macht.

Anhand dieses kurzen „Rundumblicks“ kann gefolgert werden, dass für die Erstellung genauer, dreidimensionaler Gewebesegmentierungen von mikroskopischen Pflanzenobjekten die Serienschneitbildgebung beziehungsweise eine Modellerstellung auf Basis zweidimensionaler, histologischer Bilder not-

wendig ist. Die Aufnahme der Schnitte selbst kann dabei mit unterschiedlichen Verfahren erfolgen. Die Aufnahme von Hellfeldmikrographen in Verbindung mit nicht-differentiellen Färbungen ist naheliegend, vor allem wenn bei großen Proben die Mikroskopierzeiten je Schnitt ins Gewicht fallen. Daneben können auch mit konfokalen zweidimensionalen Aufnahmen sehr kontrastreiche Bilder erhalten werden. Nativ dreidimensionale Bildgebungen können nach den angestellten Betrachtungen höchstens komplementär zur Schnittbildgebung eingesetzt beziehungsweise zur Beantwortung weiterer Fragestellungen betrachtet werden.

1.2.2 Histologische Bilddaten sich entwickelnder *Hordeum vulgare* Karyopsen

Im Folgenden soll kurz die Vorbereitung und Digitalisierung von Mikroskopbildern von *Gerstenkaryopsen* vorgestellt werden, und zwar aus zwei Gründen: Zum einen sind diese Daten vom Umfang her wesentlich für die Entwicklung und Validierung der entwickelten Methoden, dem Leser soll deswegen ein Eindruck von der Gestalt des Bildmaterials gegeben werden. Daneben wird die Begründung für die Notwendigkeit der Erstellung von Interindividualmodellen für die Gewebe anhand der gefundenen Varianzen der Phänotypen dargelegt.

Gerstenkaryopsen, als Nussfrucht der Kulturgerstenpflanze *Hordeum vulgare*, reifen in der Ähre nach der Bestäubung innerhalb von rund 30 – 40 Tagen zum reifen Korn als Überdauerungszustand der nachfolgenden Generation respektive als Ernteobjekt. Die Karyopse enthält in Volumenanteilen in erster Linie Speicherstoffe, neben dem eigentlichen Embryo, zur Versorgung des Keimlings. Aus der Pflanzenbiologie ist bekannt [RADCHUK et al., 2009], dass die chemische Zusammensetzung des reifen Kornes in der frühen Entwicklung (3 – 14 DAF) determiniert wird, daneben sind für die Akkumulation der Speicherstoffe relevante Gewebe identifiziert [WEBER et al., 2010], Transport- und Leitgewebe, Speichergewebe usw. . Zur Probengewinnung werden Karyopsen unter standardisierten Bedingungen gezogener Pflanzen einer Varietät zu definierten Zeitpunkten geerntet. Dabei wird nun trotz homogener Wachstumsbedingungen im Phänotyp eine bestimmte Varianz oder Biodiversität gefunden.

Für eine valide interindividuelle Modellierung muss die dabei vorliegende Diversität quantifiziert und die gefundenen Varianzen einer Stichprobensammlung zugrunde gelegt werden. Im vorliegenden Fall wurden dabei die Gewichte der lediglich wenige Millimeter großen Karyopsen an den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten als Kriterium verwendet. Basis sind dabei die für eine wesentlich größere Stichprobe beobachteten Gewichtspersentile, die Modellstichprobe wird dann entsprechend einer Abdeckung des 75%-Perzentils zusammengestellt.

Die eigentliche Präparation und Bildaufnahme erfolgt nun für einzelne Karyopsen. Um einen ausreichenden Kontrast bei der Bildaufnahme zu erhalten, ist Färbung notwendig. Neben klassischen Farbstoffen wie Toluolblau kann mit anorganischen Kontrastmitteln, wie beispielsweise OsO_4 eine sehr gute Penetration der Probe vor dem Schneiden erreicht werden. Das reduzierte Osmium verbleibt nach Waschung der Probe als Kontrastierung in Zellwänden. Um eine Verformung während des Schneidens zu verhindern und die Stabilität der Schnitte sicherzustellen, wird die Probe in Expoxidharz eingebettet. Die eigentliche Zerschneidung der Probe erfolgt in einem Mikrotom. Bei einer für die Bildaufnahme gewählten räumlichen Auflösung etwa von $1.83\mu px$ (bei 5-facher Vergrößerung), Schnittdicke von $3\mu m$ wird ei-

1.2 Technische Problemstellung

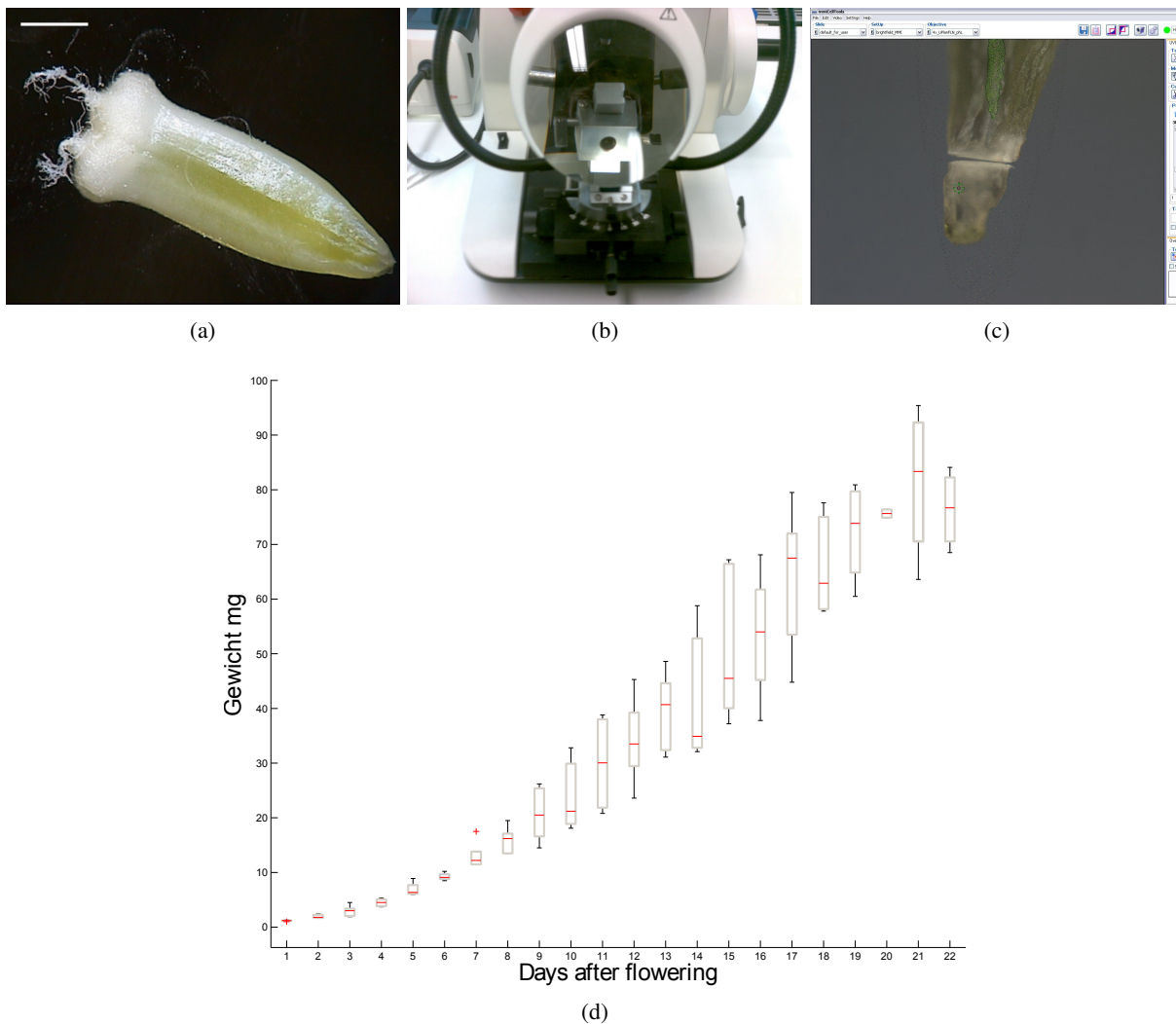


Abbildung 1.2: Probeobjekte und Präparation: 1.2a *Hordeum* Karyopse vor der Präparation (7 DAF, Balken $500\mu m$), 1.2b Ansicht eines Mikrotoms zur Erzeugung von Schnitten im Mikrometerbereich. 1.2c Ablation einer Karyopse (7 DAF) anhand von Modelldaten im Nutzerinterface des Herstellers. 1.2d Gewichtsverteilung von *Hordeum* Karyopsen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten.

ne Isotropie der Volumendaten ausreichend angenähert. Einzelne Einzüge der Mikroskopkamera liefern dann wahlweise Graustufen- oder RGB-Bilder in 12 Bit je Kanal (1200×1600 Bildpunkte). Je nach Größe müssen dabei je Schnitt zwei Einzüge aufgenommen werden.

Aus der Perspektive einer Automatisierung beziehungsweise automatischen Informationsverarbeitung ist, neben großen Datenvolumen, bei Ansicht des Rohbildmaterials festzustellen, dass Qualitätsschwankungen vorliegen. Die bei biologischen, „realen“ Messungen inhärenten Schwankungen werden durch die manuelle Handhabung der Proben verschärft, die Aufnahmen enthalten einen signifikanten Anteil Artefakte und Störungen. Daneben werden durch die langen Mikroskopierzeiten für eine gesamte Probe teilweise stark inhomogene Beleuchtungen beziehungsweise Hintergründe erhalten. Die Bildanteile der

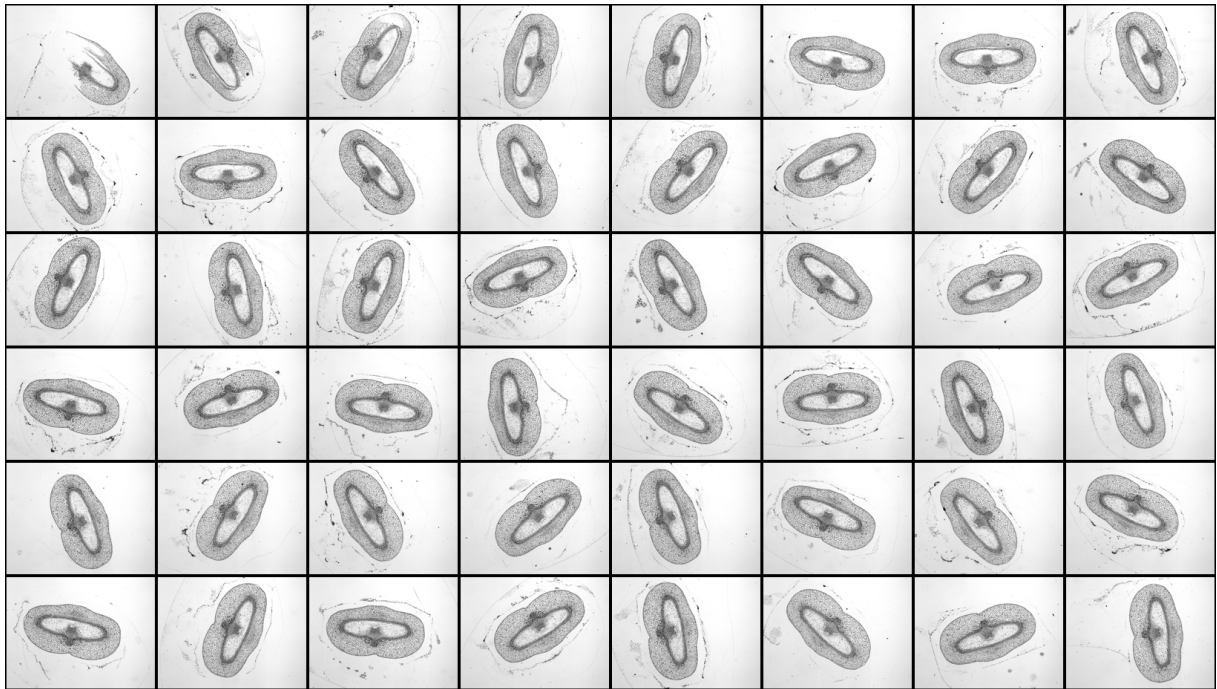


Abbildung 1.3: Rohbildansichten von *Hordeum*-Schnitten, dargestellt sind zeilenweise konsekutive Schnittbilder aus dem Nabenbereich bei $3\mu\text{m}$ Schnittdicke und $1.84\mu\text{m}/\text{px}$ lateraler Auflösung (5 DAF $I_{1456} - I_{1504}$, 12-Bit Graustufen).

eigentlichen Probe zeigen dabei einen hohen Detaillierungsgrad, die Bildfunktionen sind hier keineswegs glatt, sondern texturiert, was für mehrere Problemstellungen relevant ist.

1.3 Zielstellung und Lösungsansatz

Anhand der wissenschaftlichen Fragestellung und dieser initialen Ansicht des Bildmaterials können im Folgenden das weitere Vorgehen und der Ansatz zur Lösung vorgeschlagen werden. Für den Verarbeitungsfluss des Gesamtsystems ergibt sich daher zunächst ein Schema hin zur schrittweisen Abstraktion des Datenmaterials: von den unmittelbaren Rohbildaufnahmen zum rekonstruierten Probeobjekt, zu einem Gewebemodell und aus mehreren Gewebemodellen die Erzeugung eines Durchschnittemodell, das für die gesamte Probeobjektklasse Gültigkeit haben soll. Dabei sind einzelne Schritte nicht nur in Form von „Zwischenergebnissen“ relevant, sondern tragen im Rahmen der wissenschaftlichen Fragestellung wichtige Informationen. So eröffnen beispielsweise rekonstruierte Schnittbildvolumen die Möglichkeit einer virtuellen dreidimensionalen Mikroskopie an der intakten dreidimensionalen Probe in einer Auflösung, die mit anderen Verfahren nicht zu erreichen ist (s. oben). Gleiches gilt für individuelle Gewebemodelle: Die grundlegende Organisation, beispielsweise der Gerstenkaryopsen, ist bekannt, ein dreidimensionales Gewebemodell ermöglicht jedoch wesentlich genauere Ansichten und Untersuchungen. Anhand des jetzigen Stands lassen sich demnach für ein System zur automatischen Erzeugung aus Schnittbilddaten drei wesentliche Leistungsmerkmale bestimmen:

- Bildaufbereitung und Rekonstruktion eines intakten Probeobjektes:

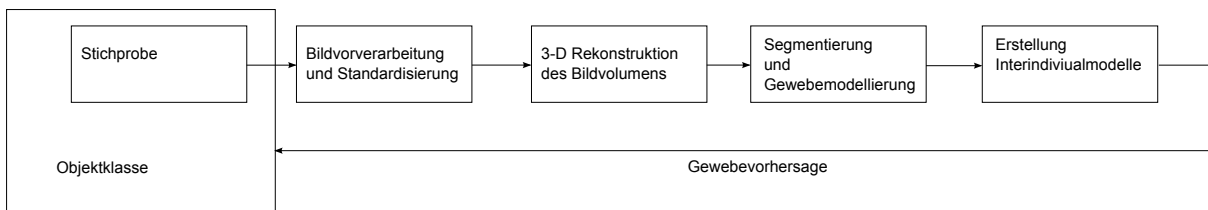


Abbildung 1.4: Übersicht des gesamten Verarbeitungsflusses: Die Modellbildung erfolgt anhand einer Stichprobe. Aus den rekonstruierten Datensätzen werden Gewebemodelle, erstellt die dann in einem interindividuellen Durchschnittsmodell zur statistischen Gewebevorhersage über die Stichprobe hinausgehend verwendet werden.

- Entfernung von Bildstörungen und Artefakten und Herstellung homogener Bildeigenschaften
- Rekonstruktion des vollständigen dreidimensionalen Mikroskopbilds aus (vorverarbeiteten) Einzelschnitten (*Registrierung*)
- Erkennung und Markierung von Gewebetypen im gesamten Volumen:
 - Automatische Markierung vorliegender Gewebe in Schnittbildern
 - Herstellung eines vollständigen, dichten Labelings auf Basis der Volumendaten (*Segmentierung*)
 - Gewebearten sind applikationsspezifisch anpassbar in Form von Referenzdaten
- Fusion individueller Daten auf Basis einzelner Gewebemodelle in ein Interindividualmodell:
 - Integration von multiplen dreidimensionalen Gewebemodellen
 - Herstellung statistischer Interindividualmodelle zur Gewebevorhersage
 - Herstellung der Korrespondenz zu der Geometrie neuer Probeobjekte für LMD-Applikation
 - (Nutzung oder Integration komplementärer Bilddaten)

Anhand der zu erwartenden Datenmengen von bis zu mehreren tausend Schnittbildern je Probeobjekt besteht für alle Teilprobleme die Herausforderung, dass für mögliche Lösungsansätze und -verfahren neben vorteilhaften theoretischen Eigenschaften vor allem eine Einstellung für den tatsächlichen praktischen Einsatz gefunden werden kann, die heißt eine sichere, homogene und reproduzierbare Verarbeitung mehrerer tausend Bilder innerhalb eines Datensatzes geleistet wird. Für eine Vorverarbeitung bedeutet dies in erster Linie die Entfernung von Bildstörungen und Artefakten im aufgenommenen Präparat sowie der Ausgleich von Inhomogenitäten aus der Bildaufnahme selbst. Diese Schritte sind, neben der Relevanz, aus biologischer Sicht „gute“ Mikrographen zu erhalten, besonders für die Wiederherstellung der Korrespondenz der Bildinhalte durch *Registrierung* der Schnitte wichtig: Aufgrund fehlender geometrischer Information muss die Beziehung aus den Bildinhalten bestimmt werden, dass heißt, die vorliegenden Intensitätswerte verglichen werden müssen und im gesamten Datensatz zueinander in Beziehung gesetzt werden.

KAPITEL 1. EINLEITUNG

Hauptaufgabe im Rahmen der angestrebten Automatisierung ist die Erkennung der vorliegenden Gewebetypen. Hier muss biologisches Expertenwissen durch geeignete Algorithmen für eine *Segmentierung* nachgebildet werden, aufgrund der Datengestalt und Anzahl unterschiedlicher Gewebe ist zu erwarten, dass mit „einfachen“ Segmentierungsverfahren keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden können. Mögliche Ansätze müssen sowohl die lokale Gestalt von Zellen und Strukturen berücksichtigen als auch die globale Struktur im Sinne der Organisation der Gewebe in der Probe. Dabei liegt durch die Größe der Datensätze die Notwendigkeit für möglichst laufzeiteffiziente Algorithmen zur Gewebesegmentierung vor.

Dazu wird im zweiten Teil der Arbeit, als zentraler Bestandteil des Systems, ein Modell vorgestellt, das gegenüber bestehenden Ansätzen im Wesentlichen zwei Punkte für die Verarbeitung großer Bildstapel adressiert: *Segmentierungsrobustheit* und *Laufzeitkomplexität*. Ausgehend von überwachten merkmalsbasierten Lernverfahren zur Gewebeerkennung und -segmentierung wird ein alternatives Modell vorgeschlagen, das auf einer konstruktiven Beschreibung der Bildfunktion basiert. Durch diesen Ansatz wird zunächst ein allgemeines Modell zur wechselseitigen *Segmentierung* und *Registrierung* von Bildstapeln entwickelt, welches eine signifikant verbesserte Segmentierungsgenauigkeit und Laufzeitkomplexität gegenüber dem Ausgangspunkt „überwachte Klassifikation“ besitzt. Dabei wird der Bezug zu Referenzdaten durch nicht-parametrische Deformationen beschrieben, deren Entwicklung anhand einer *Energiefunktion* der lokalen Bildinhalte und einer *Modellregularisierung* durch einen Diffusionsansatz gefasst und iterativ gelöst werden können. Der so gewonnene Ansatz kann daneben mit einer merkmalsbasierten Klassifikation kombiniert werden und so die Vorteile der beiden Verfahren vereinen. Durch eine Erweiterung des Algorithmus wird die Verarbeitung nicht-rekonstruierter Eingangsdaten adressiert, und so eine *gleichzeitige* Rekonstruktion und Segmentierung zur Erstellung von Gewebemodellen möglich.

Liegen Gewebemodelle vor, stellt sich die Frage nach einer geeigneten Abbildung der gefundenen strukturellen Varianzen: Dazu wird im letzten Teil der Arbeit eine statistische Beschreibung der dreidimensionalen Gewebeverteilung auf Basis der individuellen Gewebemodelle erstellt, welche eine Vorhersage für unbekannte Probeobjekte und eine quantitative Aussage über die Sicherheit der Gewebevorhersage liefern. Dazu wird zunächst das grundlegende Problem gelöst, dreidimensionale Gewebesegmentierungen der individuellen Proben räumlich in Beziehung zu setzen. Daneben ermöglicht die vorgeschlagene Fassung der morphologischen Diversitäten eine geeignete räumliche Visualisierung zur Beantwortung grundlegender biologischer Fragestellungen.

Die primäre technische Anwendung ist jedoch die Ausgabe von Steuerkoordinaten für die 3-D-LMD. Dazu müssen die Modelldaten einen Bezug zu einer realen, ungesehenen Probe erhalten, von der lediglich zweidimensionale Ansichten vorliegen. Voraussetzung für die Nutzung statistischer Gewebevorhersagen ist also eine finale Geometrierekonstruktion aus 2-D Bilddaten der realen Probe und deren Registrierung mit virtuellen Modelldaten, um damit am Ende der Verarbeitungskette die Brücke zurück „zur Realität“ zu schlagen.

Daneben wurde bereits eine allgemeine, biologische Relevanz von Gewebemodellen genannt. Dies kann beispielsweise durch Darstellung geometrischer, oberflächenbasierter 3-D Darstellung adressiert werden. Die Möglichkeit, Modelldaten um komplementäre, funktionale Bildgebungen zu erweitern, ist vor dem gleichen Hintergrund interessant, eine Datenintegration sollte dann auch automatisch erfolgen. Da-

1.3 Zielstellung und Lösungsansatz

zu werden im letzten Kapitel der Arbeit zwei Ansätze zur Integration unterschiedlicher Bildgebungen untersucht; ein etabliertes Verfahren und ein im Rahmen der Arbeit neu entwickelter Ansatz.

Teil I

Vorverarbeitung und Rekonstruktion

Kapitel 2

Vorverarbeitung und Standardisierung von Mikroskopbildern

Nach der beschriebenen Problemstellung und den gewünschten Eigenschaften einer Lösung für ein System zur automatischen Modellerzeugung aus zweidimensionalen Schnittbilddaten werden im folgenden Kapitel die Eigenschaften des vorliegenden Bildmaterials näher untersucht. Dabei stellt sich für die Entwicklung des Gesamtsystems besonders die Frage nach der Datenqualität beziehungsweise einer notwendigen Vorverarbeitung und Standardisierung der Rohbilder. In den folgenden Abschnitten wird daher auf vorliegende Probleme im Bildmaterial eingegangen, die verwendeten Ansätze sind dabei für unterschiedliche Bildgebungsverfahren und Probeobjekte anwendbar. Durch die Vorverarbeitung sollen insbesondere zwei Ziele adressiert werden:

1. Verbesserung der Bildqualität zur Beantwortung der biologischen Fragestellung.
2. Standardisierung der Datenqualität für die Optimierung der automatischen Verarbeitung beziehungsweise, um diese zu ermöglichen.

Im Bildmaterial liegen unterschiedliche Arten von Störungen vor, die aus Präparation, Probenbehandlung und Bildaufnahme resultieren. Im Folgenden wird zunächst darauf eingegangen, wie Bilder in eine geeignete Form für die Weiterverarbeitung überführt werden können.

Elementar ist dabei eine optimale Quantisierung der Dynamik der Bildintensitäten, die durch eine bimodale Histogrammanpassung erreicht wird. Ein essentieller Schritt ist die Bildkomposition der vollständigen Objektaufnahmen aus Teilbildern. Anhand der *Phasenkorrelation* wird der zunächst unbekannte Versatz aus den Bildinhalten bestimmt und zur korrekten Abbildung der Bildteile benutzt. Eine artefaktfreie Bildkomposition wird anschließend durch eine *Waveletsynthese* aus unterschiedlichen Signalanteilen der Teilbilder erzielt.

Die Trennung von Bildhintergrund gegenüber dem eigentlichen Probeobjekt stellt vor allem bezüglich Punkt 2 einen wichtigen Schritt für die Lösung der Probleme *Rekonstruktion* und *Segmentierung* dar. Hier wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Eine Segmentierung mittels *morphologischer Operatoren* und vorhergehender Kantendetektion [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008] und durch *aktive Konturmodelle* in einem variationellen Ansatz [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2009]. Dabei wird ein

Mehrskalenansatz eingesetzt, um die nötige Laufzeiteffizienz des Verfahrens im Vergleich zum filterbasierten Ansatz zu erhalten.

Allgemein bestehen für alle Verarbeitungsschritte hohe Anforderungen an die Verarbeitungsgeschwindigkeit, da auch bei paralleler Verarbeitung die typischen Datensatzgrößen im Gigabytebereich zu inakzeptablen Laufzeiten führen können. Durch die intrinsische Abhängigkeit der Daten liegt darüber hinaus besonderes Augenmerk auf der Sicherheit beziehungsweise der Robustheit der Verarbeitungsschritte: Während in Auswertungssystemen Fehlerraten von 1% meist als akzeptabel betrachtet werden können, werden in der Modellerzeugung Fehler in Einzelbildern in die dreidimensionalen Daten propagiert, so dass einzelne „schlechte“ Präparate oder Aufnahmen in einem Datensatz mehrerer tausend Bilder bereits zu einer stark reduzierten Qualität des Gesamtergebnisses führen können. Durch die Standardisierung der Objektgeometrien wird abschließend dann bereits auf das Problem der dreidimensionalen *Rekonstruktion* und der *Gewebesegmentierung* übergeleitet, welches Gegenstand der darauf folgenden Kapitel sein wird.

2.1 Abbildung und Ausgleich von *RGB*-Bildern

Beim Einsatz bildgebender Verfahren zur Beantwortung einer wissenschaftlichen Fragestellung sollte versucht werden, ein maximal vollständiges Abbild der experimentellen Realität zu erhalten, welches im Rahmen des Bildgebungsverfahrens möglich ist. Da in dieser Arbeit zu einem großen Teil Hellfeld-Mikroskopiedaten behandelt werden, werden im Folgenden Bildaufnahmen sichtbaren Lichts betrachtet. Wird also elektromagnetische Strahlung zwischen 380 und 780 *nm* Wellenlänge aufgenommen, so würde eine ideale „realitätsgetreue“ Abbildung aus einer beliebig detaillierten räumlichen Verteilung spektraler Leistungsdichten über einem kontinuierlichen Wellenlängenbereich der vom aufgenommenen Objekt ausgehenden Strahldichte oder *Radianz* bestehen.

Diese Abbildung ist natürlich nicht verfügbar: Räumliche, optische und spektrale Auflösung sind begrenzt und das „Realitätsabbild“ besteht tatsächlich aus einer begrenzten Zahl spektraler Bänder, deren Strahldichte höchstens innerhalb der *Abbe'schen* Auflösungsgrenze räumlich abgetastet und in diskreten Stufen quantisiert wird. In üblichen Systemen verfügbare Sensoren, etwa CMOS- oder CCD-Wandler des *Bayer*-Typs, nehmen *RGB*-Bilder auf, in denen die spektrale Zusammensetzung des Lichtes, welche beim Menschen die Farbempfindung hervorruft, in drei Kanälen für *rote*, *grüne* und *blaue* Anteile approximiert ist (Abb. 2.1). Aus Sicht des Experimentators ist es sinnvoll, daher zunächst diese schon stark verkürzende Repräsentation zu verwenden, und Farbbilder aufzunehmen unabhängig davon, ob das betrachtete Objekt und dessen Digitalisierung innerhalb der spektralen Zusammensetzung tatsächlich relevante Informationen birgt.

Der Prozess der Digitalisierung der gefundenen Strahlung selbst, als ein „Abbilden“ auf eine digitale Speicherungsform, ist variabel: zum einen in der numerischen Beschreibung der physikalischen Beobachtung, zum anderen durch Störungen und Schwankungen im bildgebenden System. Der diskrete Dynamikbereich, auf die ein Sensor abbildet, muss daher eine optimale Darstellung im betrachteten Wellenlängenbereich liefern, vor allem, um die Homogenität zwischen Daten, die mit identischen Parametern erfasst werden sollen, für die weitere Verarbeitung sicherzustellen. In der Bildvorverarbeitung sollte da-

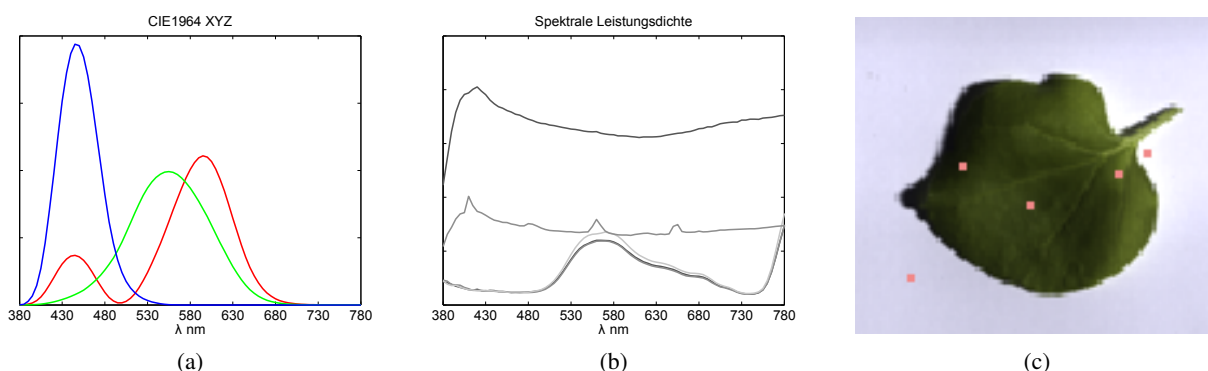


Abbildung 2.1: Phänomen *Farbsehen*: Spektrale Leistungsdichten rufen bei Menschen Farbempfindungen hervor. Die *CIE-Normwertkurven*¹ 2.1a sind Referenz für drei Grundfarben, anhand derer die tatsächliche spektrale Zusammensetzung 2.1b approximiert wird. Hier dargestellt durch einige Bildpunktspektren einer Hyperspektralaufnahme eines Blattes mit 160 Spektralbändern und das anhand der CIE-Norm daraus errechnete dreikanalige RGB-Farbbild 2.1c.

her untersucht werden, ob und gegebenenfalls wie eine Korrektur der aufgenommenen Bildintensitäten erfolgen kann.

2.1.1 Farbraumanalyse

Ob Farbinformationen für die weitere Verarbeitung relevant sind, ist stark applikationspezifisch. Werden in der Biologie etwa differentielle Färbungen zur Präparation verwendet, sind Farbbilder in der Verarbeitung natürlich zwingend. In nicht-differentiellen Färbungen oder Kontrastierung von Präparaten muss *Farbe* nicht notwendigerweise ein Informationsträger sein, sondern lediglich die über alle Bänder aggregierte Strahlungsintensität im entsprechenden einkanaligen Graustufenbild.

Allgemein stellt die *Farbbildverarbeitung* die Herausforderung, dass ihre Grundelemente vektorwertig sind und daher keine Ordnungsrelation besitzen. Da das *Mehr* oder *Weniger* jedoch die Grundlage vieler Fragestellungen und algorithmischer Ansätze ist, muss die mathematische Fassung vieler Probleme auf zusätzliche Konstrukte, mit denen eine Ordnungsrelation hergestellt wird, zurückgreifen. Für vektor- oder auch für tensorwertige Bilder sind solche Funktionen vorgeschlagen worden, um Operationen, die einen Ordnungskegel benötigen, zu realisieren [STRICKER und ORENGO, 1995, WEICKERT und HAGEN, 2006]. Diese sind jedoch im Allgemeinen applikationsspezifisch.

Sind Farbinformationen irrelevant, sind daher skalare Intensitäts- oder Grauwertdarstellungen für eine weitere Verarbeitung vorteilhaft. Daher sollten im Sinne einer objektiven und unvoreingenommenen Herangehensweise zunächst Farbbilder aufgenommen und dann untersucht werden, ob und gegebenenfalls in welchem Umfang die spektrale Zusammensetzung Information im Rahmen der Fragestellung trägt. Anhand der Aufnahmen von seriellen Dünnschnitten sich entwickelnder *Hordeum vulgare* Karyopsen soll im Folgenden beispielhaft untersucht werden, inwieweit der sogenannte *Farbraum* informativ

¹Commission Internationale de l'Éclairage, internationaler Standard für *Colormetrie* und Farbdarstellung, <http://www.cie.co.at/>, Stand Aug. 2010

ist, und wie gegebenenfalls eine sinnvolle Transformation in eine skalare Bildfunktion erfolgen kann.

Die Gesamtheit der in den Abtastpunkten des Bildbereichs Ω vorliegenden Farbwerte, etwa in RGB-Repräsentation $I : \Omega \mapsto \mathbb{R}^3$, besitzt, unabhängig von dem räumlichen Zusammenhang der Abtastpunkte, eine Verteilung im Farbraum. Es existiert also eine multivariate Dichte, die für grundlegende Aussagen über *Farbinformation* betrachtet werden muss: Eine starke Korrelation der einzelnen Farbkanäle deutet grundlegend darauf hin, dass ein geringer Informationsgehalt vorliegt und eine Transformation des Bildes auf eine eindimensionale Darstellung zu einem geringen Informationsverlust führt.

Abbildung 2.2 zeigt die Verteilung der Bildpunkte einer *Hordeum* Aufnahme im RGB-Farbraum. Hier wird zunächst visuell erkennbar, dass die Farbkanäle im gesamten Intervall stark korreliert sind, und somit lediglich die Gesamtintensität der aufgenommenen Strahlung informativ ist. Entsprechend wird eine hohe Korrelation als linearer Korrelationskoeffizient von mindestens $r_{ij} \geq 0.985$ zwischen den Punkten in den einzelnen Farbkanälen i, j dieses Bildes erhalten.

Eine Transformation in eine skalares (Graustufen-)Bild für die weitere Verarbeitung ist damit mit einem geringen Informationsverlust verbunden und wünschenswert. Allgemein ist eine solche Abbildung als Projektion der Punkte aus \mathbb{R}^3 auf eine Gerade nicht eindeutig bestimmt. Beispielsweise kann eine optimale Darstellung durch eine abbildende Gerade mit minimalem mittlerem Abstand zu den RGB-Werten erhalten werden, wie in Abbildung 2.2b dargestellt. Hinsichtlich der Erhaltung der Varianz ist diese Abbildung günstig, jedoch für jedes einzelne Bild spezifisch.

Die Transformation der RGB-Darstellung in den sogenannten *YUV* Farbraum realisiert eine Trennung der Bildanteile in Kanäle für je die Intensitäts- oder Helligkeitskomponente und der Farbinformation in die sogenannten *Luminanz*- und *Chrominanz*-Anteile [VALENSI, 1958]². Die RGB- und YAB-Farbraumdarstellung sind theoretisch durch lineare Abbildung ineinander überführbar. Tatsächlich liefern heute digitale Sensoren jedoch keine lineare Quantisierung der vorliegenden Leuchtdichten, sondern nutzen zur Dynamikerhöhung eine exponentielle Intensitätsskala, die zunächst ausgeglichen werden muss [POYNTON, 2003, JÄHNE, 2005]; korrekt wird der Helligkeitswert daher mit *Luma* Y' und die Farbinformation mit C_B, C_R bezeichnet. Für Y' , als Linearkombination der RGB-Werte, und einer differentiellen Farbrepräsentation aus den drei RGB-Kanälen in C_B, C_R ergibt sich für die Abbildung zwischen beiden Räumen

$$\begin{pmatrix} Y' \\ C_B \\ C_R \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1.0000 & 0.9560 & 0.6210 \\ 1.0000 & -0.2720 & -0.6470 \\ 1.0000 & -1.1060 & 1.7030 \end{pmatrix} := \begin{pmatrix} R \\ G \\ B \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

beziehungsweise $I^{RGB}T^{-1} = I^{Y'C_BC_R}$ für die inverse Abbildung. Die *Lumakomponente*

$$Y' := 0.2989R + 0.5870G + 0.1140B \quad (2.2)$$

als approximierte Luminanz liefert dann die Projektion der RGB-Darstellung auf ein skalares Graustufenbild. Der Informationsverlust bei der Abbildung auf Y' ist meist nicht minimal, wie in Abbildung

²VALENSI hat mit der Erfindung eines mit beiden Darstellungen kompatiblen Signals wahrscheinlich maßgeblich die Verbreitung des Farbfernsehens gegenüber dem Schwarzweißsehen befördert.

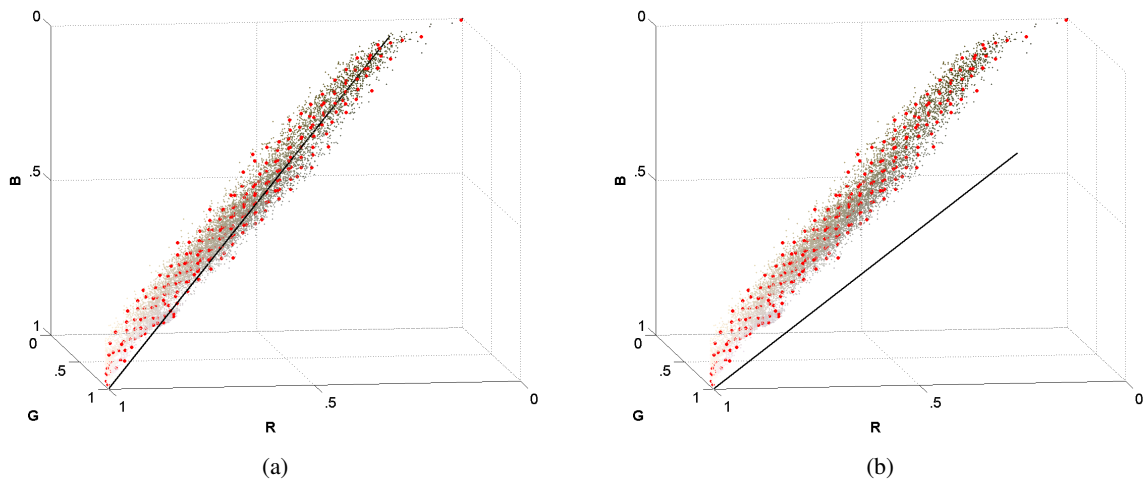


Abbildung 2.2: Verteilung der Bildpunkte im RGB-Farbraum: 2.2a und 2.2b zeigen Farbe und Position der Bildpunkte einer Hordeum-Aufnahme im RGB-Raum. 2.2a *optimale* Abbildung, 2.2b Abbildung auf *Luma*-Komponente der YAB-Repräsentation. Zur Verdeutlichung der Dichten sind Hilfspunkte mit gleichabständiger Varianz dargestellt.

2.2 dargestellt. Durch eine solche konstante Transformation wird jedoch die Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Bildern gewährleistet und zudem eine der menschlichen Wahrnehmung geeignete Darstellung erhalten.

2.1.2 Intensitätsausgleich

Die in digitalen Bildern durch den Sensor auf die Abtastpunkte integrierten Quantitäten, etwa von Quanten elektromagnetischer Strahlung bei der Lichtmikroskopie oder Radiogrammen, oder auch indirekt ermittelte Größen wie etwa bei Magnetresonanztomographen oder Massenspektrometriebildern (s. Kapitel 7) besitzen einen bestimmten Dynamikumfang. Auch bei optimalen Parametern des bildgebenden Systems, von Optiken, Belichtungs- und Integrationszeiten des Sensors usw., besteht generell die Möglichkeit, dass der dynamische Bereich der relevanten Messwerte den dynamischen Bereich der Digitalisierung nicht voll ausschöpft. Bei einer gegebenen Anzahl Quantisierungsstufen, etwa 12 oder 16 Bit, steht dann für die eigentliche Bildinformation eine wesentlich reduzierte Auflösung zur Verfügung. Für eine maschinelle Weiterverarbeitung, die mit dem technisch gegebenen Quantisierungsintervall erfolgt, sind dann große Bereiche der Auflösung bestenfalls uninformativ beziehungsweise nachteilig, wenn zusätzlich zwischen einzelnen Bildern Schwankungen existieren. Wünschenswert sind daher Operatoren, die Intensitäten so transformieren, dass der gesamte dynamische Bereich der digitalen Bildrepräsentation ausgenutzt wird.

Interessiert zunächst nur die Grauwertedynamik selbst, ist die Transformation, unabhängig von der Position und Nachbarschaft des Bildpunktes, ein *homogener Punktoperator*

$$I^*(\mathbf{x}) = r^* = T(r) = T(I(\mathbf{x})). \quad (2.3)$$

Solche homogenen Transformationen sind allgemein monoton über dem Grauwertbereich, z.B. lineare oder Potenzfunktionen (als sogenannte γ -Korrektur), aber nicht notwendigerweise umkehrbar. Im Diskreten wird durch Darstellung der Transformationsfunktion, der sogenannten *Transformationskennlinie*, über dem Bildhistogramm des Bildes das Verhalten der entsprechenden Punktoperation beschrieben.

Soll der zur Verfügung stehende Dynamikbereich nicht nur voll ausgeschöpft, wie etwa bei einer Histogrammspreizung mit linearer oder logarithmischer Transformationskennlinie, sondern *optimal* zur Quantisierung ausgenutzt werden, müssen die Häufigkeiten der auftretenden Grauwerte in der Transformationsfunktion berücksichtigt werden – das heißt, Graustufen, die entsprechend große Bereiche im Bild ausmachen, aber lediglich eine geringe Dynamik aufweisen, werden gespreizt und umgekehrt gestaucht. Betrachtet man dazu zunächst kontinuierliche Grauwerte $r \in [0, 1]$ als Zufallsvariable mit der Wahrscheinlichkeitsdichte $p_r(r)$ ihres Auftretens im Bild und setzt die kumulierte Verteilung selbst als Transformationsfunktion

$$r^* = T(r) = \int_0^r p_r(\omega) d\omega \quad (2.4)$$

wird für die Dichte der transformierten Grauwerte $p_{r^*} = p_r |dr/dr^*|$ gerade eine Gleichverteilung erhalten, das Intervall $[0, 1]$ wird also optimal zur Quantisierung genutzt [GONZALEZ und WOODS, 2007]. Für diskrete Grauwerte $r \in \{0, \dots, Q\}$ wird die Transformation direkt aus dem kumulativen Histogramm der Grauwerte erhalten

$$p_r(r_k) = \frac{n_k}{n} \quad k = 1, \dots, Q \quad (2.5)$$

$$r_k^* = T(r_k) = \sum_{j=0}^k p_r(r_j). \quad (2.6)$$

Dieser diskrete Gegenpart der Abbildung aus Gleichung 2.4 erhält nun zunächst nicht mehr die Eigenschaft der Gleichverteilung, da durch die Quantisierung Grauwerte bei steilen Steigungen der Transformationskennlinie nicht entsprechend separiert werden können. Betrachtet man jedoch deren kumulierte Verteilung, so wird mit der gegebenen Auflösung die Identitätsfunktion als kumulative Verteilung approximiert, das Histogramm ist tatsächlich ausgeglichen, das heißt, eine *Histogrammäquilisation* erreicht. Durch Erhöhung der Quantisierungsauflösung sinkt der mittlere Fehler

$$\sum_k |c(T(r_k)) - c_0| \stackrel{Q \rightarrow \infty}{\approx} 0 \quad (2.7)$$

entsprechend asymptotisch.

Die Methode der Histogrammäquilisation kann prinzipiell erweitert werden, so dass durch die Transformation Grauwerte nicht nur eine gleichverteilte, sondern eine beliebige vorgegebene Dichtefunktion annähern: Für $r, r^* \in [0, 1]$ mit der Dichte p_r und der gewünschten Dichte p_{r^*} des transformierten Bildes ist

$$H(r^*) = \int_0^{r^*} p_{r^*}(\omega) d\omega \quad r^* = \int_0^r p_r(\omega) d\omega = T(r), \quad (2.8)$$

also die Transformation, die die gewünschte Verteilung in eine Gleichverteilte transformiert. Dann wird durch die inverse Transformation H^{-1} der gleichverteilt transformierten Grauwerte

$$r^* = H^{-1}(T(r)) \quad (2.9)$$

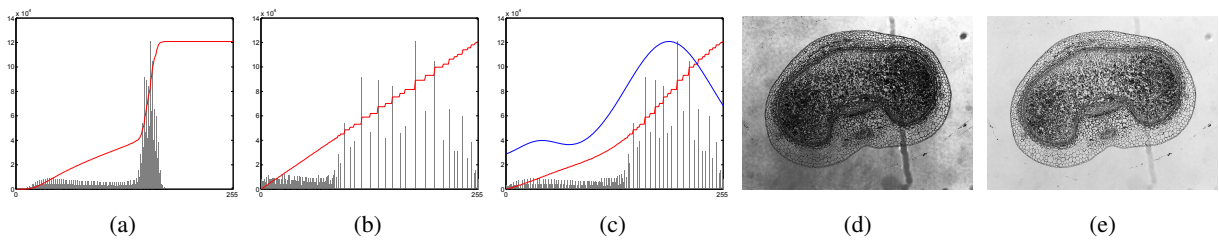


Abbildung 2.3: Histogrammanpassung zur Verbesserung der Grauwertdynamiken: 2.3a Histogramm und kumulative Verteilung des Eingangsbildes (*Hordeum vulgare* Dünnschnitt), 2.3b die Histogrammequalisation liefert zwar ein der Gleichverteilung angenähertes Histogramm bzw. eine identische kumulative Verteilung, 2.3c durch die „Zweiteilung“ der Bildanteile in Vorder- und Hintergrund wird durch Histogrammanpassung auf eine bimodale Gaußverteilung (ohne Ordinatenbeschr., $\mu_1 = 0.15, \sigma_1 = 0.05, \mu_2 = 0.75, \sigma_2 = .05, c_1 = 0.58, c_2 = 0.41$) ein besseres Ergebnis erzielt (2.3d vs. 2.3e).

gerade die Dichte $p_{r,*}$ erhalten. Die diskrete Entsprechung gleicht dann Gleichung 2.6, solange die H invertierbar, also eine kumulierte Verteilung ist.

Sind mögliche Tendenzen der Grauwerte *a priori* bekannt, werden mit einem spezifischen Ansatz für eine solche *Histogrammanpassung* bessere Ergebnisse erzielt (vgl. [WONGSRITONG et al., 1998]). Liegen beispielsweise zwei distinkte Objekte unterschiedlicher Reflektion oder Vorder- und Hintergrund im Bild vor, liefert die Abbildung hin auf eine Gleichverteilung dann unzufriedenstellende Ergebnisse. Durch Annahme einer entsprechend multimodalen Verteilung, beispielsweise einer bimodalen gaußschen Dichtefunktion

$$f(r; \Phi) := \sum_{i=1}^2 P_i p_i(r) = \sum_{i=1}^2 c_i \frac{1}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{r - \mu_i}{\sigma_i} \right)^2} \quad (2.10)$$

zur Histogrammanpassung, wird eine verbesserte Transformation der Grauwerte hin auf eine optimale Dynamik in *jeweils* beiden Bereichen erhalten.

Abbildung 2.3 zeigt die Histogrammanpassung anhand der Transformation eines Durchlichtmikrographen eines Gerstendünnschnittes mit einem bimodalen Ansatz. Während die Histogrammequalisation zwar eine angenäherte Gleichverteilung der Grauwerte liefert (2.3b), werden durch die Histogrammanpassung mittels einer bimodalen Gaußverteilung (2.3c) die tatsächlichen Gegebenheiten im aufgenommenen Präparat besser abgebildet (2.3d vs. 2.3e).

Homogene Punktoperatoren können effizient durch *Lookup-Tabellen* (LUT) implementiert werden:

Durch die Unabhängigkeit der Abbildung von der jeweiligen Bildposition wird die Transformation für alle Quantisierungsstufen im Vorhinein berechnet, die entsprechende Abbildung besteht dann nur noch aus dem *Nachschlagen* des jeweiligen Grauwertes. Durch eine LUT-Anwendung kann dann auch eine kompakte Möglichkeit zu einer optimalen *Unterabtastung* des dynamischen Bereiches realisiert werden: So können beispielsweise proprietäre Bildformate von Bildgebungssystemen (etwa 12-Bit Bilder aus Mikroskop-Software) in eine (gängigere) optimale 8-Bit Quantisierung transformiert werden.

2.2 Bildkomposition aus Teilbildern

Bedingt durch die physikalischen Voraussetzungen eines bildgebenden Verfahrens oder Eigenschaften des spezifischen Sensors, kann eine räumliche oder optische Auflösung des Bildes nicht immer mittels eines einzelnen Einzugs des Sensors erhalten werden. Bei durchlichtmikroskopischen Aufnahmen können, bei gegebener Vergrößerung und Öffnungswinkel, entsprechend dem gewünschten Abstand der Bildgitterpunkte und Auflösung des Bildwandlers, Objekte nicht mehr vollständig mit einem einzelnen Einzug aufgenommen werden: Bei der Aufnahme histologischer Schnitte von *Hordeum* Karyopsen zu späteren Entwicklungszeitpunkten (> 10 DAF) werden nicht mehr die vollständigen Querschnitte bei einer Auflösung von $1.83\mu\text{m}$ mit einem 1600×1200 Bildpunkte großen Einzug der Mikroskopkamera erfasst.

Das Gesamtbild eines Querschnitts muss in diesem Fall aus Teilbildern unterschiedlicher Aufnahmepositionen zusammengesetzt werden. Für die Komposition eines Gesamtbildes ist daher zunächst die Kenntnis der Aufnahmepositionen der Teilbilder und deren Abbildung in das Koordinatensystem des Gesamtbildes nötig. Im Falle histologischer Schnittbilder werden die Querschnitte auf dem Objektträger manuell in den Bildbereich gebracht und fotografiert. Während eine manuelle Erfassung der Bewegung des Mikroskopisches zwischen den Aufnahmen zu ungenau und zu zeitaufwendig ist, andererseits genaue Positionsangaben wie etwa bei motorisierten Tischen für die Bildrekonstruktion nötig sind, müssen die Aufnahmeposition bzw. -verschiebungen aus den Bildinhalten selbst errechnet werden. Voraussetzung dafür ist, dass manuelle Aufnahmen mit einem Überlapp aufgenommen werden.

Für die Erstellung solcher *Mosaikbilder* lautet dann die algorithmische Problemstellung, eine Koordinatentransformation zu finden, die gemeinsame Bildinhalte der Teilbilder zur Deckung bringt, um anschließend Teilbilder in einen gemeinsamen Bildbereich abzubilden und Bildintensitäten zusammenzuführen. Da eine Diskrepanz zwischen gewünschter Auflösung und Limitationen der Bildgebung vielen Anwendungen beinahe inhärent ist, gehört die Erstellung von Mosaikbildern zu einem prominenten Problem und wurde lange vor der Verfügbarkeit digitaler Verarbeitung adressiert (vgl. [WOLF, 1983]). Mit der Verfügbarkeit digitaler Bilder und deren Verarbeitung sind unterschiedliche Anwendungen und Algorithmen aus dem Problem der Bildkachelung hervorgegangen, zur Abgrenzung der Methodik seien hier neben eben der Bildsynthese aus Einzelbildern Methoden zur Bewegungsschätzung, Geometrierekonstruktion usw. aus Bildfolgen erwähnt.

Die Formulierung des Mosaikproblems gliedert sich in drei Komponenten:

- Bestimmung der Transformationsfunktion
- Finden der Transformationsparameter
- Komposition des neuen Gesamtbilds.

Beim vorliegenden Problem bestehen Transformationen, unter der Annahme, dass optische Abbildungsfehler vernachlässigbar sind, lediglich aus Translationen $\mathbf{t} \in \mathbb{R}^2$ in der Ebene das heißt ein Bildpunkt $\mathbf{x} \in \Omega \subset \mathbb{R}^2$ wird gemäß

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} t_1 \\ t_2 \end{pmatrix} \quad (2.11)$$

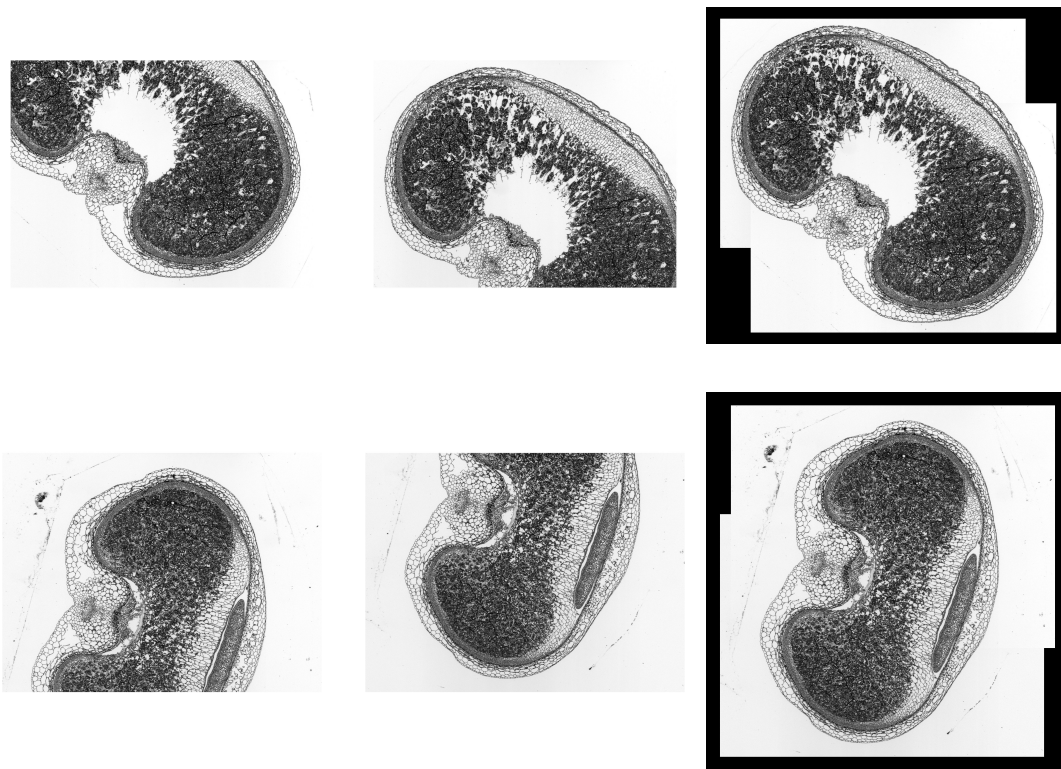


Abbildung 2.4: Komposition von Mosaikbildern aus überlappenden Teilbildern: zwei typische histologische Aufnahmen, bestehend aus zwei Teilbildern und entsprechendem Mosaikbilder.

abgebildet.

Zur Schätzung der Transformationsparameter, d.h. zur *Registrierung* der Teilbilder, schlagen ZITOVÁ *et al.* [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003] eine Klassifizierung von Algorithmen in *flächen-* oder *merkmalsbasierte* Ansätze vor: Verfahren, die auf dem Vergleich zwei- oder mehrdimensionaler *Bildintensitäten* basieren, gegenüber Ansätzen mittels Erkennung von eindeutigen Objekten oder *Landmarken* zur Bestimmung einer Korrespondenz. Landmarkenbasierte Verfahren besitzen den Vorteil geringer rechnerischer Komplexität bezüglich der Lösbarkeit des Korrespondenzproblems zwischen den beiden Punktmengen der Landmarken, die Bestimmung eindeutiger Kontrollpunkte ist jedoch besonders bei biomedizinischen Bildern aufwendig bzw. fehleranfällig. Intensitätsbasierte Verfahren bieten hier größere Robustheit, da die direkte Korrespondenz der Bildinhalte maximiert wird.

2.2.1 Phasenkorrelation und *Shift-Peak* Findung

Bildtransformationen im Ortsraum besitzen ihr entsprechendes Gegenstück im Frequenzraum. Das Registrierungsproblem kann dementsprechend für die Fourierdarstellung $\mathbf{F}_{I_1}(\mathbf{u}), \mathbf{F}_{I_2}(\mathbf{u})$ von Bildern $I_1(\mathbf{x}), I_2(\mathbf{x}): \Omega \subset \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}$ formuliert werden [KUGLIN und HINES, 1975, DE CASTRO und MORANDI, 1987].

Bestehen Transformationen aus Translationen in der Bildebene, kann der *shift* $(\Delta x, \Delta y)$ aus der Phasenkorrelation im Frequenzraum (*phase correlation method*, PCM) erhalten werden: Nach dem Verschie-

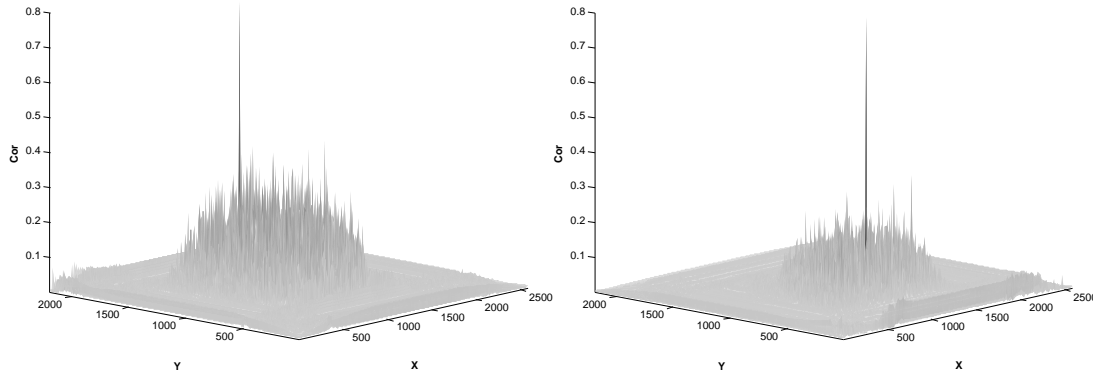


Abbildung 2.5: Phasenkorrelation zur Bestimmung des *shifts* zwischen zwei Teilbildern aus Abbildung 2.4: Das normalisierte Kreuzleistungsspektrum nimmt sein Maximum bei $(\Delta x, \Delta y)$ an. Durch die Selbstähnlichkeit (d.h. *Textur*) der Bilder liegt bei weiteren Verschiebungen eine relativ hohe Phasenkorrelation vor.

Die Verschiebung im Ortsraum entspricht einer (zirkulären) Verschiebung im Ortsraum der $m \times n$ großen Bilder

$$I_1(x, y) = I_2((x - \Delta x) \bmod m, (y - \Delta y) \bmod n) \quad (2.12)$$

einem Phasenfaktor im Frequenzraum

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_{I_1}(u, v) &= \mathbf{F}_{I_2}(u, v) e^{-2\pi i \left(\frac{u\Delta x}{M} + \frac{v\Delta y}{n} \right)} \\ \frac{\mathbf{F}_{I_1}(u, v)}{\mathbf{F}_{I_2}(u, v)} &= e^{-2\pi i \left(\frac{u\Delta x}{M} + \frac{v\Delta y}{n} \right)}. \end{aligned} \quad (2.13)$$

Die Verschiebung im Ortsraum ergibt sich aus der inversen Fouriertransformation des normalisierten Kreuzleistungsspektrums von $\mathbf{F}_{I_1}(u, v)$ und $\mathbf{F}_{I_2}(u, v)$, d.h. der Korrelation der Bilder mit $|F| = 1$

$$\begin{aligned} \frac{\mathbf{F}_{I_1}(u, v) * \mathbf{F}_{I_2}(u, v)}{|\mathbf{F}_{I_1}(u, v) * \mathbf{F}_{I_2}(u, v)|} &= e^{-2\pi i \left(\frac{u\Delta x}{M} + \frac{v\Delta y}{n} \right)} \\ \mathbf{F}^{-1} \left(\frac{\mathbf{F}_{I_1}(u, v) * \mathbf{F}_{I_2}(u, v)}{|\mathbf{F}_{I_1}(u, v) * \mathbf{F}_{I_2}(u, v)|} \right) &= \mathbf{F}^{-1} \left(e^{-2\pi i \left(\frac{u\Delta x}{M} + \frac{v\Delta y}{n} \right)} \right) \\ &= \delta(\Delta x, \Delta y) \end{aligned} \quad (2.14)$$

als *Dirac* δ -Verteilung um $(\Delta x, \Delta y)$. In der Anwendung treten finite Transformationen an die Stelle der kontinuierlichen Transformationen, und durch die inverse Fouriertransformation wird ein Einheitsimpuls an $(\Delta x, \Delta y)$ erhalten, so dass die Transformationsparameter direkt durch

$$(\Delta x, \Delta y) = \operatorname{argmax}_{x, y} \mathbf{F}^{-1} \left(\frac{\mathbf{F}_{I_1}(u, v) \mathbf{F}_{I_2}(u, v)}{|\mathbf{F}_{I_1}(u, v) * \mathbf{F}_{I_2}(u, v)|} \right) \quad (2.15)$$

erhalten werden.

2.2.2 Bildfusion und Komposition von Mikroskopbildern mittels PCM

In der Praxis ist I_1 nicht, wie oben angenommen, eine zirkulär verschobene Kopie von I_2 , sondern eine lineare Verschiebung eines Teilbildes, d.h. des gemeinsamen Bildbereiches beider Bilder. In diesen

Fällen erhält die Oberfläche der Korrelationsfunktion nicht mehr die Form einer Deltafunktion. Durch Einbettung in einen uniformen, flachen Hintergrund so, dass alle Bilddetails vom Rand des Bildbereiches entfernt liegen, gilt Gleichung 2.15 weiterhin und der *shift* zwischen überlappenden Mikroskopbildern aus dem Maximum der Korrelationsfunktion erhalten wird.

Die Bestimmung der geometrischen Korrespondenz von Bildpunkten liefert zunächst nur die grundlegenden Informationen für die Rekonstruktion des Gesamtbildes. Für die Zusammenführung der Bildinhalte in das Gesamtbild müssen Intensitäten aus den jeweiligen Teilbildern auf einen neuen Grauwert abgebildet werden. Radiometrische Varianzen aus der Bildgebung führen zu Inkonsistenzen wie etwa Rauschen oder inhomogenen Bildhintergründen und bei konstanter Superposition der Grauwerte zu Artefakten wie Kanten und unscharfen Regionen.

Adaptive Intensitätsabbildungen durch sogenanntes *blending* der Bildintensitäten adressieren eine artefaktfreie Zusammenführung in das Mosaikbild, das heißt, für überlappende Regionen ω (s. Abb. 2.6) muss eine Abbildung $B : \omega \subset \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}$ zur gewichteten Komposition der Grauwerte im Mosaikbild M definiert werden

$$M(\mathbf{x}) := B(x')I_1(\mathbf{x}) + (1 - B(x'))I_2(\mathbf{x} + \Delta\mathbf{x}). \quad (2.16)$$

Abhängig vom Bildbereich von B teilen GRACIAS et al. [GRACIAS et al., 2009] *blending* Algorithmen in zwei Gruppen ein: *transition smoothing* für Funktionen mit kontinuierlichem, und *optimal seam finding* mit binärem Bildbereich. Während *optimal seam finding* die Annahme eindeutiger Objekte oder Gruppierung der Bildinhalte zur Basis der Bildzusammenführung macht, können *transition-smoothing* basierte Ansätze diesbezüglich als *unvoreingenommen* betrachtet werden, da lediglich die geometrischen Eigenschaften der Bildgebung als Grundlage dienen und damit für die Verarbeitung und Analyse von biomedizinischen Bilddaten geeigneter sind.

BURT und ADELSON fordern in ihrer initialen Arbeit zu *transition smoothing* [BURT und ADELSON, 1983] unterschiedliche Übergangsfunktionen für unterschiedliche Frequenzanteile der Bilder. Teilbilder werden dazu zunächst in Bandpass gefilterte Komponentenbilder zerlegt und Bildkomponenten der jeweiligen Frequenzen im Ortsraum zu einem Mosaikbild zusammengeführt, wobei die Übergangsfunktion proportional der jeweiligen Frequenz parametrisiert wird. Der Übergang wird so an die Skale entsprechender Bildinhalte angepasst; grobe Strukturen können mit Transitionsfunktionen mit großem Support ineinander überführt werden, ohne dass Details und kleinere Strukturen ungenau dargestellt werden.

Der von BURT und ADELSON zunächst aus der Anschauung im Ortsraum entwickelte Ansatz, Bilder anhand von Subbändern oder Skalen zu verarbeiten, ist mit der *Wavelettheorie* und *Wavelettransformation* in der Signalverarbeitung formalisiert worden. Die *Waveletdekomposition*, basierend auf der Darstellung eines Signals durch skalierte und translatierte Versionen einer Basisfunktion mit endlichem Träger, hat durch die Einführung geeigneter Waveletfunktionen [DAUBECHIES, 1988] und Entwicklung der *schnellen Wavelettransformation* (FWT) zur diskreten Multiskalenanalyse durch MEYER [MEYER, 1992] und DAUBECHIES und COHEN [COHEN et al., 1993] [DAUBECHIES und SWELDENS, 1998] in der Signalverarbeitung große Bedeutung erlangt.³

³Für eine Einführung in die Signalverarbeitung mit Wavelets sei der Leser an dieser Stelle zunächst an die Referenz [BERGH et al., 2007] bzw. an Anhang A verwiesen. Die Waveletzerlegung wird in Abschnitt 4.1.3 erneut im Kontext der Bildsegmentierung aufgegriffen.

Der Motivation von BURT und ADELSON folgend, ist der Multiskalenansatz auf Basis von Waveletterlegung von HSU und WU [HSU und WU, 1996] für das *blending* von Bildinhalten vorgeschlagen worden: Die Sequenzen der erhaltenen Waveletkoeffizienten entsprechenden Skalen und Orientierungen werden direkt anhand der Multiskalendarstellung einer Blendingfunktion zusammengeführt, und dann zur Synthese des fusionierten Bildes benutzt.

SU et al. [SU et al., 2004] umgehen den Einfluss des verwendeten Synthesefilter auf die Bildfusion, indem bei einer Multiskalendarstellung Bilder $I_1(x), I_2(x)$ in die N Unterraumbilder der Skalen 2^j , $j = 1, \dots, N$ abgebildet werden und durch Summation der Skalenraumdarstellung das fusionierte Bild erhalten wird. Eine Zusammenfassung zur Multiskalenanalyse durch diskrete Wavelettransformation ist in Anhang A zu finden.

Bezeichnen

$$I_{1,j}(x), I_{2,j}(x + \Delta x), \text{ mit } x \in \omega \quad (2.17)$$

die Skalendarstellungen von I_1, I_2 in der Region ω der Skale j , wird das fusionierte Bild durch Summation

$$M(x') = \sum_{j=1}^N B_j(x') I_{1,j}(x) + (1 - B_j(x')) I_{2,j}(x + \Delta x) \quad (2.18)$$

erhalten.

Die in der Literatur übliche und in [BURT und ADELSON, 1983, HSU und WU, 1996, SU et al., 2004] vereinfachende Annahme einer gegebenen *links-rechts* Anordnung von Teilbildern und entsprechend eindimensionalen Übergangsfunktionen in der Mosaikregion ω , muß in der Anwendung verallgemeinert werden.

Der Wertebereich der B_j wird daher aus der Distanztransformation von ω bezüglich $R \setminus \omega$ erhalten, das heißt die Gewichtung der Signalanteile basiert auf dem euklidischen Abstand der Bildpunkte in ω zu den nicht überlappenden Bereichen von I_1 bzw. I_2

$$B_j(x') := f(d(x'); j) \quad \text{mit } d(x') := \min_{x \in I_1 \setminus \omega} \|x' - x\|. \quad (2.19)$$

und

$$f(x; j) := \begin{cases} 1 & \text{für } x < \epsilon - 2^j \\ p_{\epsilon,j} & \epsilon - 2^j < x < \epsilon + 2^j \\ 0 & \text{für } x > \epsilon + 2^j \end{cases} \quad (2.20)$$

mit $\epsilon := \max_{x \in \omega} [d(x)] / 2$ und $p_{\epsilon,j} : [\epsilon - 2^j, \epsilon + 2^j] \mapsto [0, 1]$ monoton fallender Übergangsfunktion der Skale j .

Die beschriebene Methodik, durch Phasenkorrelation und multiskalen Bildfusion Mosaikbilder zu erstellen besitzt für die praktische Anwendung mit Mikroskopbildern mehrere Vorteile: Die Registrierung mittels Phasenkorrelation ist relativ robust (vgl. [DE CASTRO und MORANDI, 1987]) sowohl gegenüber Rauschen als auch unterschiedlich hohen Intensitätsbeträgen der Eingangssignale. Ist das Bildmaterial mit genügend hohen Auflösungen aufgenommen, sind für praktische Anwendungen sub-pixel genaue Registrierungen meist unnötig. Durch Verwendung der skalenabhängigen Zusammenführung wird der Einfluss abweichender Bildanteile reduziert, so daß für die weitere Verarbeitung der Bilddaten möglichst

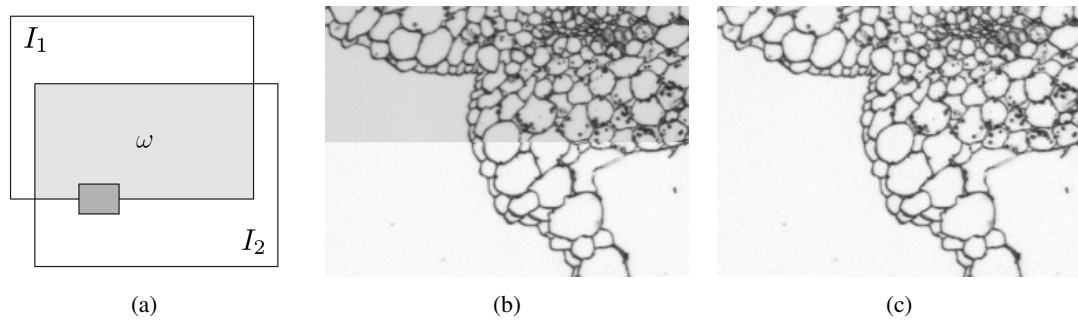


Abbildung 2.6: Bildfusion: 2.6a Schematisch dargestellt eine beliebige Anordnung zweier Teilbilder R, T mit Überlapp ω (vgl. Abb. 2.4c) und Detailausschnitt (dunkelgrau) des Ergebnisses bei ungewichteter (2.6b) Zusammenführung und (2.6c) bei Verwendung des Multiskalenansatzes.

wenig Artefakte entstehen. Schnelle Transformationsalgorithmen (*FFT, FWT* vgl. [FRIGO und JOHNSON, 2005, BEYLKIN et al., 1991]) ermöglichen die Berechnung der Phasenkorrelation bzw. Multiskalenanalyse in $\mathcal{O}(N \log N)$ bzw. $\mathcal{O}(N)$ und machen den Ansatz damit numerisch sehr effizient. Somit wird für die Vorverarbeitung ein effizienter Algorithmus zur robusten, automatischen Bildkachelung erhalten.

2.3 Hintergrundbereinigung

Durch die biologische Probenpräparation, technische Handhabung und die Modalitäten der Bildaufnahme und Digitalisierung entstehen in Bilddaten Artefakte und Bildstörungen. In Abbildung 2.7 sind Rohbilder drei unterschiedlicher Bildgebungsmodalitäten dargestellt, um die Hintergrundbereinigung exemplarisch zu motivieren. Vorliegende Artefakte in aufgenommenen Präparaten beeinhalteten meist hochfrequente Störungen durch Staubpartikel, aber auch größere Objekte. In konfokal aufgenommenen Mikrographen werden Artefakte durch Autofluoreszenz von eingebrachten Partikeln usw. erzeugt. Autoradiogrammbilder besitzen aus der Bildgebung inhärent einen hohen Rauschanteil, den es zu reduzieren gilt. Für eine automatische Auswertung stellt die Hintergrundbereinigung daher einen elementaren Schritt dar, da hier erstmals im Sinne eines maschinellen Sehens zwischen im Sinne der Aufgabenstellung informativen und uninformativen Bildinhalten unterschieden wird.

2.3.1 Segmentierung der *Regions of Interest*

In der weiteren Verarbeitung sollen daher die für die Aufgabenstellung relevanten Bildinformationen von Störungen und uninformativen Bildanteilen getrennt werden. Die Teilmenge der innerhalb der Anwendung oder Aufgabenstellung relevanten Abtastwerte bezeichnen die sogenannten *Regions of Interest* oder den Bildvordergrund; der Bildbereich Ω wird für die weitere Verarbeitung also *segmentiert*. Durch die Segmentierung werden unerwünschte Bildanteile identifiziert und können entsprechend maskiert werden. Dadurch ergeben sich für die weitere Prozessierung Vorteile:

- Biologisch und anwendungsspezifisch verfälschende Daten werden entfernt

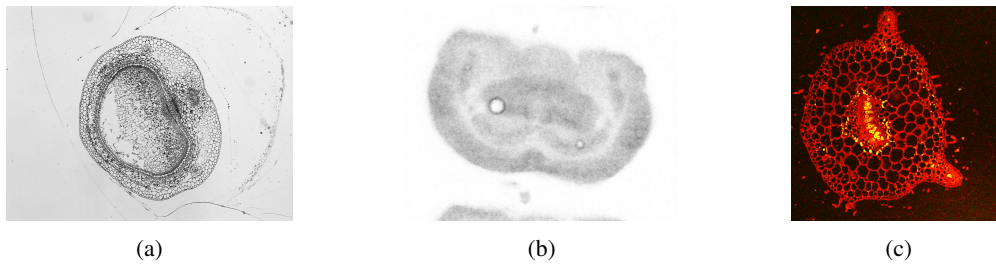


Abbildung 2.7: Ansichten von Rohbildern: 2.7a Durchlichtmikroskopische Aufnahme einer Gerstenkaryopse, 2.7b Autoradiogramm eines Mäusegehirns 2.7c Konfokales Mikrogramm eines Tabaks (in Falschfarbendarstellung).

- Verbesserung der Genauigkeit der weiteren Verarbeitungsschritte
- Optimierung der Verarbeitungsgeschwindigkeit durch Reduktion der zu verarbeitenden Samples

Als Segmentierungsproblem ist die Aufgabe in den vorliegenden Anwendungen relativ gut gestellt: Die mögliche Anzahl der ROI ist *a priori* bekannt und in der menschlichen Wahrnehmung direkt identifizierbar. Nichtsdestotrotz ergeben sich einige kritische Punkte, so sind zunächst ROI nicht homogen, etwa bezüglich Intensitätswerten oder Textur, das heißt, diese müssen anhand ihrer Objektgrenzen selbst identifiziert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Bildaten und -modalitäten weisen unterschiedliche Charakteristiken auf, welche bei der Hintergrundbereinigung berücksichtigt werden müssen (siehe Abb. 2.7). Durch die Größe der Datensätze kommt der Laufzeitkomplexität und schnellen Implementierungen Bedeutung zu. Für die ROI-Segmentierung sind zwei Ansätze unterschiedlicher Problembeschreibung und Granularität verfolgt worden:

1. Segmentierung mit *morphologischen Operatoren*
2. Segmentierung mit *geometrischen aktiven Konturmodellen*

Die beiden Ansätze stellen eine unterschiedliche Betrachtung oder Fassung des Segmentierungsproblems dar: Während in ersterem die Segmentierung durch die Aufeinanderfolge mehrerer schneller und elementarer Operationen sozusagen explizit „konstruiert“ wird, liefert das Konturmodell die kompakte Beschreibung der Segmentierung in einem Funktional als Variationsproblem.

2.3.2 Segmentierung mit morphologischen Operatoren

Die zunächst allgemeine Annahme, dass Objektgrenzen in Bildern durch starke lokale Intensitätsänderung repräsentiert sind, begründet die Bedeutung der *Kantendetektion* als grundlegenden Operator in der Bildverarbeitung. Idealerweise sind *Kanten* demnach Diskontinuitäten einer kontinuierlichen Bildfunktion. Da diskrete, das heißt von vorneherein diskontinuierliche Bildfunktionen vorliegen, müssen die vorher idealen Kanten durch Modelle angenähert werden - das heißt, die Erkennung von Kanten ist gewissermaßen „Definitionssache“ bezüglich der Wahl von Modell und Parametern.

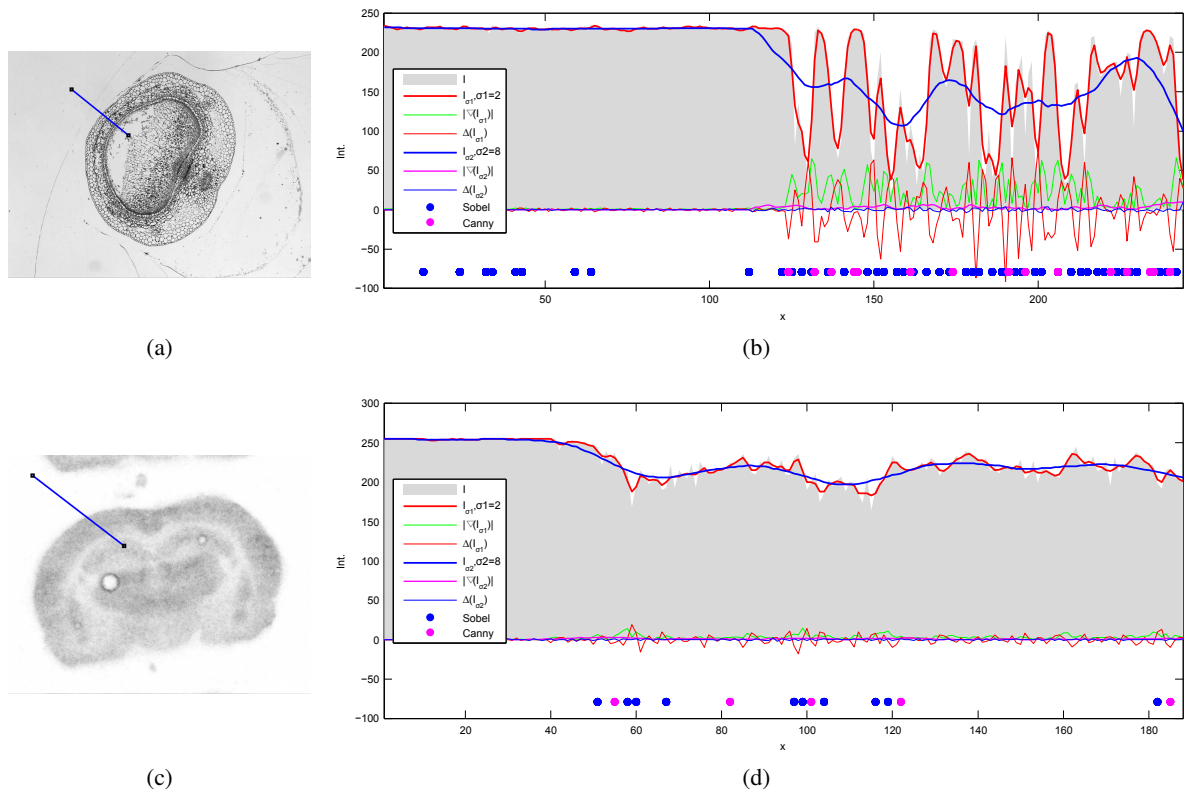


Abbildung 2.8: Skalensabhängigkeit der Bildableitung und Kantendetektion: Zwei eindimensionale Ausschnitte (Abtastung entlang dargestellter Linie) aus einer lichtmikroskopischen Aufnahme 2.8a (*Hordeum* Dünnschnitt) und Autoradiogramm 2.8c (Mausgehirn). Aufgetragen sind die Bildfunktion und Skalenraumdarstellungen $\sigma = 2, 8$ sowie die Approximationen der Ableitungen Gl. 2.21 und 2.22 auf der jeweiligen Skale und detektierte Kanten durch *Sobel*- bzw. *Canny*-Operator.

Durch Ordnung und Approximation der Ableitungen aus den diskreten Abtastwerten der Bildfunktion sowie durch die Bestimmung der Signifikanz der Kantenstärke unterscheiden sich Ansätze zur Kantenerkennung. Allgemein bewirkt die Berechnung der n -ten Ableitung im Frequenzraum eine Multiplikation der Wellenzahl mit dem Faktor $(ik)^2$. In der Praxis sind Bildbereiche Ω mindestens zweidimensional und die Funktionen $I(\mathbf{x}) : \Omega \subset \mathbb{R}^N \mapsto K$ reelwertig. Die Kantendetektion in vektor- oder tensorwertigen Bildern soll hier nicht betrachtet werden (s. Abschnitt 2.1.1). Ausgangspunkt der Kantendetektion sind daher die Approximationen der Ableitungen

$$\nabla I(\mathbf{x}) := \left[\frac{\partial I}{\partial x_1}, \frac{\partial I}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial I}{\partial x_N} \right]^T \quad (2.21)$$

und

$$\Delta I(\mathbf{x}) := \sum_{i=1}^N H_{ii}(I(\mathbf{x})) \quad \mathbf{H}(I(\mathbf{x})) := \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 I}{\partial x_1^2} & \frac{\partial^2 I}{\partial x_1 \partial x_2} & \cdots & \frac{\partial^2 I}{\partial x_1 \partial x_N} \\ \frac{\partial^2 I}{\partial x_1 \partial x_2} & \frac{\partial^2 I}{\partial x_2^2} & \cdots & \frac{\partial^2 I}{\partial x_2 \partial x_N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial^2 I}{\partial x_1 \partial x_N} & \frac{\partial^2 I}{\partial x_2 \partial x_N} & \cdots & \frac{\partial^2 I}{\partial x_N^2} \end{bmatrix} \quad (2.22)$$

Eine Vielzahl digitaler Filter sind vorgeschlagen worden, um die diskreten Versionen von *Gradient* (2.21) und *Laplace*-operator (2.22) zu implementieren und Kanten als *Extrema* beziehungsweise *Nulldurchgänge* beider Größen zu detektieren. Wünschenswerte Eigenschaften wie *Isotropie* und *Lokalisierung* werden in [JÄHNE, 2005] diskutiert. Als einfache Vertreter seien etwa der *Roberts*- oder *Prewitt*-Operator [ROBERTS, 1965, PREWITT, 1970] genannt, welche $|\nabla I|$ mittels finiter Differenzen approximieren. Genau genommen realisieren die Filter noch keine *Kantendetektion*; diese wird durch Schwellwerthaltung nachgelagert.

Eine wesentliche Verbesserung beim Entwurf von Filtern zur Kantendetektion ist die Trennung der numerischen Approximation von (2.21) und (2.22) von der Abtaststrategie der Bilddiskretisierung durch *Glättung*: Der Frequenzbereich des Nutzsignals in Bildern ist variabel und abhängig von der Bildaufnahme, daher muss ein optimaler Kantendetektor auf die *Skale* oder Frequenzbereich parametrisierbar sein indem das Nutzsignal vorliegt, um zum Beispiel höhere Frequenzen, in denen Rauschen dominiert, nicht bei der Detektion von Extrema zu berücksichtigen.

Wie im vorhergehenden Abschnitt (2.2) bereits erwähnt, erzielen Glättungsoperationen eine Unterdrückung hoher Frequenzen, das heißt eine Tiefpassfilterung des Bildsignals, und mit einem Skalenparameter t als Grenzfrequenz des Filter die *Skalenraumdarstellung* (*scale-space representation*) eines Bildes [WITKIN, 1983, KOENDERINK, 1984, LINDBERG, 1990]. Die signaltheoretischen Zusammenhänge der Multiskalenanalyse durch Wavelets werden in Anhang A kurz erläutert. Ein verbreitetes physikalisches Modell der Skalenraumdarstellung ist die Beschreibung der Bildglättung durch einen Diffusionsprozess [KOENDERINK, 1984]. Für ein lineares und isotropes Diffusionsmodell liefert die Faltung mit einer Gaußfunktion $g_\sigma : \mathbb{R}^N \mapsto \mathbb{R}$

$$g(\mathbf{x}; \sigma) := \frac{1}{(2\pi\sigma^2)^{1/N}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad I_\sigma(\mathbf{x}) := I(\mathbf{x}) * g(\mathbf{x}; \sigma) \quad (2.23)$$

die Lösung der Diffusionsgleichung für den Zeitpunkt t und damit die geglättete Darstellung von I auf der Skale $\sigma = \sqrt{t}$.

Die Berücksichtigung der Bildskale wird elementar durch den sogenannten *Laplacian-of-Gaussian* (kurz *LoG*)-Operator nach MARR und HILDRETH [MARR und HILDRETH, 1980] realisiert: Das Bild wird auf der Skale σ geglättet, und darauf der diskrete Laplacefilter angewendet. Durch die Assoziativität der Faltung können beide Operationen in einer einzigen Filtermaske implementiert werden – eben des („mexikanerhutförmigen“) laplacegefilterten Gauß’schen Glättungskerns:

$$\text{LoG}(I) := \Delta I_\sigma = \Delta(I(\mathbf{x}) * g(\mathbf{x}; \sigma)) = I(\mathbf{x}) * \underbrace{(\Delta g(\mathbf{x}, \sigma))}_{=\text{LoG}} \quad (2.24)$$

$$\text{LoG}_{2D} = \Delta g(\mathbf{x}, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{x_1^2+x_2^2}{2\sigma^2}} = \frac{\partial^2 g}{\partial x_1^2} + \frac{\partial^2 g}{\partial x_2^2} = \frac{1}{\pi\sigma^4} e^{-\frac{x_1^2+x_2^2}{2\sigma^2}} \left(1 - \frac{x_1^2 + x_2^2}{2\sigma^2}\right). \quad (2.25)$$

Kanten werden entsprechend als Nulldurchgänge dieser approximierten zweiten Ableitung der Skalenraumdarstellung des Bildes erhalten. Der *Log*-Operator produziert jedoch im Allgemeinen einen großen Anteil falsch positiver Kanten, und die Lokalisierung ist bei gekrümmten Kanten schlecht.

Zur robusten und genauen Kantendetektion ist von CANNY der gleichnamige Filter beziehungsweise Algorithmus vorgeschlagen worden [CANNY, 1986]. Der CANNY-Kantendetektor ist gewissermaßen Stand der Technik für das Kantenproblem und Vorläufer skalenbasierter merkmalserkennender Verfahren wie

etwa *SIFT* (Skaleninvariante Merkmalsextraktion, [LOWE, 1999]). In [CANNY, 1986] werden die Kriterien *Detektion*, *Lokalisierung* und *Eindeutigkeit* in einem Funktional beschrieben und der Ansatz einer zusammengesetzten Exponentialfunktion variationell optimiert. CANNY zeigte, dass diese durch die Ableitungen der Gaußfunktion hinreichend approximiert werden kann, welche zur robusten Schätzung des Bildgradienten auf der Skalenraumdarstellung I_σ benutzt wird:

$$\nabla_{\text{Canny}} I(\mathbf{x}) := \left[I(\mathbf{x})_\sigma * \frac{\partial g_\sigma}{\partial x_1}, \quad I(\mathbf{x})_\sigma * \frac{\partial g_\sigma}{\partial x_2} \right]^T \quad \Phi = \arctan \left(\frac{I(\mathbf{x})_\sigma * \frac{\partial g_\sigma}{\partial x_1}}{I(\mathbf{x})_\sigma * \frac{\partial g_\sigma}{\partial x_2}} \right) \quad (2.26)$$

Anhand Φ wird bestimmt, ob tatsächlich ein lokales Maximum in Richtung des Gradienten vorliegt (sog. *non-maximum suppression*), um so *eindeutige* Kanten der Breite 1 zu erhalten. Eine verbesserte Detektion hin auf fortlaufende Konturen wird durch eine lokale nachführende Schwellwerthaltung des Gradientenbetrages $|\nabla_{\text{Canny}} I|$ der Maxima erhalten.

Das erhaltene Kantenbild (*edge map*) liefert die Konturen der *regions of interest*, allerdings auch die von Bildstörungen. Um den Bildvordergrund von unerwünschten Bildinhalten zu trennen, sind vergleichende Operatoren notwendig, die Form und Größe von Objekten berücksichtigen.

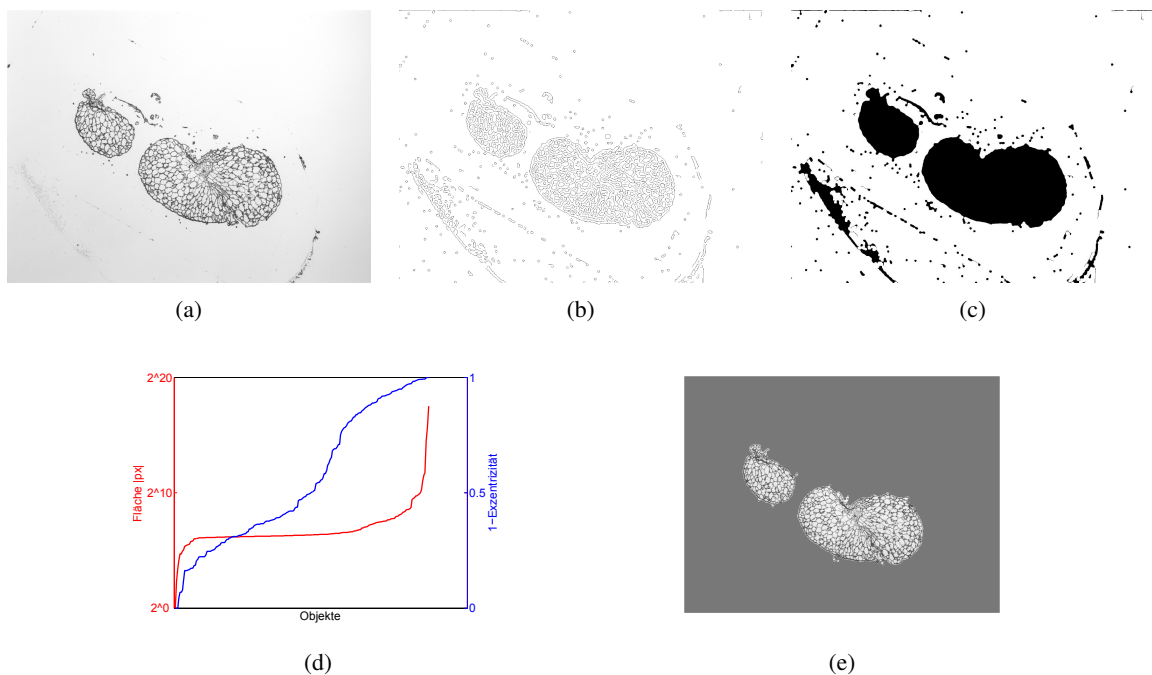


Abbildung 2.9: Hintergrundsegmentierung durch morphologische Operatoren: 2.9a Durchlicht-Mikrograph eines *Hordeum*-Dünnschnittes, 2.9b *Edgemap* der CANNY-detektierten Kanten ($\sigma = 4$, $s_1 = 0.0063$, $s_2 = 0.0156$), 2.9c Zusammenhangskomponenten nach morphologischer Schließung, 2.9d *Fläche* und *Exzentrizität* von 237 Zusammenhangskomponenten, 2.9e segmentierter Hintergrund nach Klassifikation der Objekte mittels Schwellwert ($2 \cdot 10^5$, 0.1)

Morphologische Operatoren sind Filter, welche die Gestalt und Form des Bildinhaltes an der Position der Filtermaske betrachten. Allgemein sind solche Operatoren Rangordnungsfiler, der Wert des Zielpunktes

wird aus einer nicht linearen Operation aus den benachbarten Bildpunkten gebildet. Grundlagen und Implementierungsaspekte werden zum Beispiel in [SOILLE, 1999, VINCENT, 1993] beschrieben. Für binäre Bilder $I : \Omega \mapsto \{0, 1\}$ existieren die beiden elementaren Operationen Dilatation und Erosion:

$$B \ominus M := \{p : M_p \subseteq B\} \quad \forall p \in \Omega \quad \text{Erosion} \quad (2.27)$$

$$B \oplus M := \{p : M_p \cap B \neq \emptyset\} \quad \forall p \in \Omega \quad \text{Dilatation} \quad (2.28)$$

mit $B := \{x : I(x) = 1\}$ und $M_p := \{x' + p : S(x') = 1\}$ des an Position p verschobenen *Strukturelements* S . Damit lassen sich zwei in der Praxis mächtige Operatoren kompakt schreiben:

$$B \circ M := (B \ominus M) \oplus M \quad \text{Morphologisches Öffnung} \quad (2.29)$$

$$B \bullet M := (B \oplus M) \ominus M \quad \text{Morphologisches Schließung.} \quad (2.30)$$

Das *Öffnen* entfernt alle Objekte, die das Strukturelement nicht enthalten, ohne die Größe der übrigen zu ändern; entsprechend komplementär die morphologische Schließung.

Zusätzliche absolute Lagebeziehungen werden durch die *morphologische Rekonstruktion* berücksichtigt: Neben dem Strukturelement wird ein sogenanntes binäres *Markerbild* als Startpunkt H_1 der iterativen Transformation

$$H_{i+1} := (H_i \oplus M) \cap B, \quad \forall_{i=1}^N \quad N = \min\{N : H_N = H_{N-1}\} \quad (2.31)$$

als „bedingte Dilatation“ benutzt. Durch diese Operatoren können verschiedene Problemstellungen adressiert werden, zum Beispiel wird mit dem Markerbild:

$$H_1(\mathbf{x}) := \begin{cases} \neg B(\mathbf{x}) & \mathbf{x} \in \partial\Omega \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.32)$$

eine sukzessive Füllung freistehender Objekte erhalten, das heißt, alle Objekte haben die topologische oder *Euler-Charakteristik* 1.

Durch eindeutiges Kennzeichnen solcher *Zusammenhangskomponenten* auf dem 4- oder 8-verbundenen Nachbarschaftsgraphen der Bildpunkte in Ω können nun objektspezifische Eigenschaften extrahiert werden [DOUGHERTY, 1993]. Anhand dieser regionalen Deskriptoren oder *Features* werden zusammenhängende Bildregionen nun als Bildvordergrund selektiert beziehungsweise als Bildstörungen und Artefakte verworfen und maskiert. Dies können, wenn ein relativ einfaches gelagertes Segmentierungsproblem vorliegt, zunächst elementare translationsinvariante Merkmale wie *Fläche* oder *Umfang* sein. Die merkmalsbasierte Trennung der Objekte erfolgt dann anhand einer Histogrammschätzung der Verteilung mit empirischen Schwellwerten, wenn wie hier etwa die Maximalanzahl der Vordergrundobjekte aus der Anwendung bekannt ist.

Zur Segmentierung der Region of Interest liefern morphologische Operatoren die Möglichkeit einer äußerst schnellen Implementierung: Bei der Überführung in den Skalenraum kann allgemein die Separierbarkeit, das heißt die Addition der eindimensionalen Faltungen, des Gaußkerns ausgenutzt werden. Operationen auf binären Bildern und die Berechnung regionaler Deskriptoren daraus, können sehr hardwarenah implementiert werden, so dass entsprechend kleine Konstanten für eine Laufzeitasymptote erhalten

werden. Bei hochaufgelösten (N -elementigen) Bildern „lohnt“ eine Überführung in den Fourieraum zur schnellen Faltung meist auch bei verhältnismäßig großen Filtern nicht, zumal die Komplexität der Glättung mit (großen) Maskengrößen M hier durch die erwähnte Separierbarkeit von $\mathcal{O}(NM^2)$ auf $\mathcal{O}(NM)$ stark verringert wird. Die große Zahl freier Parameter in Verbindung mit der Laufzeitkomplexität beziehungsweise schnellen Implementierungen eignet den Ansatz vor allem für die Verarbeitung von großen Datensätzen, in denen Bilder ähnliche Charakteristiken besitzen.

2.3.3 Segmentierung mit geometrischen aktiven Konturmodellen

Die Grundidee hinter *aktiven Konturmodellen* ist die Entwicklung einer geschlossenen Kurve anhand eines Bildes I , um in diesem Bild bestimmte Objekte zu erkennen. Der initiale von KASS ET AL. vorgeschlagene [KASS et al., 1988] Ansatz zur mathematischen Formulierung solcher Konturmodelle basiert auf der parametrischen Darstellung einer geschlossenen Kurve $C(s) : [0, 1] \mapsto \Omega$, etwa in einem zweidimensionalen Bildbereich $\Omega \subset \mathbb{R}^2$. Die Entwicklung oder Bewegung der Kurve hin zum Umfang des Objektes wird von den Eigenschaften der Kurve selbst und vom Bildinhalt bestimmt, das heißt, das Konturmodell J bildet für eine optimal segmentierende Kontur abhängig vom Bild I_0 und Kurve C ein Minimum: $\inf_C J(C)$. Das von Kass et al. vorgeschlagene Modell lautet entsprechend

$$J(C) := \alpha \int_0^1 |C'(s)|^2 ds + \beta \int_0^1 C''(s) ds + \lambda |\nabla I_0(C(s))|^2 ds \quad (2.33)$$

mit positiven α, β, λ . Die beiden ersten Terme, das heißt die *Glattheit* der Kurve, bezeichnen KASS ET AL. als *interne Energie*; die Form der Kurve wird abhängig von den Parametern α, β, λ regularisiert. Der dritte Term wird aus dem Bildinhalt selbst bestimmt und wirkt als *externe Energie* auf die Form der Kurve. Entsprechend den zu segmentierenden Objekten wird die Kurve auf diese zubewegt: Die Minimierung des Funktionals (2.33) strebt die Orte des maximalen Gradienten ∇I_0 unter Einhaltung der Glattheit der Kurve an.

Als allgemeiner Kantendetektor kann die Ableitung der Bildfunktion $|\nabla G_t * I_0|^p$ der Skalenraumdarstellung des Bildes als Funktion für die Bestimmung der externen Energie des Modells verwendet werden (vgl. [KASS et al., 1988, WITKIN et al., 1987]), das heißt, die Energie wird minimal für Nulldurchgänge der Bildableitung auf der Skala t .

Aus der parametrischen Darstellung der Kontur in Lagrangekoordinaten für die von KASS ET AL. vorgestellten *Snakes* Modelle ergeben sich, unabhängig vom gewählten Lösungsschema, für die praktische Anwendung zur Bildsegmentierung Nachteile:

- Änderungen der Topologie der Kurve während der Entwicklung sind mit einer parametrischen Kurve nicht darstellbar.
- Die Approximation der Kontur durch von der Bilddiskretisierung unabhängige Stützstellen machen Lösungsverfahren anfällig bzgl. Initialisierung und Parameterwahl.
- Die Regularisierungen in Gleichung 2.33 zur Lösung sind restriktiv, das heißt, die Kurve kann keine *Einbuchtungen* oder *Ecken* darstellen.

Eine alternative Darstellung geschlossener Kurven liefert die von SETHIAN und OSHER [OSHER und SETHIAN, 1988] vorgeschlagene *Niveaumengenmethode* (*Level-Set Methode*), als allgemeines Modell

für sich bewegende Konturen. Der zugrunde liegende zentrale Ansatz ist die Repräsentation der Kontur C als Niveaumenge (Isokline) einer höherdimensionalen Funktion: Die Kontur wird implizit als die Nullstellenmenge

$$C := \{\mathbf{x} | \phi(\mathbf{x}) = 0\} \quad (2.34)$$

der so genannten *Level-Set* Funktion ϕ definiert. Die Entwicklung der Funktion über die Zeit t mit $\phi = \phi(\mathbf{x}, t)$ wird allgemein durch die Bewegungsgleichung

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + F \nabla \phi = 0 \quad (2.35)$$

anhand eines Geschwindigkeitsfelds F beschrieben. Analog zur parametrischen Form in Gleichung 2.33 lautet die Bewegungsgleichung anhand der *Krümmung* (*curvature*) $\text{div}(\nabla \phi(\mathbf{x}) / |\nabla \phi(\mathbf{x})|)$ der Level-Set Funktion

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \underbrace{g(|\nabla I_0|) |\nabla \phi| \text{div} \left(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} + \nu \right)}_{:= \text{curv} \phi}. \quad (2.36)$$

Das heißt, die Niveaulinie durch den Punkt \mathbf{x} bewegt sich mit der Geschwindigkeit $g(|\nabla I_0|) \text{curv}(\phi)(\mathbf{x}) + \nu$ in Richtung ihrer Normalen und stoppt mit verschwindendem g . Die Konstante ν wirkt als zusätzliche Kraft, welche die Kurve bei verschwindender oder negativer Krümmung auf die Objektgrenzen hin bewegt.

Beide Ansätze zur Konturbewegung, sowohl von KASS's parametrischer Kurve C , als auch die Kontur als Niveaumenge $\{\mathbf{X}, \phi(\mathbf{x}) = 0\}$, basieren auf dem Bildinhalt am Ort der Kontur. Die Bildableitung $\nabla G * I_0$ bestimmt die Bewegung der Kurve, das heißt, zu erkennenden Objekte müssen entsprechende Kanten aufweisen, um korrekt umfasst zu werden.

In der Praxis sind die Werte der Bildableitung nach oben beschränkt, was zusätzlich in der Energiefunktion berücksichtigt werden muss. Darüber hinaus werden durch die Anwendung des allgemeinen Kantendetektors beziehungsweise Faltung mit Gaußkern bei verrauschten Bildern, vorliegende Kanten weiter abgeschwächt, was in Anwendung bewirken kann, dass die Kontur eine gewünschte Grenze durchläuft. Eine wesentliche Verbesserung des Konzepts *aktive Kontur* ist daher der von CHAN und VESE vorgestellte Ansatz [CHAN und VESE, 2001]. Der Ansatz verallgemeinert den Grundgedanken der Konturmodelle insofern, als dass nicht mehr lediglich die lokalen Bildinhalte bzw. -ableitungen die Konturbewegung antreiben, sondern ein Energiefunktional der durch die Kontur erhaltenen *Segmentierung* des gesamten Bildes der Bewegungsgleichung zugrunde gelegt wird.

Für die Kontur C als Rand $\partial \omega \subset \Omega$ seien ω und $\Omega \setminus \omega$ der von der Kontur umfasste Bereich beziehungsweise der Bereich außerhalb der Kontur. Als Funktion für die Bewertung der Segmentierung kann man zunächst vereinfachend annehmen, dass die Bildfunktion aus stückweise homogenen Bereichen besteht. Dann ergibt sich als Funktion für die Güte der Segmentierung

$$E_1 + E_2 := \int_{\omega} |I_0(\mathbf{x}) - c_1|^2 d\mathbf{x} + \int_{\Omega \setminus \omega} |I_0(\mathbf{x}) - c_2|^2 d\mathbf{x} \quad (2.37)$$

von den Konstanten $c_{1,2}$ für ω beziehungsweise $\Omega \setminus \omega$. Somit ergibt sich als Energiefunktion

$$J_{CV} := \alpha \text{Länge}(C) + \beta \text{Fläche}(C) + \lambda_1 \int_{\omega} |I_0(\mathbf{x}) - c_1|^2 d\mathbf{x} + \lambda_2 \int_{\Omega \setminus \omega} |I_0(\mathbf{x}) - c_2|^2 d\mathbf{x}. \quad (2.38)$$

Für die Darstellung von C durch die Funktion ϕ beziehungsweise deren Niveaumengen ergibt sich

$$\begin{aligned} C &= \partial\omega = \{\mathbf{x} \in \Omega \mid \phi_{\mathbf{x}} = 0\} \\ \omega &= \{\mathbf{x} \in \Omega \mid \phi_{\mathbf{x}} > 0\} \\ \Omega \setminus \omega &= \{\mathbf{x} \in \Omega \mid \phi_{\mathbf{x}} < 0\}. \end{aligned} \quad (2.39)$$

und mit der Treppenfunktion H über dem 0-Niveau

$$\begin{aligned} J_{\text{CV}} &= \alpha \int_{\Omega} |\nabla H(\phi(\mathbf{x}))| d\mathbf{x} + \beta \int_{\Omega} H(\phi(\mathbf{x})) d\mathbf{x} \\ &+ \lambda_1 \int_{\Omega} |I_0(\mathbf{x}) - c_2|^2 H(\phi(\mathbf{x})) d\mathbf{x} \\ &+ \lambda_2 \int_{\Omega} |I_0(\mathbf{x}) - c_2|^2 (1 - H(\phi(\mathbf{x}))) d\mathbf{x}. \end{aligned} \quad (2.40)$$

Für festes ϕ minimieren c_i die Energie 2.40 für die Mittelwerte der Bildfunktion *Innen* und *Außen*, das heißt $c_1 = \int_{\Omega} I_0(\mathbf{x}) H(\phi(\mathbf{x})) d\mathbf{x} / \int_{\Omega} H(\phi(\mathbf{x})) d\mathbf{x}$ bzw. $c_2 = \int_{\Omega} I_0(\mathbf{x}) (1 - H(\phi(\mathbf{x}))) d\mathbf{x} / \int_{\Omega} 1 - H(\phi(\mathbf{x})) d\mathbf{x}$. Die Minimierung der Energiefunktion hängt also lediglich von $H(\phi)$ ab. Für die entsprechende *Euler-Lagrange* Gleichung wird zur iterativen Lösung eine Zeit t eingeführt und eine differenzierbare Approximation der Treppenfunktion H_{ϵ} und deren Ableitung $\delta_{\epsilon} := \frac{d}{dx} H(x)$ substituiert

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \delta_{\epsilon}(\phi) \left[\alpha \operatorname{div} \left(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) + \beta + \lambda_1 (I_0 - c_1)^2 + \lambda_2 (I_0 - c_2) \right]. \quad (2.41)$$

Mit Zeitdiskretisierung wird ϕ^n mittels finiter Differenzen (auf den Gitterpunkten der diskreten Bildfunktion) bis zur stationären Lösung iteriert (Details siehe [CHAN und VESE, 2001]).

Um die Entwicklung von ϕ numerisch stabiler zu machen (Betrachtungen zum Problem *Reinitialisierung* von ϕ siehe [GOMES und FAUGERAS, 2000]), haben LI ET AL. eine zusätzliche Regularisierung vorgeschlagen [LI et al., 2005], um für ϕ die Eigenschaft $|\nabla \phi| = 1$ einer Distanzfunktion zu erhalten. Entsprechend wird die Energiefunktion erweitert

$$J_{\text{Li}} := J_{\text{CV}} + \int_{\Omega} \frac{1}{2} (1 - |\nabla \phi|)^2 d\mathbf{x} \quad (2.42)$$

und die Bewegungsgleichung

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \delta_{\epsilon}(\phi) \left[\alpha \operatorname{div} \left(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) + \beta + \lambda_1 (I_0 - c_1)^2 + \lambda_2 (I_0 - c_2) \right] + \gamma \left(\Delta \phi - \operatorname{div} \left(\frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) \right) \quad (2.43)$$

erhalten. Aus der Approximation $L(\phi)$ der Gleichung 2.43 aus den zentralen Differenzenquotienten für die Ortsableitungen und Vorwärtsdifferenzenquotienten mit der Zeitschrittweite τ iterativ gelöst

$$\phi_{t+1} := \phi_t + \tau L(\phi_t). \quad (2.44)$$

Durch die Regularisierung von ϕ im Bewegungsmodell kann eine größere Zeitschrittweite τ als im CV-Modell für die Minimierung gewählt werden; Li et al. nennen ein maximales Verhältnis von $\gamma\tau = \frac{1}{4}$ als

numerisch stabil.

Die Laufzeit des Segmentierungsmodells kann generell an zwei Ansatzstellen optimiert werden: *Iterationsanzahl* und *Komplexität pro Iteration*. Die Steuerung der Zeitschrittweiten hin auf schnellstmögliche Konvergenz birgt das Risiko von Instabilität und falsch lokalisierten Konturen. Die Komplexität pro Iteration ist *optimal*, d.h. linear in der Größe der *Level Set* Funktion ϕ , entsprechend Gleichung 2.37; die Berechnung der Ableitungen in Gleichung 2.43 wird durch lineare Filteroperation auf dem Bereich der diskreten Bildfunktion implementiert.

Algorithmus 1 MehrskalenAktiveKontur(I, t_{max})

```

1: // Berechne Skalenraumdarstellung:
2:  $\mathcal{I}(0) := I$ ;
3: for  $t = (1, \dots, t_{max})$  do
4:    $\mathcal{I}(t) := (\downarrow 2)(\mathcal{I}(t-1) * G_{\sigma=2})$ 
5: end for
6: // Initialisiere  $\phi_t$  für  $\mathcal{I}(t)$ :
7:  $\phi_t(\partial\omega) = 0, \phi_t(\Omega \setminus \omega) = k, \phi_t(\omega) = -k, k \in \mathbb{N}$ 
8: for  $t = t_{max}$  downto 1 do
9:   while iter < MaxIter do
10:    // Berechne Bildenergie
11:     $E_1 := (I(t) - c_1)^2 + (I(t) - c_2)^2$ 
12:    // Berechne interne Energie
13:     $E_2 := \mu \cdot \text{curv}(\phi_t) / \max(|(\text{curv}(\phi_t))|)$ 
14:    // Regularisierung Li et al.
15:     $E_3 := \gamma (\Delta\phi_t - \text{curv}(\phi_t))$ 
16:    // Update levelset Funktion
17:     $\phi_t = \phi_t + \tau (E_1 + E_2 + E_3)$ 
18:   end while
19:    $\phi_{t-1} := (\uparrow 2) \phi_t$ 
20: end for

```

Um das Laufzeitverhalten zu optimieren, kann die iterative Lösung auf einer Mehr-Skalen Bilddarstellung durchgeführt werden. Dabei wird die Bildfunktion auf größeren Skalen entsprechend der *Nyquist*-Frequenz der jeweiligen Stufe unterabgetastet [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2009]: Während der Minimierung werden hochfrequente Bildanteile erst dann berücksichtigt, wenn sie die Lokalisierung der Kontur beeinflussen und somit die Komplexität pro Iteration stark reduziert. Entsprechend wird die Minimierung auf einer großen Skale begonnen, durch die zusätzliche Regularisierung von ϕ kann beim Übergang auf die nächste Auflösungsstufe ohne die Berechnung einer Distanzfunktion extrapoliert werden. Die genaue Ausrichtung der Kontur erfolgt auf der ursprünglichen Bildauflösung mit entsprechend hochfrequenten Anteilen. Der in [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2009] beschriebene Ansatz ist in Algorithmus 5 zusammengefasst. Dadurch kann in der praktischen Anwendung ein wesentlicher Vorteil erzielt werden: Indem die Vorteile aus dem *Level Set* Modells mit praktikable Laufzeiten verbunden werden, wird ein leistungsfähiges Modell zu Vorsegmentierung erhalten und sowohl das Problem wechselnder Topologie, als auch unterschiedlicher Kanteninformation bei verschiedenen Bildgebungsverfahren gelöst.

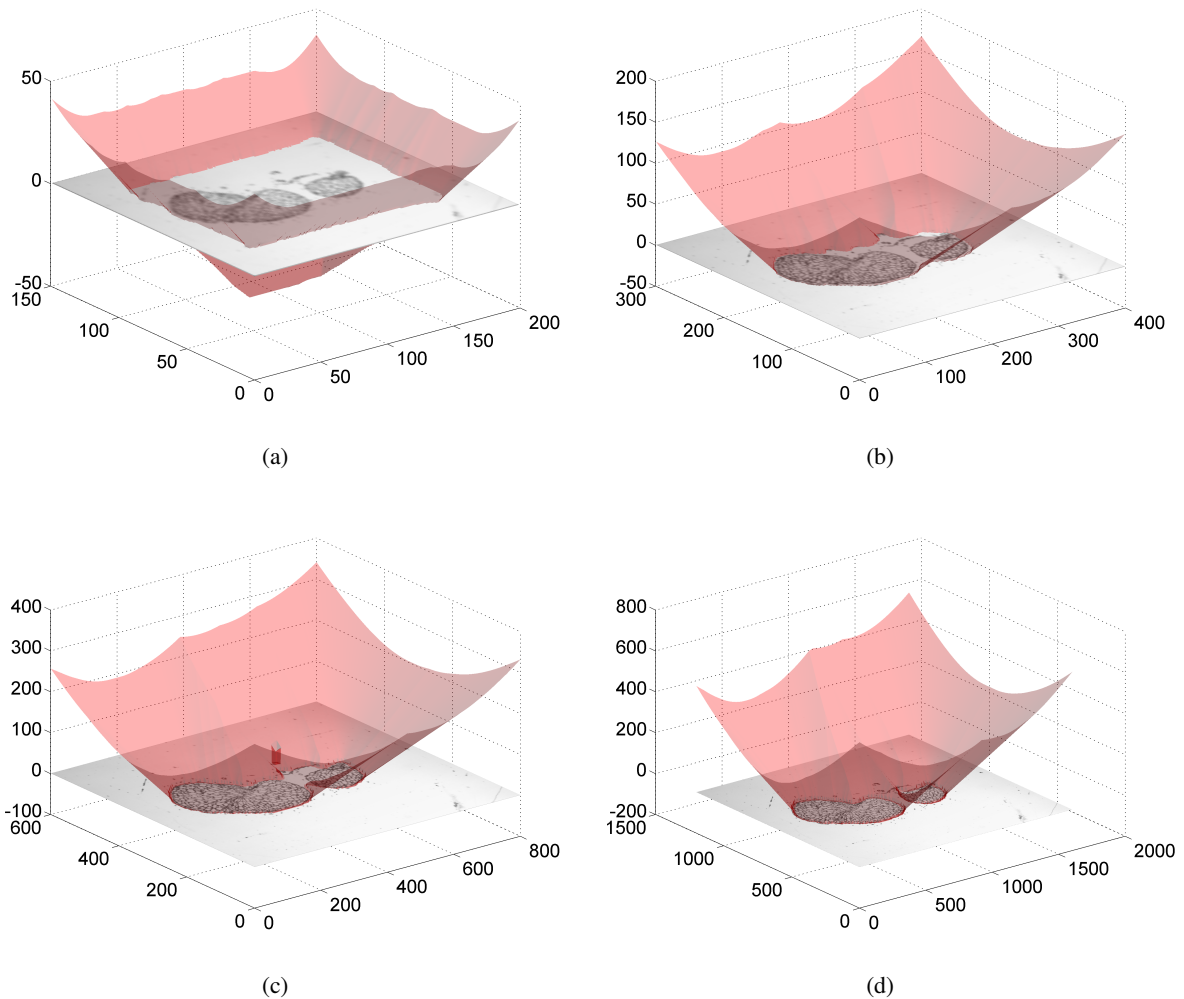


Abbildung 2.10: Entwicklung der *Level-Set* Funktion im Mehrskalensatz an einem typischen histologischen Schnittbild einer *Hordeum* Karyopse (Bildbereichgröße in Pixeln). 2.10a Initiale Kontur auf der Skale $t = 16$ (Abtastung $14.64\mu\text{m}/\text{pixel}$), 2.10b nach 200 Iterationen, Skale $t = 4$ ($7.32\mu\text{m}/\text{pixel}$), 2.10c nach 50 Iterationen Skale $t=2$ ($3.66\mu\text{m}/\text{pixel}$), finale Kontur 2.10d nach 300 Iterationen total, Skale $t=1$, ($1.83\mu\text{m}/\text{pixel}$; 44.3 sek. total

2.4 Geometrische Standardisierung

Die Verarbeitung von Objekt(-aufnahmen) unabhängig von ihrer geometrischen Orientierung, das heißt der Ausgleich von starren (affinen) Transformationen wie Rotationen, Translation und Scherung, und die damit verbundene Theorie der *Momentinvarianzen* besitzt in der maschinellen Nachbildung von visuellen Systemen große Bedeutung. Das Problem der beliebigen Anordnung von Objekten in Szenen oder Präparaten ist vermutlich allgegenwärtig in unterschiedlichen Anwendungen und schon *früh* bearbeitet worden [HU, 1962, TEAGUE, 1980, TEH und CHIN, 1988, FLUSSER und SUK, 1993]. Auch bei der Akquisition von Bildern in biologischen oder medizinischen Anwendungen liegt fast immer eine uneinheitliche Orientierung der aufgenommenen Objekte vor, die zunächst vor einer weiteren Verarbeitung

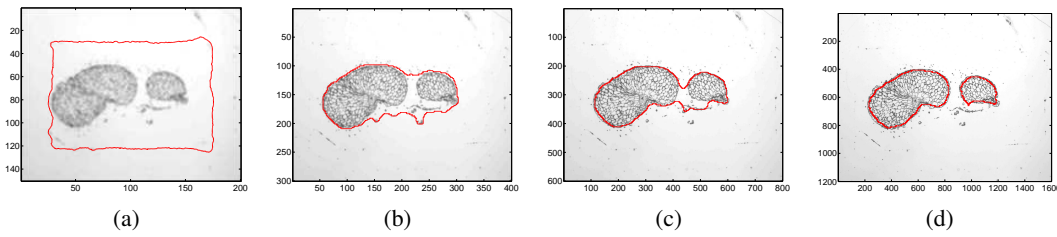


Abbildung 2.11: Entwicklung der Kontur $\phi = 0$ aus Abbildung 2.10 hinzu zur Umrandung der *Regions of Interest* (histologischer Schnitt im Nabenbereich einer einzelnen *Hordeum* Karyopse.)

standardisiert werden muss, wie beispielsweise in [ALPERT et al., 1990, MAURER und FITZPATRICK, 1993] beschrieben.

Bei den in dieser Arbeit betrachteten Anwendungen resultieren diese Inhomogenitäten zunächst aus einer manuellen Präparation mikroskopischer Objekte, da automatisierte Lösungen für die entsprechenden Präparationstechniken noch nicht flächendeckend verfügbar sind. Die Korrektur solcher Störungen durch den Präparator selbst ist aus Zeit- und Genauigkeitsgründen nicht akzeptabel. Das daraus entstehende Problem der Rekonstruktion ganzer zusammenhängender Bildstapel und entsprechender, algorithmischer Ansätze wird detailliert in den nachfolgenden Teilen zur Bildregistrierung und Rekonstruktion betrachtet. Die geometrische Transformation und Standardisierung von einzelnen Bildern wird hier zunächst im Sinne einer Normalisierung und Vorverarbeitung betrachtet.

2.4.1 Momente

Entsprechend der stochastischen Bedeutung von *Momenten* (vgl. [PAPOULIS und PILLAI, 2002]) als Kenngrößen von Verteilungsfunktionen existieren Momente in der Bildverarbeitung zur Charakterisierung der Grauwertverteilung der Bildfunktion I .

Aus der allgemeinen Form des Erwartungswerts einer Zufallsvariable I für eine angenommene Dichtefunktion f

$$\mathbb{E}_I[f] := \frac{\int f(\mathbf{x})I(\mathbf{x})d\mathbf{x}}{\int I(\mathbf{x})d\mathbf{x}} \quad (2.45)$$

ergibt sich für die Annahme (zweidimensionaler) gaußscher Wahrscheinlichkeitsdichten

$$G := \{g_{A,b} : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbf{R} \mid A \in \mathbb{R}^{2 \times 2}, |A| > 0, b\} \quad (2.46)$$

mit den Dichtefunktionen

$$g_{A,b}(\mathbf{x}) := \frac{1}{2\pi\sqrt{|A|}} e^{(\mathbf{x}-b)^T A^{-1}(\mathbf{x}-b)} \quad (2.47)$$

für die Maximierung des Erwartungswerts (*Maximum-Likelihood* Methode)

$$\mathbb{E}_I[\log g_{A,b}] = -\log(2\pi) - \log(|A|) - \mathbb{E}_I\left[\frac{1}{2}(\mathbf{x}-b)^T A^{-1}(\mathbf{x}-b)\right] \quad (2.48)$$

bezüglich b, A , das heißt durch Setzen von $\frac{\partial}{\partial b} \mathbb{E}_I = 0$ und $\frac{\partial}{\partial A} \mathbb{E}_I = 0$ gerade Mittelwert $b = \bar{x}$ und Kovarianz als $A = \text{Cov}(I)$ als Lösung.

Mittels der Definition von Momenten $m_{i,j}$

$$m_{ij} := \int_{\Omega} x_1^i x_2^j I(x_1, x_2) dx_1 dx_2 \quad i, j \in \mathbb{N} \quad (2.49)$$

beziehungsweise werden

$$\bar{\mathbf{x}} := \frac{1}{m_{00}} (m_{10}, m_{01})^T \quad \hat{m}_{ij} := \int_{\Omega} \left[(x_1, x_2)^T - \bar{\mathbf{x}} \right] I(x_1, x_2) dx_1 dx_2 \quad (2.50)$$

für die Schätzung der Parameter erhalten

$$\text{Cov}(I) := \begin{pmatrix} \hat{m}_{20} & \hat{m}_{11} \\ \hat{m}_{11} & \hat{m}_{02} \end{pmatrix}. \quad (2.51)$$

Äquivalent der Definition des Inertialtensors fester Körper in der Mechanik, erfolgt die Bestimmung der Kovarianzmatrix als Annäherung der Intensitätsverteilung in Bildern mittels Momenten. Die geschätzten Parameter der Verteilung dienen der Beschreibung der Objekte des Bildes, das heißt Position und Orientierung der Grauwerte im Bildbereich Ω , welche es für die weitere Verarbeitung zu standardisieren gilt.

2.4.2 Schätzung und Transformation

Als symmetrische Matrix mit $|A| > 0$ gestattet die multivariate Kovarianz die Eigenwertzerlegung, das heißt Überführung in die Diagonalf orm ihrer Eigenwerte durch die zugehörigen Eigenvektoren [GOLUB und VAN LOAN, 1983]

$$\text{Cov}(I) = D(\rho^I) \Sigma^I D(-\rho^I). \quad (2.52)$$

Die Rotationsmatrix D besteht aus den orthogonalen Eigenvektoren in Richtung der Hauptachsen: Geometrisch kommt D einer Rotation relativ zu den Achsen des Koordinatensystems entsprechend der Momentendefinition (2.50) gleich:

$$D(\rho) := \begin{pmatrix} \cos \rho & -\sin \rho \\ \sin \rho & \cos \rho \end{pmatrix}, \quad \Sigma := \begin{pmatrix} \sigma_1^2 & 0 \\ 0 & \sigma_2^2 \end{pmatrix} \quad (2.53)$$

Die beiden Hauptachsen werden von $(\cos \rho \sin \rho)^T$ und $(-\sin \rho \cos \rho)^T$ aufgespannt und schneiden in $\bar{\mathbf{x}}$. Wobei die Eigenwerte $\text{spur}(\Sigma)$ gerade die Standardabweichung der Projektion auf die Richtung der Eigenvektoren, also die Länge der Hauptachsen darstellen. Durch die fünf Merkmale

$$(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \sigma_1, \sigma_2, \rho) \quad (2.54)$$

wird also eine Beschreibung der Geometrie des Bildes erhalten. Die für die geometrische Standardisierung der Bilder gesuchte affine Abbildung $\phi(\mathbf{x}) : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}^2$ der Bildpunkte

$$\phi(\mathbf{x}) = \mathbf{A}\mathbf{x} + \mathbf{b} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \end{pmatrix}^T \quad (2.55)$$

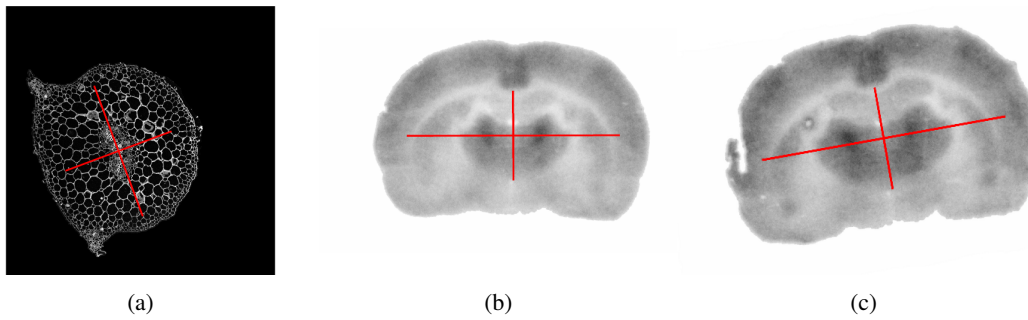


Abbildung 2.12: Standardisierung der Geometrien anhand der Hauptachsen und Schwerpunkte verschiedener Bildmodalitäten: 2.12a Konfokale Aufnahme eines seriellen Dünnschnittes (*Nicotiana benthamiana*), 2.12b und 2.12c I_{23} und I_{30} eines Autoradiogramm bildstapels eines Mäusehirns.

zur Transformation der Bildfunktion $I^*(\mathbf{x}) := I(A\mathbf{x} + b)$, so dass für Bilder I_i, I_j $\bar{\mathbf{x}}_i^* = \bar{\mathbf{x}}_j^*$ und $\text{Cov}(I_i^*) = \text{Cov}^{-1}(I_j^*)$ gilt, wird durch die Singulärwertzerlegung

$$A := D_i \Sigma_i U D_j \Sigma_j^T \quad b := \bar{\mathbf{x}}_i - A \bar{\mathbf{x}}_j \quad (2.56)$$

erhalten.

Die so gewonnene Abbildung ist allerdings nicht eindeutig, durch die Symmetrie der Kovarianzen können lediglich $1/2d(d+1)$ Parameter bestimmt werden [SCHORMANN und ZILLES, 1997]. Dadurch ist die Drehrichtung nicht eindeutig bestimmt, was jedoch durch Sortierung der Eigenvektoren hin auf eine minimale Rotation in der Praxis behoben werden kann. Der Fall identischer Randverteilungen von I mit entsprechend singulären, nicht eigenwertzerlegbaren Kovarianzen kann in der Praxis ausgeschlossen werden. In der Praxis problematisch ist allerdings die Invarianz gegenüber *Bildscherungen*, die in Gleichung 2.56 durch die Matrix U mit dem Scherwinkel α beziehungsweise $U(\alpha)$ dargestellt wird. Scherungen müssen daher aus der Geometrie der Bildaufnahme ausgeschlossen beziehungsweise gesondert adressiert werden [SCHORMANN und ZILLES, 1997, SCHORMANN et al., 1997].

2.5 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieses Abschnittes war es, die für die weitere Verarbeitung notwendige Bildqualität sicherzustellen und die der Bildaufnahme inhärenten Fehler und Inhomogenitäten zu entfernen oder auszugleichen.

Konkret wurden die aus der Mikroskopsoftware erhaltenen 14-Bit Farbbilder in eine reduzierte 8-Bit Darstellung überführt und Belichtungsvarianzen weitestgehend ausgeglichen. Durch Analyse der Verteilung im Farbraum wurden geringe Farbinformationen in den vorliegenden Bildern festgestellt, weswegen von der Verarbeitung von Farbinformation abgesehen wurde, und die für weitere Verarbeitungsschritte vorteilhafte, skalare Bildrepräsentation aus der Linearkombination der RGB-Werte zur $Y'AB$ -Darstellung und der *Luma*-Komponente gebildet.

Für die notwendige Rekonstruktion stellt besonders die Entfernung des Bildhintergrunds und der darin enthaltenen Artefakte eine wichtige Voraussetzung dar. Durch die Einbettung der ROI in einen uniformen Hintergrund werden die im folgenden Kapitel behandelte *Registrierung* und Rekonstruktion der

Bildstapel sowohl wesentlich robuster, durch Entfernung der im Hintergrund vorliegenden Störungen, als auch numerisch effizienter durch die Einschränkung des für eine Rekonstruktion relevanten Bildbereichs. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: Durch Kantendetektion und morphologische Filteroperatoren in Verbindung mit einer nachgelagerten einfachen Objektklassifikation wird ein effizientes Verfahren erhalten. Dieser „konstruktive“ Ansatz mehrerer spezifisch parametrisierter Schritte hat sich besonders für die Verarbeitung großer Datensätze mit identischen Charakteristiken als sinnvoll erwiesen, wie beispielsweise den Anhang B beschriebene *Hordeum* Datensatz ($> 5 \cdot 10^6$ Einzelbilder). Daneben lieferte der erweiterten *Level-Set* Ansatz ein geschlossenes Modell für die ROI-Segmentierung zur exakten Objektgrenzenbestimmung. Die Entwicklung der Kontur anhand der globalen Intensitätsverteilungen im gesamten Bild benötigt dabei keine spezifischen Skalenparameter, womit sowohl bei Durchlichtmikrographen (*Hordeum*, *Nicotiana*) als auch bei Konfokalaufnahmen (*Nicotiana*), Autoradiogrammbildern (*Maus*) und NMR-Tomographien⁴ (*Hordeum*) eine sichere Hintergrundsegmentierung erhalten wurde. Die Formulierung von Kontur und -entwicklung als Niveaumenge gestattete hierbei die Berücksichtigung von Topologieänderungen in der Konturentwicklung, die in vorliegenden Datensätzen in Schnittrichtung existieren. Die Implementierung der Konturentwicklung im Mehrskalensatz und Unterabtastung liefert im Vergleich zum herkömmlichen Ansatz dabei wesentlich schnellere Laufzeiten.

Durch die Standardisierung der beliebig im Bildbereich ausgerichteten ROI bzw. Probeobjekte durch momentbasierte Hauptachsentransformation wurde ein erster Schritt in Richtung der dreidimensionalen Rekonstruktion erhalten. Dabei zeigt sich, dass jedoch keine tatsächliche Alignierung der inneren Strukturen erhalten wurde, das heißt die Bestimmung der Momente in einzelnen Bildern für die Rekonstruktion nicht ausreichend ist, und räumlich benachbarte Bilddaten für die Rekonstruktion herangezogen werden müssen. Im folgenden Kapitel wird die Rekonstruktion der Probeobjekte auf der Korrespondenz benachbarter Bildinhalte, und damit eine erste Wiederherstellung des ursprünglich dreidimensionalen Materials vorgestellt. Die in diesem Abschnitt vorgestellten Vorverarbeitungsschritte waren hierfür eine wichtige Voraussetzung.

⁴NMR-Volumen-Daten werden in Kapitel 7 im Rahmen der *intermodalen Registrierung* (s. Abschn. 7.1) behandelt.

2.5 Ergebnisse und Diskussion

Kapitel 3

Registrierung und Rekonstruktion von Bildstapeln

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Systems zur automatischen Erzeugung von strukturellen Gewebemodellen aus zweidimensionalen Schnittbildern und damit die *Rekonstruktion* dreidimensionaler Bildvolumen biologischer Objekte aus Einzelbildern. Die Bilddaten biologischer Präparate müssen dazu so verarbeitet werden, dass im Resultat die physikalische Zerlegung des Objektes aus der Präparation vollständig korrigiert wird und ein intaktes dreidimensionales Bildvolumen mit annähernd isotroper Auflösung erhalten wird. Eine solche Rekonstruktion aus zweidimensionalen Bildern liefert idealerweise dann eine intakte dreidimensionale Struktur für beliebig ausgerichtete Schnitte durch das Bildvolumen, so dass ein dreidimensionales Mikroskopbild mit entsprechend hoher Auflösung aus dem Objekt erhalten wird.

Eine automatische Verarbeitung der Schnittbilder zur Rekonstruktion soll daher vor allem unter Berücksichtigung von zwei Gesichtspunkten betrachtet werden:

- Exakte Wiederherstellung von räumlichen Strukturen in Intensitätsvolumen
- Robustheit/Fehlertoleranz, Reproduzierbarkeit und geringe numerische Komplexität.

Im Folgenden werden diese Anforderungen spezifiziert, mathematisch gefasst und zwei Lösungsansätze für das Rekonstruktionsproblem präsentiert.

3.1 Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder aus seriellen Schnittbildern

Durch die Präparation und die Digitalisierung geht die dreidimensionale Kohärenz der Bildinhalte in den konsekutiven Schnittbildern verloren, das heißt, nach der Bildaufnahme und Vorverarbeitung liegen zunächst unalignierte Bildstapel vor. Dieser Nachteil ist allen Ansätzen der Bildgebung aus seriellen Schnitten gemeinsam, die Vorteile von zweidimensionalen Aufnahmen, etwa der höheren räumlichen Auflösung der zweidimensionalen Mikroskopbilder, werden gewissermaßen mit dem Nachteil des Verlustes der räumlichen Struktur erkaufte. Die Wiederherstellung dieser Strukturen in Schnittrichtung stellt daher ein grundlegendes Problem dar, welches für die Erstellung des dreidimensionalen Bildvolumens

3.1 Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder aus seriellen Schnittbildern

gelöst werden muss. Da mechanisch-technische Lösungen nicht verfügbar sind¹ und die erhaltenen Bildstapel typischerweise, wie auch bei den in dieser Arbeit betrachteten Datensätzen, mehrere hundert bis tausende Schnittbilder umfassen, stellt die Rekonstruktion ein komplexes Problem in der Verarbeitung der Serienschneitbildgebung dar. Darüber hinaus liegen in den akquirierten Schnittbildern zudem meist die genannten Artefakte oder Fehlerquellen vor (vgl. Abschnitt 2.3), die sich aus den Unsicherheiten der manuellen Präparation und der allgemein bei biologischen Proben vorliegenden Variabilität ergeben; bei der Rekonstruktion gesamter Bilderstapel ist dann für diese Bildinhalte keine Korrespondenz mehr gegeben, wodurch der „Gesamtzusammenhang“ der Daten erheblich gestört sein kann.

Die Serienschneitbildgebung und -rekonstruktion ist tatsächlich als ältestes Verfahren zur Akquisition von dreidimensionalen Mikroskopiebildern zu betrachten und damit schon lange vor der Verfügbarkeit digitaler Bilder und Verarbeitung adressiert worden [BORN, 1883]. Zur Rekonstruktion digitaler Bild-daten ergeben sich verschiedene Möglichkeiten. Bestehende Ansätze basieren auf *manueller* [FIALA, 2005], *interaktiver* [DERCKSEN et al., 2008] und *vollautomatischer* [OURSELIN et al., 2001, SCHMITT et al., 2006] Verarbeitung.

Für ein im Rahmen dieser Arbeit erstelltes automatisches System sind die beiden erstgenannten Möglichkeiten insofern interessant, als sich daraus die Notwendigkeiten für eine gewünschte Fehlertoleranz des Systems ableiten lassen. DERCKSEN und Kollegen beschrieben einen semi-automatischen Ansatz zur Rekonstruktion [DERCKSEN et al., 2008], in dem eine Nutzerschnittstelle zur *Initialisierung* der manuellen Rekonstruktion dient. *Fehlerhafte Ergebnisse* sollen anschließend durch entsprechende Visualisierung von Strukturüberlagerungen vom Nutzer erkannt und korrigiert werden – diese beiden Punkte sollen in dem im folgenden beschriebenen Ansatz wieder aufgegriffen werden.

Bestehende Ansätze zur automatischen Rekonstruktion aus Bildstapeln, wie etwa [OURSELIN et al., 2001], sind teilweise stark an die bearbeiteten Datensätze angepasste Verfahren, beziehungsweise nutzen zur Rekonstruktion zusätzliche nativ dreidimensionale Daten etwa aus vorhergehenden tomographischen Aufnahmen. Der von SCHMITT ET AL. beschriebene Algorithmus zur Rekonstruktion von Schnittbilddaten basiert auf einem iterativen Zusammensetzen einzelner Schnitte durch Optimierung einer Zielfunktion; worauf auch die hier beschriebene Methode basiert. Dabei wird jedoch keine Korrektur von fehlerhaften (Teil-)Ergebnissen vorgenommen; durch die iterative Verarbeitung werden dabei jedoch Fehler durch den gesamten Datensatz propagiert, und auch kleinere Abweichungen führen in aller Regel zu insgesamt inakzeptablen Ergebnissen.

In den folgenden Abschnitten wird daher genauer auf die Methodik der Rekonstruktion eingegangen. Um die genannten Probleme zu lösen, werden zwei Ansätze zur Rekonstruktion großer Bildstapel vorgestellt, die insbesondere robust gegenüber Bildstörungen sind und eine automatische Korrektur, beziehungsweise Rückweisung fehlerhafter Zwischenergebnisse realisieren. Die Leistungsfähigkeit der Verfahren zur Rekonstruktion soll anhand mehrerer Datensätze diskutiert, und dabei besonders die Fehlertoleranz gegenüber Bildstörungen untersucht werden, welche nicht durch die vorangestellte Vorverarbeitung eliminiert werden können - bei den verarbeiteten Datenmengen von mehreren zehntausend Schnittbildern ist eine vollständig ohne Interaktion und menschliche Qualitätskontrolle, eben automatische Lösung wünschenswert.

¹Die sogenannten *block-face* Methoden sollen hier nicht zu den Serienschneitverfahren gezählt werden, da die genannten Vorteile, etwa bezüglich Auflösung für Durchlichtaufnahmen, dort nicht gelten.

3.2 Das Registrierungsproblem

Ein grundlegendes Problem in der digitalen Bildverarbeitung und dem maschinellen Sehen ist das Finden von Korrespondenzen in Inhalten unterschiedlicher Bilder. Das heißt, die algorithmische Bestimmung von Punkten, Flächen oder Volumina, die in den aufgenommenen Szenen oder in bio-medizinischen Präparaten tatsächlich identische Strukturen darstellen, die im Koordinatensystem aufgenommener Bilder jedoch, gewollt oder ungewollt, unterschiedlich, das heißt *transformiert* abgebildet sind. Dies können sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedlich aufgenommene Bilder und Bildsequenzen, Aufnahmen unterschiedlicher Instanzen einer Klasse oder auch Aufnahmen verschiedener Sensoren (Bildgebungsmodalitäten) sein. Die algorithmische Bestimmung und evt. der Ausgleich solcher Transformationen oder Verschiebungen wird im Forschungsfeld der *Bildregistrierung* bearbeitet. Entsprechend der grundlegenden Bedeutung der Problemstellung und der obigen Aufzählung unterschiedlicher Konstellationen ist im Bereich Registrierung eine extensive Methodik entwickelt worden – was eventuell auch in gewissem Maße auf die Unbestimmtheit des Begriffes der *Korrespondenz* zurückzuführen ist. Im Rahmen der Arbeit bildet die Bildregistrierung einen zentralen Aspekt in dem entwickelten System zur automatischen Modellerzeugung, der später auch im Kapitel zur automatischen Gewebeerkennung wieder aufgegriffen wird. Im nachfolgenden Abschnitt soll eine kurze Exposition bzw. Taxonomie der unterschiedlichen Methoden der Bildregistrierung versucht werden, um anschließend den hier entwickelten Ansatz zur Registrierung vorzustellen.

Allen Ansätzen zur Registrierung liegt zunächst ein bestimmtes Transformationsmodell zugrunde, mit dem die realen oder physikalischen Änderungen zwischen den Bildaufnahmen angenähert und damit die Beziehung zwischen unterschiedlichen Bildinhalten bestimmt werden soll. Für die Transformation zwischen korrespondierenden Bereichen sind, je nach Applikation, zunächst beliebige Funktionen bestimmbar, die zwischen Bildbereichen $\Omega(I_1)$ und $\Omega(I_2)$ abbilden. Dies können, wie in Abschnitt 2.2, einfache Translationen in der Ebene, lineare affine oder projektive Abbildungen, oder auch parametrische, nicht-lineare Funktionen, wie Spline-, Polynomial- und radiale Basisfunktionen mit entsprechenden Transformationsparametern sein [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003]. Nicht-parametrische Transformationsfunktionen oder sogenannte *Freiformdeformationen* ordnen allen Bildpunkten direkt einen Verschiebungsvektor zu, definieren also ein Vektorfeld über dem gesamten Bildbereich. Hier müssen zusätzliche Funktionen definiert werden, die für diese Transformationen die gewünschten Eigenschaften, beispielsweise ein physikalisches Deformationsverhalten [BROIT, 1981, BRO-NIELSEN und GRAMKOW, 1996, FISCHER und MODERSITZKI, 2002], sicherstellen. Eine einordnende Übersicht verschiedener Ansätze und Anwendungen wird in [BROWN, 1992] und in [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003] vorgeschlagen.

Das eigentliche Registrierungsproblem lautet nun, für ein bestimmtes Transformationsmodell entsprechende Transformationsparameter aus den vorliegenden Bildinhalten zu ermitteln: Die Bestimmung oder Schätzung soll für eine definierte Transformationsfunktion die Korrespondenz im Sinne einer Güte- oder Zielfunktion maximieren. Zur Parameterschätzung sind, je nach benutzten Transformationen, unterschiedlichste Ansätze vorgeschlagen worden (vgl. [BROWN, 1992, ZITOVÁ und FLUSSER, 2003]). Diese können sowohl direkt auf Basis der Intensitätswerte der Bildfunktion, auf der Korrespondenz von

extrahierten Merkmalen, sogenannten *Landmarken*², oder auch im Frequenzraum wie in Abschnitt 2.2 erfolgen.

Für eine Transformation $\mathcal{T}_\varphi(\mathbf{x}) : \mathbb{R}^d \mapsto \mathbb{R}^d$ mit Parametern φ besteht die Schätzung aus einer Optimierung einer Zielfunktion $E : I(d)^2 \mapsto \mathbb{R}$ über die Transformationsparameter

$$\varphi^* = \operatorname{argmax}_{\varphi} E(I_1, I_2, \mathcal{T}(\varphi)) \quad (3.1)$$

anhand derer die Güte der Übereinstimmung quantifiziert wird; die Zielfunktion wird also für die Korrespondenz beziehungsweise eine *Übereinstimmung* der Bildinhalte maximiert, oder minimiert für eine Funktion der *Abstände*.

Anhand möglicher Zielfunktionen lassen sich prinzipiell zwei Klassen von Registrierungsansätzen unterscheiden:

- *merkmalsbasierte* Registrierung durch Punktkorrespondenzen
- *merkmalslose* Registrierung durch Intensitätskorrespondenzen.

Erstgenannte Verfahren abstrahieren von der eigentlich vorliegenden Bildfunktion, indem *Merkmale* in Form von Punktkoordinaten aus den unterschiedlichen Bildern extrahiert werden. Diese werden paarweise zugeordnet und mittels einer Distanzfunktion die Korrespondenz quantifiziert, dabei liegt durch die, aus einer Punktzuordnung verfügbare Distanzinformation für Ausdruck 3.1 ein konvexes Optimierungsproblem vor [MODERSITZKI, 2004].

Die automatische Extraktion von geeigneten Merkmalen für die Registrierung ist Gegenstand der Forschung. Neben der automatischen Erkennung von Korrespondenzpunkten besitzen auch technisch eingebrachte Markerpunkte (*fiducial markers*) und manuelle Landmarkendefinitionen große Bedeutung, besonders in medizinischen Anwendungen [WEST et al., 2001], was vermutlich die unten beschriebene Schwierigkeiten der Merkmalsextraktion verdeutlicht. Automatisch werden Merkmale im Allgemeinen durch die Erkennung von einfachen Strukturen wie etwa *Kanten* oder *Ecken* im Bild ermittelt. Dazu kommen Operatoren wie etwa die CANNY-Kantendetektion [CANNY, 1986] (s. Abschn. 2.3.2) und sogenannte *Interest*-Operatoren zur Detektion markanter Punkte, wie etwa der HARRIS-Operator [HARRIS und STEPHENS, 1988], SIFT-Merkmale nach LOWE [LOWE, 1999] oder stark laufzeitoptimierte Algorithmen, wie der FAST-Operator [ROSTEN und DRUMMOND, 2006] zum Einsatz. Komplexere Merkmale, wie ganze Linienzüge oder geometrische Figuren, bedeuten allgemein nicht nur eine aufwendigere Detektionsphase, sondern auch spezielle Abstandsmaße zur Bestimmung der Übereinstimmung; eine Aufzählung bestehender Ansätze findet sich beispielsweise in [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003].

Da auch bei sehr robusten Merkmalsdetektoren falsch detektierte und lokalisierte Merkmalspunkte meist nicht mit ausreichender Sicherheit ausgeschlossen werden können, haben für merkmalsbasierte Ansätze Verfahren zur gezielten Auswahl verlässlicher Merkmale Bedeutung erlangt. Der RANSAC-Algorithmus (*Random Sample Consensus*) nach FISCHER und BOLLES [FISCHLER und BOLLES, 1981] kann dabei als das grundlegende Verfahren zum Ausschluss von falsch detektierten Merkmalspunkten in Re-

²Der gebrauchte englische Begriff für solche Registrierungsfeatures lautet „landmarks“, was begriffsgeschichtlich wahrscheinlich aus der Fernerkundung und Geographie beziehungsweise der Registrierung von Luftaufnahmen herrührt.

gistrierungsproblemen gelten, für das zahlreiche Erweiterungen vorgeschlagen wurden. Für die mittels des Operators \mathbf{F} bestimmte Menge (vermuteter) korrespondierender Punktpaare in Bildern R, T

$$\mathcal{M} := \{(m_i, n_j) | m_i \in \mathbf{F}(R), n_j \in \mathbf{F}(T)\} \quad (3.2)$$

soll dabei jene Teilmenge ausgewählt werden, welche die Gesamtkorrespondenz innerhalb des Transformationsmodells maximiert. Der stochastische RANSAC-Ansatz wählt dazu zufällige Teilmengen aus \mathcal{M} und bestimmt die Güte der damit geschätzten Transformation mit einem geeigneten Qualitätsmaß. Auf Basis der bestbewerteten Teilmenge werden dann die letztendlich angewandten Transformationsparameter geschätzt. Das heißt gleichzeitig, dass der Registrierungsprozess für eine sichere Selektion von Fehlern vollständig wiederholt werden muss. Hybride Ansätze, vor allem aus dem Bereich medizinischer Anwendungen, zielen auf die Korrektur von detektierten Merkmalspunkten beziehungsweise Unterstützung durch die Betrachtung der lokalen Bildfunktion an detektierten Punkten. ROHR untersucht in [ROHR, 2001] und Referenzen darin Lokalisierungseigenschaften von Detektoren und Möglichkeiten zur Berücksichtigung von Unsicherheiten, wobei dazu manuell definierte Punkte eingesetzt werden und im Transformationsmodell zusätzlich die Bildintensitäten berücksichtigt werden. Große lokale Bildunterschiede sollen beispielsweise durch das Setzen von Landmarken in diesen Bereichen besser registriert werden [WÖRZ und ROHR, 2007], wobei entsprechende Punkte manuell definiert werden.

Merkmalsfreie Verfahren lassen die Extraktion von Merkmalen aus und maximieren die Bildkorrespondenz direkt anhand der Intensitätswerte der Bildfunktion. Dabei basieren gegebene Funktionen auf dem aggregierten Vergleich der Intensitätswerte an superpositionierten Bildpunkten im gesamten Bildbereich oder Teilen

$$\varphi^* = \operatorname{argmax}_{\varphi} \int_{\Omega} E(I_1, I_2, \mathcal{T}(\varphi)) dx \quad (3.3)$$

und werden daher allgemein auch als *Bildmetriken* bezeichnet. Unabhängig von der tatsächlich verwendeten Metrik ist bei merkmalslosen Ansätzen die Unsicherheit fehlerhaft extrahierter Merkmale zunächst vermieden, durch die fehlende geometrische Information in Form von Punktzuordnungen aber auch ein komplexeres Problem für die Optimierung der Transformationsparameter gegeben.

Merkmalslose Verfahren, die auf Repräsentation des Bildes im Frequenzraum als fouriertransformiertes Signal basieren, wie in Abschnitt 2.2 die Phasenkorrelationsmethode, benötigen dabei zunächst keine numerische Optimierung einer Zielfunktion. Über das ursprüngliche PCM-Verfahren [DE CASTRO und MORANDI, 1987] hinausgehend sind Erweiterungen vorgeschlagen worden, um zusätzlich Skalierungen und Transformationen mit festem Rotationszentrum berücksichtigen zu können [CHEN et al., 1994].

Mittels iterativer Verfahren können allgemein beliebige Transformationsmodelle für unterschiedliche Bildmetriken hin auf optimale Parameter bestimmt werden, unabhängig davon, ob eine perfekte Übereinstimmung tatsächlich vorliegt. Zur Korrespondenzbestimmung kommen dabei *abstands-* oder *ähnlichkeitsbasierte* Metriken als Zielfunktion der Optimierung in Frage. Wenn zwischen Bildern ähnliche Grauwertverteilungen zu erwarten, das heißt die absoluten Intensitätswerte aussagekräftig sind, können mittlere oder summierte quadratische Abstände der jeweiligen Bildpunktswerte als übliche Maße benutzt werden (*summed squared distance*, SSD; *mean squared error*, MSE) [BROWN, 1992]; für binäre oder indexierte Bilder können, als elementares Abstandsmaß, die Kardinalitäten identischer Bildpunktswerte (als sog. *Overlap-Index*) als Bildmetrik dienen.

Ein direkter Intensitätsvergleich ist nicht mehr als Korrespondenzmaß geeignet, wenn unterschiedliche Grauwertverteilungen vorliegen, beispielsweise bei unterschiedlicher Beleuchtung von Bildern. Korrelationsbasierte Metriken³ dienen daher oft als geeignete Abstandsmaße, wenn unterschiedliche Bilder zwar mit gleichen Sensoren, jedoch mit unterschiedlichen äußeren Bedingungen oder Parametern aufgenommen werden [HAJNAL et al., 2001]. Die durch die Autokorrelation beider Bilder normalisierte *Kreuzkorrelation* (vgl. [GONZALEZ und WOODS, 2007]) bildet dann ein gegenüber multiplikativen Faktoren robustes Abstandsmaß für eine Registrierung.

Über korrelative Zusammenhänge in Intensitätswerten hinausgehende Modelle für Metriken zielen auf die Registrierung von Bildern unterschiedlicher Sensoren oder Bildgebungsmodalitäten: Dort liefern identische physikalische Strukturen systematisch unterschiedliche Intensitätsverteilungen. Solche generalisierten Zusammenhänge können durch statistische Beschreibungen, wie beispielsweise der *Kreuzinformation* (*mutual information*, MI [VIOLA und WELLS III, 1997, MATTES et al., 2001]), oder durch Regressionsmodelle (s. Kapitel 7) als Bildmetrik gefasst werden, um damit, etwa in medizinischen Anwendungen (s. Referenzen in [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003] und Kapitel 7), unterschiedliche Bildmodalitäten zu registrieren.

Für die Rekonstruktion dreidimensionaler Bilder aus Serienschnitten eignen sich merkmalslose, iterative Verfahren besonders aus drei Gründen:

- Merkmale können nicht sicher detektiert werden, da typischerweise morphologische und qualitative Varianzen biologischer Präparate vorliegen.
- Sub-Pixel genaue Optimierung einer Zielfunktion ermöglicht die Registrierung bei fehlender, perfekter Übereinstimmung, Fehler werden durch die Daten propagiert.
- Eine iterative Parametersuche ermöglicht eine automatische Fehlertoleranz anhand des Verhaltens der Zielfunktion, während eine manuelle Interaktion oder Korrektur möglich ist.

Das Registrierungsproblem für die Rekonstruktion von Bildstapeln $\mathcal{I} = (I_1, \dots, I_m)$ aus m Schnittbildern lautet

$$\Phi^* = \underset{\Phi}{\operatorname{argmin}} \mathcal{D}(\mathcal{I} \circ \Phi) := \sum_{i \in \{1, \dots, m\}} \int_{\Omega} D(I_i \circ \varphi_i, I_{\nu(i)} \circ \varphi_{\nu(i)}) d\mathbf{x} \quad (3.4)$$

das heißt, es werden Transformationsparameter $\Phi := (\varphi_1, \dots, \varphi_m)^{top}$, $\varphi_i(\mathbf{x}) : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}^2$ gesucht, welche den Gesamtabstand *benachbarter* Bilder minimieren. Gleichung 3.4 ist für eine direkte Optimierung, das heißt für eine gleichzeitige Optimierung aller Transformationsparameter zu *instabil*, und muss daher auf eine spezifische Nachbarschaft, etwa $\nu(i) = i + 1$, eingeschränkt, das heißt als sequentielles Problem aufgefasst werden. Neben der erwähnten Problematik der Fehlerfortpflanzung durch die sequentielle Minimierung ergibt sich davon unabhängig ein grundsätzliches Problem der absoluten Orientierung, welche Bilder a priori fix gehalten werden, um die optimale Transformation des gesamten Stapels zu bestimmen. Als Transformationsmodell zur Korrektur von beliebig angeordneten Einzelschnitten werden zunächst affine Abbildungen $\mathbf{x}' = T(\mathbf{x}) = A\mathbf{x} + b$, $\det A > 0$ zugrunde gelegt. Das Transformationsmodell wird

³Mit einer korrelationsbasierten *Metrik* als numerische optimierte Zielfunktion, in Abgrenzung zur *Matched-Filter* Korrelationsmethode als äquivalent der Phasenkorrelationsmethode im Ortsraum.

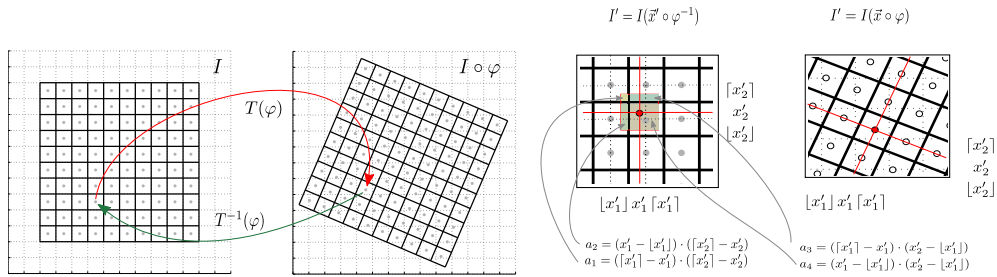


Abbildung 3.1: Realisierung der Bildtransformation auf diskreten Punktgittern: Durch die Verwendung der inversen Transformation werden die Interpolationspunkte in einem regelmäßigen Koordinatengitter bestimmt.

für die Minimierung von Gleichung 3.4 entsprechend parametrisiert als $T(\varphi)$, $\varphi = [\theta, \mathbf{t}, \mathbf{c}]$, $\theta \in [-\pi, \pi]$, $\mathbf{t}, \mathbf{c} \in \mathbb{R}^2$

$$\begin{pmatrix} x'_1 \\ x'_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix} (\mathbf{x} - \mathbf{c}) + (\mathbf{t} + \mathbf{c}). \quad (3.5)$$

Dabei wird das Rotationszentrum \mathbf{c} als unabhängige Variable mit in die Optimierung aufgenommen, um das Konvergenzverhalten zu verbessern⁴.

In der praktischen Anwendung werden durch die Transformation $\mathbf{x} \circ \varphi$ Bildpunkte von ganzzahligen Gitterkoordinaten auf kontinuierliche Werte abgebildet. An den Bildpunkten der neuen, transformierten Bildfunktion müssen daher die Intensitätswerte an den ganzzahligen Bildpunkten interpoliert werden. Dabei liegen jedoch die vorhandenen, transformierten Intensitäten nun nicht mehr auf einem regelmäßigen Punktgitter vor, was die Interpolation erschwert. Da Bildtransformationen invertierbare Abbildungen mit $T^{-1}(\varphi) := T(\varphi^{-1})$ sind, wird das Problem daher durch Ausnutzung der inversen Transformation oder der sogenannten *Rückwärtstransformation*⁵ umgangen. Formal wird für die Berechnung der neuen Intensitätswerte daher von der *Langrangedarstellung* $I' = I(\mathbf{x} \circ \varphi)$ in die äquivalente *Eulersche Darstellung* $I' = I(\mathbf{x}' \circ \varphi^{-1})$ übergegangen, womit die, für die Interpolation nötigen Nachbarpunkte direkt dem ursprünglichen Koordinatengitter entnommen werden können. Für die numerische Interpolation wird dann beispielsweise ein bilinearer Ansatz

$$I'(\mathbf{x}) := \frac{1}{A} (a_1 I(\lfloor x'_1 \rfloor, \lfloor x'_2 \rfloor) + a_2 I(\lceil x'_1 \rceil, \lfloor x'_2 \rfloor) + a_3 I(\lfloor x'_1 \rfloor, \lceil x'_2 \rceil) + a_4 I(\lceil x'_1 \rceil, \lceil x'_2 \rceil)) \quad (3.6)$$

benutzt um das transformierte Bild zu erhalten (siehe Abbildung 3.1).

3.2.1 Intensitätsbasierte Bildmetrik

Neben dem Transformationsmodell bestimmt vor allem die Zielfunktion in Gleichung 3.4 die Eigenschaften der Registrierung: Geeignete Maße für die Bildkorrespondenz sind zentraler Bestandteil der Lösung und bestimmen auch Optimierungsregime und -verhalten. Die entsprechende Bildmetrik muss den tatsächlichen Zusammenhang der Bildfunktionen abbilden können, der korrelativer oder allgemeiner statistischer Natur sein kann. Die Bildkorrespondenz wird dann anhand von Korrelationskoeffizient

⁴Das Erreichen des globalen Minimums in der Optimierung bei vorliegenden Rotationen ist mit festem Zentrum allgemein durch das Überwinden einer hohen *Energiebarriere* in der Topographie der Kostenfunktion erschwert.

⁵Die im Englischen gebräuchlichen Begriffe sind *forward-* und *backward transform*.

oder Kreuzinformation quantifiziert und entsprechend als Zielfunktion der Transformation optimiert. Komplexität und das Abbildungsverhalten dieser Funktionen bestimmen dabei Ansatz und Konvergenzeigenschaften für die Optimierung.

Ist die Vergleichbarkeit der absoluten Intensitäten durch homogene Intensitätsverteilungen gegeben, wird durch die L_2 -Norm als Summe der quadratischen Abstände (*sum of squared differences*) der Bildpunkte $D^{\text{SSD}} : \text{Img}^2 \rightarrow \mathbb{R}$

$$D^{\text{SSD}}(I_1, I_2) := \|I_2 - I_1\|^2 = \int_{\Omega} (I_2(\mathbf{x}) - I_1(\mathbf{x}))^2 d\mathbf{x} \quad (3.7)$$

eine direkte und numerisch optimale Zielfunktion erhalten. D wird entsprechend für die Optimumsuche der Transformation mit φ parametrisiert

$$D^{\text{SSD}}(I_1, I_2; \varphi) := D^{\text{SSD}}(I_1, I_2 \circ \varphi). \quad (3.8)$$

Der quadratische Ansatz zur Abstandsbestimmung ist vorteilhaft für die numerische Optimierung selbst: Zum einen können die Ableitungen der Zielfunktion ohne die Notwendigkeit von Interpolationsansätzen (s. Abschnitt 7.1) direkt analytisch gefasst werden (s. unten), ferner liefert das quadratische Abstandsmaß damit eine für gerichtete Suchverfahren sinnvolle Schnittstelle, da die Änderung der Transformationsparameter in einem linearen Zusammenhang zur Metrikänderung steht.

3.2.2 Erweiterung der Bildmetrik

Durch den Ansatz einer sequentiellen Registrierung in Gleichung 3.4 werden mögliche Registrierungsfehler während der Rekonstruktion durch den gesamten Datensatz propagiert. Da jeweils nur direkt benachbarte Bilder betrachtet werden, aggregieren dann auch kleinere Bildstörungen und -artefakte zu beträchtlichen Fehlern in der Gesamtkorrespondenz des Datensatzes typischerweise liegen dabei in Schnittrichtung Fehlrotationen vor.

Um den Einfluss von Störungen in Einzelbildern zu reduzieren, muss daher die Beschränkung auf jeweils ein adjazentes Bild zur Korrespondenzbestimmung erweitert werden. Die Erweiterung der Bildmetrik auf mehrere Bildnachbarn ist in erster Linie zur Regularisierung von nicht-linearen Transformationen vorgeschlagen worden ([JU et al., 2006, DERCKSEN et al., 2008]), wobei eine korrekte lineare Transformation als vorgegeben beziehungsweise manuell sichergestellt wird. Vorliegende nicht-lineare Deformationen können so ausgeglichen werden, allerdings werden dabei auch suboptimale, das heißt fehlerhafte lineare Registrierungen lediglich geglättet und verfälschen möglicherweise die tatsächlich vorliegende Morphologie; fehlerhaft alignierte Strukturen können dann nicht korrigiert werden.

Um die Fehlertoleranz innerhalb der eigentlichen Rekonstruktion des Bildstapels zu erhöhen, wird die Bestimmung der Korrespondenz durch die Bildmetrik auf ein gewichtetes Mittel innerhalb von d registrierten Nachbarbildern erweitert, das heißt die Bildmetrik wird für jede Transformation des Bilds d -mal ausgewertet.

$$\Phi^* = \underset{\Phi}{\operatorname{argmin}} \mathcal{D}(\mathcal{I} \circ \Phi) := \sum_{i=1}^m \sum_{j=\max(1, i-d)}^{i-1} \int_{\Omega} w_d(j) D(I_j, I_i \circ \varphi_{(i)}) d\mathbf{x}. \quad (3.9)$$

Der Nachbarschaftsparameter $d > 0$ ist dabei abhängig von der physikalischen Auflösung des Datensatzes, bei näherungsweise isotroper Auflösung des Volumens kann d anhand der Größe der minimal

Tabelle 3.1: Übersicht von Optimierungsverfahren zur Bestimmung der optimalen Transformationsparameter und hier verwendeten Algorithmen (**fett**).

Ansatz	Vorgehen	Algorithmen
Systematische globale Suche	Regelmäßige Abtastung des Parameterraums	<i>Brute-Force</i> Algorithmus
Gerichtete lokale Suche	Ableitungsbasierte und -freie Verfahren	Simplex-Algorithmus , GC-Algorithmus <i>Gauß-Newton-Algorithmen</i>
Heuristische globale Suchstrategien	Genetische Algorithmen, <i>Tunneling</i> -Verfahren	<i>Differential Evolution</i> , <i>STUN</i>

aufgelösten Strukturen bestimmt werden.

Die Wichtungsfaktoren $w_d(j)$ sind monoton fallend und normalisiert in $[1, d]$, so dass für $d = 1$ die ursprüngliche Form 3.4 besteht. Durch eine sigmoide Funktion

$$w(j; d) := \frac{1}{1 - e^{-(j-2d)}} \quad (3.10)$$

wird beispielsweise sichergestellt, dass bei Inkonsistenzen des direkte Nachbarn ausreichend Information durch die übrigen Bilder kompensiert wird, um so die Wahrscheinlichkeit von Fehlregistrierungen als Unstetigkeiten im Verlauf der Bildmetrik über den gesamten Stapel zu reduzieren.

3.2.3 Numerische Optimierung im Transformationsraum

Für die iterative Optimierung der Bildmetrik als Zielfunktion im Raum der Transformationsparameter können zunächst verschiedene Optimierungsverfahren zum Einsatz kommen. Die Topographie der Zielfunktion besitzt meist mehrere lokale Minima beziehungsweise ist meist nicht *glatt*. Das Risiko solcher lokaler Minimumseinstellungen ist besonders bei texturierten Bildinhalten beziehungsweise hoher Entropie in Bildern groß. Durch die Datenvorverarbeitung ist zunächst eine Vorbereitung hin auf die Lösung des Registrierungsproblems hergestellt worden: Erstens werden durch die Hintergrundmaskierung nur tatsächlich relevante Bildpunkte in der Bildmetrik berücksichtigt und zweitens durch standardisierte Hauptachsen eine ungenaue Vortransformation als Startpunkt für die Optimierung vorgegeben.

Tabelle 3.1 enthält eine Übersicht unterschiedlicher Ansätze und Algorithmen für die numerische Optimierung von Bildmetriken. Systematische, regelmäßige Abtastungen des Parameterraums garantieren eine Annäherung des globalen Maximums innerhalb der vorgegebenen Schrittweiten. Da Parameter nicht unabhängig optimiert werden können, liegen bei notwendigen kleinen Schrittweiten, einschränkend hohe Laufzeiten vor. Lokale Suchverfahren garantieren per Definition zunächst nicht das Erreichen des globalen Minimums, bei entsprechender Initialisierung der Parameter ermöglichen diese jedoch eine effiziente, gerichtete Suche und sub-pixel Genauigkeit, intuitive Parameter und Abbruchkriterien und sind daher für die Bildregistrierung bevorzugte Verfahren. Globale Verfahren, wie beispielsweise nicht-deterministische, evolutionäre oder genetische Algorithmen, liefern leistungsfähige Optimierungsalgorithmen, für das vorliegende Problem sind dabei jedoch intransparente Parametrisierung und hohen Iterationszahlen nachteilig.

Für lokale Optimierungsverfahren werden im Allgemeinen ableitungsfreie und Verfahren erster oder höherer Ordnung in den benutzten Ableitungen unterschieden. Der von NELDER und MEADE vorgestellte [NELDER und MEAD, 1965, LAGARIAS et al., 1999] *Downhill-Simplex-Algorithmus*, kann als etabliertes, leistungsfähiges *direct-search* Verfahren gelten, das unempfindlich gegen Unstetigkeiten und verworfene Topographien der Zielfunktion ist. Die lokale Kostenfunktion im d -Dimensionalen wird dabei durch $d + 1$ Punkte dem sogenannten *Simplex* angenähert. Anhand der gefundenen Werte wird das *Simplex* in Richtung niedrigerer Funktionswerte bewegt, wobei anhand der vorliegenden Werte das Simplex *kontrahiert*, *komprimiert* oder *expandiert* wird, um den Suchradius anzupassen (vgl. [PRESS et al., 2007]). Diese adaptive Suche begründet die Robustheit des Verfahrens gegenüber verrauschten Kostenfunktionen, bis zur Konvergenz wird jedoch im Allgemeinen eine *hohe* Iterationszahl benötigt, während das Simplex „amöbenähnlich“ durch den Parameterraum wandert.

Wird neben den Metrikwerten auch der Gradient ∇f das heißt der Vektor der partiellen Ableitungen der Metrikfunktion nach den Transformationsparameter benutzt, kann allgemein eine schnellere Konvergenz in der Optimierung erhalten werden. Gradientenabstiegsverfahren minimieren eine Funktion f anhand der 1. Ableitung in Richtung des steilsten Abstiegs ∇f (*steepest descent*)

$$\mathbf{p}^{i+1} := \mathbf{p}^i - \gamma_i \nabla f(\mathbf{p}_i) \quad (3.11)$$

und der eindimensionalen Minimierung in Richtung des Gradienten $\gamma_i := \min_{\gamma} f(\mathbf{p}_i - \gamma \nabla f(\mathbf{p}^i))$. Die Konvergenz des Gradientenabstiegsverfahrens ist jedoch defizitär: die aus der eindimensionalen Minimierung erhaltenen Vektoren sind zwangsläufig lotrecht zur vorhergehenden Richtung, wodurch unnötig viele Iterationen zur Minimumeinstellung benötigt werden.

Die Berücksichtigung der Richtung aus vorhergehenden Iterationen wird durch die konjugierte Gradienten Methode (*conjugate gradients*, GC) erreicht: Der steilste Abstieg wird zugunsten des zur vorhergehenden Richtungen konjugierten Vektors \mathbf{h}_i , $\mathbf{h}_i \cdot A \cdot \mathbf{h}_j = 0 \forall i \neq j$ verworfen das heißt,

$$\mathbf{p}^{i+1} := \mathbf{p}^i - \gamma_i \mathbf{h}_i \quad (3.12)$$

und $\gamma_i := \min_{\gamma} f(\mathbf{p}_i - \gamma \mathbf{h}_i)$ gesetzt. Für die Aktualisierung der konjugierten Richtung sind verschiedene Ansätze vorgeschlagen worden. In der Praxis hat sich hierbei der Ansatz [POLAK, 1971] von POLAK und RIBIÈRE als robust erwiesen, Verhalten und Varianten werden in [PRESS et al., 2007] untersucht.

Durch das inkrementelle Update von \mathbf{h} wird eine Approximation der Zielfunktion durch die quadratischen Form $f \approx \mathbf{c} - \mathbf{b}\mathbf{x} + \frac{1}{2}\mathbf{x}\mathbf{A}\mathbf{x}$ aufgebaut. Kann die Zielfunktion damit hinreichend genau angenähert werden, erhält man mit dem GC-Verfahren eine lineare Konvergenz (in der Anzahl der Variablen). Ist der quadratische Ansatz ungültig, sind die sukzessiv bestimmten Richtungen nicht konjugiert, schlechtestenfalls wird ein Gradientenabstieg erhalten; die quadratische Approximation ist jedoch in vor allem in der Nähe des Minimums meist gültig und liefert eine signifikante Verbesserung gegenüber dem Gradientenabstieg.

Um die Komplexität je Iteration gering zu halten, sollte die Berechnung der Ableitungen der Kostenfunktion D bezüglich der Transformationsparameter φ nicht durch finite Differenzen, sondern durch die

Algorithmus 2 $\mathbf{p}^* = \text{GCMin}(f, \mathbf{p}_0)$

- 1: $\Delta \mathbf{p}_0 := -\nabla f(\mathbf{p}_0)$
 - 2: $\alpha_0 := \text{argmin}_\alpha f(\mathbf{p}_0 + \alpha \Delta \mathbf{p}_0)$
 - 3: $\mathbf{p}_1 := \mathbf{p}_0 + \alpha_0 \Delta \mathbf{p}_0$
 - 4: **while** ($\|\nabla f(\mathbf{p}^i)\| < \text{Tol} \mid i < \text{maxIter}$) **do**
 - 5: $\Delta \mathbf{p}_i := -\nabla f(\mathbf{p}_i)$
 - 6: //Polak-Ribière Aktualisierung
 - 7: $\beta_i := \frac{\Delta \mathbf{p}_i^\top (\Delta \mathbf{p}_i - \Delta \mathbf{p}_{i-1})}{\Delta \mathbf{p}_{i-1}^\top \Delta \mathbf{p}_{i-1}}$
 - 8: $\mathbf{h}_i := \Delta \mathbf{p}_i + \beta_i \mathbf{h}_{i-1}$
 - 9: $\alpha_i := \text{argmin}_\alpha f(\mathbf{p}_i + \alpha \mathbf{h}_i)$
 - 10: $\mathbf{p}_{i+1} := \mathbf{p}_i + \alpha_i \mathbf{h}_i$
 - 11: **end while**
-

analytische Bestimmung der Ableitungsfunktion gebildet werden.

Durch Anwendung der Kettenregel für den quadratischen Abstand als Bildmetrik ergibt sich

$$\frac{\partial f(\mathbf{p})}{\partial \mathbf{p}} = \frac{\partial D_{\text{SSD}}(I_1, I_2, \varphi)}{\partial \varphi} = 2 \int_{\Omega} (I_1(\mathbf{x}) - I_2(\mathbf{x} \circ \varphi)) \cdot \frac{\partial I_2(\mathbf{x} \circ \varphi)}{\partial \varphi} d\mathbf{x} \quad (3.13)$$

$$\begin{aligned} &= 2 \int_{\Omega} (I_1(\mathbf{x}) - I_2(\mathbf{x} \circ \varphi)) \cdot \left\langle \frac{\partial I_2(\mathbf{x}')}{\partial \mathbf{x}'}, \frac{\partial \mathbf{x}'}{\partial \varphi} \right\rangle d\mathbf{x} \\ &= 2 \int_{\Omega} (I_1(\mathbf{x}) - I_2(\mathbf{x} \circ \varphi)) \cdot \sum_i \nabla(I_2 \circ \varphi) \cdot \frac{\partial \mathbf{x}'}{\partial \varphi_i} d\mathbf{x} \end{aligned} \quad (3.14)$$

wobei $\nabla(I_2 \circ \varphi)$ den Intensitätsgradienten des transformierten Bilds im transformierten Koordinatensystem bezeichnet. Die Jacobimatrix $J = [\partial x'_j \setminus \partial \varphi_i]$ der partiellen Ableitungen

$$J = \begin{bmatrix} \frac{\partial x'_1}{\partial \varphi_1} & \cdots & \frac{\partial x'_1}{\partial \varphi_n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial x'_d}{\partial \varphi_1} & \cdots & \frac{\partial x'_d}{\partial \varphi_n} \end{bmatrix} \quad (3.15)$$

zeigt an, wie stark sich die Komponenten x_i des abgebildeten Punktes für eine Variation der Transformationsparameter φ_j ändern, das heißt, das Produkt in 3.14 bestimmt, wie stark sich die Bildmetrik für die Variation eines Bildpunktes ändert.

Die Parametrisierung der translationalen und angularen Komponenten der Transformation respektive der Zielfunktion besitzt unterschiedliche Wertebereiche: Eine Rotation um 1 Radianten resultiert in einer wesentlich größeren Änderung als eine Translation um einen Bildpunkt. Diese ungleiche Dynamik äußert sich in der Kostenfunktion in langen, schmalen „Tälern“ um das Optimum.

Die Parameter müssen daher in der Optimierung mit Faktoren $F \in \mathbb{R}^{|\varphi|}$ skaliert werden. Verfahren erster Ordnung basieren auf der Annäherung der lokalen Funktionstopologie durch den Gradienten, das heißt, der zweite Ableitungsterm der Taylorreihenapproximation muss entsprechend klein sein: Bei einer angularen Schrittweite von 1 sollte die Bildpunktverschiebung im Bildmittel auch 1 betragen. Für die Transformation aus Gleichung 3.5 ergibt sich dann als Skalierungsfaktor

$$F = (1/f_\theta, 1, \dots, 1) \quad \text{mit} \quad f_\theta := \frac{1}{|\Omega|} \int_{\Omega} (\mathbf{x} - \mathbf{c})^2 d\mathbf{x} \quad (3.16)$$

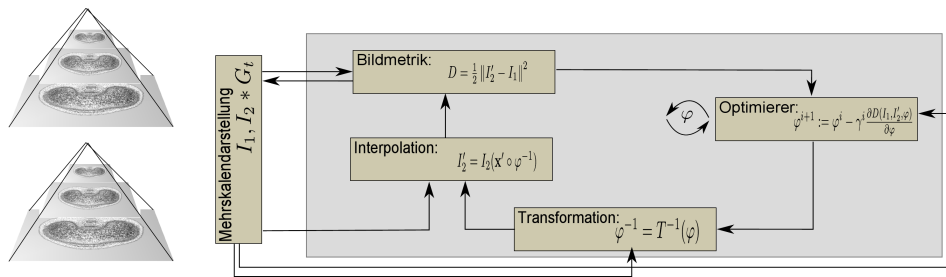


Abbildung 3.2: Schematischer Ablauf der Parameterschätzung in der Registrierung anhand der Multiskalendarstellung der Eingangsbilder.

für eine verbesserte Konvergenz beziehungsweise Stabilität der Optimierung ⁶.

3.2.4 Multiskalenansatz zur effizienten Lösung

Ein wichtige Ansatz, um Robustheit und Geschwindigkeit der Optimumsuche neben den eigentlichen numerischen Iterationsverfahren zu verbessern, liefern hierarchische Verfahren. Dabei erfolgt die Suche auf einer Multiskalendarstellung der Bilder: Die Suche wird auf einer groben Skale begonnen, die dann während der Optimierung sukzessive verringert wird, bis schließlich die Zielfunktion auf der ursprünglichen Auflösung ausgewertet wird. Dabei wird die Bildfunktion auf der, der jeweiligen Skale entsprechenden der Grenzfrequenz des Gaußfilter unterabgetastet, so dass eine reduzierte Bildauflösung vorliegt.

Dieses Vorgehen liefert mehrere Vorteile für die Bestimmung der Transformation: Die Robustheit der Suche bezüglich lokaler Minima wird erhöht, da durch die *glatteren* Skalenraumdarstellungen der Bilder die Topologie der Zielfunktion verbessert wird. Dies ermöglicht im es Optimierungsverfahren selbst, größere Schrittweiten zu realisieren. Zusammen mit der reduzierten Auflösung kann so wesentlich schneller in die Region des globalen Optimums fortgeschritten werden, was im Allgemeinen in der Optimierung den Großteil der Iterationszeit ausmacht (vgl. [PRESS et al., 2007] und Anhang C). Darüber hinaus wird durch die Unterabtastung eine wesentlich geringere Laufzeit pro Iteration erzielt, das heißt, die „teure“ Suche der großenl Transformationsschritte in die Nähe des Optimums ist weitestgehend entschärft, was beispielsweise in der praktischen Anwendung die Testung unterschiedlicher Startpunkte möglich macht. Für den Multiskalenansatz wird das Bildpaar zunächst in seine entsprechende Multiskalendarstellung $\mathcal{I}_{1,2}(\mathbf{x}, t)$, mit Skalenparameter $t \in \{1, \dots, t_{\max}\}$ überführt. Dabei stellt sich die Frage nach der maximalen Skale: Wird eine zu große Skale für den Start der Optimierung gewählt, kann die Zielfunktion gegebenenfalls für die Bildkorrespondenz nicht mehr informativ sein. Die Optimierung „steckt“ dann auf den nachfolgenden Skalen in einem lokalen Minimum fest. Die systematische Bestimmung der maximalen Skale respektive der Auflösungsstufen wird in der Literatur zur Registrierung nicht eindeutig behandelt. Allgemein kann durch die Detektion sogenannter *Skalenraummaxima* (*scale space maxima*) [LINDBERG, 1990] bis zu welchem t_{\max} innerhalb von Objekten noch informative Bildinhalte erhalten werden; in der Praxis ist eine direkte Abschätzung anhand der Bildgröße jedoch meist ausreichend.

Bei gegebener Auflösungs pyramid liefert das Optimum der Skale t die Initialisierung der jeweils nächsten Stufe $t + 1$. Transformationsparameter müssen dabei anhand der physikalischen Auflösung des Dis-

⁶Aus der Approximation der Ableitungen im Diskreten sind Verfahren 2. Ordnung meist instabil in der Anwendung - vgl. hierzu auch praktische Überlegungen in [PRESS et al., 2007] und Anhang C

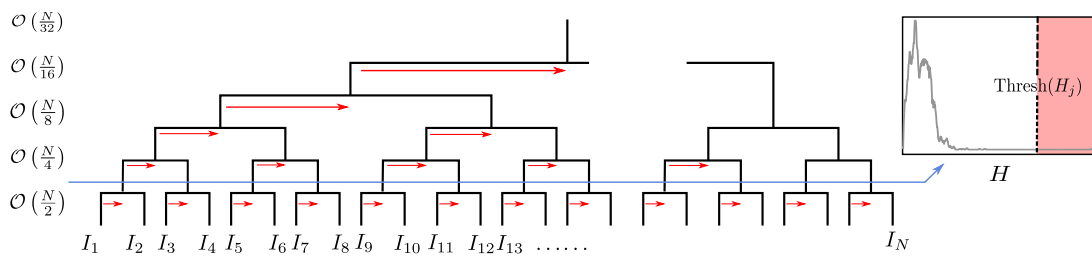


Abbildung 3.3: Ablaufschema des rekursiven Ansatzes in Algorithmus 3: Registrierte Teilmengen werden in der Rekursionsauflösung zur registrierten Mengen vereinigt, dabei wird in der untersten Rekursionsebene die Verteilung der Metrikwerte geschätzt. Die Gesamtkomplexität bzgl. der Optimierungsläufe bleibt dabei gleich.

Skalierungsgitters je Stufe skaliert werden und bleiben für den Optimierungsalgorithmus „unsichtbar“; die Skalierungsfaktoren aus Gleichung 3.16 werden dabei entsprechend pro Auflösungsstufe neu bestimmt.

3.2.5 Divide-and-conquer Formulierung zur Fehlerrückweisung

Fehlerhafte Bildregistrierungen können trotz Vorverarbeitung, Ansätzen zur Dämpfung von Bildstörungen und systematischer Verwendung der Optimierungsverfahren nicht *sicher* ausgeschlossen werden. Durch die intrinsische Abhängigkeit des Rekonstruktionsproblems führen Fehlregistrierungen zu einem insgesamt fehlerhaften Ergebnis. Beispielsweise ist eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $0.5 \cdot 10^{-4}$ bei den vorliegenden typischen Bildstapelgrößen bereits zu hoch für eine sichere Rekonstruktion. Durch die Erweiterung der Bildmetrik auf benachbarte Bilder lässt sich eine heuristische Fehlerunterdrückung realisieren, die in der praktischen Anwendung meist zu guten Ergebnissen führt. Nichtsdestotrotz muss für die vollautomatische Verarbeitung vor allem auch mit einem Fehlschlagen der Vorverarbeitungsschritte in Abschnitt 2.1-2.3 gerechnet werden: Dies vor allem aufgrund von fehlerhaften Eingangsdaten beziehungsweise fehlgeschlagener Präparation. Damit liegen dann Daten vor, für die letztlich keine fehlerfreie Registrierung erhalten werden kann, und das Gesamtergebnis damit stark beeinträchtigt wird.

Aussagen über die Registrierungsgüte oder den maximalen Korrespondenzgrad werden durch die Zielfunktion quantifiziert, da jedoch für vorliegende Bilder kein perfektes Match existiert, liefern die Absolutwerte nur in Bezug zur Verteilung der Metrikwerte über den gesamten Datensatz eine Aussage zur Identifikation von Registrierungsfehlern, die dann als Ausreißer einer geschätzten Verteilung vorliegen. In der sequentiellen Formulierung des Rekonstruktionsproblems liegen die für die Schätzung der Verteilung nötigen Metrikwerte jedoch erst am Ende der Verarbeitung des gesamten Datensatzes vor, das heißt, mögliche Fehlerregistrierungen können nicht während der Rekonstruktion erkannt werden, sondern müssten in einer nachgelagerten Verarbeitung adressiert werden, die dann wieder dem gleichen Problem unterliegt, usf..

Wünschenswert ist daher eine alternative Formulierung des sequentiellen Problems, welche eine:

- statistische sichere Fehlererkennung anhand der Verteilung der Zielfunktionswerte im Datensatz *während* der Rekonstruktion ermöglicht
- Rückweisung fehlerhafter Bilder und Korrektur dieser während der Rekonstruktion realisiert

- Ein *datenparallele* Prozessierung des Registrierungsproblems bei geringem rechnerischem Mehraufwand ermöglicht.

Dies wird mittels einer alternativen und allgemeingültigen, rekursiven Formulierung des Rekonstruktionsproblems für Bildstapel erreicht: Grundlage hierbei ist eine rekursive Partitionierung des Problems in Teilprobleme. Dabei wird als Invariante in der Rekursionsauflösung das Zusammenführen bereits registrierter Teilmengen zur registrierten Vereinigungsmenge, ähnlich *divide-and-conquer* Ansätzen zur Sortierung, realisiert. Das Vorgehen ist in Algorithmus 3 zusammengefasst.

Durch die alternative Formulierung werden die oben beschriebenen Eigenschaften erhalten, und dabei ein vernachlässigbarer rechnerischer Overhead, nämlich die Anwendung der Transformation auf jeweils alle Elemente im Vereinigungsschritt in Zeile 16 pro Rekursionsebene, in Kauf genommen, der durch die erhaltene Parallelisierbarkeit jedoch ausgeglichen wird. Die asymptotische Komplexität $\mathcal{O}(N)$ bezüglich der durchgeführten Optimierungsläufe für die Anzahl der Bilder N bleibt dabei gleich, wie im Flussdiagramm 3.3 angezeigt.

Algorithmus 3 \mathcal{I} -RekursivesRegistrieren(\mathcal{I})

```

1: if ( $|\mathcal{I}| \geq 2$ ) then
2:    $\mathcal{I}_1 = \text{RekursivesRegistrieren}(\mathcal{I}_1)$ 
3:    $\mathcal{I}_2 = \text{RekursivesRegistrieren}(\mathcal{I}_2)$ 
4: end if
5: if (then  $|\mathcal{I}| = 2$ )
6:    $\varphi^* = \underset{\varphi}{\text{argmin}} D_{SSD}(I_i, I_{i+1}, \varphi) \quad I_i \in \mathcal{I}_1, I_{i+1} \in \mathcal{I}_2$  // registriere adjazente Elemente aus  $\mathcal{I}_1, \mathcal{I}_2$ 
7:    $H_j = D_{SSD}((I_i, I_{i+1}, \varphi^*))$  // Bestimme Verteilung der Metrikwerte
8: else
9:    $\varphi^* = \underset{\varphi}{\text{argmin}} D_{SSD}(I_i, I_{i+1}, \varphi) \quad I_i \in \mathcal{I}_1, I_{i+1} \in \mathcal{I}_2$ 
10:  while do ( $\text{Thresh}(H_j) < D_{SSD}((I_i, I_{i+1}, \varphi^*))$ ) // Teste auf Fehlregistrierung
11:     $\varphi^* = \underset{\varphi}{\text{argmin}} D_{SSD}(I_{(i)--}, I_{(i+1)++}, \varphi) \quad I_i \in \mathcal{I}_1, I_{i+1} \in \mathcal{I}_2$  // Verwerfe Paar für weitere Verarbeitung
12:  end while
13: end if
14: // Halte registrierte Teilmengen
15: for ( $I \in \mathcal{I}_2$ ) do
16:    $I = I \circ \varphi^*$ 
17: end for
18:  $\mathcal{I} = [\mathcal{I}_1, \mathcal{I}_2]$  // Zusammenführen

```

3.3 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieses Abschnittes war es, das aus der Serienschichtbildung entspringende Rekonstruktionsproblem zu lösen, um damit die Auflösungsvorteile der zweidimensionalen Bildaufnahme in dreidimensionale Bilder zu übertragen. Auf Basis der vorliegenden Bilddaten wurde in dem entsprechenden Registrierungsproblem ein merkmalsloser Ansatz umgesetzt, und so die Fehlerquelle Kontrollpunktdetektion umgangen. Die in Bilddaten vorliegenden Transformationen wurden dabei durch die Verwendung eines affinen Transformationsmodells abgebildet, welches zur Minimierung des Intensitätsabstands benutzt wurde. Durch zwei unterschiedliche Ansätze wurden die bei der Rekonstruktion von großen Bildstapeln

vordringlichsten Probleme *Fehlertoleranz* und *Verarbeitungsgeschwindigkeit* gelöst: Durch i) Erweiterung der Bildmetrik auf eine gewichtete Nachbarschaft und ii) durch eine alternative Formulierung des sequentiellen Problems in einem *divide-and-conquer* Ansatz. Dazu war neben den in Kapitel 2 beschriebenen Operationen die Erweiterung bestehender Ansätze notwendig, um so eine tatsächlich vollautomatische Verarbeitung der Eingangsdaten zu gewährleisten.

Durch die Umformulierung des üblichen Ansatzes wird eine, vor allem für die Verarbeitung großer Datensätze wichtige grobgranulare Parallelisierbarkeit der Rekonstruktion sichergestellt. Beide Verfahren bestimmen die optimalen Transformationsparameter dabei in einem hierarchischen Mehrskalensatz. Das Konvergenzverhalten und auch die Sicherheit der Optimierung gegenüber lokalen Minimumseinstellung konnte so verbessert werden (siehe Anhang C). Die eigentliche Optimierung der Bildmetrik als Zielfunktion wurde mittels Simplex-Algorithmus und GC-Verfahren gelöst. Durch die analytische Bestimmung der Ableitungen anstelle der Approximation mit finiten Differenzen wird eine Laufzeitoptimierung, neben den Funktionsauswertungen in der Liniensuche pro Iteration erzielt. *Newton* Methoden als Verfahren höherer Ordnung unter Verwendung der *Hesse*-Matrix besitzen zwar bessere theoretische Konvergenzeigenschaften (das heißt *super-lineare* Konvergenz), sind jedoch für „wenig glatte“ auf diskreten „Messdaten“ aufsetzende Zielfunktionen instabil (s. Anhang C und [PRESS et al., 2007]).

Die vorgeschlagenen Methoden wurden zur Rekonstruktion verschiedener Probeobjekte und Bildgebungsverfahren validiert, dabei besonders Durchlichtmikrographen, wie etwa von *Hordeum* Karyopsen mit 25 Datensätzen mit je zwischen 1200 und 3000 Einzelschnitten, aber auch konfokalen Aufnahmen (*Nicotiana*) und Radiogrammen (Maus) (s. Anhang B).

In der Rekonstruktion wurden nicht-lineare Deformation aus zwei Gründen nicht adressiert: Zunächst konnte solche nicht aus der Bildakquisition beobachtet werden, dies zeigen auch die Rekonstruktionsergebnisse. Durch die Verwendung von Polymereinbettungen in der biologischen Probenpräparation wird die Verformung des Objektes während der Sektion offenbar verhindert. Mit den vorgestellten Methoden, insbesondere Algorithmus 3 können jedoch auch nicht-lineare Transformationsfunktionen zu Registrierung angesetzt werden. Eine Korrektur von Deformationen einzelner Schnitte allein aus den vorliegenden Daten ist jedoch problematisch: Eine solche Registrierung mittelt dann lediglich lokale Deformationen anhand der übrigen auch deformiert vorliegenden Referenzbilder. Letztlich werden so in erster Linie visuell zufriedenstellende Ergebnisse erzielt, es besteht jedoch die Gefahr, demgegenüber die tatsächliche Morphologie zu verfälschen (beispielsweise, als Gedankenexperiment, einen Kegel in einen Zylinder zu transformieren).

Im folgenden Kapitel sollen, nachdem das Problem der Rekonstruktion der Objekte gelöst ist, in diesen nun relevante Gewebe und Strukturen segmentiert, und damit der eigentliche Schritt in der automatischen Auswertung des biologischen Bildmaterials und die automatische Modellerzeugung realisiert werden. In diesem Zusammenhang werden dann auch nicht-lineare Transformationen und Registrierung erneut betrachtet.

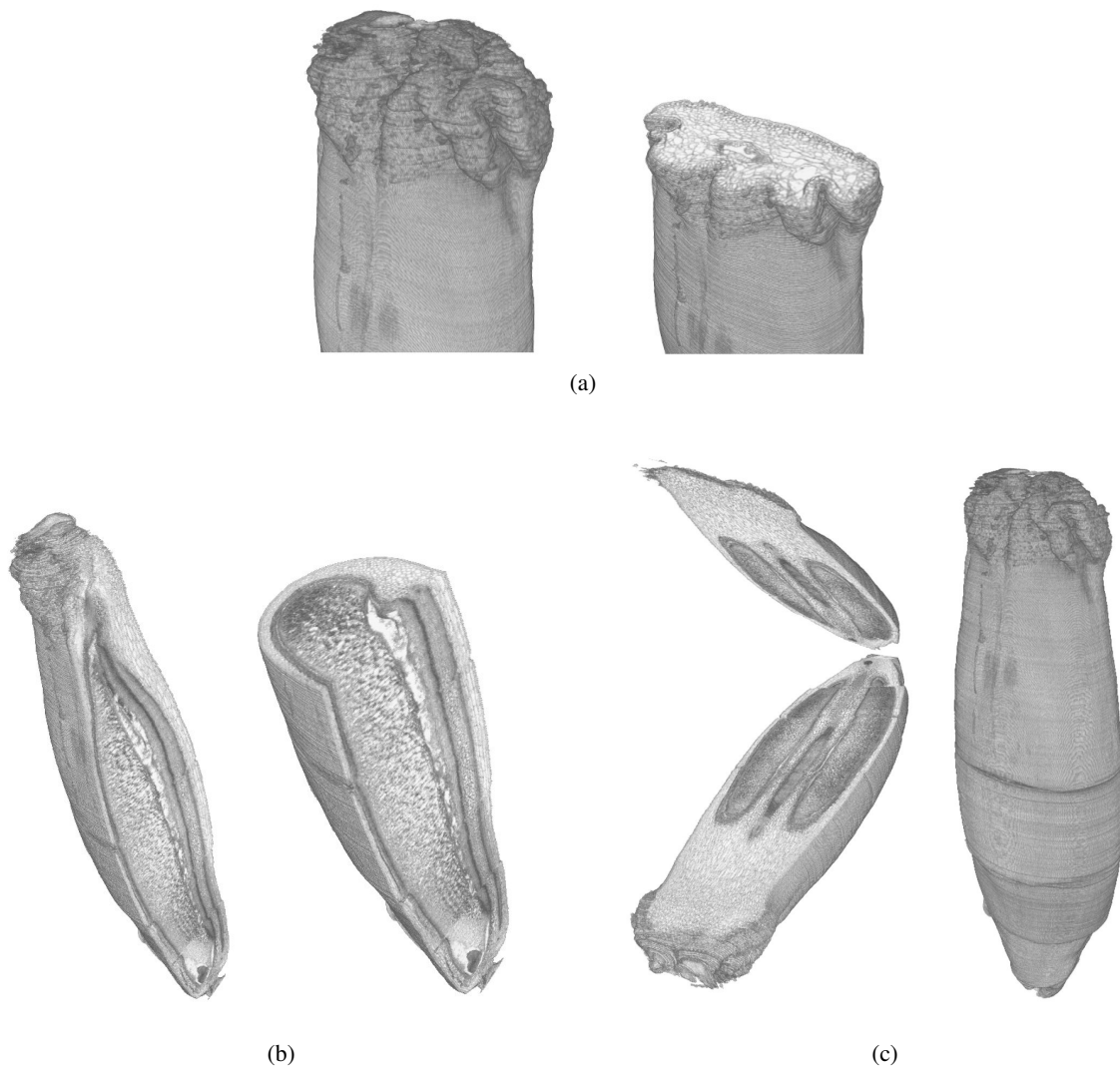


Abbildung 3.4: Ansichten einer rekonstruierten *Hordeum* Karyopse: Beliebige Schnittebenen durch das rekonstruierte Volumen zeigen intakte histologische Strukturen und Außenhülle (10 DAF, 2979 Schnittbilder, $1800 \times 1400px$, max. 2 Einzelbilder pro Schnitt, 7 Gb total)

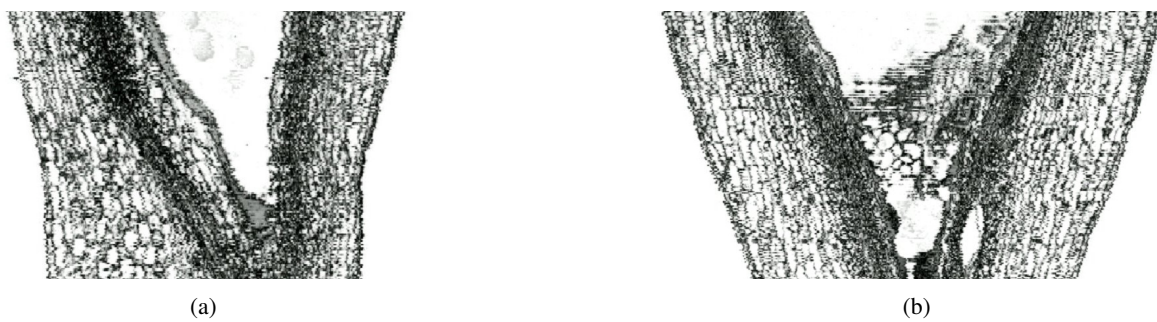


Abbildung 3.5: Detailansicht eines *Hordeum* Datensatzes (3 DAF, vgl. [DERCKSEN et al., 2008]), 3.5a sagital, 3.5b transversal.

KAPITEL 3. REGISTRIERUNG UND REKONSTRUKTION VON BILDSTAPELN

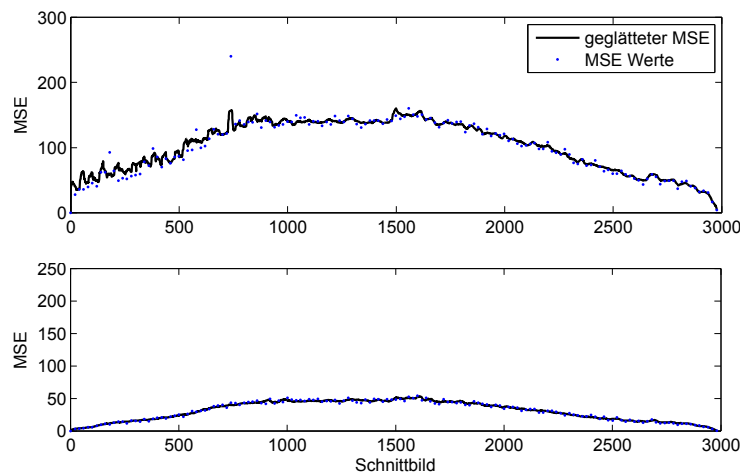


Abbildung 3.6: Mittlerer quadratischer Abstand benachbarter Bilder in einem Bildstapel (Hordeum Schnittbilder, 10 DAF, 2979 Einzelschnitte, s. Abb. 3.4) *vor* und *nach* der Registrierung. Die Übereinstimmung ist nicht perfekt, in Abhängigkeit von der Objektgröße liegt im registrierten Datensatz ein systematischer Abstand aus der Bildaufnahme vor.

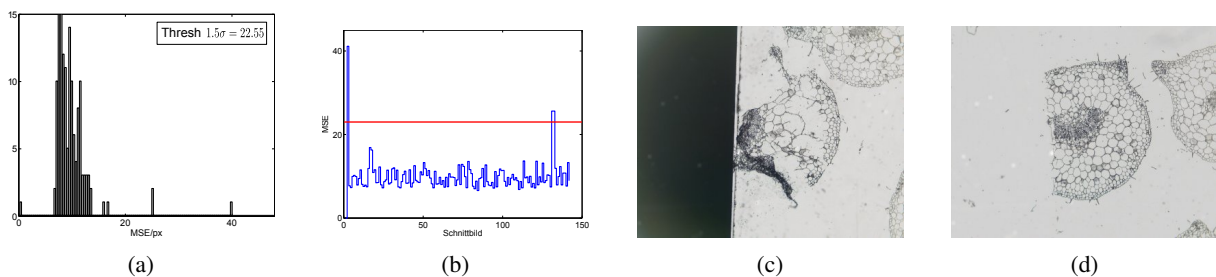


Abbildung 3.7: Automatische Fehlerrückweisung im rekursiven Ansatz: Auf der untersten Rekursions-ebene wird die Verteilung 3.7a der Metrikwerte im gesamten Datensatz geschätzt, dies ermöglicht die Bestimmung des ubiquitär vorliegenden Bildabstands (vgl. Abb. 3.6), etwa verursacht durch Varianzen in der Bildaufnahme, und damit die Identifizierung von Registrierungsfehlern 3.7b. Hier dargestellt anhand von zwei zurückgewiesenen Bildern fehlerhafter Präparate 3.7c, 3.7d in einem *Nicotiana* Substapel (150 Schnittbilder, $1200 \times 1200px$, Schwellwert $2\sigma = 22.55$).

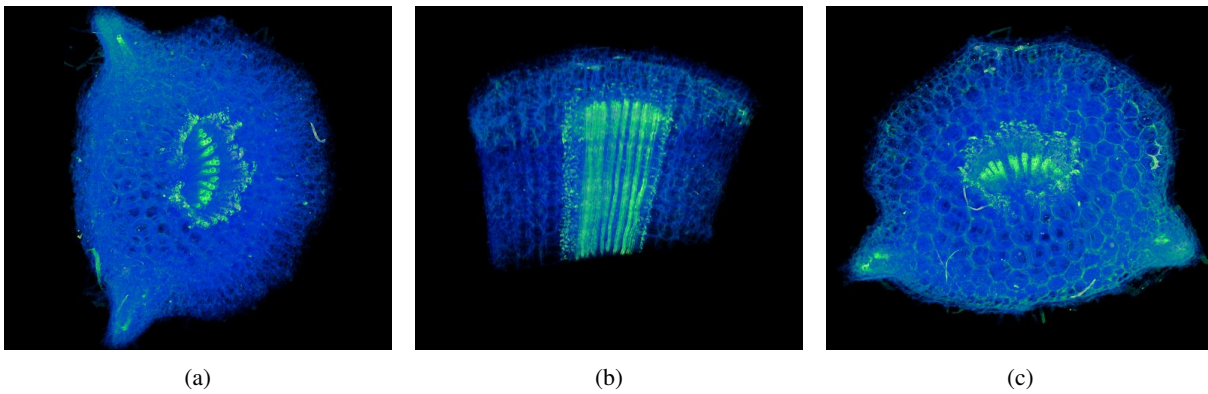


Abbildung 3.8: Rekonstruktion konfokaler Aufnahmen eines *Nicotiana* Bildstapels (200 Einzelbilder, spezifische Färbung der *Leitgewebe*) .

Teil II

Segmentierung relevanter Gewebe in biomedizinischen Bilddaten

Kapitel 4

Segmentierung durch überwachte Klassifikation

Als Ergebnis der Registrierung erhalten die Bilddaten nun ein korrektes Abbild der Organisation von Materialien und Gewebe im realen Probeobjekt. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob und wie diese Gewebetypen mittels entsprechender Modelle in den Bildern erkannt und segmentiert werden können und damit die Grundlage für die automatische dreidimensionale Modellgenerierung geschaffen werden kann. Dazu ist zunächst festzuhalten daß:

- die Erkennung der unterschiedlichen Gewebetypen in Bildern durch den Menschen biologisches Expertenwissen erfordert und damit, beispielsweise im Vergleich zur binären Aufgabe aus 2.3, ein „schwieriges“ Segmentierungsproblem vorliegt.
- sich daraus auch die Notwendigkeit eines *überwachten Ansatzes* ableiten lässt: Um eine ausreichende Erkennungsleistung sicherzustellen, muss dieses Expertenwissen geeignet in Modellen zur Klassifikation und Segmentierung der Gewebetypen berücksichtigt werden.

Neben Referenz- oder *Trainingsdaten* und dem eigentlichen Segmentierungsmodell kommt besonders der geeigneten Darstellung und Transformation der Bildinhalte hin auf die Beschreibung der Charakteristiken der jeweiligen Gewebeklassen eine grundlegende Bedeutung zu. Bevor zwei Ansätze zur Segmentierung durch überwachte Klassifikation untersucht werden, müssen daher zunächst Operatoren bestimmt werden, mit denen charakteristische Merkmale aus der Bildfunktion bestimmt werden können.

4.1 Merkmalsraum für das Mehrklassenproblem

Aus dem Eingangsbild, der skalarwertigen Bildfunktion, werden Operatoren zur Berechnung eines mehrdimensionalen *Merkmalsbildes* angesetzt: Jedem Punkt im Bildbereich werden ein oder mehrere Werte zugewiesen, die bezüglich der Anwendung charakteristische lokale Eigenschaften der Bildfunktion quantifizieren. Diese können einfache Eigenschaften, beispielsweise die *Bildableitung* und allgemeine lineare Operatoren sein, aber vor allem auch komplexere, aus unterschiedlichen Filtern und Darstellungen bestimmte Größen sein. Für das vorliegende Segmentierungsproblem ist hierbei entscheidend, dass nicht

die Eigenschaften einzelner Bildbestandteile, *Kanten*, *Konturen* oder *ROI* usw. ausreichen, sondern im gesamten Bildbereich *dichte* Werte für die Klassifikation der Bildpunkte erhalten werden müssen.

4.1.1 Statistische Merkmale

Die Fassung von semantischen Klassen kann durch die Beschreibung der lokalen Bildinhalte erfolgen, anhand von *Mittelwert*, *Varianz*, *Orientierung* und *Größe* durch *Rangordnungsfilter*. Die lokalen Grauwertverteilungen $p_{\mathcal{M}}(z)$ der diskreten Zufallsvariable z der Graustufen $p(z_i)$, $i = 0, \dots, L - 1$ werden dazu in einer definierten Nachbarschaft \mathcal{M} empirisch aus dem lokalen Histogramm geschätzt, und sind zunächst unabhängig von der räumlichen Anordnung der Grauwerte innerhalb von \mathcal{M} und damit *rotationsinvariant*.

Aus den lokalen Grauwertverteilungen lassen sich mittels der Definition von Momenten μ_n (vgl. Abschn. 2.4) skalare Werte

$$\mu_n = \sum_{i=0}^{L-1} (z_i - m)^n p(z_i) \quad m := \sum_{i=0}^{L-1} z_i p(z_i) \quad (4.1)$$

als Merkmale des Bildinhaltes innerhalb \mathcal{M} bestimmen:

Mit der Varianz $\sigma^2(z) = \mu_2(z)$ ergibt sich aus

$$R := 1 - \frac{1}{1 + \sigma^2(z)} \quad (4.2)$$

ein normalisiertes Maß als Deskriptor der lokalen *Glätte* des Bildausschnitts, als Indikator von Textur gegenüber konstanten Bereichen [GONZALEZ und WOODS, 2007]. Momente höherer Ordnung liefern weitere Eigenschaften der lokalen Grauwertverteilung, beispielsweise

$$S := \frac{\mu_3}{\sigma^3} \quad (4.3)$$

zur Beschreibung der *Neigungsstärke* der Verteilung. Die *Wölbung* oder *Kurtosis* der

$$K := \frac{\mu_4}{\sigma^4} s \quad (4.4)$$

liefert ein Maß für die *Steilheit* der vorliegenden Verteilung relativ zur Normalverteilung.

Ein weiteres empirisches Maß liefert die *Entropie*

$$E := - \sum_{i=0}^{L-1} p(z_i) \log_2 p(z_i) \quad (4.5)$$

als normalisierter Deskriptor der Variabilität oder des *Informationsgehalts* in \mathcal{M} (vgl. Abschnitt 7.1).

Das *Range*-Filter

$$R := \max(\mathcal{M}) - \min(\mathcal{M}) \quad (4.6)$$

liefert als elementarer Rangordnungsfilter eine Erkennung von Nachbarschaften mit hoher gegenüber niedriger Variation von Graustufen in \mathcal{M} .

Die Beschreibung des Bildinhalts mit unterschiedlichen Maskengrößen \mathcal{M}_i und lokalen Grauwertstatistiken erlaubt die Erkennung von unterschiedlichen Skalen und Periodizität des Bildinhaltes, und damit wichtige Eigenschaften für die Diskriminierung unterschiedlicher Bildinhalte.

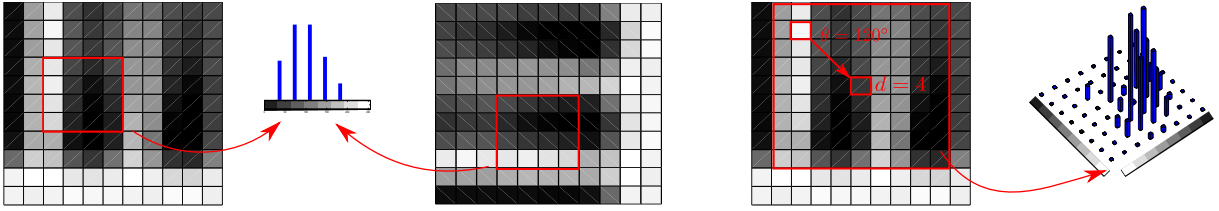


Abbildung 4.1: Textur und Orientierung bei der Merkmalsextraktion: Histogrammmerkmale sind invariant zur räumlichen Orientierung, dargestellt hier beispielhaft anhand eines Bildausschnitts, und der um 90° gedrehten Variante. Graustufenkookuränzen berücksichtigen Skale und Orientierung im entsprechenden bivariaten Histogramm.

Die Invarianz gegenüber der Orientierung schränkt Histogrammmerkmale für eine Diskriminierung von Bildinhalten jedoch ein. Der räumliche Zusammenhang von Grauwerten kann mit generativen Texturmodellen nach HARALICK [HARALICK, 1979] als sogenannte Graustufenkookuränzen (*Gray-Level-Cocurrences*, GLCM) bestimmt werden: Grundidee ist die statistische Beschreibung der räumlichen Beziehung der Grauwerte, das heißt, für eine gegebene Skale und Orientierung werden bivariate Dichten bestimmt, aus denen dann skalare Maßzahlen zur Charakterisierung, analog Gleichung 4.2-4.6, bestimmt werden. Um für die Schätzung des bivariaten Histogramms im Diskreten sowohl die nötige Robustheit der Schätzung zu sichern als auch der rechnerischen Handhabbarkeit wegen, wird die Bildfunktion dazu meist auf weniger Graustufen L' , mit $|L'| = 8$ oder 16 typischerweise, quantisiert.

Der GLCM-Operator $G : \mathcal{M} \mapsto \mathbb{R}^{L' \times L'}$ kann durch Binärbilder $I^i(\mathbf{x}) := \delta(I(\mathbf{x}), i)$, $i = \{1, \dots, |L'|\}$ dargestellt werden

$$G_{i,j}(\mathcal{M}, \Delta \mathbf{x}) := \frac{1}{|\mathcal{M}|} \int_{\mathcal{M}} \delta(I^i(\mathbf{x}), I^j(\mathbf{x} + \Delta \mathbf{x})), \quad (4.7)$$

wobei $\Delta \mathbf{x}$ aus gegebener Orientierung $\theta \in \pi$ und Skale $d \in \mathbb{R}^+$ bestimmt wird (G wird als symmetrisch betrachtet). Aus der matrixwertigen Abbildung über dem Bildbereich werden anschließend Kennzahlen zur Beschreibung der bivariaten Verteilung bestimmt, um zu quantifizieren, wie gut die vorgegebene Strukturbeziehung den lokalen Bildinhalt „trifft“:

$$\begin{aligned} U &:= \sum_{ij} G_{ij}(\mathcal{M}, \Delta)^2 && \text{Uniformität} \\ &\sum_{ij} |i - j|^2 G_{ij}(\mathcal{M}, \Delta) && \text{Kontrast} \\ &\sum_{ij} \frac{(i - \mu_1)(j - \mu_2) G_{ij}(\mathcal{M}, \Delta)}{\sigma_1 \sigma_2} && \text{Korrelation} \\ &\sum_{ij} \frac{G_{ij}}{1 + |i - j|}(\mathcal{M}, \Delta) && \text{Homogenität} \end{aligned} \quad (4.8)$$

Die Operatoren werden dabei überlappend durch die Fensterfunktion \mathcal{M} im gesamten Bildbereich Ω angewandt, etwa $U(I \circ G(\mathcal{M}, \Delta)) : \Omega \mapsto \mathbb{R}$.

Tabelle 4.1: Übersicht der extrahierten Merkmale zur Gewebeklassifikation und Streuung der Klassenzugehörigkeit (*Fisher-Score*, Gl. 4.20).

Dimension	Merkmal	Beschreibung	Mehrklassen <i>Fisher-Score</i>
f_1	I	Intensitätsbild	1.1
f_{2-4}	$\text{Range}(I; \{5, 20, 40\})$	$\max_{I(\mathcal{M})} - \min_{I(\mathcal{M})}$	[1.3, 4.9]
f_{5-7}	$\text{Entropie}(I; \{9, 27, 45\})$	Entropiefilter	[10.7, 14.5]
f_{8-15}	$\text{Gabor}(I; \{8, 16, 32, 65\}, \{\pi, \pi/2\})$	Gabor Features	[1.8, 6.4]
f_{16-18}	$\text{Std}(I; \{5, 21, 45\})$	Std-Filter	[1.7, 3.5]
f_{19-30}	$\text{GLCM}(I)$	GCLM-Features	[0.3, 6.5]
f_{30-51}	$\text{WavPak}(I)$	Wavelet-Features	[2.1, 2.2]

Die beschriebenen Filter zur Berechnung lokaler Merkmale lassen sich allgemein nicht als Faltungsoperationen realisieren (für bestimmte Rangordnungsfilter sind lineare Approximationen vorgeschlagen), sondern basieren immer auf einer nicht-linearen Sortierungs- beziehungsweise Histogrammoperation und Komplexität $\mathcal{O}(|\Omega| \cdot |\mathcal{M}| \log |\mathcal{M}|)$.

4.1.2 Gabor-Filter und -Merkmale

Einen analytischen Ansatz zur Beschreibung von lokalen Bildinhalten liefern *Gabor-Filter* nach GABOR [GABOR, 1946]. Grundlage ist hierbei die Beschreibung der lokalen Wellenzahl und Phase des Bilds durch eine spezielle Funktionenfamilie, die sogenannten *Gaborfunktionen*. Der Gabor-Filter wirkt dabei zunächst als Bandpassfilter, ein bestimmter Wellenzahlbereich wird mittels Gaußfilter selektiert. Als *Quadraturfilter* basiert der Gabor-Filter auf der harmonischen Darstellung des zuvor bandpassgefilterten Signals innerhalb des vom Gaußfilter definierten Fensters, das heißt, die lokale Phase wird durch die symmetrischen negativen und positiven Anteile des Filter für die entsprechende Phasenverschiebung berechnet.

Die Impulsantwort des Filter ergibt sich also als Harmonische, welche mit der, der Skale entsprechenden Gaußfunktion gefaltet ist

$$G_{\lambda,\theta,\phi}(\mathbf{x}) = e^{-((x_1')^2 + \gamma x_2'^2)/2\sigma^2)} \cos\left(2\pi \frac{x_1'}{\lambda} + \phi\right), \quad (4.9)$$

mit $x_1' = x_1 \cos \theta + x_2 \sin \theta$, $x_2' = -x_1 \sin \theta + x_2 \cos \theta$, $\sigma = 0.5\lambda$, $\gamma = 0.5$. Wobei $\gamma, \lambda, \phi, \sigma, \theta$ Elliptizität, Wellenlänge der Cosinusfunktion, Phasenverschiebung, Skale des Gaußfilter und Orientierung definieren.

Es wird vermutet [DAUGMAN, 1985], dass ein Teil des menschlichen Sehsystems ähnlich einer Kombination aus den Filterantworten mit symmetrischer und asymmetrischer Phasenverschiebung funktioniert. Ein Merkmal zur Erfassung von Bildinhalten, die den λ, θ für die lokale Phase und Orientierung innerhalb der Filtermaske entsprechen, wird durch die Filterantwort $r_{\lambda,\theta,\phi} := I * G_{\lambda,\theta,\phi}$ und

$$E_{\lambda,\theta}(\mathbf{x}) := \sqrt{r_{\lambda,\theta,0}^2 + r_{\lambda,\theta,-\pi/2}^2} \quad (4.10)$$

als sogenannte *Gabor-Energie* erhalten [DAUGMAN, 1985, GRIGORESCU et al., 2002].

Dem folgend sind Gabor-Filter als Deskriptoren der lokalen Bildfunktion zur Erkennung von Textur vorgeschlagen worden [JAIN und FARROKHANIA, 1991, GRIGORESCU et al., 2002]. Auf verschiedene Orientierungen und Wellenzahlen parametrisierte Filterfunktionen als Filterbank liefern dann für die vorliegenden Bildinhalte eine Menge von Merkmalsbildern beziehungsweise Merkmalsvektoren der jeweiligen Bildpunkte entsprechend der obigen Kombination in Gleichung 4.10 für unterschiedliche Phasenparameter $\phi = \{0, -1/2\pi\}$ als kombiniertes Merkmal. Für unterschiedliche Wellenzahlen und Orientierungen, beispielsweise $\lambda = 2^{\{1,2,3,\dots,m\}}$ $\Theta = \{i(\pi/n), i = 1, \dots, n\}$, werden dann für unterschiedliche lokale Inhalte entsprechende Filterantworten erhalten, die als Eingabe für die Separation der Bildpunkte dienen. Im Gegensatz zum Graustufenkookkuränzansatz liefern lineare Filter eine rechnerisch wesentlich laufzeiteffizientere Merkmalsextraktion, verschiedene Parameter können im Frequenzraum aus der einmaligen Fouriertransformation des Bilds bestimmt werden. Prominente Skalen und Orientierungen der Bildfunktion können aus einem *Log-polar* transformierten Fourierspektrums bestimmt werden, um eine initial „gute“ Parameterwahl sicherzustellen [GONZALEZ und WOODS, 2007, BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008].

4.1.3 Wavelet-Paket Analyse und Merkmale

Neben den beschriebenen generativen Ansätzen zur Texturbeschreibung mittels GLCM und Gabor-Filtern, respektive der Bestimmung geeigneter Parameter dafür wird mit geeigneten Basiswechseln der Bildfunktion versucht, eine systematische Beschreibung unterschiedlicher Bildinhalte zu erhalten. Die im Abschnitt 2.2 (Appendix A) beschriebene Zerlegung in unterschiedliche Frequenzanteile, beziehungsweise Bildskalen und Orientierungen durch die Wavelettransformation stellt durch die Lokalisierung der entsprechenden Komponenten im transformierten Bild eine geeignete Repräsentation zur Berechnung diskriminativer Merkmale dar.

Die in Abschnitt 2.2 beschriebene Zerlegung des Bildes als Multiskalenrepräsentation liefert eine optimale, nicht-redundante Darstellung des gesamten Signals im Sinne des Abtasttheorems. Sollen jedoch gezielt informative oder diskriminative Signalanteile durch die Zerlegung erhalten werden, ist eine gleichmäßige Zerlegung des Skalenraums bzw. gleichbreite Frequenzbänder für eine gegebene Ebenenanzahl besser geeignet: Durch sogenannte *Wavelet-Paket* Transformation als Erweiterung der schnellen Wavelettransformation werden Frequenzbänder gleicher Breite erhalten, indem Tiefpass- und Bandpasskanal einer erneuten Zerlegung und Abtastung unterworfen werden – die „Fischgräte“ des Zerlegungsschemas wird zum vollständigen Binärbaum. Die Darstellung durch die Wavelet-Paket-Transformation hat sich als geeignet zur Informationsextraktion aus Bildern und deren optimaler Repräsentation im Kontext der *Bildkompression* erwiesen: Informative Skalen und Orientierung werden anhand der Entropie der jeweiligen Koeffizientenmatrizen bestimmt und liefern so eine optimale Zerlegung [COIFMAN und WICKERHAUSER, 1992].

Für Waveletpakete als Funktionen

$$W_{j,n,k} := 2^{-2/j} W_n(2^j x - k) \quad W_0(x) := \phi(x), W_1 = \Psi(x) \quad (4.11)$$

mit Skalierungs- ϕ und Waveletfunktion Ψ [DAUBECHIES, 1992] wird anhand der Koeffizienten

$$S_{j,n,k} = 2^{j/2} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) W_n(2^j x - k) dx \quad (4.12)$$

die geforderte Zerlegung des Signals in gleich breite Frequenzbänder erhalten. (Die reguläre Waveletzerlegung wird als Spezialfall für die Rekursion mit $W_{1,2}$ und $n = 0$ erhalten.) Durch die Orthogonalität der $W_{j,n,k}$ (vgl. Anh. A) gilt mit der Definition der *Entropie* eines Waveletpakets

$$E_{j,n} := \sum_k \int_{\Omega} |S_{j,n,k}(x)|^2 \log |S_{j,n,k}(x)|^2 dx \quad (4.13)$$

$$E_{j+1,n} = E_{2j,2n} + E_{2j,2n+1}$$

$$E_{j+1,n,m} = E_{2j,2n,2m} + E_{2j,2n,2m+1} + E_{2j,2n+1,2m} + E_{2j,2n+1,2m+1}$$

respektive für den zweidimensionalen Fall als Tensorprodukt des separablen Wavelets (Gl. A.13).

4.1.4 Analyse und Transformation des Merkmalsraums

Mit der Anwendung der beschriebenen Operatoren steht nun ein hochdimensionaler *Merkmalsraum* für die Klassifikation der Bildpunkte zur Verfügung. Trotz systematischer Ansätze und Parameterwahl in der Merkmalsextraktion ist für das weitere Vorgehen entscheidend, inwieweit die berechneten Merkmalsdaten für eine überwachte Segmentierung des Bilds geeignet, bzw. *diskriminant* für unterschiedliche Gewebeklassen sind. Das heißt, die *intrinsische Dimensionalität* des Merkmalsraums und die Separierbarkeit dieser Merkmalskombinationen beschränkt die mögliche Klassifikationsleistung nach oben. Liegen Dimensionen oder Merkmalskombinationen vor, die für eine Klassifikation keine Informationen liefern, wird die Klassifikationsaufgabe zusätzlich erschwert: Das Hinzufügen einer Variable (bzw. Dimension) zu den Eingangsdaten führt, unabhängig von dem verwendeten Klassifikator, zu einer exponentiellen Erhöhung der Komplexität des Klassifikationsproblems; als Phänomen des sogenannten *Curse of Dimensionality* [HUGHES, 1968]. Wünschenswert sind daher Ansätze zur Bewertung und Optimierung des Merkmalsraums, um die Klassifikationsgenauigkeit zu erhöhen und das Klassifikationsproblem, auch bezüglich der numerischen Komplexität zu vereinfachen.

Ultimatives Kriterium für eine Bewertung des Merkmalsraums ist die Klassifikationsleistung selbst, die Auswahl einzelner Merkmale (*feature selection*) bzw. Kombinationen (*subset feature selection*) kann daher zunächst als kombinatorisches Problem gefasst werden, welches bezüglich der Klassifikationsleistung optimiert wird. Die Auswertung der Klassifikationsgenauigkeit als Zielfunktion ist rechnerisch aufwendig, wird der kleinste optimale Merkmalsatz gefordert, ergibt sich ein kombinatorisches, KP-ähnliches Problem¹, welches dann mittels Heuristiken wie etwa *greedy*-Ansätzen [FRIEDMAN, 1991] oder gerichteter Suche [NARENDRA und FUKUNAGA, 2006] adressiert werden kann, wobei immer noch eine hohe numerische Komplexität verbleibt.

Statistische Ansätze zur Merkmalsanalyse besitzen den Vorteil, daß die eigentlichen Merkmalswerte auf Parameter von Verteilungsfunktionen kondensiert werden, und die Untersuchung und Transformation des

¹Das sogenannte KNAPSACK-Problem bezeichnet in der Komplexitätstheorie ein kombinatorisches Optimierungsproblem aus der Komplexitätsklasse *NP*: Aus einer Menge von Objekten mit Gewichten und Nutzwerten soll eine Teilmenge bestimmten Gewichts mit maximalem Nutzen ausgewählt werden.

Merkmalsraums so analytisch gefasst werden kann. Zur Abbildung des Merkmalsraumes dienen dabei lineare, orthogonale Funktionen $\Phi \mathbb{R}^M \mapsto \mathbb{R}^N$, wobei $N < M$ im oben genannten Sinn gilt, die für ein Kriterium $S(\mathbf{f}')$ eine optimale Transformation $\mathbf{f}' := \Phi \mathbf{f}$ der Merkmale $\mathbf{f} \in \mathbb{R}^M$ liefern. Ausgehend von einer Stichprobe $\omega = \{\mathbf{f}_1, \dots, \mathbf{f}_n\}$ die in K Klassen klassifiziert ist $\omega = \bigcup_{k=1}^K \omega_k$, $\omega_k = \{\mathbf{f}_{k,1}, \dots, \mathbf{f}_{k,N_k}\}$ liefern drei grundlegende Kriterien eine Aussage zur *Deskriptivität* und *Diskriminanz* des Merkmalsraums

$$S_1 := \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N D(\mathbf{f}'_i, \mathbf{f}'_j) \quad (4.14)$$

$$S_2 := \frac{1}{K(K-1)} \sum_{k=2}^K \sum_{l=1}^{k-1} \frac{1}{N_k N_l} \sum_{i=1}^{N_k} \sum_{j=1}^{N_l} D(\mathbf{f}'_{k,i}, \mathbf{f}'_{l,j}) \quad (4.15)$$

$$S_3 := \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^{N_k} \sum_{j=1}^{N_k} D(\mathbf{f}'_{k,i}, \mathbf{f}'_{k,j}) \quad (4.16)$$

als klassenunspezifische *Streuung* (4.14), und *Inter-* (4.15) und *Intraklassenabstand* (4.16) innerhalb der Stichprobe.

Da lineare Abbildungen zugrunde gelegt werden, ergeben sich optimale Φ , welche die Kriterien S_i maximieren, aus Eigenvektoren und Eigenwertspektrum geeigneter *symmetrischer Kernmatrizen* [BISHOP, 1995] \mathbf{Q}_i ,

$$\mathbf{Q}_1 := \mathbf{R} - \boldsymbol{\mu} \boldsymbol{\mu}^\top \quad \mathbf{R} := \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \mathbf{f} \mathbf{f}^\top \quad (4.17)$$

$$\mathbf{Q}_2 := \frac{1}{K} \mathbf{R}_k - \frac{2}{k(k-1)} \sum_{k=2}^K \sum_{l=1}^{k-1} \left(\boldsymbol{\mu}_k \boldsymbol{\mu}_l^\top - \boldsymbol{\mu}_l \boldsymbol{\mu}_k^\top \right) \quad (4.18)$$

$$\mathbf{Q}_3 := \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K \mathbf{R}_k - \boldsymbol{\mu}_k \boldsymbol{\mu}_k^\top, \quad (4.19)$$

der Eigenwertzerlegung $\mathbf{Q}_i = \mathbf{V} \boldsymbol{\Lambda} \mathbf{E} \mathbf{V}^\top$ beziehungsweise dem Spektrum der Singulärwerte aus der Singulärwertzerlegung $\mathbf{Q}_i = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}$ (etwa nach GOLUB [GOLUB und VAN LOAN, 1983]).

Für das klassenunabhängige Kriterium S_1 liefern die Eigenvektoren der Kovarianz \mathbf{Q}_1 der Stichprobe ω genau die Kernmatrize, welche den mittleren quadratischen Approximationsfehler für die Abbildung Φ minimiert; als Verfahren der multivariaten Statistik die zunächst von PEARSON [PEARSON, 1901] beschriebene *Hauptkomponentenanalyse* (*Principal Component Analysis, PCA*) beziehungsweise als allgemeine Darstellung stochastischer Prozesse anhand orthogonaler Varianzdarstellungen als *Karhunen-Loeve-Transformation* [LOEVE, 1978]. Damit können für die vorliegende Klassifikationsaufgabe zunächst die Merkmale im Merkmalsraum maximal dekorreliert abgebildet werden, so dass mit Φ eine varianzerhaltende Reduktion des Merkmalsraums erhalten wird.

Für eine Klassifikation kann S_1 lediglich notwendiges Kriterium sein (s. Abb 4.2). Die Berücksichtigung der Klassenzugehörigkeit entsprechend S_2 und S_3 ist daher notwendig: Unabhängig vom verwendeten Klassifikator sinkt die Wahrscheinlichkeit der Falschklassifikation mit geringer Inter- \mathbf{Q}_2 und hoher Intraklassenvarianz \mathbf{Q}_3 .

Das Verhältnis von Inter- und Intraklassenvarianz $\mathbf{Q}_2/\mathbf{Q}_3$ liefert als sogenanntes FISHER-Kriterium [FISHER et al., 1936] ein Maß für die Diskriminanz der Punkte im Merkmalsraum (vgl. Tabelle 4.1). Bezogen auf eine lineare Transformation werden mit

$$J(\Phi) = \frac{\Phi^T \mathbf{Q}_2 \Phi}{\Phi^T \mathbf{Q}_3 \Phi} \quad (4.20)$$

für $\Phi = \operatorname{argmax} J(\Phi)$ aus dem Eigenwertansatz maximal $K - 1$ orthogonale Eigenvektoren erhalten (\mathbf{Q}_2 hat als Außenprodukt von K Mittelwertvektoren maximal Rang $K - 1$); Φ bildet dann $K - 1$ Skalarprodukte, die jeweils eine Klasse optimal gegen den Rest separieren.

Wünschenswert in Anwendungen, in denen eine lineare Diskriminante nicht die geforderte Klassifikation liefern kann, ist jedoch ein Orthogonalsystem (Φ_1, \dots, Φ_L) von Diskriminanzvektoren, welches die Abbildung auf einen beliebig dimensionalen Unterraum gestattet.

Für die Klassifikation im vorliegenden Fall ist diese Erweiterung insofern wichtig, als durch die Diskriminanzanalyse uninformative Merkmale für die nachgelagerten Klassifikatoren entfernt werden, aber nicht davon ausgegangen werden kann, dass das Mehrklassenproblem jeweils klassenweise linear separabel ist. Neben der paarweisen Auswertung des FISHER-Kriteriums 4.20 zur Diskriminanzbestimmung, wie in [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008], kann durch den Ansatz

$$\operatorname{argmax}_{\Phi \in \mathbb{R}^{m \times L}, \Phi^T \Phi = E_n} \mathcal{K}(\Phi) := \mathbf{Q}_2 - \frac{\operatorname{sp}(\Phi^T \mathbf{Q}_2 \Phi)}{\operatorname{sp}(\Phi^T \mathbf{Q}_3 \Phi)} \mathbf{Q}_3 \quad (4.21)$$

und

$$\Phi_{i+1} := \operatorname{eig}(\mathcal{K}(\Phi_i)) \quad \Phi_0 \in \mathbb{R}^{m \times L} \quad \Phi_0^T \Phi_0 = E_L \quad (4.22)$$

iterativ [WANG et al., 2007] eine Orthonormalbasis $\Phi \in \mathbb{R}^{m \times L}$ zur Abbildung auf $L > K$ Dimensionen erhalten werden (vgl. auch [DUCHENE und LECLERCQ, 1988]).

Die Schätzung der Größen in Gleichung 4.17-4.19 muss nicht notwendigerweise im ursprünglichen Raum extrahierter Merkmale erfolgen, sondern kann mittels nichtlinearer Abbildungen φ in einem höherdimensionalen Raum, das heißt für $\mathbf{x} \mapsto \varphi(\mathbf{x}) \in \mathbb{R}^{p > m}$, durchgeführt werden. Dabei erfolgt die Berechnung der Vektorprodukte implizit durch sogenannte *Kernfunktionen* k , $k(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \langle \varphi(\mathbf{x})^T \varphi(\mathbf{y}) \rangle$, und daraus die \mathbf{Q}_i^φ , anhand derer eine Basis $\phi \in \mathbb{R}^p$ bestimmt wird. Somit können zwar zusätzlich nicht-lineare Zusammenhänge gefasst beziehungsweise die Einschränkung auf klassenweise unimodale Verteilung der Daten aufgehoben werden, andererseits besteht das Risiko der Überanpassung auf die Stichprobe; daher sollte diese Aufgabe den aufsetzenden Klassifikatoren überlassen werden, die Nicht-Linearitäten berücksichtigen und zusätzlich die *Generalisierung* der Beobachtungen aus der Stichprobe leisten können.

Im vorliegenden Fall wurden mit den Operatoren aus Abschnitt 4.1.1-4.1.3 (s. Tabelle 4.1) leistungsfähige Ansätze aus der Literatur zur Charakterisierung von lokalen Bildinhalten zusammengestellt. Aus der Analyse des Merkmalsraums mit den beschriebenen Methoden zeigt sich, dass einerseits ein hochdimensionaler Merkmalsraum für die Klassifikation nötig ist und nicht einige bestimmte Merkmale eine gute Separierbarkeit sicherstellen, und andererseits keine einfache lineare Trennung der Klassen im Merkmalsraum möglich ist. Daher sind für eine genaue Erkennung und Segmentierung der Gewebe entsprechende Klassifikatoren notwendig. Zwei grundlegende Ansätze zur nicht-linearen Mehrklassen-Klassifikation werden daher im Folgenden vorgestellt.

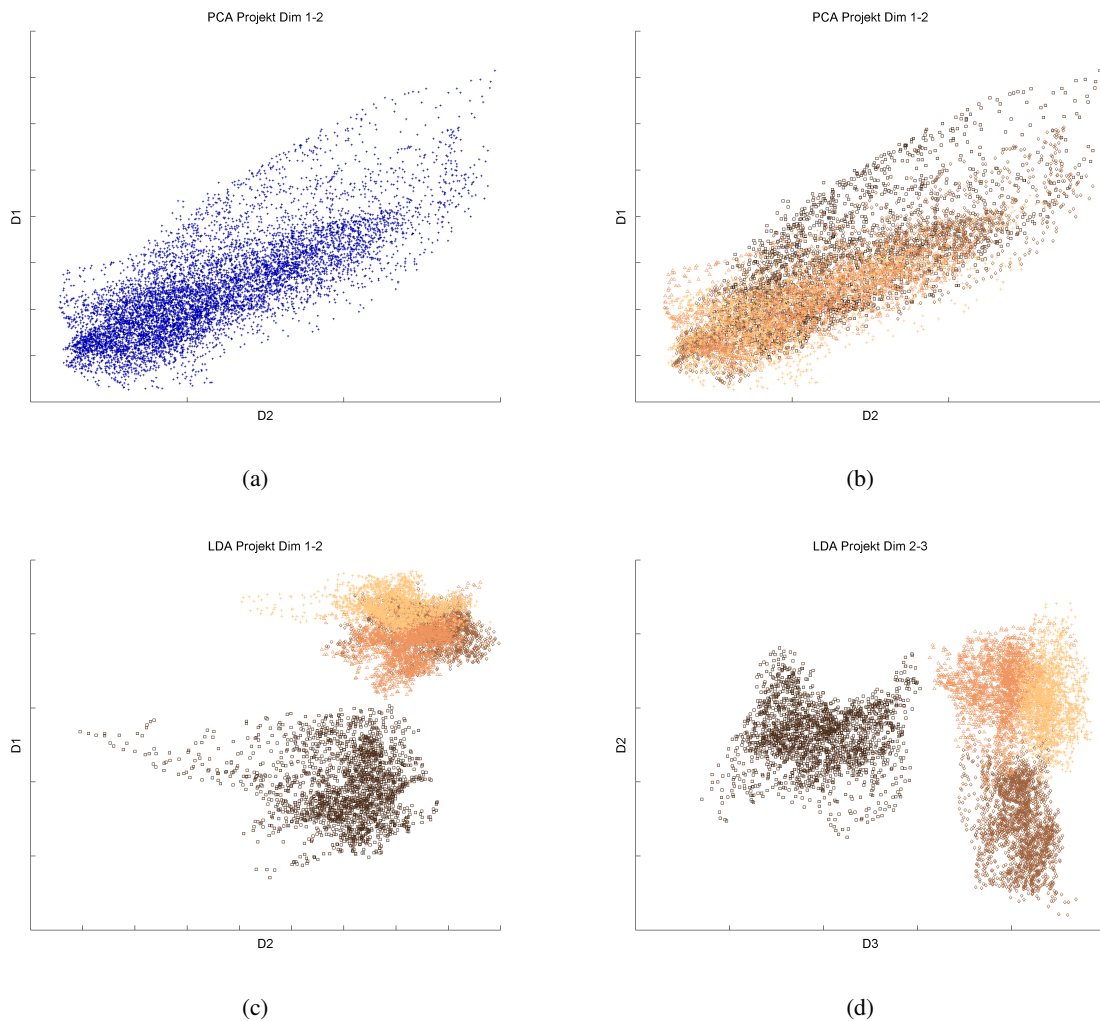


Abbildung 4.2: Analyse des Merkmalsraums: 4.2a Mittels PCA wird durch Reduktion mittels der beiden größten Eigenwertvektoren 98% der gesamten *Varianz* erhalten. Die Betrachtung der Klasseninformation 4.2b innerhalb der Stichprobe zeigt jedoch, dass diese Transformation wenig geeignet ist (*Fisherscore* (0.66, 1.61)). LDA erhält eine geeignete Abbildung zur Reduktion der Merkmalsdaten, geometrisch sichtbar in den ersten drei Dimensionen 4.2c-4.2b

4.2 Klassifikatoren zur merkmalsbasierten Segmentierung

Für die extrahierten, diskriminativen Merkmale über dem Bildbereich sind nun Klassifikatoren gesucht, welche Merkmalsdaten auf Gewebeklassen abbilden und damit eine Segmentierung der Bilder realisieren. Das sollen zunächst allgemein Funktionen F sein, die aus dem Eingaberaum $\{\mathbf{x}\} \subset \mathbb{R}^m$ auf die Menge der K Klassen beziehungsweise biologischer Gewebetypen abbilden. Wie eingangs gefordert, wird dabei ein überwachter Ansatz verfolgt: Parameter für F einer bestimmten Modellklasse werden anhand einer klassifizierten Stichprobe bestimmt, die im Sinne einer Abbildung als $\mathcal{S} = \{(\mathbf{x}_1, y_1), \dots, (\mathbf{x}_n, y_n)\} \mid \mathbf{x}_i \in \mathbb{R}^m, y_i \in \{1, \dots, K\}$ bezeichnet, das heißt aus Merkmalsdaten von Bild-

punkten und deren korrekten Klassenzugehörigkeiten bestehen. Modellklasse und Parameterschätzung, oder *Training* stehen daher unter zwei Anforderungen:

1. Die in den Merkmalsdaten enkodierte Information zur ausreichend genauen Klassifikation *separieren* zu können
2. die aus der Stichprobe repräsentierten Varianzen der Daten entsprechend auf nicht klassifizierte Daten *generalisieren* zu können.

Diese Anforderungen scheinen zunächst diametral: Ein naives, optimales Modell bezüglich 1. ist die Stichprobe selbst, dagegen kann die Generalisierbarkeit des Modells nicht aus den Daten selbst hergestellt werden, sondern bestimmt sich aus Eigenschaften der Modellklasse und der Komplexität des Modells. Dies soll im Folgenden durch zwei unterschiedliche Ansätze untersucht werden: i) durch die biologisch inspirierte Informationsverarbeitung und Generalisierung durch *künstliche neuronale Netze* und ii) durch die geometrische Fassung der Separierungseigenschaft und Generalisierbarkeit mittels *Support-Vector Maschinen*. Beide Ansätze sind im Rahmen des vorliegenden Szenarios besonders vorteilhaft für die Verarbeitung *großer* Datensätze und damit für die Segmentierung der Bildstapel, neben der eigentlichen Klassifikationsleistung, besonders geeignet.

4.2.1 Mehrschichtperzeptren

Parallel mit der Verfügbarkeit digitaler Signalverarbeitung entstanden schon früh Ansätze, die menschliche oder biologische Informationsverarbeitung nachzubilden; als sogenannte künstliche neuronale Netze. Motiv der Entwicklungen waren die aus der Physiologie bekannten Mechanismen *Konnektionismus* (mehrfache Eingangsdaten) und *Aktivierungspotential* (Aktivierungsschwelle) biologischer Neuronen. Das *Perzeptron* oder Modellneuron [ROSENBLATT, 1958] liefert dabei die Grundlage der sogenannten *Mehrschichtperzeptren* (sog. *feed-forward* Netze). Für Eingabe \mathbf{x} wird mit dem Gewichtsvektor \mathbf{w} ein Aktivierungszustand $\mathbb{R} \ni h = \langle \mathbf{x}\mathbf{w} \rangle$ bestimmt:

$$y := \sigma(\mathbf{x}^\top \mathbf{w} - \theta) = \sigma \left(\sum_{i=1}^n w_i x_i - \theta \right) = \sigma \left(\sum_{i=0}^m w_i x_i \right) \quad (4.23)$$

abhängig von der Aktivierungsfunktion σ , *bias* $\theta = w_0$, $x_0 = -1$ der Ausgangswert bestimmt. Als Aktivierungsfunktionen dienen dann meist beschränkte, stetig differenzierbare Funktionen

$\theta : \mathbb{R} \mapsto [-1, 1]$, beispielsweise $\sigma(h; \beta) := \tanh(\beta(h - \theta))$

Das Modellneuron realisiert lediglich einen linearen Klassifikator, daher erfolgt eine Erweiterung des Modells auf einen Konnektionismus mit L vollständig verbundenen Schichten aus je $M_l, l = 1, \dots, L$ Neuronen zum Mehrschichtperzeptron (*multi layer perceptron*, MLP) [ROSENBLATT, 1962]

$$y_i^l := \sigma \left(\sum_{j=0}^{M_{l-1}} w_{ijl} x_{jl} \right) = \sigma(\langle \mathbf{w}_{il}, \mathbf{x}_l \rangle)$$

beziehungsweise je Schicht

$$\mathbf{y}_l := \sigma \circ \left(\mathbf{W}_l^\top \mathbf{x}_l \right) \quad \text{mit } \mathbf{W}_l := (\mathbf{w}_{1l}, \dots, \mathbf{w}_{M_l l}) \quad (4.24)$$

und $\mathbf{x}_{l+1} := \mathbf{y}_l$. Zur Klassifikation (vgl. Abschnitt 7.2 zur *Regression* mittels vorwärtsgekoppelten Netzen) im Mehrklassenfall wird daher $M_L = K$ gesetzt und $y := \operatorname{argmax}_i (y_{L,i})$ $i = 1, \dots, K$ als Entscheidungsregel.

Die Adaption der Parameter \mathbf{W}_i erfolgt anhand der Stichprobe mittels einer Fehlerfunktion E hin zu

$$\min_{\mathbf{W}_i} \left(\sum_{(\mathbf{x}, \mathbf{y}) \in S} E(\mathbf{y}, \mathbf{x}_L) \right) \quad (4.25)$$

etwa mit $E(x, y) := \|x - y\|^2$. Der Fehler der \mathbf{W}_i bezüglich \mathbf{y} kann nicht direkt bestimmt werden. Daher wird die Ableitung der Fehlerfunktion bezüglich der Parameter $\partial E(\mathbf{x}) / \partial w_{ijl}$ iterativ über S Rückführung (*backpropagation*)

$$E_l(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \begin{cases} (\mathbf{y} - \mathbf{x}_L \sigma'(h(\mathbf{x})_L)) & \text{für } l = L \\ \langle E_{l+1} \mathbf{W}_{l+1} \rangle \circ \sigma'(\mathbf{h}_l) & \text{sonst.} \end{cases} \quad (4.26)$$

des Fehlers je Schicht bestimmt [DE RUMELHART und WILLIAMS, 1986]. Anhand des so ermittelten Fehlers erfolgt dann die eigentliche Anpassung der Parameter.

Als naives Verfahren liefert dabei ein Gradientenabstieg mit fester oder heuristischer Lernschrittweite $\Delta w_{ijl} : \epsilon E_{il} x_{l-1,i}$ schlechte Konvergenz. Erweiterte Optimierungsverfahren mittels *line-search* Subroutinen, etwa konjugierte Gradienten (vgl. Kap. 3), liefern vor allem bei großen Parameterzahlen die nötigen Konvergenzraten. Für stetig differenzierbar Transferfunktionen σ kann darüber hinaus die Hessematrix $\partial E / \partial w_{ij} \partial w_{lk}$ für Verfahren höherer Ordnung (Quasi-Newton) benutzt werden, um so superlineare Konvergenz in $\mathcal{O}(|\mathbf{W}|)$ zu erreichen. Für quadratische Fehlermaße liefert der LM-Algorithmus nach LEVENBERG und MARQUART [MARQUARDT, 1963] als hybrider Optimierungsalgorithmus zwischen Verfahren erster und zweiter Ordnung eine besonders robuste Minimumsuche mit geringfügig schlechterer Konvergenz als Newton-Verfahren, und ist de facto Standard für die Parameteradaption in feed-forward Netzen (s. [BISHOP, 1995] Kap. 7 zu Optimierungsverfahren für MLP).

Durch die iterative Optimierung der Fehlerfunktion für die Stichprobenelemente erfolgt die Parameteradaption nicht *geschlossen*, eine Steuerung des Lernprozesses ist nötig. Dabei muss für eine hinreichende Separierung für allgemeine Probleme $L \geq 3$ gewählt werden. Daraus resultieren große Parameterzahlen mit einem komplexen Modell: Externe Mechanismen müssen dann die Generalisierbarkeit sicherstellen, so dass eine Überanpassung verhindert wird. Effektiv ist hier der Ansatz einer zweiten Stichprobe, welche nicht zur Anpassung der Gewichte dient, sondern der Überwachung der Generalisierungsfähigkeit, bzw. Abbruch (*early stopping*) der Minimierung von E dient.

4.2.2 Mehrklassen Support Vektor Maschinen

Der in Abschnitt 4.1.4 beschriebene FISHER'sche Ansatz basierte auf der Bestimmung einer linearen Funktion im Merkmalsraum, welche eine optimale Trennung der Stichprobe durch Projektion auf eine Gerade realisiert. Verallgemeinernd dazu kann die (binäre) Trennung der Datenpunkte im Raum durch lineare Funktionen in Form einer Hyperebene angesetzt werden: Ausgehend von der Normalform der

Ebene (\mathbf{w}, \mathbf{b}) im \mathbb{R}^L werden Punkte \mathbf{x} im Raum anhand ihrer Orientierung zur Projektion auf die Ebene

$$y := \text{sgn}(\langle \mathbf{w}, \mathbf{x} \rangle + \mathbf{b}) \quad (4.27)$$

in $y \in \{-1, 1\}$ separiert.

VAPNIK forderte für einen solchen Klassifikator optimale Generalisierungseigenschaften entsprechend dem von ihm postulierten Prinzips der *structural risk minimization* [VAPNIK und CHERVONENKIS, 1974] für maschinelles Lernen, und zeigte [CORTES und VAPNIK, 1995], dass dies durch eine Ebene mit maximalem Abstand zu den an die Ebene grenzenden Datenpunkten, den sogenannten *support vectors* erhalten wird. Einschließlich der Regularisierung für die nicht linear separierbaren Datenpunkte durch die sog. *Schlupfvariablen*² wird der Ansatz sogenannter *support vector maschinen* (SVM)

$$\min_{\mathbf{w}, \xi} \left(\frac{1}{2} \|\mathbf{w}^2\| + C \sum_{i=1}^n \xi_i \right) \quad \text{mit} \quad y_i (\langle \mathbf{w}, \mathbf{x}_i \rangle + \mathbf{b}) \geq 1 - \xi_i \quad \forall_{i=1}^n \xi_i \geq 0, \quad (4.28)$$

erhalten beziehungsweise durch Darstellung von \mathbf{w} mittels Lagrangemultiplikatoren $\mathbf{w} = \sum \alpha_i y_i \mathbf{x}_i$ der klassifizierten Stichprobe als duales Problem die quadratische Form

$$\max_{\alpha} \left(\sum_{i=1}^n \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \alpha_i \alpha_j y_i y_j \langle \mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j \rangle \right) \quad \text{und} \quad y := \text{sgn} \left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle \mathbf{x}_i, \mathbf{x} \rangle \right). \quad (4.29)$$

Für Mehrklassenprobleme kann als elementare Lösung ein *Ensemble* binärer SVM angesetzt werden: Jeweils eine Klasse wird gegen $K - 1$ beziehungsweise kombinatorisch $K(K - 1)/2$ separiert und daraus heuristisch das Klassifikationsergebnis bestimmt [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008].

Ein geschlossener Ansatz wird durch Erweiterung von Gleichung 4.28 auf K Ebenen und die Darstellung $y_i \in \{1, \dots, K\} \forall_{i=1}^n$ erhalten [WESTON und WATKINS, 1998]:

$$\min_{\mathbf{w}, \xi} = \frac{1}{2} \sum_{k=1}^K \|\mathbf{w}_k\|^2 + C \sum_{i=1}^n \sum_{k \neq y_i} \xi_{ik} \quad (4.30)$$

und

$$\begin{aligned} (\langle \mathbf{w}_{y_i}, \mathbf{x}_i \rangle + \mathbf{b}_{y_i}) &\geq (\langle \mathbf{w}_m, \mathbf{x}_i \rangle + \mathbf{b}_m + 2 - \xi_{im}) \\ \xi_{im} &\geq 0, \quad i = 1, \dots, n \quad m \in \{1, \dots, K\} \setminus y_i, \end{aligned} \quad (4.31)$$

mit der Entscheidungsfunktion

$$f(\mathbf{x}) := \underset{k}{\text{argmax}} (\langle \mathbf{w}_k, \mathbf{x} \rangle + \mathbf{b}_k). \quad (4.32)$$

Für das duale Problem wird, entsprechend der Erweiterung ein zweiter Index für die Lagrangemultiplikatoren eingeführt und mit $A_i := \sum_{k=1}^K \alpha_{ik}$

$$\min_{\alpha} \left(- \sum_{ik} \alpha_{ik} + \sum_{ijk} (\delta_{y_i y_j} A_i A_j - \alpha_{ki} \alpha_{y_i j} + \alpha_{k,i} \alpha_{k,j}) \langle \mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j \rangle \right)$$

²Der ursprüngliche Begriff lautet *slack variables* (slack, dt. *nachlässig, locker*).

$$f(\mathbf{x}) := \operatorname{argmax}_k \sum_{i=1}^n (\delta_{ik} A_i - \alpha_{in}) \langle \mathbf{x}_i, \mathbf{x} \rangle + \mathbf{b}_k. \quad (4.33)$$

erhalten. Der Mehrklassenansatz liefert ein kompakteres Modell, es werden insgesamt weniger Supportvektoren erhalten, und das quadratische Problem in den Stichprobendaten muss lediglich einmal gelöst werden.

Sowohl Gleichung 4.29 als auch 4.33 enthalten lediglich Skalarprodukte im Eingaberaum und können damit um nicht-lineare Einbettungen k , $k(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \langle \varphi(\mathbf{x}), \varphi(\mathbf{y}) \rangle$, beispielsweise polynomiale oder Gaußsche Kernfunktionen (vgl. [SCHÖLLKOPF und SMOLA, 2001]), erweitert werden und nicht-linear separieren.

Für den vorliegenden Merkmalsraum erweisen sich hierbei besonders die von VAPNIK gezeigten Generalisierungseigenschaften als vorteilhaft: Trotz der Auswertung in einem hochdimensionalen Merkmalsraum $\varphi(\mathbf{x}) \in \mathbb{R}^{p>m}$ wird eine Überanpassung des Modells auf die Stichprobe verhindert.

Besonders für große, hochdimensionale Stichproben ($|\{\alpha_i\}| \in \mathcal{O}(n^2)!$), wie etwa hier (Teil)Mengen segmentierter Referenzbilder und extrahierter Merkmale, mündet das quadratische Optimierungsproblem Gl. 4.33 in zu hohem Rechenaufwand, wenn der ursprüngliche, von VAPNIK vorgeschlagene blockbasierte (*chunking*) Algorithmus benutzt wird. Stand der Technik ist der von PLATT vorgeschlagene [PLATT, 1998] iterative SMO-Algorithmus mit linearer Bandkomplexität zur Lösung von Gl. 4.33, der beispielsweise in der *libSVM* Bibliothek [CHANG und LIN, 2001] implementiert ist.

4.2.3 Merkmalsbasierte Segmentierung von Gewebetypen

Mit den beschriebenen Klassifikatoren kann nun eine Erkennung unterschiedlicher biologischer Gewebetypen in Bilddaten anhand der extrahierten Merkmalsdaten erfolgen. Dabei sind Anzahl und Art der unterschiedlichen Gewebeklassen zunächst nicht beschränkt und bestimmen sich aus der Anwendung beziehungsweise den vorliegenden Daten. Aus den klassifizierten Merkmalsdaten wird dann die Segmentierung, das heißt die Partitionierung des Bildbereichs erhalten; die geschätzte Klassenzugehörigkeit der Datenpunkte wird zurück in den Bildbereich abgebildet und damit für Bildstapel ein Volumenbild der Gewebeanordnung erhalten. Die für die Parameteroptimierung benötigte manuell klassifizierte Stichprobe wird in Form von vollständig segmentierten Schnittbildern, erhalten: Der biologische Experte muss anhand der vollständigen Bildinhalte differenzieren können und muss dazu, ähnlich den Operatoren zur Merkmalsextraktion, die lokalen Nachbarschaften im Bild untersuchen können. Um den gesamten Datensatz abzudecken, werden äquidistante Schnitte in die Stichprobe aufgenommen, typischerweise 5 – 10% des Beispieldatensatzes. Durch die Vorverarbeitung und Registrierung der Daten werden für die Extraktion der Merkmale einheitliche absolute Intensitätswerte, Anordnung und Orientierung der Strukturen sichergestellt, was für die Generalisierung der Klassifikationsleistung auf ungesehene Daten nötig ist.

Um die Leistungsfähigkeit des überwachten Ansatzes zur Klassifikation vollständiger Bildstapel zu bestimmen, wurde aus *Hordeum*-Aufnahmen ein Teilstapel von 80 Bildern durch den biologischen Experten in $K = 6$ Materialklassen (*Hintergrund*), *Pericarp*, *Endosperm*, *Nucellare Projektion*, *Leitbündel*, *Transferzellen*) segmentiert und Merkmalsdaten berechnet. Aus der Transformation des ursprünglichen 51-dimensionalen Merkmalsraums wurde dabei 21 Dimensionen verworfen und 30 Eingabedimensionen für die Klassifikation erhalten.

Tabelle 4.2: Laufzeiten einer Wiederholung der merkmalsbasierten (MLP/SVM) Segmentierung des Referenzdatensatzes (1xCPU AMD Opteron 2.5GHz, s. Text).

	Merkmalsberechnung	Transformation	Training	Klassifikation
Train (15E + 06) Samples	360 min	180 sec	87.3/44.7 min	8.2/13.1 min
Test (134E + 06) Samples	52.5h	24 min	-	14, 17h

Die Segmentierungsgenauigkeit des Ansatzes wurde dabei im Sinne der Klassifikationsleistung auf unbekanntem Daten bestimmt, dabei wurde analog dem Anwendungsfall eine wiederholte, zufällige 90/10%-Teilung in *Test*- und *Trainingsmenge* aller vorliegenden Datenpunkte gezogen. Aus den Trainingsmengen wurden anschließend klassenspezifisch gleichverteilte Datenpunkte gezogen, so dass die Anzahl der Trainingspunkte nochmals reduziert wurde.

Zur Bewertung muss die Genauigkeit zunächst numerisch gefasst werden, im Mehrklassenfall erweitern sich die üblichen elementaren Fehlermaße *Sensitivität*, *Spezifität*, *Korrektklassifikation* und *Konfusionsmatrix* [DUDA et al., 2001] entsprechend und sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Als weiteres, qualitatives Maß für das *Klassifikationsverhalten* eines Modells dienen darüber hinaus ROC-Charakteristiken [GREEN und SWETS, 1966, DUDA et al., 2001] zur statistischen Fassung des Verhaltens von *Sensitivität* und *Spezifität* auf den Testdaten (die direkte Erweiterung auf den Mehrklassenfall ist hier wenig intuitiv und wird daher als *K*-mal 1-gegen-Rest gefasst). Zusammengefasst liefert der Ansatz folgende Ergebnisse für die Gewebesegmentierung:

- Die Gesamtkorrektklassifikation liegt mit 82.2% (MLP) bzw. 87.0% (SVM) in einer akzeptablen Größenordnung,
- die Korrektklassifikationsrate der anteilmäßig kleinen Klassen ist trotz gleichverteilter Stichprobe unzufriedenstellend,
- die ROC-Verläufe und Konfusionsmatrizen zeigen, dass mit den gegebenen Modellen der klassenspezifische Fehler trotz gleichverteilter Trainingsamples auf Unterrepräsentation der „kleinen“ Gewebe zurückzuführen ist.

4.3 Diskussion

Die Segmentierung durch merkmalsbasierte Klassifikation liefert allgemein einen leistungsfähigen Ansatz, Vorteil ist hier vor allem die Möglichkeit, beliebige Eigenschaften der Bildinhalte anhand von Referenzdaten lernen zu können, und kann daher bei schwierigen Segmentierungsproblemen gewissermaßen als *Brute-Force*-Ansatz betrachtet werden [BRÜSS et al., 2006b, DERCKSEN et al., 2008]. Die überproportionale Anfälligkeit von kleinen Klassen gegenüber dem stochastischen Klassifikationsfehler kann evt. durch geeignete a-priori Annahmen weiter gesenkt werden (vgl. Kapitel 5). Inhärent ist jedoch die Eigenschaft, dass mögliche Klassifikationsfehler nicht räumlich gebunden sind, sondern *gespeckelt* auftreten: Die räumliche Beziehung von Schnitten und Geweben ist hier unberücksichtigt geblieben und

KAPITEL 4. SEGMENTIERUNG DURCH ÜBERWACHTE KLASSIFIKATION

führt daher auch zu qualitativ schweren Fehlsegmentierungen. Daneben ist die hohe numerische Komplexität dieses universellen Ansatzes eine starke Einschränkung für den praktischen Einsatz beziehungsweise die Segmentierung größerer Datensätze. Diese Probleme sollen daher im Folgenden aufgegriffen und mit entsprechenden Modellen adressiert werden.

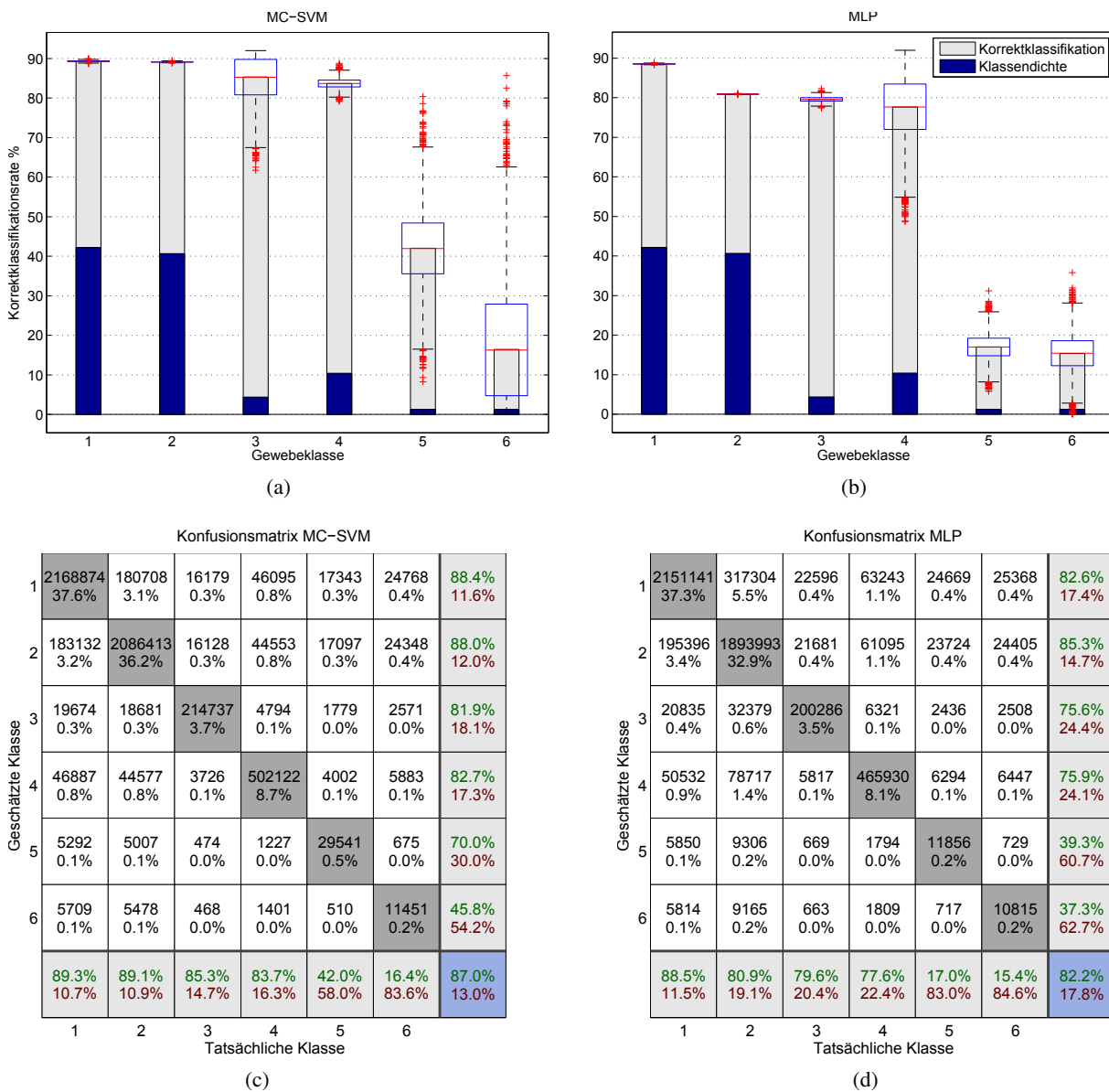


Abbildung 4.3: Untersuchung der überwachten Klassifikationsleistung auf dem Referenzdatensatz: Die Klassifikationsaufgabe ist unbalanciert, trotz gleichverteilter Lernstichprobe senkt der stochastische Fehler die Korrektklassifikationsrate der anteilmäßig kleinen Klassen bei Klassifikation mit MC-SCM und MLP stark (16.4, 15.4%). Dies zeigt auch die Aufschlüsselung der Fehlklassifikation in der Konfusionsmatrix: Besonders die großen Klassen werden vom Klassifikator häufig falsch vorhergesagt.

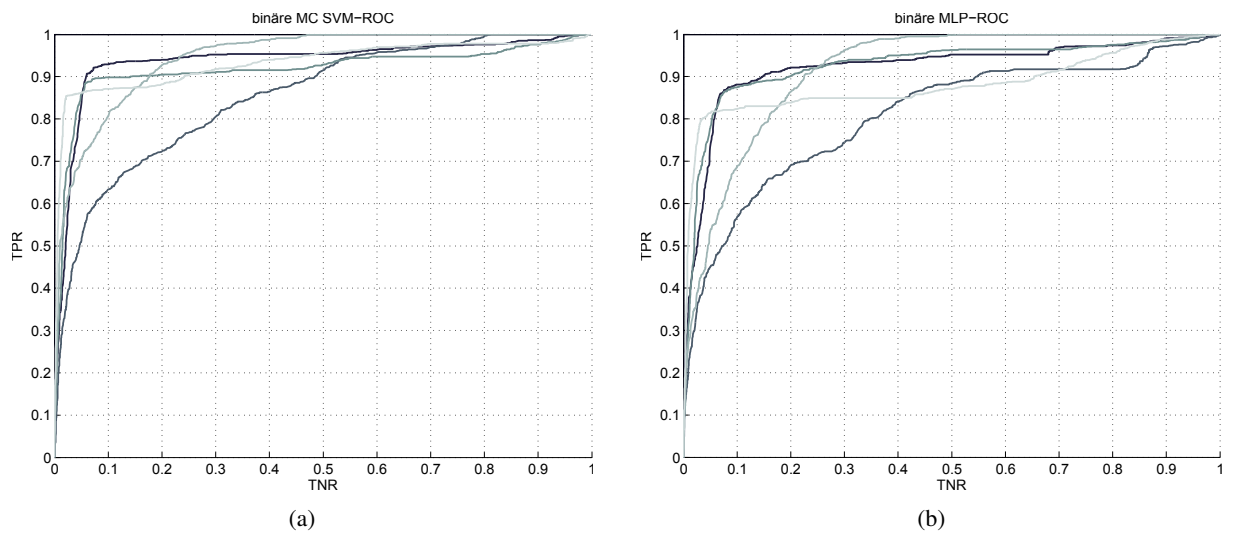


Abbildung 4.4: ROC-Verlauf der Klassifikation auf dem Referenzdatensatz (s. Text) für beide Klassifikationsverfahren, aufgetragen jeweils klassenweise. Der Verlauf der abgetragenen Testpunkte zeigt, dass trotz geeigneter Parameterwahl durch die Unterrepräsentation der kleinen Klassen die Klassifikationsgenauigkeit nicht wesentlich erhöht werden kann.

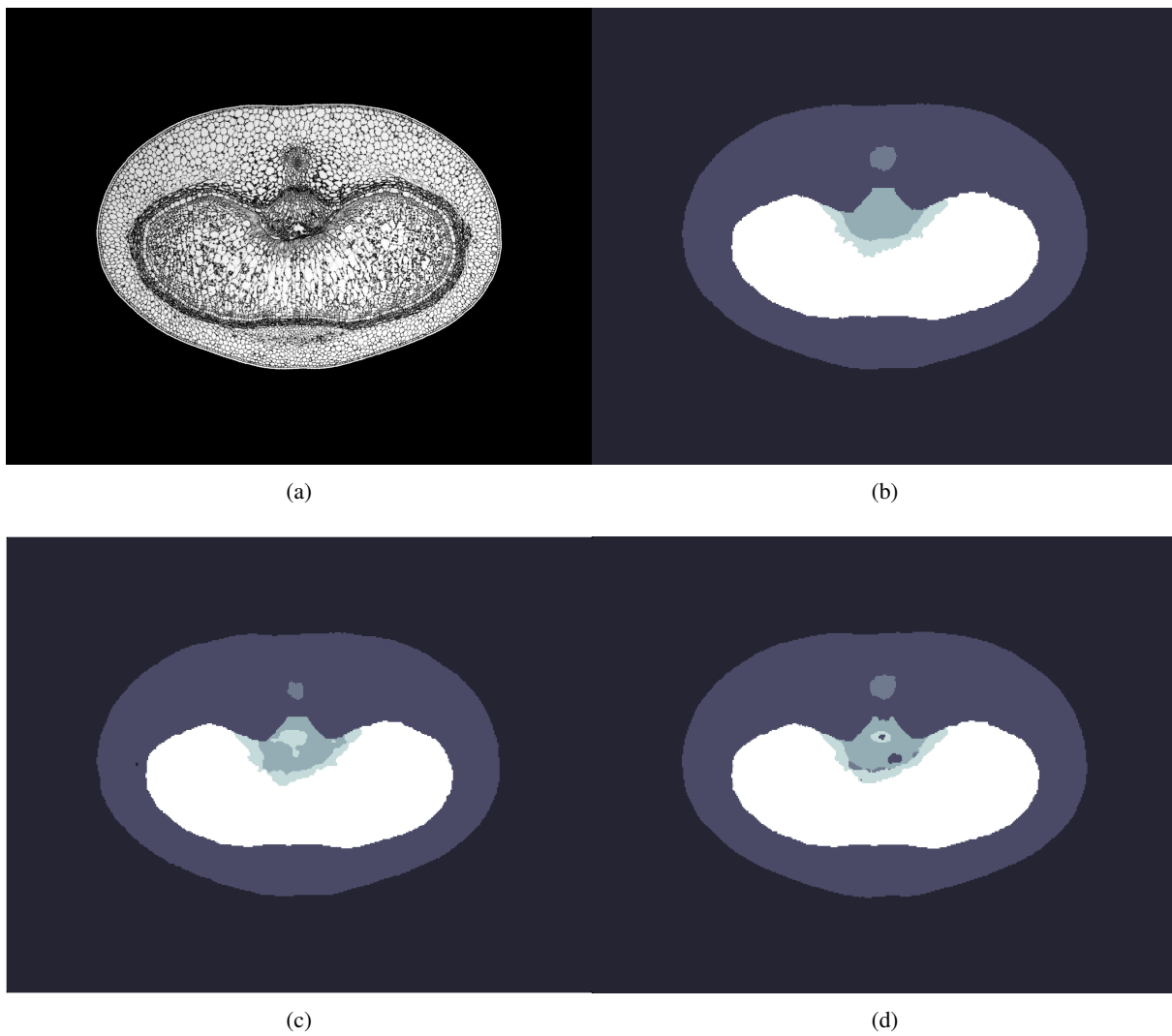


Abbildung 4.5: Segmentierungsergebnisse eines Schnittes aus dem Referenzdatensatz.

Kapitel 5

Segmentierung als Registrierungsproblem

Nachdem im vorhergehenden Kapitel einzelne Bildpunkte und zugehörige Merkmalsvektoren als unabhängige Datenpunkte betrachtet wurden, sollen im Folgenden, wie in Kapitel 3, vollständige Bilder wieder als ein Datum, das heißt die vollständige Lagebeziehung der Bildpunkte im Bild zugrunde gelegt werden. Mit dieser Darstellung soll ein alternatives Modell zur Segmentierung von Gewebetypen erstellt werden, um die bei der überwachten Klassifikation von Bildpunkten beobachteten Schwachstellen zu verbessern: *Segmentierungsrobustheit* und *Laufzeitkomplexität*. Das heißt, die Beziehung zwischen klassifizierten und ungesehenen Daten wird nicht mehr durch Klassifikatoren für bildpunktweise, lokale Merkmale abgebildet, sondern durch eine Quantifizierung und konstruktive Beschreibung der *Bildähnlichkeiten* zwischen vollständigen Bildern der Referenz- und Teststichprobe; wie in Kapitel 3 sollen also Abbildungen gefunden werden, welche eine Bildkorrespondenz herstellen, das heißt, Bilder sollen *registriert* werden.

Grundlage der Formulierung der Bildsegmentierung als Registrierungsproblem ist folgende Beobachtung: Sind zwei Bilder perfekt registriert, dann gilt diese Kongruenz auch für deren Segmentierung. Anders gesagt kann die aus der Registrierung gefundene Transformation auf die Segmentierung eines Referenzbildes angewandt werden, um damit eine Segmentierung des Testbildes zu erhalten. Um komplexere Unterschiede zwischen Bildern respektive deren Segmentierungen erfassen zu können, reichen affine Transformationen im Allgemeinen nicht aus. In den folgenden Abschnitten werden daher allgemeinere, nicht parametrische *deformierbare* Transformationen eingeführt, die ähnlich den aktiven Konturmodellen aus Kapitel 2 eine Formulierung aus *externer Energiefunktion* und *Modellregularisierung* zur Lösung benötigen, und entsprechende Verfahren zur Optimierung untersucht.

Durch einen diffusionsbasierten Registrierungsansatz wurde zunächst ein Modell zur Segmentierung von Bildstapeln entwickelt, welches eine signifikant verbesserte Segmentierungsgenauigkeit und Laufzeitkomplexität gegenüber dem Klassifikationsansatz besitzt [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008]. Dabei werden Unterschiede zwischen Referenz- und Testbildern durch nicht-parametrische Deformationen beschrieben, deren Entwicklung anhand der lokalen Bildinhalte durch eine Diffusionsgleichung reguliert wird, die iterativ gelöst werden kann. Durch die Verbindung von einem globalen Ansatz mittels intensitätsbasierter Deformation und der lokalen, merkmalsbasierten Klassifikation in einem *Mischmodell* können die Vorteile beider Verfahren kombiniert werden: Deformationsfelder und possibilistische Ausgaben eines MLP-Netzes werden in einem statischen Modell kombiniert und liefern eine Verbesse-

rung speziell der örtlich gewichteten Segmentierungsgenauigkeit [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2009]. Darüber hinaus wird der deformationsbasierte Ansatz zur *gleichzeitigen* Registrierung und Segmentierung unalignierter Bilddaten untersucht. Das hieraus entwickelte Modell [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2010] basiert auf einem Mehrskalenansatz zur iterativen Schätzung von affiner Registrierung der Bilddaten und Anpassung der Bildsegmentierung.

Stand der Technik zur simultanen Adressierung von Registrierungs- und Segmentierungsproblemen ist unter anderem der von POHL ET AL. für die Verarbeitung von MRT-Volumendaten vorgeschlagene Ansatz [POHL et al., 2005]. Dabei wird für eine a priori gegebene, vollständige Segmentierung des Volumens eine Anpassung an ein MRT-Volumen bestimmt, um dieses geometrisch zu standardisieren und eine anatomische Zuordnung zu erhalten und gleichzeitig Intensitätsfehler aus der Bildgebung auszugleichen. Für die hier beschriebene Problemstellung ist jedoch eine solche vollständige Segmentierung nicht gegeben, und es liegen keine nativen 3-D Bilder wie aus der MRT-Bildgebung vor. POHLs Ansatz basiert auf einer gegenseitigen Verbesserung beider Schritte und ist daher dem hier vorgestellten Ansatz ähnlich, jedoch ohne unterschiedliche Skalen und unvollständige Referenzdaten zu berücksichtigen. Daneben existieren segmentierungsgetriebene Ansätze wie beispielsweise [VEMURI et al., 2003], um aktive Konturmodelle respektive deren Levelsetfunktionen (s. Kap. 2.3) zu fusionieren und damit eine Registrierung der Bilder zu schätzen. Die Erweiterung auf den Mehrklassenfall ist mit diesen Modellen jedoch nicht ohne weiteres möglich. Der hier beschriebene Ansatz ist methodisch zwischen beiden genannten angesiedelt: Mittels unvollständigen a priori Wissens wird eine Segmentierung geschätzt, die durch die Kongruenz innerhalb der zugrunde liegenden Intensitätsbilder abgesichert und anhand der Bilddifferenzen, ähnlich den Konturmodellen, iterativ optimiert wird.

5.1 Deformierbare Registrierung

Der Bestimmung einer Bildkongruenz im Registrierungsproblem können nicht nur lineare Transformationen zwischen Bildern zugrunde gelegt werden. In der Anwendung sind lineare oder allgemein affine projektive Abbildungen meist dann zu beobachten, wenn beispielsweise die relative Position des Sensors, oder einer Kamera zwischen Aufnahmen unterschiedlich ist, das heißt, zwar eine globale Transformation der Gitterpunkte vorliegt, die Beziehung zwischen einzelnen Bildpunkten für das gesamte Bild jedoch homogen bleibt oder zumindest, etwa für projektive Abbildungen, einer globalen Vorschrift folgt. Diese Annahme kann nicht mehr gelten, wenn innerhalb der Szene oder des Probeobjektes Änderungen von Lagebeziehungen auftreten: Transformationen müssen dann allgemeinere Änderungen der Punktbeziehungen ermöglichen.

Dies können zunächst auch wieder globale parametrische Abbildungen sein, beispielsweise Polynome zweiten oder dritten Grades in x . Daneben kann durch stückweise definierte Funktion die Einschränkung auf ein globales Verhalten der Abbildung aufgehoben werden. Hier sind zunächst radiale Basisfunktionen, beispielsweise *thin plate spline* (TPS) Funktionen [GRIMSON, 1982] zu nennen, welche im Kontext kontrollpunktbasierter Ansätze große Bedeutung haben (sog. *kernel transforms*). Die Transformationsvorschrift ist dabei stückweise durch eben die unterschiedlichen Basisfunktionen bestimmt. Analog sind für die intensitätsbasierte Registrierung bikubische *Spline*-Funktionen vorgeschlagen worden [RUECKERT et al., 1999]: Für eine Transformation Stützstellengitters werden die Koordinationstrans-

formationen des Bildgitters mittels zweidimensionalen Splines interpoliert; eine Bildmetrik wird dann iterativ über die Parameter des Splinegitters optimiert.

Dieser zunächst allgemeingültige Ansatz besitzt jedoch zwei wesentliche Nachteile: Zum einen erfordert die hohe Anzahl der Parameter bei „indirekter“ Optimierung über die Bildmetrik großen numerischen Aufwand in der Optimierung, daneben entsteht, umgekehrt proportional der Gitterdichte eine Begrenzung der möglichen Deformationen in der Transformation. Neben anderen (s. [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003] und Referenzen darin) zielen parametrische Ansätze darauf, durch explizite Definition der Transformationsvorschrift implizit Eigenschaften wie etwa die Stetigkeit der Transformationen sicherzustellen.

Nicht-parametrische Ansätze gestatten zunächst beliebige Verschiebungen der Bildgitterpunkte, und gewünschte Transformationseigenschaften werden dabei *explizit* in einer Regularisierung der Zielfunktion gefasst. Daraus wird eine geschlossene Form als Energiefunktional erhalten, welches variationell gelöst werden kann (vgl. Abschnitt 2.3). Wegweisend ist hier der von BROIT [BROIT, 1981] vorgeschlagene Ansatz zur *elastischen Registrierung* von Bildern mittels eines quantitativen Maßes für die Deformation und die Bildmetrik. BROITs Verfahren basiert auf dem Ansatz eines physikalisch motivierten, elastischen Potentials der Deformation, der Regularisierung der optimalen Transformation damit und Lösung der entsprechenden Differentialgleichung des Funktionals. Darauf basierend sind weitere Ansätze zu Regularisierung vorgeschlagen worden (s. [MODERSITZKI, 2004] und Referenzen darin), die jedoch alle auf einer identischen Fassung als Energiefunktional fußen; wie auch der unten beschriebene Ansatz zur Segmentierung durch deformierbare Modelle.

Wie in Kapitel 3 sind zunächst wieder Transformationen φ gesucht, welche eine Bildmetrik zwischen Bildern I_1, I_2 optimieren. Transformationen $\varphi \in \mathbb{R}^{n \times n \times d}$ sind nun nicht-parametrisch und ordnen jedem Bildpunkt eine Koordinationverschiebung zu. Ohne den identischen Teil der Abbildung wird dabei die *Verschiebung* $\mathbf{u} : \mathbb{R}^d \mapsto \mathbb{R}^d$

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) := \mathbf{x} - \varphi(\mathbf{x}) \quad (5.1)$$

gegenüber dem Eingangskordinatensystem betrachtet. Dabei wird wieder, wie in Kapitel 3, zur Interpolation der Bildfunktion die äquivalente eulersche Darstellung

$$\mathbf{x} = \varphi'(\mathbf{x}') = \mathbf{x}' + \mathbf{u}'(\mathbf{x}') \text{ und } \mathbf{x}' = \varphi(\mathbf{x}) = \mathbf{x} - \mathbf{u}(\mathbf{x}) \quad (5.2)$$

unter der Annahme, dass φ stetig umkehrbar ist, mit $\varphi = \varphi'^{-1}$, $\mathbf{u}'(\mathbf{x}') = \mathbf{u}(\mathbf{x}')$, der Transformation benutzt. Auch für nicht-parametrische φ soll nun wieder der Bildabstand, gegeben durch eine Bildmetrik D minimiert werden, das heißt

$$D(I_1, I_2; \mathbf{u}) = D(I_1, I_2^{\mathbf{u}}) \mapsto_{\mathbf{u}} \min \quad (5.3)$$

mit

$$I^{\mathbf{u}} := I(\mathbf{x} - \mathbf{u}(\mathbf{x})). \quad (5.4)$$

Die direkte Minimierung von Gl. 5.3 bezüglich \mathbf{u} liefert ein schlecht gestelltes Problem und ist nicht (numerisch) lösbar: Die Lösung ist nicht eindeutig bestimmt und erhaltene Deformationen nicht notwendiger kontinuierlich. Daneben soll \mathbf{u} stetig umkehrbar sein, sowohl bezüglich Gl. 5.2 als auch im Sinne

der Anwendung.

Die freie Deformation im Funktional 5.3 muss daher um einen *Regularisierungsterm* $S(\mathbf{u}) : \mathbb{R}^{n \times n \times d} \mapsto \mathbb{R}$ zur Bewertung von \mathbf{u} erweitert werden

$$E(\mathbf{u}) := D(I_1, I_2; \mathbf{u}) + \alpha S(\mathbf{u}) = \min_{\alpha \in \mathbb{R}^+}, \quad (5.5)$$

so dass bestimmte, aus der Anwendung begründete Eigenschaften der Transformation erhalten werden und das entsprechende Optimierungsproblem numerisch adressiert werden kann.

5.1.1 Regularisierung durch Diffusionstherm

Mögliche Regularisierer können beispielsweise bi-lineare Ansätze $S(\mathbf{u}) = 1/2a[\mathbf{u}, \mathbf{u}]$ sein, so dass mit den Ableitungen $dS(\mathbf{u})$ und $dD(\mathbf{u})$ eine partielle Differentialgleichung der Form

$$\nabla_{\mathbf{u}}^2(\mathbf{x}) - f(\mathbf{x}, \mathbf{u}(\mathbf{x})) \quad (5.6)$$

erhalten wird. Neben dem physikalisch motivierten Ansatz der elastischen Registrierung liefert die Regularisierung des Gradienten $\nabla \mathbf{u}$ möglichst *glatte* Deformationen, das heißt, starke Schwankungen in den jeweiligen Dimensionen werden vermieden (vgl. optischer Fluss nach HORN und SCHUNCK [HORN und SCHUNCK, 1981]). Für S ergibt sich dann die Form

$$S(u) := \sum_{i=1}^d \int_{\Omega} \langle \nabla \mathbf{u}_i, \nabla \mathbf{u}_i \rangle \quad (5.7)$$

$$= \frac{1}{2} \sum_{i=1}^d \|\nabla \mathbf{u}_i\|^2 \quad (5.8)$$

welche als allgemeine Diffusionsgleichung aufgefasst werden kann [FISCHER und MODERSITZKI, 2002].

5.1.2 Lösung der diffusionsbasierten Registrierung

Der numerische Ansatz zur Lösung der diffusionsbasierten Registrierung basiert im Wesentlichen auf der Diskretisierung des Problems und dessen iterativer Lösung durch Einführung eines Zeitschrittes. Dabei wird eine von WEICKERT vorgeschlagene [WEICKERT, 1998] additive Approximation des partiellen Differentials von \mathbf{u} benutzt, welche für die Lösung des Ansatzes einen linear beschränkten Fehler aufweist [FISCHER und MODERSITZKI, 2002].

Der Lösung des Minimierungsproblems Gl. 5.5 liegt die Euler-Lagrange Differentialgleichung

$$f(\mathbf{x}, \mathbf{u}(\mathbf{x})) + \alpha \Delta \mathbf{u}(\mathbf{x}) = 0 \quad \mathbf{x} \in \Omega \quad (5.9)$$

mit Laplaceoperator $\Delta \mathbf{u} := (\Delta u_1, \dots, \Delta u_d)$ zugrunde. Mit der SSD-Metrik Gl. 3.7 ergibt sich als *Kraftfeld* die Beziehung zum Bildinhalt

$$f(\mathbf{x}, \mathbf{u}(\mathbf{x})) := (I_2^u(\mathbf{x}) - S(\mathbf{x})) \cdot \nabla (I_2^u(\mathbf{x})). \quad (5.10)$$

KAPITEL 5. SEGMENTIERUNG ALS REGISTRIERUNGSPROBLEM

Als Ansatz zur iterativen Lösung der partiellen Differentialgleichung wird eine Zeit t eingeführt und mit einer initialen Deformation $\mathbf{u}(x, t_0) = 0$ die Gleichgewichtseinstellung $\partial_t \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = 0$ gesucht (im Folgenden stehen räumliche *und* zeitliche Indizes tief), das heißt

$$\partial_t \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) = f(\mathbf{x}, \mathbf{u}) + \alpha \Delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, t) \quad \mathbf{x} \in \Omega \quad t \geq 0. \quad (5.11)$$

Daraus wird eine semi-implizite Euler-Vorschrift [PRESS et al., 2007] für die linearisierte Form

$$\partial_t \mathbf{u}(\mathbf{x}, t_{k+1}) - \alpha \Delta \mathbf{u}(\mathbf{x}, t_{k+1}) = f(\mathbf{x}, \mathbf{u}(\mathbf{x}, t_k)) \quad k = 0, 1, \dots, \quad (5.12)$$

erhalten. Dabei ist die linke Seite entkoppelt, und für die i -te Komponente wird die Wärmeleichung

$$\partial_t u_i(\mathbf{x}, t_{k+1}) - \alpha \Delta_i(\mathbf{x}, t_{k+1}) = f_i(\mathbf{x}, \mathbf{u}(\mathbf{x}, t_k)) \quad (5.13)$$

erhalten.

Die Zeitdiskretisierung erfolgt mit Schrittweite $\tau > 0$ und die Diskretisierung des Bildbereiches auf $\mathcal{X} = (\mathbf{X}_1, \dots, \mathbf{X}_d) \in \mathbb{R}^{n \times d}$, mit \mathbf{X}_j als j -te Komponente des Bildgitters.

Für die diskrete Form von Gleichung 5.13 wird dann, mit A_i als finite Differenzapproximation mittels zentralen Differenzenquotienten (*Stern-Operator*) für die Ableitungen 2. Ordnung $\mathbf{A}_i = \alpha \partial_{jj} u_i(\mathbf{X}, \tau k)$ in Dimension j die Gleichung

$$(\mathbf{V}_{k+1} - \mathbf{V}_k) / \tau - \sum_{j=1}^d \mathbf{A}_j \mathbf{V}_{k+1} = \mathbf{F}_{ik}, \quad (5.14)$$

mit Kraftfeld $\mathbf{F}_{ik} := f_i(\mathbf{X}, \mathbf{u}(\mathbf{X}, \tau k))$ und $\mathbf{V}_k := u_i(\mathbf{X}, \tau k)$ erhalten. Aus der Approximation mittels zentraler Differenzen erhalten dabei die \mathbf{A}_i Tridiagonalform.

Umformung liefert die Iteration

$$\mathbf{V}_{k+1}^{\text{EUL}} = \left(E_n - \tau \sum_{i=1}^d \mathbf{A}_i \right)^{-1} (\mathbf{V}_k + \tau \mathbf{F}_{jk}), \quad (5.15)$$

dass heißt, pro Zeitschritt muss ein System mit n Unbekannten gelöst werden. Durch die Bandstruktur können die Inversen der einzelnen Summanden A_i durch direktes Eliminieren in $\mathcal{O}(n)$ (statt in $\mathcal{O}(n^3)$) bestimmt werden, was jedoch nicht für die Summe gilt. Idee des *additives operator splitting* (AOS) nach WEICKERT [WEICKERT, 1998] ist nun, die Inverse der Summe gegen die Summe der Inversen zu substituieren,

$$\mathbf{V}_{k+1}^{\text{AOS}} := \frac{1}{d} \sum_{j=1}^d (E_n - d\tau \mathbf{A}_j)^{-1} (\mathbf{V}^k + \tau \mathbf{f}_i^k) \quad (5.16)$$

und dadurch eine Komplexität von $\mathcal{O}(n)$ pro Zeitschritt zu erzielen.

Dabei kann gezeigt werden [FISCHER und MODERSITZKI, 2002], dass der Abstand in der Schrittweite τ

$$\|V^{\text{EUL}} - V^{\text{AOS}}\| \in \mathcal{O}(\tau^2) \quad (5.17)$$

beschränkt und damit für praktikable Schrittweiten (vgl. 5.2.2) irrelevant ist. Die Bestimmung der optimalen Verschiebung \mathbf{u} ist in Algorithmus 4 zusammengefasst.

Algorithmus 4 $AOS(I_1, I_2; \tau, \alpha, maxIter)$

```

1: Initialisiere  $k := 0, \mathbf{U}_k := \mathbf{0}$ 
2: for  $k = 0$  to  $MaxIter$  do
3:   for  $i = 1$  to  $d$  do
4:      $\mathbf{F}_i^k := (I_2(\mathbf{X} - \mathbf{U}^k) - I_1) \partial_i I_2(\mathbf{X} - \mathbf{U}^k)$ 
5:     for  $j = 1$  to  $d$  do
6:        $\mathbf{A}_j := S_A * \mathbf{U}_i^k$ 
7:        $\mathbf{V}_j := (\mathbf{E}_n - \alpha\tau\mathbf{A}_j)^{-1} (\mathbf{U}_i^k + \tau\mathbf{F}^k)$ 
8:     end for
9:     Setze  $\mathbf{U}_i^k := \frac{1}{d} \sum_{j=1}^d \mathbf{V}_j$ 
10:   end for
11: end for

```

5.2 Segmentierung durch deformierbare Registrierung

Mit der Diffusions-Registrierung steht nun ein Modell zur Verfügung, welches die Beziehung von Bildinhalten mittels Deformationsfeldern herstellt. Lokale Verformungen können dabei zunächst beliebige Gestalt annehmen und sind nicht, wie etwa bei parametrischen Ansätzen, auf bestimmte Formen beschränkt. Die Sinnhaftigkeit der Transformation ist dabei durch die Regularisierung durch den Diffusionstherm gegeben, der sicherstellt, dass das Deformationsfeld nicht oszilliert, sich gewissermaßen „gutartig“ verhält und damit das transformierte Bild als Ergebnis einen korrekten Bildinhalt vermittelt. Die Deformation wird dabei durch die Differenz der Bildfunktionen, das heißt der Intensitätswerte im Bild bestimmt. Im Gegensatz zu der affinen Registrierung in Kapitel 3 wird dabei bezüglich der Bildmetrik nicht nur eine bestmögliche globale Übereinstimmung der Bilder erhalten, sondern auch lokale Unterschiede in der Bildstruktur erfasst und durch Deformation angenähert. Das heißt, auch für (Teil-)Bilder, die eigentlich keine Übereinstimmung oder Ähnlichkeit aufweisen, wird eine Vorschrift zur „Konstruktion“ aus den Intensitätswerten aus dem Eingangsbild erhalten.

Diese Betrachtung motiviert dann auch die Verwendung der deformierbaren Registrierung zur Segmentierung von Bildern: Die aus den Intensitätswerten berechnete Überführung der Bildinhalte ineinander muss dann auch für eine auf den Bildinhalten begründete Funktion gelten, die Segmentierung.

In [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008] wird dieser Ansatz zur Segmentierung von Bildstapeln anhand einer Menge von Referenzsegmentierungen untersucht. Für eine gegebene Referenzsegmentierung wird die Deformation des zugehörigen Intensitätsbilds zu einem unbekanntem Bilddatum mittels des Diffusionsansatzes bestimmt und die erhaltene Transformation auf die Referenzsegmentierung angewandt, um eine Segmentierung des neuen Bildes zu erhalten. Der Ansatz ist dabei besonders für serielle Schnittbilder geeignet, da hier für konsekutive Schnitte eine globale Ähnlichkeit beziehungsweise ähnliche Topologie der Segmentierung, gegenüber lokalen Unterschieden und Formänderungen angenommen werden kann, wodurch die Bestimmung der Transformation erleichtert wird.

5.2.1 Deformationsfeld und Transformation

Im Gegensatz zum vorhergehenden Kapitel werden nun Segmentierungen nicht als Klassenlabel der einzelnen Bildpunkte aufgefasst, sondern als Funktion über dem Bildbereich, das heißt $S : \Omega \mapsto \{1, \dots, K\}$

$S_i := S(\Omega) = i \cup_{i=1}^K S_i = \Omega$ und $S_i \neq S_j = \emptyset$, $i \neq j$ auf K Klassen oder *Klassenlabels*.

Für ein segmentiertes Referenzbild (I_1, S_1) und unsegmentiertes Testbild I_2 wird nun eine Segmentierung S'_2 von I_2 aus der Deformation von S mittels der zwischen I_1 und I_2 bestimmten Koordinatenverschiebung \mathbf{u} erhalten:

$$S'_2 := S_1 \circ \mathbf{u} \quad (5.18)$$

und

$$\mathbf{u} =: \operatorname{argmin}_{\mathbf{u}} \frac{1}{2} \int_{\Omega} (I_2 - (I_1 \circ \mathbf{u}))^2 + \alpha \sum_{i=1}^d \int_{\Omega} \|\mathbf{u}_i\|^2. \quad (5.19)$$

Dabei wird die optimale Transformation \mathbf{u} zwischen beiden Intensitätsbildern aus der Minimierung mittels des AOS-Ansatzes Alg. 4 bestimmt.

In Algorithmus 4 beziehungsweise auch im vorhergehenden Abschnitt wird lediglich die Diskretisierung einer kontinuierlichen Bildfunktion eingeführt. Dabei ist jedoch, beispielsweise in Alg. 4, Z. 4 auch die umgekehrte Richtung wichtig für die Lösung: die Auswertung der kontinuierlichen Verschiebungen über dem diskreten Bildgitter. Für den beschriebenen Ansatz zur Lösung des Diffusionsproblems genügt im iterativen Verfahren zunächst wieder ein (bi)linearer Ansatz zur Interpolation, für die Transformation gemäß Gleichung 5.18 ist eine kontinuierliche Interpolation der Segmentierung jedoch ungeeignet, da die Klassenzugehörigkeiten keinen ordinalen Zusammenhang besitzen. Für die Berechnung von $S \circ \mathbf{u}$ muss daher die Interpolation mittels nächster *Nachbar-Interpolation* erfolgen

$$S' := S([\mathbf{u}(\mathbf{x})]) \quad \text{mit } [\mathbf{x}] := ([x_1], \dots, [x_d]) \quad (5.20)$$

und Rundungsoperator $[\] : \mathbb{R} \mapsto \mathbb{Z}$.

Durch den Registrierungsansatz wird der Bezug zwischen beiden Bildern hergestellt. Im Gegensatz zu beispielsweise aktiven Konturmodellen ist also die Relation zur Referenzstichprobe explizit gegeben, dass heißt, das im vorhergehenden Kapitel geforderte überwachte Szenario für die Segmentierung ist auch hier gegeben, dabei werden vom Experten erstellte Referenzsegmentierungen und -bilder vollständig verwendet. Die Findung der Deformation wird dabei von den Intensitäten des gesamten Bildes getrieben und nicht wie bei *Snake*-Modellen lediglich von der lokalen Gestalt der Bildfunktion. So wird zum einen für die Segmentierung eine wesentliche Verbesserung erzielt, indem die Segmentierung „im Großen“ von vorneherein sichergestellt wird. Zum anderen werden durch die Deformation auch die lokalen Bildinhalte berücksichtigt, die Regularisierung stellt dabei sicher, dass dabei kein „unnatürliches“ Verhalten angenommen wird. Der Diffusionsansatz besitzt dabei jedoch keine direkte physikalische Bedeutung, wie beispielsweise elastische Modelle. Durch die Regularisierung sind ferner nicht beliebige Deformationen und damit Segmentierungen, wie beim klassifikationsbasierten Ansatz, möglich.

5.2.2 Einfluss und Wahl der Parameter für die Lösung

Das qualitative Verhalten des Registrierungsansatzes ergibt sich aus der Regularisierung selbst. Für gegebenes Bildmaterial ist daher das Verhalten bei der Gleichgewichtseinstellung beziehungsweise der numerischen Lösung bezüglich des Regularisierungsparameters α und der Zeitschrittweite τ im Lösungsverfahren selbst interessant. Während die Wahl von α als Gewichtung des Strafterms in gewissen Grenzen frei wählbar sein sollte, um unterschiedlich *glatte* Verschiebungsvektorfelder zu erhalten, ist τ

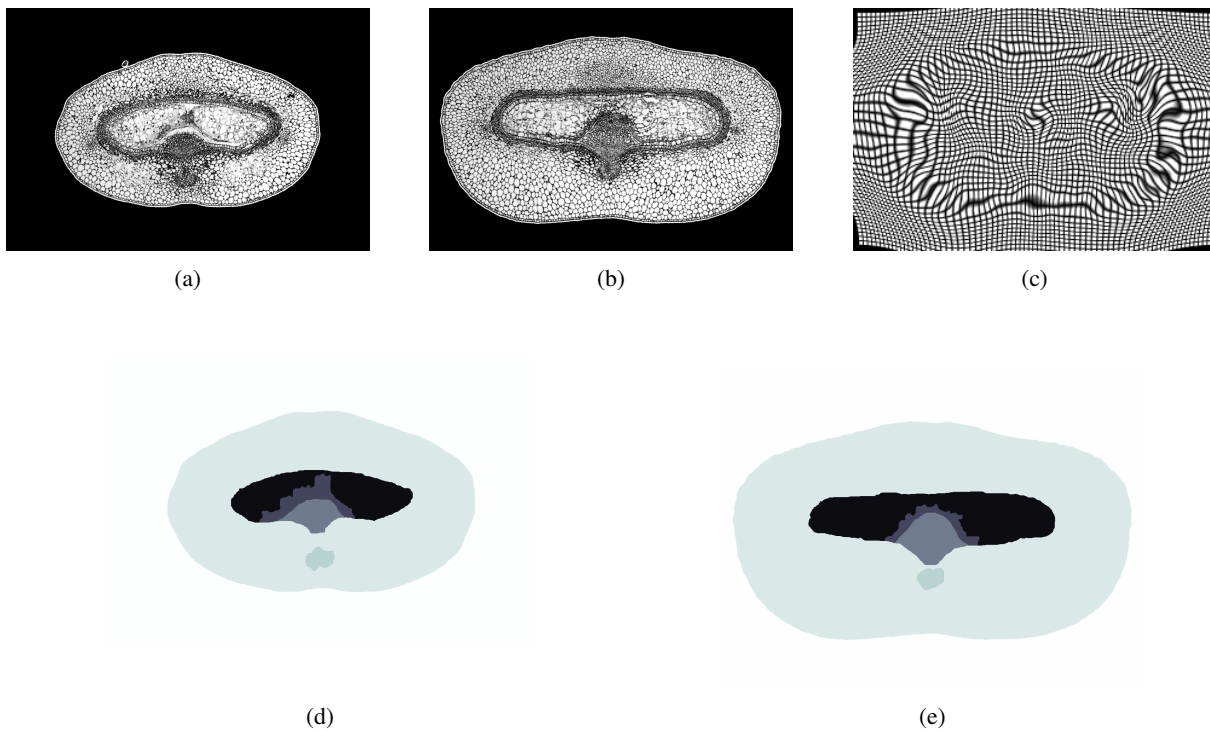


Abbildung 5.1: Bestimmung der Deformation mittels Diffusionsregistrierung zwischen zwei Intensitätsbildern 5.1a, 5.1a 5.1a (*Hordeum* Schnittbilder, 5 DAF) errechnete Deformation (als Gitterdeformation) 5.1c, Referenzsegmentierung 5.1d und transformierte Segmentierung 5.1e

eine eindeutig zu optimierende Variable: Die Zeitschrittweite bestimmt direkt die Anzahl notwendiger Iterationen bis zur Gleichgewichtseinstellung. Wird eine zu große Schrittweite gewählt, ist das System natürlich nicht mehr stabil, und die Iteration kann keine Lösung finden, oszilliert usw. . Kleine Schrittweiten resultieren andererseits in großen Iterationszahlen beziehungsweise in der Praxis zur Terminierung vor der Minimaleinstellung, wie in Abb. 5.2a dargestellt. Da τ nicht linear in die Berechnung des von U_t (Alg. 4 Z.6) eingeht, ist eine Bestimmung der Schrittweite aus der aktuellen Verschiebung nicht möglich und wird daher fest gewählt.

Die Wahl von α beeinflusst bei angenommener Konvergenz mit festem τ die Bestimmung von U in der Iteration und ist damit auch vom Kraftfeld und Bildinhalt abhängig. Wird ein zu geringer Wert gesetzt, ist das Problem wieder schlecht gestellt, die Lösung bleibt in einer „schlechten“ Deformation stecken. Bei zu starker Regularisierung können „notwendige“ Deformationen nicht erreicht werden. Neben einer festen Wahl mit einem geeigneten Wert kann $\alpha := \alpha(t) \mapsto 0$ für $t \mapsto \infty$ parametrisiert werden, das heißt, zu Iterationsanfang wird die „richtige Richtung“ der Deformation sichergestellt, um gegen Ende wieder ganz beliebige Transformationen zur Minimierung zuzulassen.

5.3 Ein Mischmodell für die Segmentierung

Der registrierungsbasierte Ansatz liefert eine vollständig andere Herangehensweise an das Segmentierungsproblem als der im vorhergehenden Kapitel beschriebene Ansatz durch die überwachte Klassifi-

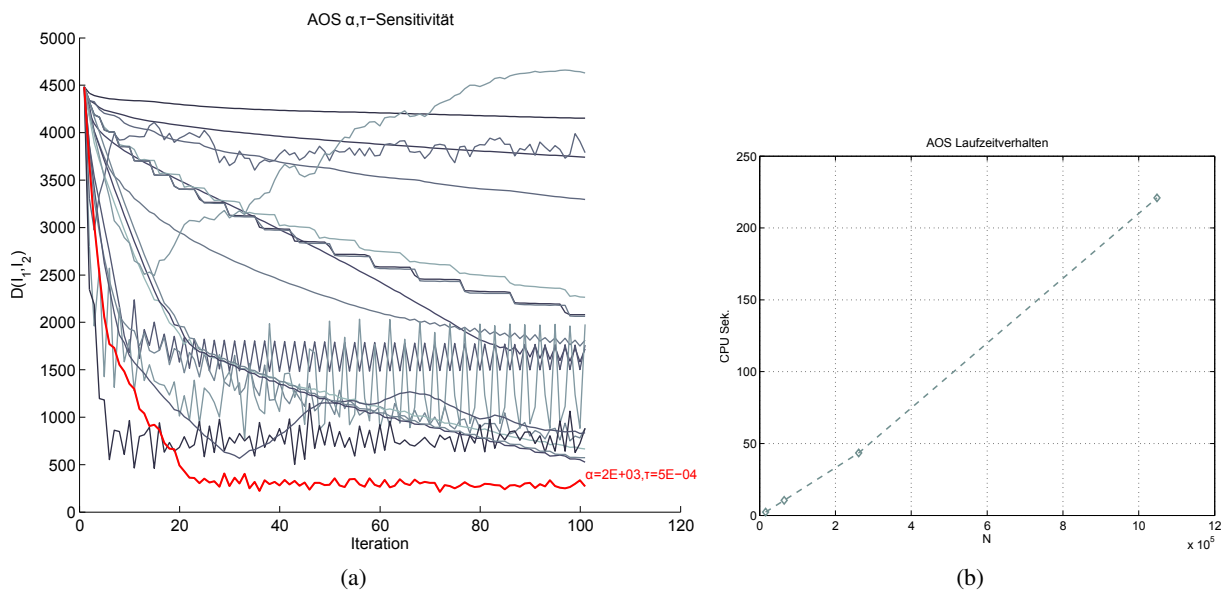


Abbildung 5.2: Einfluss der Parameter τ, α für die Minimierung des Diffusionsansatzes: Kurvenschar für unterschiedliche Parameter 5.2a $\alpha = \{2E02, 2E03, 2E04, 2E05\}$, $\tau = \{5E - 03, 5E - 04, 5E - 05\}$. Zu schwache Regularisierung und große Schrittweiten liefern starke Oszillationen, bzw. keine Gleichgewichtseinstellung, im anderen Extrem keine Konvergenz in gegebener Zeit. 5.2b Lineares Laufzeitverhalten für Alg. 4 : $n = \{16384, 65536, 262144, 1048576\}$, Laufzeit 100 Iterationen (1 CPU, in Sek.).

kation. Daraus stellt sich die Frage, ob sich durch die Verbindung der diskriminativen Modelle durch Merkmalsklassifikation und des generativen Modells durch Deformation eine Verbesserung der Klassifikationsleistung erzielen lassen kann. Dies ist zunächst im Sinne der Anwendung relevant, inwiefern sich eine verbesserte Modellerzeugung durch Erhöhung der Segmentierungsgenauigkeit erreichen lässt. Darüber hinaus können so auch mögliche Schwachstellen des registrierungsbasierten Ansatzes quantifiziert werden, beispielsweise bezüglich der aus der Regularisierung entspringenden, Limitationen in der Abbildung lokaler unstetiger Deformationen.

In [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2009] wurde dazu ein Mischmodell zur Kombination der beiden Ansätze untersucht, das wechselseitig die Unsicherheiten beider Ansätze der Gewebivorhersagen quantifiziert, und die optimale Vorhersagen auf dieser Basis ermittelt.

5.3.1 Globale und lokale Segmentierung

Grundlage sollen zunächst Beobachtungen über die räumliche Verteilung des Segmentierungs- beziehungsweise Klassifikationsfehlers im Bildbereich Ω sein, welche dann die Grundlage einer statistischen Gewichtung der Vorhersagen beider Modelle ist.

Für das Deformationsmodell, als globales Modell zur Segmentierung, kann die Fehlerwahrscheinlichkeit zunächst als *proportional* zum Betrag der Verschiebungsvektoren angenommen werden: Eine identische Abbildung liegt vor, wenn Bildinhalte beider Bilder identisch sind. Liegen dagegen starke Verschiebungen vor, so sind in Form des Kraftfeldes große Bildunterschiede dargestellt. Kraftfeld und Strafterm befinden sich jedoch im Gleichgewicht, und etwaige aus, den Intensitäten manifeste Deformationen wer-

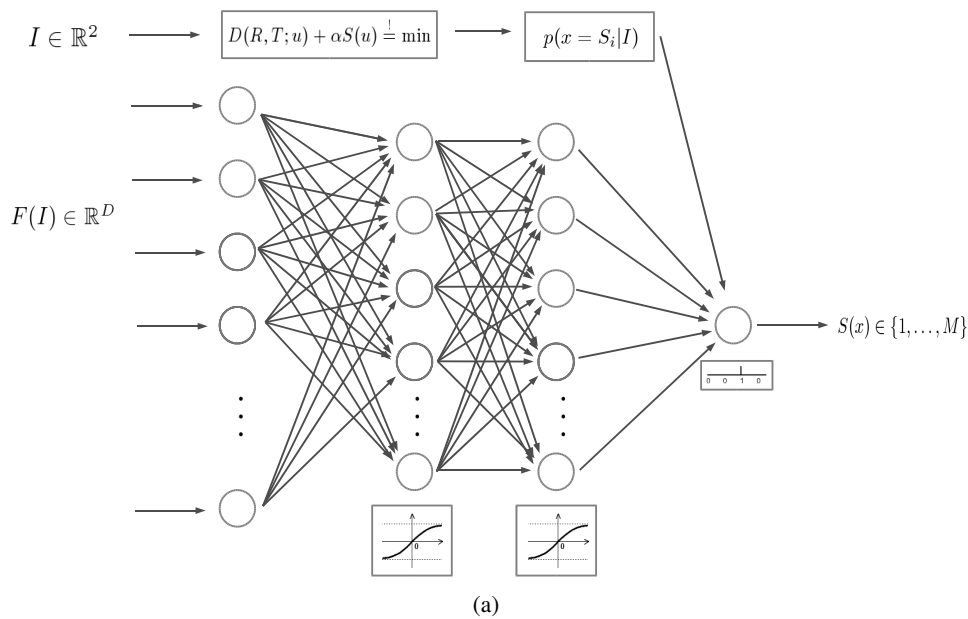


Abbildung 5.3: Konnektionismus im Mischmodell: Ausgabe des Netzwerkmodells und a priori Gewebewahrscheinlichkeiten aus dem Diffusionsansatz werden in der Ausgabeschicht gewichtet kombiniert.

den aufgrund der Regularisierung unterdrückt, was zu den beschriebenen Segmentierungsfehlern führen kann.

Die Fehlerwahrscheinlichkeit eines Klassifikators muss als gleichverteilt über Ω angenommen werden, Merkmalsvektoren werden unabhängig von ihrer Lage im Bild verarbeitet. Ein Maß für die *Sicherheit* der Vorhersage respektive des Klassifikationsrisikos muss daher aus einer Wertung des Klassifikators für den vorliegenden (Merkmals-)Datenpunkt kommen. Dies kann beispielsweise für die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen SVM der Abstand zur Entscheidungsfläche sein. Für MLP-Modelle kann die Sicherheit der Vorhersage direkt aus der Netzanwort für ein Datum vor Anwendung der Entscheidungsregel bestimmt werden. Die Komponenten des Ausgabevektors liefern dabei ein probabilistisches Maß der Klassenzugehörigkeiten [BISHOP, 1995]. In dem vorgeschlagenen Mischmodell können nun die Ausgaben beider Modelle kombiniert werden, indem beide Fehlermaße zur Gewichtung der Modellvorhersage genutzt werden, und damit insgesamt das Fehlklassifikationsrisiko minimiert wird.

5.3.2 Annahmen (*Prior*) und Modellselektion

Aus diesen Annahmen über die Verteilung des Segmentierungsfehlers werden nun Größen für ein Mischmodell abgeleitet. Dabei dient die globale, aus der Registrierung entsprungene Segmentierung zur Schätzung einer a priori Wahrscheinlichkeit $P(S)$, die dann mit in das neuronale Netz zur tatsächlichen Gewebivorhersage $P(S|I)$ einfließt. Die Vorhersage des globalen Modells kann so auf einfache Art und Weise in die Architektur des neuronalen Netzes integriert werden, in der Trainingsphase kann dann mit gegebenen a priori Wahrscheinlichkeiten für Referenzdaten eine Netzarchitektur hin zu optimaler Generalisierungsleistung des Mischmodells mit den bestehenden Verfahren gefunden werden: Das neuronale Netz wird gewissermaßen um eine stochastische Komponente erweitert, die aus der Energieminimierung der Registrierung geschätzt wird. Die zusätzliche Eingabe sichert dabei gewissermaßen die Netzworhersage

ab, indem die globale Übereinstimmung der Bildinhalte und damit *sichere* Bereiche der Segmentierung bestimmt werden und so der räumlich nicht gebundene Fehler (*Übersegmentierung*) der nur bildpunkt-basierten Klassifikation unterdrückt wird.

Die Wahrscheinlichkeit eine Klassenzugehörigkeit am Punkt \mathbf{x} zu beobachten, werden dazu, wie eingangs motiviert, aus U beziehungsweise dem Betrag der Verschiebung $\|U\|$ geschätzt

$$p(S(\mathbf{x} = k)|I) := \begin{cases} 0 & (S(\mathbf{x}) \circ u) \neq k \\ f(\|U(\mathbf{x})\|) & \text{else} \end{cases} \quad (5.21)$$

mit $f : \mathbb{R}^2 \mapsto [0, 1]$ aus der empirischen Verteilungsfunktion für die beobachteten Verschiebungsbeträge $\|U\|$.

Für die Bewertung der Vorhersage aus dem Netzmodell werden die Komponenten des Ausgabevektors x_L (s. Abschn. 4.2.1) betrachtet: Für das mittels Fehlerrückführung auf minimalen quadratischen Fehler zwischen Ein- und Ausgabevektoren adaptierte Netzwerk liefern die Ausgaben eine statistische Vorhersage bezogen auf den zu erwartenden Fehler (vgl. [BISHOP, 1995], Kap. 6). Für die Bewertung der Ausgaben kann nun mittels *Shannon-Entropie* der Abstand vom gleichverteilten Fehler bestimmt werden

$$H(\mathbf{x}) := - \sum_{i=1}^k x \log_2 x, \quad H(\mathbf{x}) \in [0, 2] \text{ (Bits);} \quad (5.22)$$

und damit eine Gewichtung $\lambda = 0.5H(\mathbf{x}_L)$ beziehungsweise $(1 - \lambda)$ der Netzausgabe \mathbf{x}_L und $p(S^U|I)$ respektive als Eingabe in die *argmax*-Ausgabeschicht zu erhalten.

Für das so konstruierte Modell stellt sich nun die Frage nach der optimalen Architektur des Netzwerkes für die Segmentierung, das heißt die Anzahl der Schichten, und Neuronen darin deren Transferfunktionen usw. vor der eigentlichen Parameteradaption durch Fehlerrückführung auf den Referenzdaten.

Während eine Vielzahl von Netzen gute Adaption auf den Trainingsdaten liefern kann, sollte eine optimale Architektur vor allem gut auf unklassifizierten Daten generalisieren und damit, im Sinne einer strukturellen Risikominierung, die Adaption mit möglichst wenigen Parametern realisieren. Die automatische Auswahl optimaler Netzarchitektur, anhand Netzausdünnung oder konstruktiver Verfahren, ist Gegenstand der Forschung [TIBSHIRANI, 1996]. Neben informationstheoretischen Kriterien, die Netzwerkgröße und -struktur zu regularisieren beziehungsweise Modell- gegen Datenkomplexität zu bewerten [GRÜNWARD et al., 2005], kann mittels Kreuzvalidierung die Generalisierungsfähigkeit unterschiedlicher Netze direkt auf den vorliegenden Daten optimiert werden [ANDERSEN und MARTINEZ, 2002]. Im vorliegenden Fall wurde auf Basis der Merkmalsdaten eine zehnfache Kreuzvalidierung mit unterschiedlichen Netzarchitekturen durchgeführt, um damit eine rein datengetriebene Auswahl zu erhalten. Basierend auf der Annahme, dass die Trainingsdaten ähnlich den Anwendungsdaten verteilt sind, wird das Modell mit maximaler durchschnittlicher Korrektklassifikationsrate ausgewählt. Die Akkurazitäten aus Kreuzvalidierung auf den Referenzdaten liegen im Allgemeinen über der tatsächlichen Genauigkeit, nichtsdestotrotz liefert die Modellselektion auch eine Abschätzung der zu erwartenden Genauigkeiten in der Anwendung.

Die Untersuchung zur Modellselektion ist in Abb. 5.4 zusammengefasst: Die *Expressivität* des Netzwerkes mit nur einer versteckten Schicht reicht für eine hinreichende Trennung und Generalisierbarkeit

5.3 Ein Mischmodell für die Segmentierung

nicht aus, während zweischichtige Netze hohe Akkurazitäten auf der Testmenge liefern. Eine weitere Erhöhung der Neuronenzahl liefert keine Verbesserung.

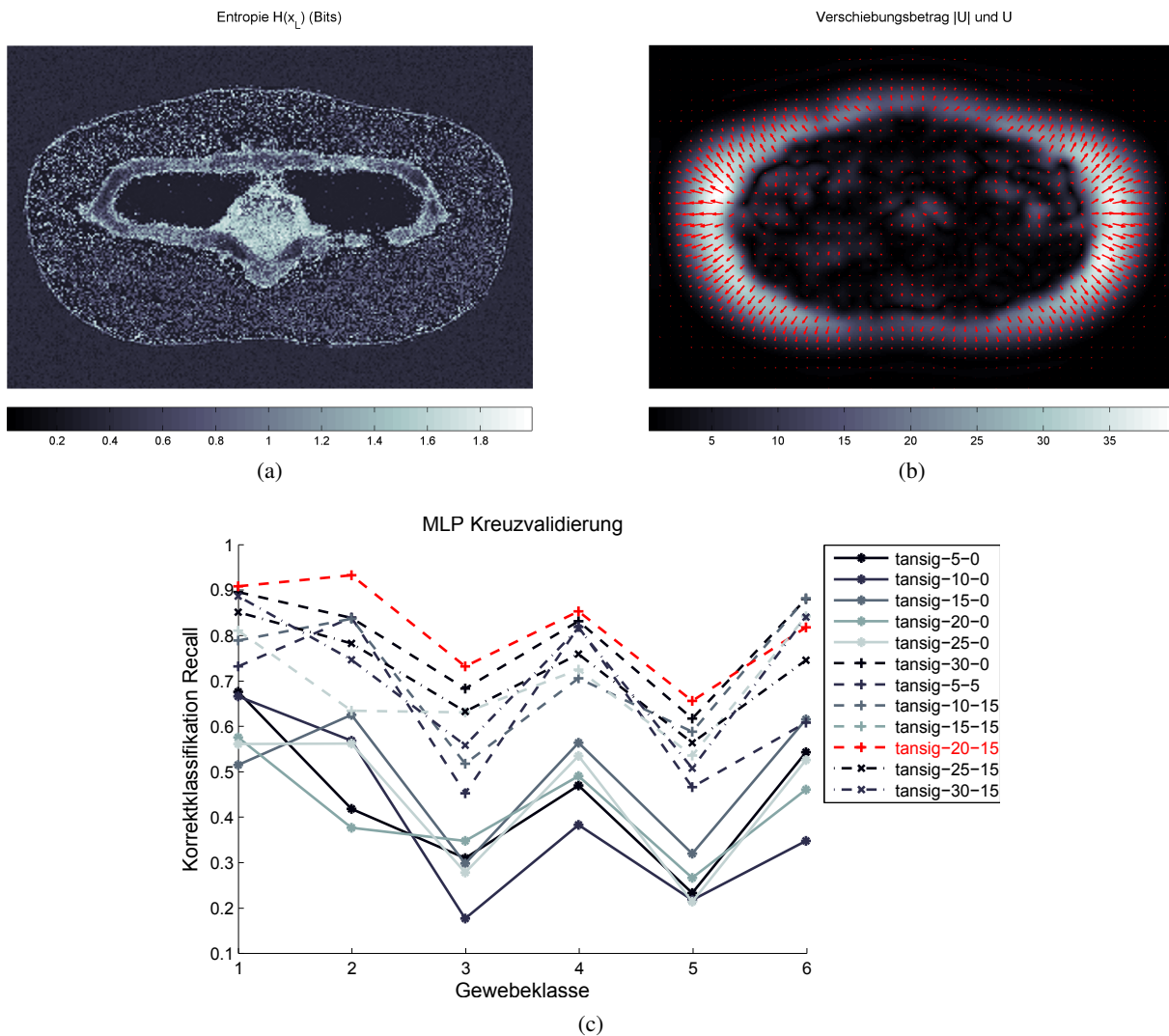


Abbildung 5.4: Mischmodell für die Segmentierung: 5.4a Entropie der MLP-Ausgaben aus der überwachten Klassifikation der Merkmalsdaten, 5.4b Betrag der Koordinatenverschiebung und einige Verschiebungsvektoren, Bestimmung der optimalen Netzwerkarchitektur anhand der Korrektklassifikationsraten für Gewebeklassen in der Kreuzvalidierung.

5.4 Simultane Rekonstruktion und Segmentierung

Eingangs des Kapitels wurde motiviert, wie die Bildsegmentierung als Registrierungsproblem aufgefasst werden kann. Basierend auf dieser Beobachtung wurde mit dem AOS-Ansatz ein Modell zur Segmentierung vorgestellt, das auf der deformierbaren Registrierung zweier Bilddaten besteht. Grundlage oder Eingangsdaten des Verfahrens waren rekonstruierte Bildstapel, so dass eine geometrische (biologische) Kongruenz angenommen und die vorliegenden Bildunterschiede als unterschiedliche Gewebestrukturen in der Probe betrachtet werden konnten. Im Folgenden soll untersucht werden, inwieweit mit dem Deformationsansatz *unregistrierte* Bildstapel segmentiert werden können beziehungsweise wie weit eine *gleichzeitige* Segmentierung und Rekonstruktion der Bildvolumen erreicht werden kann.

Grundlage ist dabei wieder der Zusammenhang zwischen Registrierung und Segmentierung von Bildern, dabei soll nun für die Verarbeitung von nicht alignierten Bildstapeln auch die „umgekehrte Richtung“ der obigen Schlussfolgerung ausgenutzt werden: Liegen für Bildpaare Segmentierungen vor, so liefert eine Registrierung anhand beider Segmentierungen eine gültige Registrierung auch für die zugrunde liegenden Intensitätsbilder.

In anderer Form ist diese Äquivalenz auch Grundlage einer *landmarkenbasierten* Registrierung von Bildern mittels automatisch extrahierter Punkte und Deskriptoren durch sogenannte *Interest-Operatoren*: Die Detektion eindeutiger Bildinhalte und Koordinaten ist letztlich ein der (unüberwachten) Segmentierung ähnliches Problem. Darüber hinaus sind für die Bestimmung parametrischer Transformationen keine dichten Koordinatenkorrespondenzen notwendig, das heißt, auch unvollständige „Segmentierungen“ genügen für die Bestimmung beispielsweise affiner Transformationen.

Anhand dieser Beobachtungen wurde ein Modell vorgestellt [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2010], welches eine verschränkte, oder wechselseitige Segmentierung und Registrierung von unalignierten Bildstapeln liefert. Grundlage oder Motivation des Ansatzes ist, jeweils Segmentierung und Registrierung von Intensitätsbildern durch Information aus dem jeweils komplementären Schritt zu verbessern, das heißt, den Rekonstruktionsschritt mittels verfügbarer, möglicherweise fehlerhafter Segmentierung des Bildes zu vereinfachen und darauf basierend eine aktualisierte Bildsegmentierung zu bestimmen.

5.4.1 Wechselseitige Formulierung von Registrierung und Segmentierung

Mit dem so motivierten Modell sollen Segmentierungsfehler und Bildmetrik der Grauwerte für die Registrierung gemeinsam minimiert werden. Ziel des Ansatzes ist nun also für eine Menge von Schnittbildern die Herstellung eines registrierten und segmentierten Bildvolumens \mathcal{V} , das heißt als Funktion in $\Omega \subset \mathbb{R}^3$ der Graustufen \mathcal{I} und Klassenzugehörigkeiten \mathcal{S}

$$\begin{aligned} \mathcal{V}(\vec{x}) &= (\mathcal{I}(\vec{x}), \mathcal{S}(\vec{x})) & (5.23) \\ \mathcal{I}(\vec{x}) &: \mathbb{R}^3 \mapsto \mathbb{R} \\ \mathcal{S}(\vec{x}) &: \mathbb{R}^3 \mapsto \{1, \dots, M\} \end{aligned}$$

Der Gesamtfehler für die geschätzte Segmentierung \mathcal{S}^* und Registrierung \mathcal{I}^* für einen gegebenen Bildstapel ergibt sich entsprechend als Summe

$$\mathcal{E}(\mathcal{V}^*) = E_1(\mathcal{I}^*) + E_2(\mathcal{S}^*) \quad (5.24)$$

beispielsweise der in den vorhergehenden Kapiteln definierten Fehlermaße.

Um nun wieder in ein überwachtes Szenario für die Segmentierung zurückkehren zu können, wird die Existenz einer unvollständige Referenzsegmentierung für äquidistante Schnittbilder, das heißt

$$\mathcal{S} := \{S_1, \dots, S_n\} \quad \mathcal{S} : \mathbb{R} \times \mathbb{R} \times \{\alpha, \dots, n\alpha\} \quad (5.25)$$

angenommen.

Für die Bestimmung des Segmentierungsfehlers wird auch eine Bildmetrik eingeführt, dabei wird nun angenommen, dass $N(i)$ auf die nächstgelegene Referenzsegmentierung abbildet:

$$\begin{aligned} E_1(\mathcal{S}^*) &:= \sum_k \int_{\Omega} D(S_1(\mathbf{x}), S_2(\mathbf{x})) d\mathbf{x} \\ &= \sum_{i=1}^k D(S_i, S_{N(i)}). \end{aligned} \quad (5.26)$$

Eine solche Metrik für die Bestimmung von E_1 kann nun nicht mehr ein numerisches Abstandsmaß wie im Vorhergehenden sein: Die (Gewebe-)Klassen der Segmentierung sind lediglich eindeutige Bezeichner und bilden keine Ordinalskale.

Daher wird eine alternative Bildmetrik definiert, welche die Segmentierungsgenauigkeit im Sinne der Klassifikationsgenauigkeit abbildet. Als Äquivalent zur Akkurazität der Klassifikation wird die Kardinalität der Menge der übereinstimmenden Pixel (*cardinality match metric*, CMM [ROWLAND, 2007])

$$D_{\text{CMM}}(S_1, S_2) := -\frac{1}{|\Omega|} \int_{\Omega} \delta(S_1(\mathbf{x}), S_2(\mathbf{x})) d\mathbf{x} \in [-1, 0] \quad (5.27)$$

betrachtet.

Als Metrik für die Registrierung der Intensitätsbilder wird wieder der quadratische Abstand

$$E_2(\mathcal{I}^*) := \sum_{i=1}^k D_{\text{SSD}}(I_i, I_{i+1}; u) \quad (5.28)$$

benutzt.

Ansatz des Verfahrens ist nun, die jeweiligen Fehlermaße wechselseitig zur Optimierung des gesamten Fehlers zu verwenden:

1. Minimiere E_1 für die Schätzung der affinen Transformation zur Registrierung
2. Benutze E_2 für die Schätzung der Deformation u zur Segmentierung.

Durch die Rekonstruktion anhand der aktuellen Segmentierung wird im Vergleich zu der intensitätbasierten Registrierung ein numerisch wesentlich robusterer Ansatz erhalten, da Oszillationen der Metrik weitestgehend unterbunden werden, insbesondere wenn, wie im vorliegenden Fall bei histologischen Färbungen, die Bildfunktionen eine hohe lokale Entropie aufweisen.

Die deformierbare Registrierung ist auf eine affine Vorregistrierung zur Abbildung von globalen Änderungen „angewiesen“: Transformation der Form $\mathbf{u} = C\mathbf{x} + b$ werden durch die Regularisierung der Norm des Gradienten für $C \neq 0$ verhindert; dies ist für die Adaption der Segmentierung wünschenswert, was die direkte Korrespondenzfindung und Segmentierung aber unmöglich macht.

5.4.2 Iterative Optimierung im Skalenraum

Die bestimmten Fehlermaße sollen nun iterativ optimiert werden, um ein Volumen \mathcal{V}^* mit minimalem Gesamtfehler zu erhalten. Dazu wird eine Mehrskalrepräsentation der vorliegenden Bildaten verwendet, dabei unterliegt, zusätzlich zu der in Kapitel 3 beschriebenen Auflösungshierarchie, auch die Verarbeitung der Segmentierung einer Unterabtastung. Dadurch sollen, wie vorher, Vorteile sowohl für die Geschwindigkeit als auch für die Robustheit des Verfahrens erhalten werden:

- Bestimmung größerer Deformation für die Diffusionsregistrierung zu Anfang der Iteration
- Unterdrückung von Details bei der Schätzung der initialen Segmentierungen und deren Registrierung
- Verbesserung der Laufzeit bei fester Laufzeitkomplexität.

Es wird also Skalenparameter t für Intensitätsbilder und entsprechende Unterabtastung der Segmentierungen und Intensitätsbilder für die Fehlermaße eingeführt. Durch die Skalenraumdarstellung mittels Faltung mit Gaußkernen und Unterabtastung $I_t := \downarrow \sqrt{t}(I * g_t)$, werden Strukturen, deren räumliche Ausdehnung kleiner \sqrt{t} ist, unterdrückt und bleiben in der Segmentierung $S_t := \downarrow \sqrt{t}(S)$ daher unberücksichtigt. So werden zum einen zu Beginn „kleinere“ Daten erhalten und zum anderen im oben genannten Sinn auch glattere Bildfunktionen für die deformierbare Registrierung. Allgemein kann das „Zurückfallen“ auf eine größere Skale als eine Art Initialisierung für die Iteration der nächsten Stufe betrachtet werden, wobei jeweils ein entsprechender Fehler für die Schätzung angenommen werden kann.

Die CMM-Bildmetrik liefert zwar wegen der geringen lokalen Varianz der Segmentierung(-sfunktion) eine wesentlich glattere Funktionsoberfläche im Raum möglicher Transformationen, ist aber aufgrund der Indikatorfunktion in Gleichung 5.27 nicht mehr (stetig) differenzierbar. Für die Optimierung können daher keine ableitungsbasierten Verfahren benutzt werden, die auf einem analytischen Gradienten basieren, sondern müssen Verfahren 0-ter Ordnung eingesetzt werden, wie beispielsweise der *Downhill-Simplex* Algorithmus aus Kapitel 3 nach NELDER und MEADE [NELDER und MEAD, 1965]. Was sich aber wegen der „Gutmütigkeit“ der Zielfunktion gegenüber numerischer Approximation der Ableitungen als immernoch vorteilhaft erweist.

Als Eingabe wird eine initiale Schätzung der Segmentierung von I_2 benötigt. Dazu wird angenommen, dass auf großen Skalen t analog der Energiefunktion im CHAN-VESE Modell [CHAN und VESE, 2001] für die aktiven Konturen (Abschn. 2.3.3) eine zunächst ausreichend genaue Approximation der Segmentierung anhand des mittleren Grauwertes der jeweiligen Segmente erhalten werden kann. Das heißt, aus dem Referenzdatum wird ein Vektor $\boldsymbol{\mu} = (\mu_1, \dots, \mu_K)$ mit

$$\mu_i := \frac{\int_{\Omega} \delta(i, S(\mathbf{x})) I(\mathbf{x}) d\mathbf{x}}{\int_{\Omega} \delta(i, S(\mathbf{x})) d\mathbf{x}} \quad (5.29)$$

der klassenbedingten Intensitätswerte geschätzt, der zur Segmentierung des Testdatums mit

$$S_2(\mathbf{x}) := \underset{i}{\operatorname{argmin}} (|I_2(\mathbf{x}) - \mu_i|) \quad i = 1, \dots, K \quad (5.30)$$

benutzt wird.

Nun soll eine affine Abbildung φ zur Registrierung (Rekonstruktion) der Intensitätsbilder und ein Deformationsfeld \mathbf{u} zur Segmentierung anhand der gegebenen Referenz bestimmt werden. Das heißt, die affine Transformation

$$\varphi_t := \operatorname{argmin}_{\varphi} D_{\text{CMM}}(S_{1;t}, S_{2;t}^*; \varphi) \quad (5.31)$$

wird der Bestimmung des Deformationsfelds zugrunde gelegt

$$\mathbf{u}_t := \operatorname{argmin}_{\phi} D(I_{1;t}, I_{2;t} \circ \phi_t; \mathbf{u}), \quad (5.32)$$

welches wiederum die Segmentierung durch

$$S_{2;t}^* := S_{1;t} \circ u_t \quad t = T, \dots, 1. \quad (5.33)$$

gestattet.

Um eine gegenseitige Verbesserung von Registrierung und Segmentierung zu erreichen, werden nun beide Schritte in einer dem *expectation-maximization* Algorithmus ähnlichen Heuristik über die Skalenraumdarstellung der Bilder iteriert: Die Registrierung wird durch eine exaktere Segmentierung verbessert und umgekehrt. Das gesamte Vorgehen ist in Algorithmus 5 zusammengefasst.

Algorithmus 5 DIF()

- 1: Berechne Skalenraumdarstellung $I_{1,2} * G_t$, $t = 1, \dots, t_{\max}$
 - 2: $S_{2;T} = \operatorname{argmin}_i |I_2 - \mu_i|$
 - 3: **for** $t = t_{\max}$ **downto** 1 **do**
 - 4: $\phi := \operatorname{argmin}_{\phi} D_C(S_{1;t}, S_{2;t}; \phi)$ (*Nelder-Mead*)
 - 5: $I_{2;t} := I_{2;t} \circ \phi$
 - 6: $u_t := \operatorname{argmin}_{\phi} (D(I_{1;t}, I_{2;t} \circ \phi_t; \mathbf{u}) + \alpha \frac{1}{2} \sum \|\nabla u_i\|)$ (*AOS*)
 - 7: Transformation $S_{2;t-1}^* = S_{1;t} \circ u_t$
 - 8: **end for**
-

5.5 Segmentierungsergebnisse

Zur genauen Untersuchung wurde wieder eine vollständig klassifizierte Stichprobe als vollständig vom biologischen Experten manuell segmentierter Bildstapel eines *Hordeum* Datums zugrunde gelegt. Durch die Verwendung dieses rechnerisch handhabbareren Datensatzes wird neben der eigentlichen Anwendung der Verarbeitung der realen Gigabyte großen Daten wieder, wie im vorhergehenden Abschnitt, das quantitative und qualitative Verhalten der vorher beschriebenen Ansätze zur Segmentierung untersucht.

5.5.1 Konfusionsmatrix

Zunächst soll die Segmentierung wieder im Sinne eines Klassifikationsproblems für die Bildpunkte betrachtet werden, um damit einen direkten Leistungsvergleich mit den Methoden aus dem vorhergehenden Kapitel zu erhalten: Richtig und falsch segmentierte Bildpunkte werden in Bezug zu den Referenzdaten bestimmt, um die entsprechenden Genauigkeiten wieder in Form der Konfusionsmatrizen zu erhalten.

KAPITEL 5. SEGMENTIERUNG ALS REGISTRIERUNGSPROBLEM

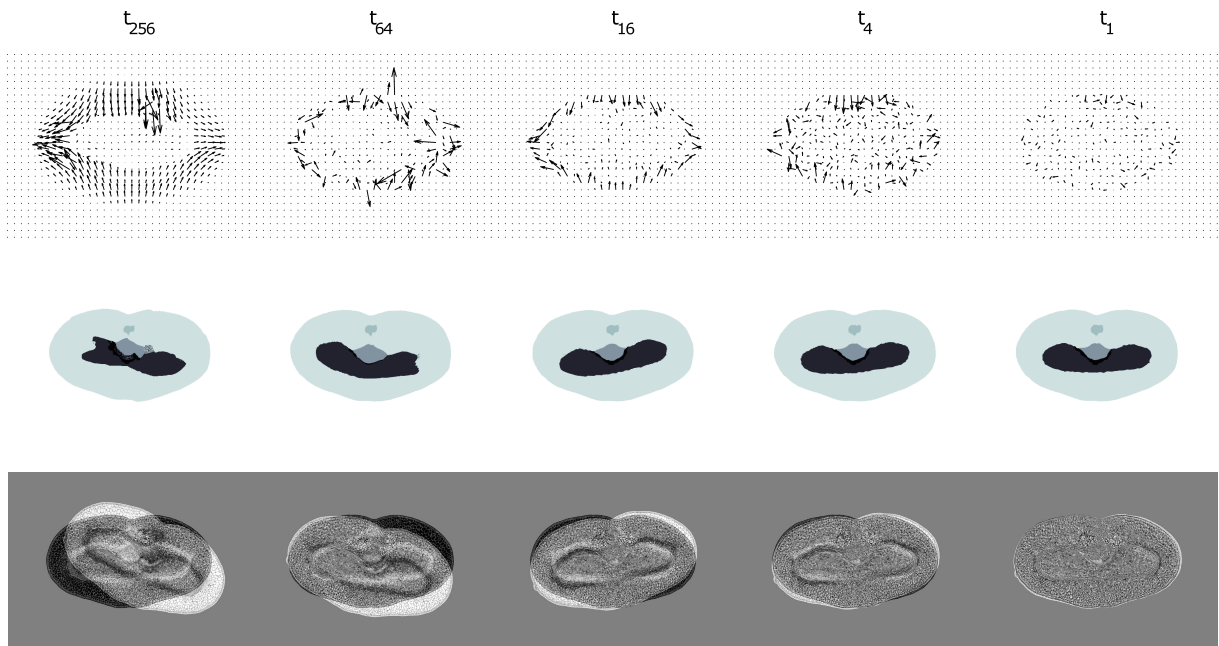


Abbildung 5.5: Iterative Rekonstruktion und Segmentierung im Mehrskalenansatz: 5.5a-5.5e Berechnete Koordinatenverschiebungen aus dem Diffusionsansatz, 5.5f-5.5j erhaltene Segmentierung, 5.5k-5.5o entsprechende Registrierung der Intensitätsbilder (Darstellung $\frac{1}{2} (I_1^{-1} + I_2)$) für unterschiedliche Skalen t_i .

Die statistische Validierung durch Wiederholung (Kreuzvalidierung und ROC-Kurven) entfällt dabei, da im registrierungsbasierten Verfahren ein stochastisches Verhalten wie bei den Klassifikatoren durch Initialisierung, Stichprobenziehung usw. nicht vorliegt.

Hier zeigt sich, dass besonders bei den anteilmäßig kleinen Klassen die Segmentierungsgenauigkeit des diffusionsbasierten Ansatzes wesentlich höher (72%, 71%) liegt als bei beiden Klassifikatoren. Auch für die unterrepräsentierten Datenpunkte wird durch die Vorgabe einer Segmentierung als deformierbares „Template“ die Klassifikation gewissermaßen abgesichert, indem die bei der Klassifikation vorliegende stochastische „Wahlfreiheit“ im Rahmen der Fehlerrate vermieden wird.

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit der Segmentierungsfehler der unterschiedlichen Verfahren zusammenhängt, beziehungsweise die Fehlsegmentierungen komplementär sind: Motivation des Hybridmodells aus Abschnitt 5.3 ist es, mögliche Limitationen des Diffusionsalgorithmus zu überwinden. Die Segmentierungsakkurazität des Hybridmodells liegt dabei auf den Referenzdaten für alle Klassen geringfügig höher (97.5% vs. 92.4%). Hier ist zu vermuten, dass anhand der punktwisen Klassifikation lokale Details in der Segmentierung abgebildet werden, die durch die Regularisierung der Verformung unterbunden werden.

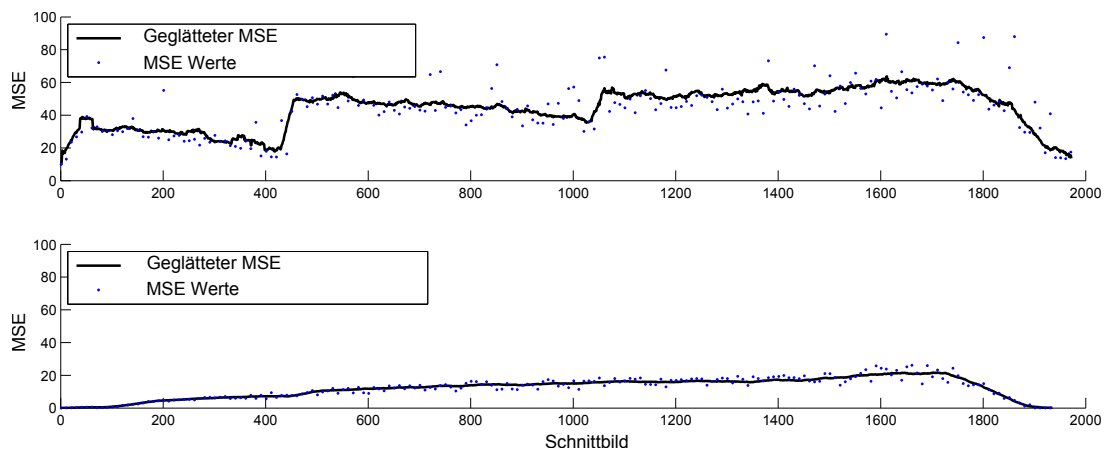


Abbildung 5.6: Rekonstruktion der Intensitätsvolumen durch den DIF-Ansatz anhand der Segmentierungsinformation: SSD-Abstände aller Bilder eines Datensatzes (*Hordeum*, 7 DAF) vor und nach der Transformation.

5.5.2 Hausdorff-Distanz gewichteter Fehler

In der Literatur sind mehr oder minder applikationsspezifische Fassungen einer *Segmentierungsqualität* vorgeschlagen worden, die einerseits auf spezifische Bilddaten und Probeobjekte angepasst, beispielsweise für medizinische Anwendungen, oder aber für bestimmte Klassen von Verfahren adaptiert sind (vgl. [SURI et al., 2002]).

Die bildpunktweise Betrachtung, in Form von Akkurazität und Konfusionsmatrix, liefert zunächst einen fundamentalen Indikator der Segmentierungsgenauigkeit. Durch die uniforme Aggregation und Mittelwertbildung falsch und korrekt klassifizierter Bildpunkte wird jedoch der räumliche Zusammenhang im Bilddatum vernachlässigt: Ein falsch segmentierter Datenpunkt, der sich räumlich *nah* zur korrekten Segment- oder Gewebegrenze befindet, reduziert die Klassifikationsgenauigkeit gleich stark wie einer, der sich in großer Entfernung zum tatsächlichen Segment befindet und damit einen qualitativ schwerwiegenderen Fehler darstellen sollte.

Da diese Beobachtung allgemeingültig für Segmentierungsprobleme ist, kann ein erweitertes Akkurazitätsmaß eingeführt werden, welches Segmentierungsfehler mit der Distanz zur Menge der Koordinaten des tatsächlichen Segments, analog zur Definition der *Hausdorff*-Distanz zwischen Mengen, gewichtet und damit eine Quantifizierung, *wie* falsch die Fehlklassifikation ist, liefert.

Dazu wird die Distanz zum nächsten Punkt (*distance to closest point*, DCP) als Gewichtung des Fehlers betrachtet: Für $S'(\mathbf{x}) = i$ und $S(\mathbf{x}) = j$ der geschätzten und tatsächlichen Segmentierung des Punktes $\mathbf{x} \in \Omega$ wird mit dem euklidischen Abstand

$$\text{DCP}(\mathbf{x}, S) := \begin{cases} \min_{\hat{\mathbf{x}} \in S_j} \|\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}\| & \text{für } S'(\mathbf{x}) \neq S(\mathbf{x}) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (5.34)$$

mit $S_j := \{\mathbf{x} | S(\mathbf{x}) = j\}$, als Maß zwischen Segmentierungen $E(S', S) := \frac{1}{N} \int_{\Omega} \text{DCP}(S'(\mathbf{x}), S(\mathbf{x})) dx$ erhalten, für den klassenweise oder totalen gewichteten Klassifikationsfehler. Neben der universellen Anwendbarkeit für die Segmentierungsbewertung ist das Maß besonders im vorliegenden Fall nützlich, um das qualitative Verhalten unterschiedlicher Ansätze zu untersuchen.

KAPITEL 5. SEGMENTIERUNG ALS REGISTRIERUNGSPROBLEM

		Konfusionsmatrix DIF							
Geschätzte Klasse	1	769363 40.1%	33274 1.7%	4477 0.2%	16859 0.9%	2809 0.1%	2887 0.2%	92.7% 7.3%	
	2	28416 1.5%	733471 38.2%	4289 0.2%	16398 0.9%	2743 0.1%	2838 0.1%	93.1% 6.9%	
	3	3065 0.2%	3425 0.2%	73836 3.8%	1744 0.1%	275 0.0%	279 0.0%	89.4% 10.6%	
	4	7241 0.4%	8132 0.4%	1059 0.1%	164052 8.5%	642 0.0%	666 0.0%	90.2% 9.8%	
	5	842 0.0%	958 0.0%	107 0.0%	479 0.0%	16865 0.9%	67 0.0%	87.3% 12.7%	
	6	929 0.0%	1028 0.1%	136 0.0%	532 0.0%	90 0.0%	16495 0.9%	85.9% 14.1%	
			95.0% 5.0%	94.0% 6.0%	88.0% 12.0%	82.0% 18.0%	72.0% 28.0%	71.0% 29.0%	92.4% 7.6%
			1	2	3	4	5	6	
		Tatsächliche Klasse							
		(a)							

		Konfusionsmatrix Hybrid							
Geschätzte Klasse	1	801757 41.7%	5578 0.3%	1482 0.1%	8480 0.4%	1710 0.1%	2730 0.1%	97.6% 2.4%	
	2	5740 0.3%	772485 40.2%	1457 0.1%	8189 0.4%	1644 0.1%	2600 0.1%	97.5% 2.5%	
	3	589 0.0%	550 0.0%	80548 4.2%	835 0.0%	165 0.0%	268 0.0%	97.1% 2.9%	
	4	1420 0.1%	1345 0.1%	336 0.0%	182058 9.5%	388 0.0%	634 0.0%	97.8% 2.2%	
	5	190 0.0%	181 0.0%	46 0.0%	258 0.0%	19283 1.0%	92 0.0%	96.2% 3.8%	
	6	160 0.0%	149 0.0%	35 0.0%	244 0.0%	42 0.0%	17100 0.9%	96.4% 3.6%	
			99.0% 1.0%	99.0% 1.0%	96.0% 4.0%	91.0% 9.0%	83.0% 17.0%	73.0% 27.0%	97.5% 2.5%
			1	2	3	4	5	6	
		Tatsächliche Klasse							
		(b)							

Abbildung 5.7: Konfusionsmatrizen Deformations- und Mischmodell: Für beide Verfahren wird vor allem bei kleineren Klassen eine signifikant verbesserte Klassifikationsgenauigkeit erhalten.

Die Verteilung der durchschnittlichen DCP-Werte für den klassifikationsbasierten Ansatz zeigt dabei eine gleichmäßige Streuung des Abstands über dem gesamten Bildbereich respektive den Bildvordergrund. Dieses Verhalten eines räumlich gleichverteilten Fehlers war unter anderem in der Herleitung des Hybridansatzes erwartet worden und ist der bildpunktbasierten Klassifikation inhärent. Der Abstand fehlklassifizierter Punkte ist dagegen für das Mischmodell selber deutlich verringert. Bei niedrigerem Gesamtfehler zeigt die Verteilung der Werte gegenüber dem reinen DIF-Ansatz eine etwas stärkere Tendenz zum „Ausreißen“ von Fehlerpunkten, was letztlich auf die schwache Gewichtung der DIF-Vorhersage in manchen Regionen zurückzuführen ist ($\mu_{\text{DIF}} = (3.5307, 3.0013, 2.69, 5.39, 9.13, 12.27)$ $\mu = 6.01$, $\mu_{\text{MLP}} = (91.76, 79.27, 57.55, 234.25, 163.59, 256.50)$ $\mu = 147.16$ $\mu_{\text{Hybrid}} = (3.68, 3.12, 2.94, 6.01, , 0.31, 14.04)$ $\mu = 6.68$).

5.6 Diskussion

Eingangs wurde die Erstellung eines alternativen Segmentierungsmodells mit der Erhöhung der Segmentierungsgenauigkeit beziehungsweise Robustheit gegenüber unbalancierten Daten, und einer Verbesserung der Laufzeit gegenüber der rechnerisch sehr „teuren“ Merkmalsextraktion und -klassifikation begründet (die Laufzeiten in 4.2 beziehen sich auf das Testdatum aus 80 Bildern). Es ist davon auszugehen, dass sich die Klassifikationsleistung durch eine Erweiterung des Merkmalsvektors weiter erhöhen lässt, mit entsprechender Verschlechterung der Praktikabilität.

Durch den Deformationsansatz wurde demgegenüber ein kompaktes Modell erhalten, welches hinreichend gute Genauigkeiten auch gegenüber kleinen Geweben leistet. Die Limitationen dieses Ansatz gegenüber Segmentierungsdetails war zu erwarten und konnte durch den Ansatz des Mischmodells anhand

der Fehlermaße bestätigt werden. Die totale Verbesserung der Genauigkeit durch Hinzunahme der Merkmalsdaten und -klassifikation ist jedoch gering. Eine Reduzierung der Laufzeitkomplexität des Mischmodells gegenüber dem reinen Merkmalsmodell ist möglich, beispielsweise durch ROI-basierte Merkmalsextraktion, führt aber für die beschriebenen, nicht-linearen Operatoren für eine echte Optimierung zu erheblichen Anstrengungen für die Implementierung.

Der diffusionsbasierte Ansatz besitzt eine lineare Komplexität $\mathcal{O}(n)$ in der Anzahl der Bildpunkte n pro Iteration. Je nach Konvergenzverhalten auf dem jeweiligen Datum (vgl. Abb. 5.2 und Appendix C) werden pro Bild 10–100 Iterationen bis zur Gleichgewichtseinstellung benötigt und damit eine (notwendige) drastische Reduktion der Rechenzeiten für die Verarbeitung der Anwendungsdaten mit mehreren tausend Bildern pro Bildstapel. Darüber hinaus kann zur weiteren Reduktion der Laufzeit die Berechnung des Deformationsfeldes auf einem unterabgetasteten Bildgitter erfolgen und zur eigentlichen Transformation extrapoliert werden.

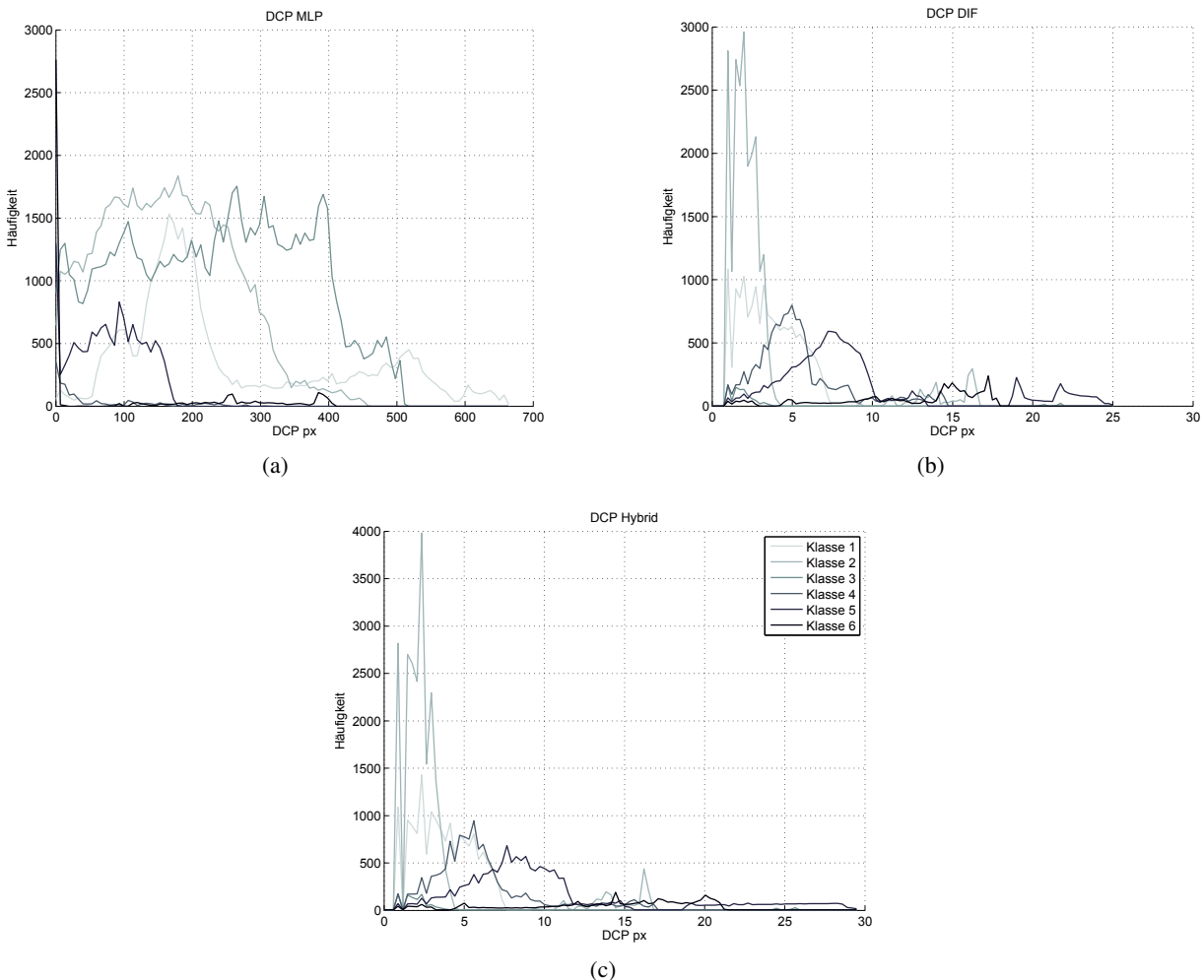


Abbildung 5.8: Verteilung der durchschnittlichen DCP-Werte falschklassifizierter Bildpunkte: 5.8a Merkmalsklassifikation (MLP), 5.8b Deformationansatz (DIF), 5.8c Mischmodell (100 Histogrambins über dem jeweiligen Wertebereich)

KAPITEL 5. SEGMENTIERUNG ALS REGISTRIERUNGSPROBLEM

Mit den beschriebenen Ansätzen stehen nun die Werkzeuge zur Rekonstruktion des Probeobjektes und die Abstraktion dieser Daten zu einem Volumen der vorliegenden Gewebeklassen vor. Die weiteren Schritte zur Verarbeitung der dichten Volumendaten hin zu geometrischen 3-D Modellen, die eine Varianz zwischen Probeobjekten berücksichtigen, und deren Nutzung zur technischen Lösung und Beantwortung biologischer Fragestellungen ist Inhalt der folgenden Kapitel.

Teil III

3-D Modellierung und Integration funktionaler Daten

Kapitel 6

Geometrische Modelle und interindividuelle 3-D Modellierung

6.1 Modellerstellung aus segmentierten Daten

Mit den entwickelten Methoden, insbesondere des letzten Kapitels, stehen nun die Werkzeuge für die eigentliche *Durchschnittsmodellbildung*, wie in der Zielstellung in Kapitel 1 gefordert, zur Verfügung: Die unalignierten, zweidimensionalen Rohbilder der physikalisch zerstörten Proben können zu segmentierten dreidimensionalen Modellen der relevanten Gewebe rekonstruiert werden. Auf dieser Basis sollen nun Modelle erhalten werden, die die in der anhand biologischen Vorwissens zusammengestellten Stichprobe beobachteten *interindividuellen* Varianzen berücksichtigen, das heißt, unterschiedliche Gesamtgrößen der Probeobjekte und davon unabhängige Gewebeverteilungen auf der Segmentierungsebene abbilden. Ansätze zur Durchschnittsmodellbildung existieren in der medizinischen Bildverarbeitung, im Sinne prototypischer Organ- oder Gewebestrukturen, etwa zur Diagnose pathologischer Größen- und Formveränderungen. Unterschiedliche Verfahren seien an dieser Stelle anhand der zugrunde gelegten Eingangsdaten unterschieden: Für nicht segmentierte dreidimensionale Intensitätsbilder existieren Ansätze, durchschnittliche oder prototypische Volumendaten zu bestimmen. Im Sinne eines mehrfachen Alignments der Eingangsdaten werden dabei Algorithmen zur iterativen Durchschnittsbestimmung für ein visuell zufriedenstellendes, prototypisches Intensitätsvolumen vorgeschlagen [GUIMOND et al., 2000].

Daneben existieren Verfahren für die Durchschnittserstellung anhand gegebener Oberflächenmodelle. Die Modellbildung erfolgt dabei auf der Basis einer geometrischen Darstellung von Gewebe- oder Organengrenzen und zielt auf die Registrierung und Bestimmung einer Durchschnittsoberfläche für die gegebenen Strukturen [MASCHINO et al., 2006].

Die Zusammenführung der Intensitätsbilder hat den Nachteil, dass ein künstliches oder hypothetisches Durchschnittsbild entsteht, welches eventuell für bestimmte Bildgebungen eine korrekte *a posteriori* Segmentierung zu einem durchschnittlichen Gewebemodell ermöglicht, was aber im Allgemeinen nicht gegeben sein muss. Die Durchschnittsbildung anhand von vorliegenden geometrischen Strukturmodellen hat den Nachteil, dass im *Mehrklassenfall* aus den aneinandergrenzenden Gewebetypen beziehungsweise Segmenten überlappende Oberflächen entstehen können. Sowohl durchschnittlichen Intensitätsvolumen als auch Durchschnittsoberflächen ist gemeinsam, dass die *räumliche Varianz* der Morphologie von

Gewebe und Organen nicht mehr rekonstruierbar ist. Dies jedoch aus allgemeiner, biologischer Sicht relevant und für die Gewebevorhersage zur automatischen Dissektion notwendig.

Im Kontext der vorliegenden Zielstellung liegen zunächst zwei Teilaufgaben vor: die Extraktion von Oberflächenmodellen zur Darstellung und Exploration der segmentierten Gewebestrukturen und die Formulierung eines Modellansatzes zur Fassung der morphologischen Varianzen in vorliegenden Individuen. Erstgenanntes wird durch etablierte Verfahren der Computergrafik geleistet, die im folgenden kurz beschrieben werden und sowohl für die individuellen als auch für die Darstellung der Durchschnittsmodelle zur Anwendung kommen.

Für die interindividuelle Modellierung wurde ein direkter Ansatz erstellt [BOLLENBECK et al., 2009c], der auf der geometrischen Standardisierung der individuellen Segmentierungen und der Schätzung der Gewebewahrscheinlichkeiten im gesamten Volumen beruht. Spezifische Fragestellungen, wie beispielsweise oberflächenbasierte Visualisierung, Volumetrie oder Gewebevorhersagen zur Dissektionssteuerung, können damit jeweils spezifisch in nachgelagerten Schritten beantwortet werden.

6.1.1 Extraktion von *Iso-Oberflächen* aus Voxeldaten

Die auf einem dichten, dreidimensionalen Gitter definierten Bildfunktionen oder -segmentierungen sollen nun in geometrische Modelle überführt werden: Aus der regelmäßigen Abtastung einer Funktion soll eine parametrische Darstellung durch geometrische Primitive im Raum erfolgen. Dies sollen im Folgenden Polygone sein, das heißt, es soll eine geometrische Beschreibung von *Grenzflächen* erhalten werden - die Voxeldarstellung der Gewebezugehörigkeiten des entsprechenden Bildvolumens wird durch die entsprechenden *Gewebegrenzen* ersetzt. Das zugrunde liegende Problem kann also auf den Begriff einer *Oberflächenextraktion* (*surface extraction*) zusammengefasst werden. Da sich Grenzen auf eine Menge gleicher Werte innerhalb der Volumendaten beziehen, werden die erhaltenen Flächen auch als *Iso-Oberflächen* bezeichnet¹.

Methodisch liegt ein *Extrapolationsproblem* vor: Aus der diskreten, das heißt nur an „bestimmten Stellen“ im Raum definierten Bildfunktion sollen kontinuierliche, wenn auch stückweise definierte Funktionen beziehungsweise Flächen treten. Eine solche Funktion soll dann beispielsweise aus einer Menge von *Dreiecken* im Raum eine Darstellung der Grenze durch die im Bildvolumen vorliegenden Werte liefern. Neben der Definition einzelner Polygone existieren auch stetige parametrische Grenzflächenbeschreibungen [RAMSHAW und CENTER, 1987], beispielsweise durch nicht-uniforme Splinefunktionen (NURBS) im Raum. Diese entspringen jedoch der Motivation einer *de novo* Flächendefinition, beispielsweise im *computer aided design*.

Eine analytische, geschlossene Form zur Berechnung dieser Dreiecksmenge existiert zunächst nicht: Es liegt das diskrete, kombinatorische Problem vor, eine Oberfläche aus einer Menge von Flächenprimitiven zu konstruieren. Wegweisend für die Oberflächenextraktion aus Volumendaten ist der von LORENSEN und KLEIN vorgestellte [LORENSEN und CLINE, 1987] *marching-cubes* Algorithmus, der besonders

¹Etymologisch liegt die Segmentierung und Extraktion von Gewebegrenzen in MRT-Volumen als eine der ersten Anwendungen für entsprechende Algorithmen anhand fester, bekannter Schwell- beziehungsweise sogenannter Iso-Werte zugrunde.

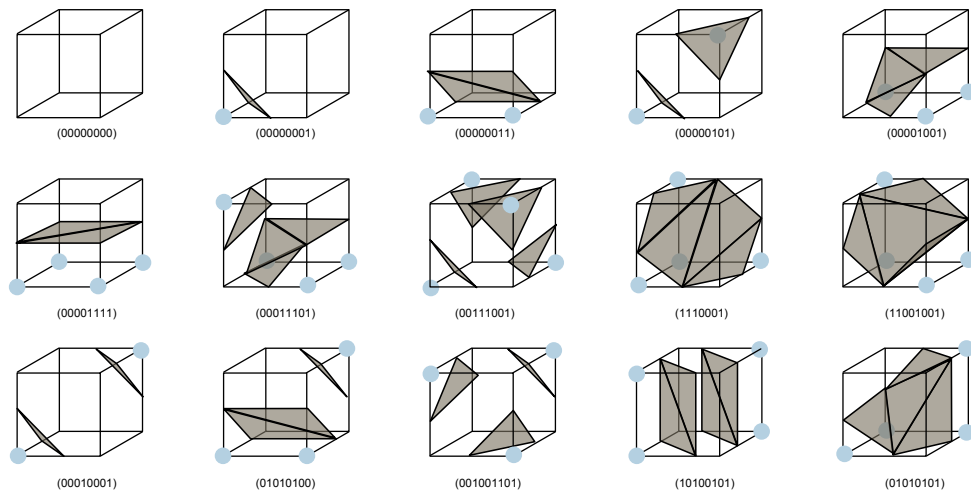


Abbildung 6.1: Primitive der Oberflächenextraktion: Anhand der vorliegenden Konfiguration (und deren zyklische Rotationen) der Werte in den Gitterpunkten werden Dreiecke der Geometrie hinzugefügt.

aufgrund seiner Einfachheit und schnellen Implementierung weite Verbreitung gefunden hat beziehungsweise Ursprung zahlreicher Varianten ist.

Die Heuristik lautet dabei, die Flächenkonstruktion regelbasiert durchzuführen. Dabei werden Würfel (*cubes*) aus acht benachbarten Gitterpunkten im Bildbereich als Grundbaustein betrachtet und anhand der in den Punkten gefundenen Klassenlabel (Intensitätswerte) für die lokale Grenzfläche eine Dreiecksanordnung anhand einer vorgegebenen Liste gewählt und lediglich mit den Koordinaten des Würfels versehen. Für die Iso-Oberfläche ergeben sich im Gitter lediglich zwei relevante Werte für die Bestimmung der Grenzfläche: 0 und 1 für Werte jeweils größer oder kleiner dem Iso-Wert. Grundlage der schnellen Implementierung ist nun, das Nachschlagen mittels der $\{0, 1\}^8 = 256$ Würfelknotenwerte als Indexwert durchzuführen, das heißt, für jeden Würfel (v_1, \dots, v_8) wird die Dreiecksanordnung $D = (V, E, T)$ aus Knoten- $V \in [0, 1]^3$, Kantenkonfiguration $E \subset V \times V$ und Dreiecksnormalen $T \subset \mathbb{R}^3$ direkt aus einer Tabelle T nachgeschlagen

$$D \leftarrow T(\mathcal{S}(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_8)) \circ \mathbf{x}; \quad (6.1)$$

(für $15 = 2 \log(256) - 1$, zyklische Binärzahlen bzw. topologisch eindeutige Anordnungen) und dieser für die Berechnung der vollständigen Oberfläche in einem Durchlauf über das gesamte Volumen verschoben (*marching*).

Damit wird jedoch lediglich die Oberflächenextraktion bezüglich *eines* Schwellwertes gelöst. Für die vorliegenden Daten, wie auch im Allgemeinen, soll jedoch nicht nur eine einzige Grenzfläche bestimmt, sondern Geometrien für K unterschiedliche Gewebetypen beziehungsweise entsprechende Werte aus dem Gittervolumen erhalten werden. Eine K -malige Anwendung des binären Schemas liefert dabei keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da der Fall sich berührender Grenzflächen nicht ausgeschlossen werden kann und diese dann „missverständlich“ bezüglich einer erhaltenen Grenze sind. Das bestehende Schema kann jedoch einfach auf den Mehrklassenfall erweitert werden, indem zunächst nun zusammengesetzte Gitterknoten-Indexwerte der Form $\{1, \dots, K\}^8$ zugelassen werden. Dabei wird das Problem auf die Erstellung entsprechender Dreiecksanordnungen und -Listen reduziert, was dann beispielsweise

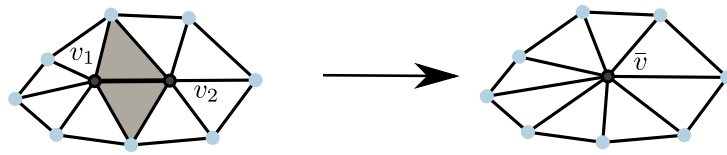


Abbildung 6.2: Oberflächenreduktion: Kontraktion von Dreiecksknoten für den quadrik-basierten Ansatz (nach [GARLAND und HECKBERT, 1997]).

mittels Interpolation auf Subvoxelwerte und -gitter adressiert werden kann: Anhand des Subgitters kann nun K -mal mit dem binären Ansatz Oberflächen bestimmt und zusammengefasst (s. unten) werden (diese Tabellenerstellung muss nur einmal ausgeführt werden). Mit dem Marching-Cubes Algorithmus wird also in $\mathcal{O}(n)$, das heißt in einem Lauf über das gesamte Volumen, eine Transformation in ein geometrisches Oberflächenmodell aus den segmentierten Volumen erhalten.

6.1.2 Gitterdarstellung und -reduktion

Als Resultat der Oberflächenextraktion werden also geometrische Modelle der Gewebestrukturen im Probeobjekt erhalten. Diese Oberflächen dienen einer realistischen Darstellung der errechneten Segmentierungen in ihrer tatsächlichen dreidimensionalen Ausdehnung durch *Rendering* auf Basis von Grafikschnittstellen wie beispielsweise *OpenGL*.

Der Algorithmus liefert aus der Oberflächenextraktion zunächst eine detaillierte Auflösung der Grenzflächen: In Abhängigkeit von der jeweiligen Gestalt wird pro Gitterelement des Bildvolumens mindestens ein Dreieck erhalten. Dabei liefern dann entsprechend große Bildvolumina Dreiecksanzahlen, deren Darstellung erheblichen Rechenaufwand benötigt. Die Darstellung selbst ist dabei jedoch möglicherweise redundant: Die Auswahl der Primitive in der Oberflächenextraktion erfolgt unabhängig von den Konfigurationen in der Nachbarschaft, auch wenn für größere Bereiche identische Voxelkonfigurationen vorliegen, werden diese aus einer Vielzahl identischer Primitive konstruiert, das heißt, die Grenzoberflächen sind zunächst genau der Auflösung des Bildgitters unterworfen und die eingangs motivierten kontinuierliche Darstellung der Gewebegrenzen im Raum damit nicht hergestellt.

Die Geometrien müssen daher adaptiv von der erhaltenen Gitterstruktur in eine für Grenzflächen optimale Form überführt werden. Die Herstellung optimaler Geometrien wird durch Reduktionsalgorithmen, sogenannte *remeshing* oder *surface-reduction* Verfahren erzielt. Ziel ist dabei die Transformation auf eine optimale, nicht-redundante Darstellung der Oberfläche:

- eine realitätsgetreuere Darstellung als Annäherung kontinuierlicher Grenzverläufe zu erhalten,
- erwünschte Details gegenüber unerwünschten Artefakten (*Aliasing* aus den Marching Cubes) zu erhalten,
- die Datenmenge der Darstellung zu reduzieren.

Um dabei keine Informationen zu verlieren, sollte eine Reduktion nicht anhand von Heuristiken, sondern unter Berücksichtigung eines quantitativen Fehlermaßes erfolgen. Wegweisend ist hier der von GARLAND und HECKBERT vorgeschlagene [GARLAND und HECKBERT, 1997] Ansatz einer adaptiven

Oberflächenkonstruktion anhand von Quadriken und darauf basierenden Abstandsmaßen. Der Algorithmus von GARLAND und HECKBERT basiert dabei auf einem iterativen Zusammenfassen von Dreiecken durch *Knotenkontraktion*: Für die Zusammenfassung von Knoten $\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2$ zu $\bar{\mathbf{v}}$ wird der Abstand

$$D^2 = (\mathbf{n}\bar{\mathbf{v}} + d)^2 \quad (6.2)$$

zur ursprünglichen Fläche (Dreieck) $\mathbf{n}_1\mathbf{v} + d = 0$ durch die Quadrik

$$Q(\bar{\mathbf{v}}) = \mathbf{v}A + 2\mathbf{b} + c \quad A \in \mathbb{R}^{3 \times 3} \quad (6.3)$$

beschrieben, die additiv ist, das heißt, für die Kosten der Kontraktion $\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2 \mapsto \bar{\mathbf{v}}$ gilt $Q(\bar{\mathbf{v}}) = Q_1(\bar{\mathbf{v}} + Q_2(\bar{\mathbf{v}}))$. Aus der Menge aller Kontraktionen der ursprünglichen Dreiecksmenge wird dann die Kontraktion mit geringstem Fehler bis zum Erreichen einer Fehlerschranke oder Dreiecksanzahl ausgewählt. Durch die *Greedy*-Strategie wird ein effizienter Algorithmus erhalten. Die Implementierung der Autoren ist in der Bibliothek *QSlim* [GARLAND, 2009] verfügbar.

6.2 Statistische dreidimensionale Modellierung von Gewebestrukturen

Anhand der eingangs des Kapitels gemachten Beobachtungen sollte eine statistische Fassung auf Segmentierungsebene erfolgen, auf Basis der dichten Gewebezuidnungen innerhalb des Bildvolumens (bzw. -Gitters). Dabei soll sowohl eine Darstellung der Varianzen, im Sinne von „wo variieren Gewebe, gegeben die Stichprobe wie stark“, möglich sein wie auch andererseits eine eindeutige Zuordnung jedes Gitterpunktes zum wahrscheinlichsten Gewebe im Sinne eines prototypischen Probeobjekts.

6.2.1 Interindividuelle Atlanten zur Gewebevorhersage

Die mit diesen Eigenschaften ausgestatteten Interindividualmodelle sollen die Funktionalität als *Gewebe-atlas* erfüllen: Für Proben eines bestimmten Entwicklungszeitpunktes liefert das dazugehörige Modell eine allgemeingültige Vorhersage der Gewebeverteilungen. Die Vorhersage kann dabei nicht für jeden beliebigen Punkt *sicher* erfolgen, jedoch sollen für alle Gewebetypen *ubiquitäre* Regionen gefunden werden können: Die Identifizierung dieser Regionen ist, neben dem grundlegenden, biologischen Informationsgehalt, in Form von morphologischen *Regelmäßigkeiten* oder *Motiven* von Gewebewachstum und -differenzierung, Grundlage für eine automatisierte dreidimensionale Dissektion von Objekten, beziehungsweise die Bestimmung von Zielvolumina für die Präparation einer gewebereinen Probe.

Sowohl aus biologischer als auch aus technischer Sicht sollte daher bei der Erstellung des Atlasmodells keine Information über die Gewebeverteilung selbst genutzt werden: aus biologischer Sicht nicht, weil die Organisation im Inneren der Probe relativ gerade die zu untersuchende morphologische Varianz darstellt, und aus technischer Sicht nicht, weil für die Präparation einer ungesehenen Instanz, für die keine Gewebeinformationen vorliegen, folglich dann auch keine Beziehung zur Referenz hergestellt werden kann.

6.2.2 Abbildung in ein gemeinsames Koordinatensystem

Zur mathematischen Beschreibung von Übereinstimmung und Varianzen innerhalb der Gewebestrukturen in Probeobjekten muss eine geometrische Korrespondenz der Gewebevolumen hergestellt werden. Individuen müssen gewissenmaßen standardisiert im Raum ausgerichtet werden. Dabei liegt nun explizit *kein* Registrierungsproblem vor: Die vorliegenden Segmentierungen sollen nicht, etwa durch Minimierung eines Fehlermaßes, in Übereinstimmung gebracht werden, da der beobachtete Fehler respektive die Abweichung zwischen den Gewebedaten gerade die zu beobachtende Größe ist.

Die im Folgenden beschriebene Methodik ist, wie schon im Kapitel 2 zur Registrierung von medizinischen Volumendaten vorgeschlagen worden [ALPERT et al., 1990], in der hier beschriebenen Formulierung wird jedoch kein expliziter Zusammenhang zwischen den individuellen Daten hergestellt, sondern eine Standardisierung bezüglich der räumlichen Ausdehnung in ein gemeinsames Koordinatensystem. Daneben soll für die Standardisierung aus dem gleichen Grund auch keine Information über die Gewebeverteilungen selbst zum Tragen kommen, vorhandene Volumensegmentierungen im Bildbereich können lediglich im Sinne „Probeobjekt“ und „kein Probeobjekt“ benutzt werden. Dies ist für die Gültigkeit der statistischen Durchschnittsmodelle entscheidend und final auch in der Anwendung von großer Bedeutung: Beim „Brückenschlag“ von den virtuellen Modelldaten zurück zu physisch vorliegenden Probeobjekten in der Mikrodisektionsanwendung sind außer den rekonstruierten äußeren Geometrien keine weiteren Daten bekannt, so dass eine gültige Referenzierung und Gewebevorhersage auch lediglich anhand dieser Daten erfolgen kann.

Die vorhandenen Segmentierungen S werden also bezüglich der Gewebetypen als binär betrachtet, mit $S(\mathbf{x} = 0)$ als Hintergrundklasse und entsprechender Momentedefinition

$$m_{ijk} := \int_{\Omega} x_1^i x_2^j x_3^k (1 - \delta(S(\mathbf{x}), 0)) dx_1^i x_2^j x_3^k. \quad (6.4)$$

Mit dem Schwerpunkt $\bar{\mathbf{x}}$ und den damit zentrierten Momenten \hat{m} wieder wie in Kapitel 2.4 wird

$$T := \frac{1}{\hat{m}_{000}} \begin{pmatrix} \hat{m}_{200} & \hat{m}_{110} & \hat{m}_{101} \\ \hat{m}_{110} & \hat{m}_{020} & \hat{m}_{011} \\ \hat{m}_{101} & \hat{m}_{011} & \hat{m}_{002} \end{pmatrix} \quad (6.5)$$

als Momententensor des Probeobjektes im Raum erhalten.

Nun erfolgt die Bestimmung einer orthogonalen Transformation R mittels Eigenwertzerlegung, so dass $T' = R^{-1}TR$ Diagonalfom erhält das heißt, die Hauptachsen des Objektes in Achsen des Koordinatensystem gelegt werden. Die Koordinatentransformation R wird also aus den Eigenvektoren des Trägheitstensors erhalten.

Die erhaltene Matrix R ist dabei eine verkettete Rotationsmatrix von drei Rotationswinkeln $(\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3)$,

als Eulerwinkel um die drei Hauptachsen des Objektes. Das als Abbildung für die Koordinatentransformation wird

$$\varphi := R(\phi)R(\theta)R(\psi)(\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) + \bar{\mathbf{x}} \quad (6.6)$$

$$= \begin{pmatrix} \cos \theta \cos \psi & -\cos \phi \sin \psi + \sin \phi \sin \theta \cos \psi & \sin \phi \sin \psi + \cos \phi \sin \theta \cos \psi \\ \cos \theta \sin \psi & \cos \phi \cos \psi + \sin \phi \sin \theta \sin \psi & -\sin \phi \cos \psi + \cos \phi \sin \theta \sin \psi \\ -\sin \theta & \sin \phi \cos \theta & \cos \phi \cos \theta \end{pmatrix} \quad (6.7)$$

$$\cdot (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}) + \bar{\mathbf{x}} \quad (6.8)$$

erhalten.

Die aus den Eigenwerten bestimmte Transformationsmatrix liefert im Allgemeinen jedoch keine Transformation der Hauptachsen in die Achsen des Koordinatensystems, da aus der Eigenwertzerlegung zwar ein Orthogonalsystem für den Momententensor erhalten wird, aber keine Zuordnung dieser zu den Achsen des Koordinatensystems. Zur Bestimmung der „richtigen“ Anordnung der Spaltenvektoren von R kann nun davon ausgegangen werden, dass der minimale gesamte Rotationswinkel die korrekte Abbildung darstellt². Die entsprechende Anordnung der Eigenvektoren \mathbf{r}_i kann dann durch „Ausprobieren“ anhand des Rotationswinkels für die Spalten der Einheitsmatrix \mathbf{e}_j

$$\alpha_i = \arccos \frac{\langle \mathbf{r}_i \mathbf{e}_j \rangle}{|\mathbf{r}_i \mathbf{e}_j|} \quad (6.9)$$

als $\min \sum \alpha_i$ erhalten werden.

Für die Transformation einer Menge $\mathcal{S} = \{\mathcal{S}_1, \dots, \mathcal{S}_I\}$ von segmentierten Objekten wird eine Sortierung der Koordinatensysteme der I individuellen Bildbereiche $(1, \dots, I) \mid |\Omega_1| > \dots > |\Omega_I|$ erstellt und die Berechnung im Koordinatensystem von Ω_1 , das heißt $\varphi_i := R_i(\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}_i) + \bar{\mathbf{x}}_1$ zur Standardisierung des Schwerpunktes, durchgeführt. Die im gemeinsamen Koordinatensystem so standardisierten Gewebevolumenta werden damit als

$$\mathcal{S}' = \{\mathcal{S}_1 \circ \varphi_1, \dots, \mathcal{S}_I \circ \varphi_I\} \quad (6.10)$$

erhalten.

6.2.3 Statistische Modellierung der interindividuellen Streuung

Mittels der so standardisierten Gewebesegmentierung kann nun eine Schätzung der interindividuellen Varianzen der Probeobjekte erfolgen. Ein Modell im Sinne eines Durchschnittsmodells einer Menge von Individuen soll dabei eine räumliche Auflösung dieser Varianzen für alle Gewebetypen liefern.

Die eindeutige Segmentierung eines Objektes soll gegen eine statistische Segmentierung auf Basis mehrerer Objekte substituiert werden. Mit diesem Modell soll für jeden Punkt im (standardisierten) Koordinatensystem eine Vorhersage erhalten werden, wie wahrscheinlich das Vorfinden eines Gewebetyps $k \in \{1, \dots, K\}$ an diesem Ort ist, das heißt

$$p_{\mathbf{x}}(k) := \frac{1}{|\mathcal{S}|} \sum_{i=1}^I \delta(\mathcal{S}_i(\mathbf{x}), k) \quad \forall_{k=1}^K \quad (6.11)$$

²Die allgemeine Uneindeutigkeit der Rotationswinkel aus dem Momententensors wurde bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, die Annahme der „kleinsten“ Drehung als korrekte Transformation ist für die praktische Anwendunge gültig, meist liegen Drehungen kleiner 45° vor.

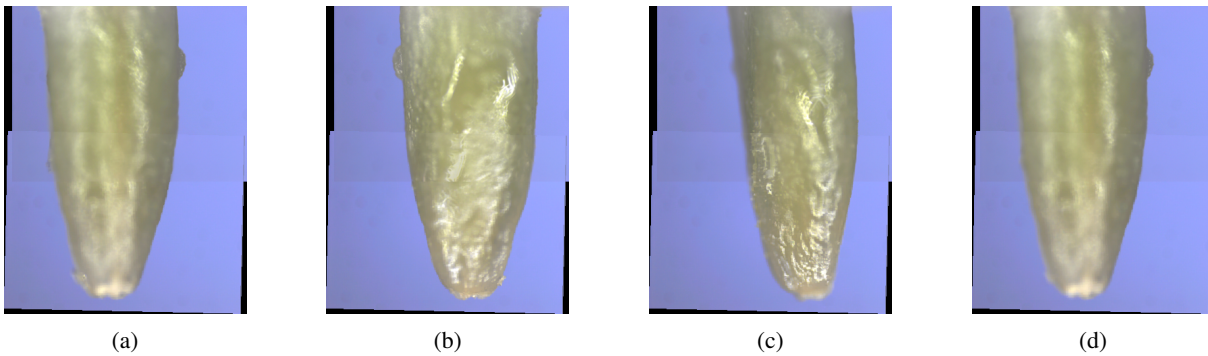


Abbildung 6.3: Bilder I_1, I_7, I_{43}, I_{63} unterschiedlicher Rotationswinkel $5.7^\circ, 40^\circ, 245.7^\circ, 348.5^\circ$ einer Bildsequenz des Probeobjektes in der Ablationskammer.

Für jeden Punkt im Bildbereich wird also ein Vektor (p_1, \dots, p_K) erhalten, der die empirische Wahrscheinlichkeit für die hier gefundenen Gewebe liefert beziehungsweise ein vektorwertiges, stochastisches Bildvolumen $P : \Omega \mapsto [0, 1]^K, \sum_k P(x) = 1$ für den gesamten Bildbereich.

6.3 Integration der geometrischen Modelle in ein automatisches Mikrodissektionssystem

Für die Nutzung der geometrischen interindividual Modelle in einem System zur robotisierten Kryo-LMD müssen die Geometrien dem Ablationssystem und -algorithmus verfügbar gemacht werden. Die Steuerung der Laser- beziehungsweise Objektbewegung ist nicht Teil dieser Arbeit, wohl aber die Bereitstellung der physikalischen räumlichen Koordinaten der Zielvolumen für den Ablationsprozess. Neben der Darstellung in dichten, physikalischen Koordinaten, stellt sich vor allem die Herausforderung der Einpassung der virtuellen Modelldaten in die Geometrie einer realen Probe: Um die Laserbewegung korrekt steuern zu können, müssen Probe- und Modellgeometrie in Übereinstimmung gebracht, das heißt die Geometrien miteinander registriert werden. Für das in der Ablationskammer fixierte Probeobjekt sind jedoch keine Geometriedaten vorhanden, die zur Registrierung genutzt werden könnten. Eine Auflösung der inneren Strukturen ist nicht möglich, als Informationsquelle liegen lediglich die aus der eingekoppelten RGB-Kamera verfügbaren 2-D Bilder vor. Die dreidimensionale Struktur des Probeobjekts muß daher aus Sequenzen zweidimensionaler Bildern *rekonstruiert*, und Modelldaten der Gewebestrukturen als Zielvolumina in diese rekonstruierte Geometrie registriert und entsprechend abgebildet werden. Die Rekonstruktion von 3-D Struktur aus Mengen zweidimensionaler Ansichten bezeichnen sogenannte *Structure-From-Motion* (SFM) Verfahren. Dabei werden für ein angenommenes Kameramodell die entsprechenden Transformationsparameter der Kamerabewegung zwischen unterschiedlichen Aufnahmen geschätzt und anhand dieser detektierte Strukturmerkmale der Objekte im Bild, wie Punkte oder Konturen, zurück in den \mathbb{R}^3 projiziert. Das *Lochkameramodell* ist dabei das Standardmodell der SFM-

Methodik und die damit verbundene *Epipolargeometrie* der Kamerabewegung: Seien $P = K[Rt] \in \mathbb{R}^{3 \times 4}$, $\alpha \in \mathbb{R}$, dann bestimmt

$$\alpha \begin{pmatrix} u \\ v \\ 1 \end{pmatrix} = P \begin{pmatrix} X \\ Y \\ Z \\ 1 \end{pmatrix} \quad (6.12)$$

die skalierungsinvariante Projektion der Szene auf das zweidimensionale Bild die sogenannte *Projektionsmatrix* P , mit Kalibrationsmatrix $K \in \mathbb{R}^{3 \times 3}$, Rotationsmatrix $R \in \mathbb{R}^{3 \times 3}$ und Translationsvektor $\mathbf{t} \in \mathbb{R}^3$. Die sogenannten *extrinsischen* Parameter R, \mathbf{t} sind abhängig von der Bewegung der Kamera(position) im Raum, während die Kalibrationsmatrix K als *intrinsische* das Abbildungsverhalten der Kamera selbst beschreiben, das heißt Brennweite, Brennpunkt, Achsschrägung und -verhältnis. Die Bestimmung der extrinsischen und intrinsischen Parameter wird als *Kalibrierung* der Kamera bezeichnet.

Während die intrinsischen Kameraparameter bei SFM-Problemen meist unabhängig vorab bestimmt werden, wird mit dem Teilproblem *Motion* die Schätzung der Kamerabewegung im Raum adressiert. In der epipolaren Geometrie der Abbildungen wird der Zusammenhang zwischen zwei Projektionen des Punktes $\mathbf{X} \in \mathbb{R}^3$ in I_i, I_j als sogenannte *Fundamentalmatrix* F bestimmt. Sind die intrinsischen Parameter K_i, K_j bekannt, kann aus F die *essentielle Matrix* $E = K_j^T F K_i$ bestimmt werden; $E = [\mathbf{t}]_{\times} R$ beschreibt also die relative Rotation und Translation zwischen P_i und P_j und damit die Grundlage der Rekonstruktion, beziehungsweise die Abbildung der Projektion zurück in den Raum. Die Schätzung von F und E wird in der vorliegenden Anwendung stark vereinfacht, da aus *xyz*-Steuerung die aktuellen Werte im Koordinatensystem der Maschine bekannt sind. Die Optiken der Kamera gestatten keine Gesamtansicht der Probe, daher müssen Einzelbilder zum Gesamtbild gekachelt werden. Eine Gesamtsequenz der Kamerafahrt ähnelt sinnbildlich einem „Apfelschälen“ (siehe Abb. 6.3).

Grundlage der Rekonstruktion der äußeren Geometrie des Probeobjektes ist die Menge der Silhouetten bei unterschiedlichen Kamerapositionen, das Objekt wird daher als sogenannter *Konturgenerator* bezeichnet. Aus den RGB-Bildern der Ablationskamera werden die Silhouetten daher als Objektgrenzen segmentiert, wofür unterschiedliche Verfahren zum Einsatz kommen können: Es zeigt sich, dass eine hinreichend genaue³ Segmentierung bereits mittels Schwellwerthaltung im *hue*-Kanal in den Farbbildern erhalten werden kann. Eine genauere Segmentierung und Lokalisierung der Objektkonturen wird mittels der in Abschnitt 2.3 beschriebenen aktiven Konturmodelle erhalten. Dazu wird die Bestimmung der externen Energie in Gleichung 2.37 für die vorliegenden RGB-Farbbilder auf den durchschnittlichen Abstand zum *Mittelwertvektor* über alle Farbkanäle erweitert [CHAN et al., 2000].

Für die geschätzten Projektionen P_i des Objekts in die Sequenzbilder I_i muss nun umgekehrt die Rückprojektion in den \mathbb{R}^3 als Grundlage der Geometrierekonstruktion aus den unterschiedlichen Aufnahme-positionen erfolgen. Dabei wird, analog der 2-D Bilder, der Raum als Quader mit einem regelmäßigen Gitter angenommen. Einen intuitiven Ansatz, aus projizierten Objektkonturen einen soliden Körper zur Oberflächenextraktion zu erhalten, bildet die Methode der *projizierenden Kegel* (*projecting cones*), um die Tangenten des Körpers anhand der Schnittmenge der in die Blickrichtungen replizierten Konturen zu

³Bezüglich der Anfahrngenauigkeiten des *xyz*-Tisches des Ablationsgerätes von $\sim 10\mu\text{m}$

approximieren [GIBLIN und WEISS, 1987]. Einen effizienteren Ansatz liefert das von WONG [WONG, 2001] vorgeschlagene Verfahren zur Geometrieerzeugung: Dabei werden nun nicht mehr die Konturpunkte mittels der inversen Projektion P_i^{-1} in den Raum abgebildet, sondern umgekehrt die Gitterzellen des Raums auf die Kontur projiziert. Der Vorteil des Verfahrens ist, dass so *a priori* bekannt ist, ob eine Teilmenge des Volumens ein Kontursegment enthält. Damit kann eine hierarchische *oct-tree* Struktur des Gitters für die Abbildung verwendet werden, so dass Bereiche, die keine Konturinformation enthalten, von der weiteren Prozessierung ausgeschlossen werden können. Die erhaltene Baumstruktur kann anschließend für die Oberflächenextraktion genutzt werden (siehe Abschn. 6.1.1), als Resultat wird eine triangulierte Oberflächen der Geometrie der vorliegenden Probe erhalten (das Verfahren ist detailliert in [WONG, 2001] beschrieben).

Anhand der Life-Geometrien ist nun die exakte Ausrichtung der Modelldaten in das Koordinatensystem der xyz -Steuerung der Ablationskammer beziehungsweise der vorliegenden Probe bestimmbar: Die Modelldaten müssen in die Life-Geometrie registriert und entsprechend abgebildet werden. Dazu werden die jeweiligen, allgemein unterschiedlich mächtigen Knotenmengen $\mathcal{M}, \mathcal{T} \subset \mathbb{R}^3$ der triangulierten Oberflächen von Life- und Modellgeometrie hin auf minimale, paarweise Distanzen transformiert. Dem Registrierungsproblem liegen dabei zwei abhängige Teilprobleme zugrunde

1. Finden der optimalen Punktzuordnung

$$\mathcal{N} = (\vec{m}_i, \vec{t}_j) := \{\vec{m}_i \in \mathcal{M}, \vec{t}_j \in \mathcal{T} \mid \vec{t}_j = \underset{\vec{t}_j}{\operatorname{argmin}} (D(\vec{m}_i, \vec{t}_j)), \forall \vec{t}_j \in \mathcal{T}\} \quad (6.13)$$

2. Finden der optimalen Transformation gegebener Punktepaare

$$\varphi^* = \underset{\vec{t}_j}{\operatorname{argmin}} D(\vec{m}_j, \vec{t}_j \circ \varphi) \quad (6.14)$$

Standardverfahren für die Registrierung von Punktwolken ist der von BESL und MCKAY vorgeschlagene *Iterative-Closest-Point* (ICP) Algorithmus [BESL und MCKAY, 1992], der eine iterative Optimierung beider Probleme realisiert: Für eine gegebene Transformation der Punkte \mathcal{N}^i wird eine Zuordnung entsprechend Gleichung 6.13 bestimmt. Für diese Punktordnung wird die mittlere Paar-Distanz minimiert, beispielsweise mittels Gradientenabstieg oder *Quasi-Newton*-Methoden [PRESS et al., 2007], und für $\mathcal{N}^{i+1} = \mathcal{T}^i \circ \varphi^* \varphi = (\rho_x, \rho_y, \rho_z, \Delta_x, \Delta_y, \Delta_z)$ eine neue Zuordnung bestimmt. Erweiterungen des ICP-Algorithmus (s. [RUSINKIEWICZ und LEVOY, 2001]) zielen vor allem auf Laufzeitoptimierung der Bestimmung der nächsten Nachbarn in Schritt 1, wie hier durch Zerlegung des Koordinatenvolumens mittels einer k - d -Baumstruktur [BENTLEY, 1975].

Durch den SFM-Ansatz wird somit die technische Problemstellung, bestehende Modelle für eine automatische Ablationssteuerung verfügbar zu machen, gelöst und damit die wichtige Verbindung vom Modell zurück zur realen Probe geschlagen.

6.4 Ergebnisse und Darstellung

Die Atlaserstellung erfolgt in der Anwendung, wie beispielsweise für die vorliegenden *Hordeum* Datensätze, zeitpunktspezifisch für die jeweilige Stichprobe der Individuen (für *Hordeum* 3, 5, 7, 10, 14DAF

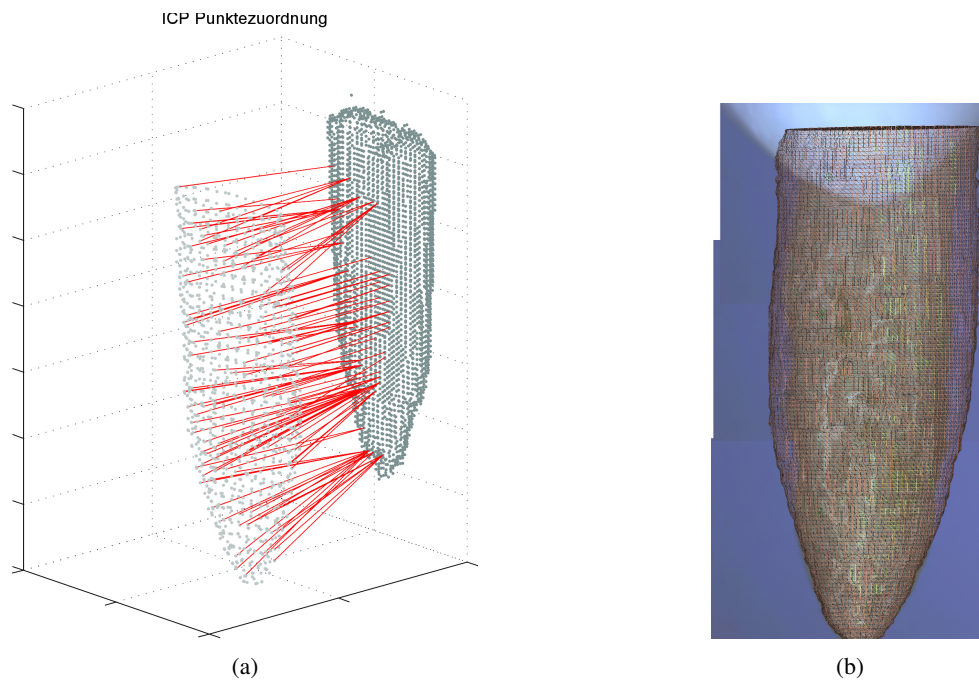


Abbildung 6.4: Integration der Modelldaten in die Life-Geometrien zur Ablationssteuerung. 6.4a Berechnete Life-Geometrie und Modellgeometrien zur ICP-Registrierung der Knotenmengen: Orientierung im Raum vor der Registrierung, für 10% der Punkte sind die entsprechenden Punktpaarungen eingezeichnet. 6.4b Rendering von registriertem Zielvolumen und Life-Geometrie über Life-Ansicht (die Gesamtansicht wird aufgrund der Kamera im Gerät aus drei registrierten Einzelbildern gekachelt).

mit je 5 Individuen, s. Anhang B), das heißt, die individuellen Segmentierungen eines Zeitpunktes werden zur Schätzung der Wahrscheinlichkeiten herangezogen.

Anhand dieses relativ einfachen statistischen Modellansatzes werden nun die eingangs geforderten Eigenschaften für die Beantwortung der spezifischen Teilfragen getroffen:

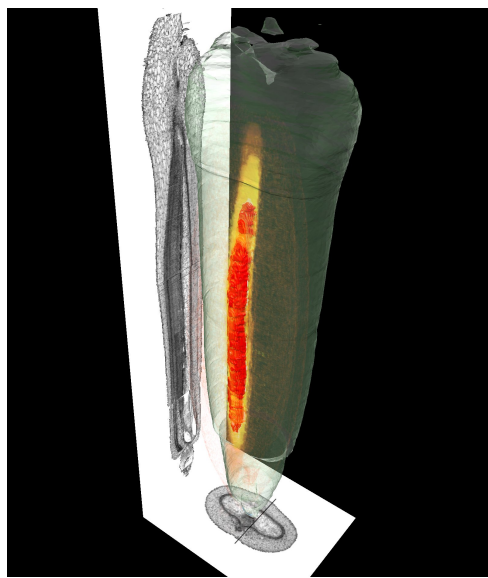
- Welcher Gestalt ist die räumliche Varianz unterschiedlicher Gewebe
- Wie stellen sich Volumenverhältnisse unterschiedlicher Gewebe dar
- Ob, und in welcher Gestalt existieren ubiquitäre Regionen der Gewebe als Zielvolumen für eine Dissektion?

Für eine Visualisierung der Gewebewahrscheinlichkeiten in den Atlasdaten kann dann beispielsweise ein kombiniertes Rendering wie in Abb. 6.5 benutzt werden: Die Verteilung der Wahrscheinlichkeit für ein Gewebe k im Raum wird durch Volumen-Rendering mit Transparenz und Sättigung proportional zum vorliegenden Wert $p_{\mathbf{x}(k)} \in [0, 1]$ dargestellt. Zur deutlicheren Darstellung kann gleichzeitig für den ubiquitären Bereich $p_{\mathbf{x}(k)} = 1$ aus dem Atlas die entsprechende Oberfläche extrahiert werden.

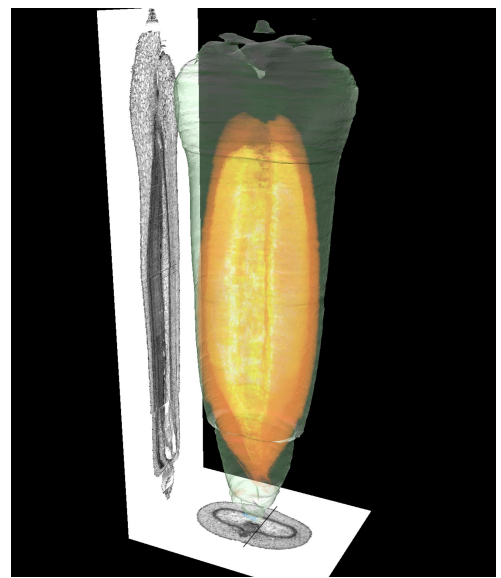
Mit dieser Darstellung kann neben einer biologischen Relevanz geklärt werden, inwiefern für Dissektion topologisch einfachere Gebiete mit $p_{\mathbf{x}(k)} < 1$ als Zielkoordinaten und Registrierung mit dem Life-Modell übergeben werden können. Anhand einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit werden die Zielvolu-

men beziehungsweise deren Knotenmenge aus der Oberflächenextraktion für den entsprechenden Wahrscheinlichkeitswert in P_k erhalten. Die Koordinaten des Zielvolumens stehen in fester Beziehung zu denen der Objekthülle und werden daher mit den gefundenen Parametern „mittransformiert“. Als Objekthülle selbst wird zur Registrierung mit den SFM-Geometrien dabei die Durchschnittsoberfläche extrahiert, das heißt für das Volumen $\min |P_0(\mathbf{x} - .5)|$, und als Ausgabe dann die Punktwolken der SFM-Geometrie und der transformierten Zielgewebeknoten erhalten, dieses Vorgehen konnte in prototypischen Anwendungen der automatischen Laserablation validiert werden.

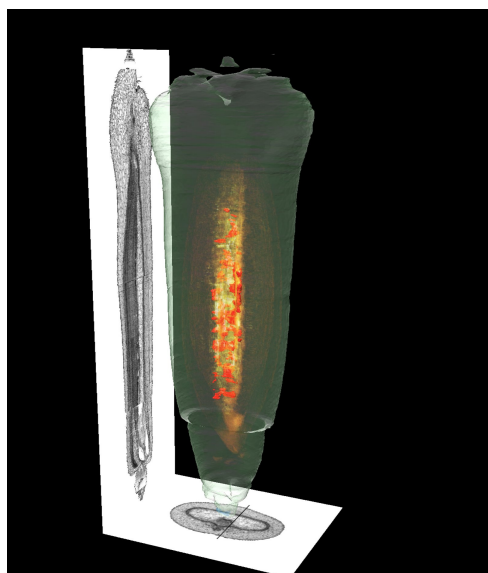
Mit dem Ansatz wird ein intuitives Interindividualmodell erhalten, sowohl für die Beantwortung biologischer Fragestellungen als auch für die geschilderte technische Problemstellung. Der Ansatz fußt dabei jedoch auf der Annahme kompakter, überlappender Segmente und ist beispielsweise für die Modellierung von *Gefäßen* nicht geeignet. Entsprechende Einschränkungen gelten auch für andere Modellansätze, wie beispielsweise temporale Durchschnittsmodelle. Vorteilhaft ist jedoch, dass die Annahme einer strukturellen Ähnlichkeit direkt etwa durch die beschriebene Visualisierung validiert werden kann.



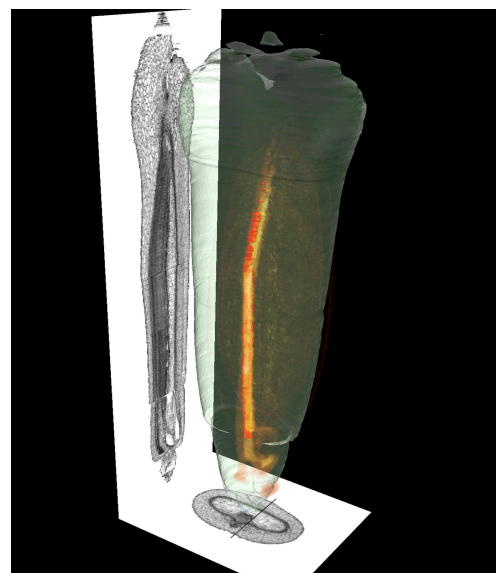
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 6.5: Interindividualmodell: Visualisierung der Gewebeverteilungen durch Volumenrendering (Transparenz und Sättigung proportional zur Wahrscheinlichkeit) und extrahierter Oberfläche der eindeutigen Regionen. 6.5a: *Nucellare Projektion*, 6.5b: *Endosperm*, 6.5c: *Transferzellen*, 6.5d: *Hauptleitbündel*.

Kapitel 7

Automatische Integration funktionaler Daten

Im vorhergehenden Kapitel wurde unter anderem die Verwendung der automatisch erstellten Modelle zur technischen Problemlösung im Rahmen eines automatisierten Dissektionssystems geschildert. Im Folgenden soll noch ein anderer Aspekt der Modellerstellung und -verwendung untersucht werden: die Verwendung als Referenzrahmen für die Analyse von *funktionellen* Daten. Damit seien fortan (Bild-)Daten bezeichnet, deren zugehöriges Bildgebungsverfahren explizit nicht auf die Abbildung physischer Strukturen in der Probe abzielt, sondern auf die Darstellung biochemischer Funktionen und Abläufe darin.

Die grundlegende wissenschaftliche Motivation für eine Integration solcher Daten in Gewebemodelle ist damit offenkundig: Durch die Zusammenführung wird der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion hergestellt und damit eine elementare biologische Fragestellung adressiert. Dazu werden zwei allgemeingültige Verfahren zur algorithmischen Lösung des Problems betrachtet und deren Funktion jeweils anhand einer bestimmten Bildgebung demonstriert.

Mittels eines etablierten Verfahrens wurde die Integration hochdimensionaler funktionaler Bilddaten in dreidimensionale Modelle untersucht [BOLLENBECK et al., 2009a], und dadurch ein Ansatz zur Auswertung beziehungsweise zur Bestimmung biologisch relevanter Messwerte in diesen Daten erhalten. Daneben wurde ein Modell entwickelt [BOLLENBECK et al., 2009b], welches die Nachteile des *de facto* Standardverfahrens zur Integration unterschiedlicher Bildgebungsverfahren durch Verwendung neuronaler Netze zur Lösung eines Regressionsproblems adressiert.

7.1 Inter-Modale Registrierung durch informationsbasierte Bildmetriken

Da sowohl die bisher betrachteten Bildvolumen als auch die jetzt untersuchten funktionellen Bilder Messwerte an Punkten im Raum darstellen, stellt sich für eine Integration von Daten zuallererst die Frage nach der Korrespondenz dieser Koordinaten, es liegt ein Registrierungsproblem vor. Da die Registrierung automatisch anhand der vorliegenden Bildinhalte erfolgen sollte, muss daher zunächst geklärt werden, wie zwei oder mehrere Bildgebungen „verglichen“ werden können. Aus der medizinischen Bild-

verarbeitung kommend hat sich hier der Begriff *inter-modale* Registrierung durchgesetzt, in Anlehnung an die Bezeichnung unterschiedlicher Geräte in der bildgebenden Diagnostik.

Prinzipiell liegt also wieder das gleiche Problem wie in Kapitel 3 vor: Für eine bestimmte Klasse von Transformationen sollen Parameter gefunden werden, die die Ähnlichkeit der vorliegenden Bildinhalte in Form einer Bildmetrik maximieren. Als Metriken konnten bis jetzt für den *intra*-modalen Fall einfache Abstandsmaße benutzt werden: Abgebildete Strukturen liefern gleiche Charakteristiken der entsprechenden Bildintensitäten, durch Vorverarbeitung und Standardisierung lieferte die absolute Differenz ein ausreichendes Maß. Dies gilt im *inter*-modalen Fall nun nicht mehr: Die aus den Bildgebungen erhaltenen Intensitäten stehen nun in keiner direkten, absoluten Beziehung mehr, sondern es wird, für plausible Messungen, ein allgemeinerer gelagerter Zusammenhang angenommen. Ein grundlegendes Problem der *inter*-modalen Registrierung ist daher die Bestimmung von Metriken, die die jeweiligen Intensitätscharakteristiken, im Sinne eines gegenseitigen Informationsgehaltes, quantifizieren.

7.1.1 Integration von *Mass Spectrometric Imaging* (MSI) Daten

Im Folgenden werden als funktionale Bilddaten räumlich aufgelöste Massenspektrometriedaten aus dem MALDI (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) Verfahren, sogenannten MALDI-IMS (*MALDI as a mass spectrometry imaging*) Bilder betrachtet. Mit dem Verfahren wird durch gerasterte Ionisierung einer Probe eine räumlich aufgelöste Verteilung der Masse-Ladungsverhältnisse (m/z in Dalton) der Moleküle darin erhalten. Die Probe selber liegt dabei als flächiges Präparat vor, das dann entsprechend zur Ionisierung und Ionendetektion abgerastert wird, die erhaltenen Daten besitzen also eine zweidimensionale Geometrie. Ein Bildpunkt erhält dabei jedoch ein vollständiges Massenspektrum der detektierten Ionen, in dem je nach Auflösungsfähigkeit des Spektrometers mehrere tausend m/z -Werte erhalten werden. Die räumliche Auflösung unterliegt dabei den Limitationen der Matrixaufbringung auf die Probe und beträgt typischerweise zwischen 50 und $100\mu m$. Für mikroskopische Objekte, wie beispielsweise die *Hordeum* Karyopsen ($\sim 1.5 - 5.0mm$ lateral), ist die massenspektrale Dimension dabei also wesentlich größer als die räumliche.

Mit dem Verfahren kann so also zunächst ein relativ-quantitatives Abbild der biochemischen Prozesse in der Präparationsebene erhalten werden, und damit ein für die Untersuchung der dynamischen Prozesse im Organismus mächtiges Werkzeug. Anforderungen an die algorithmische Betrachtung einer Auswertung und Integration ergeben sich besonders aufgrund von zwei biologischen Fragestellungen:

- Welche Quantitäten liegen für bestimmte *bekannte* Stoffe, respektive deren Massen in den unterschiedlichen Geweben vor,
- Welche *unbekannten* Massen besitzen differentielle Verteilungen in unterschiedlichen Gewebetypen?

Beide Fragestellungen lassen sich also beantworten, indem die funktionalen Daten in eine strukturelle Referenz beziehungsweise ein räumliches Modell der tatsächlichen Gewebeverteilung integriert werden, und anhand dieser kombinierten Daten eine gewebespezifische Betrachtung mit mathematischen Methoden möglich wird.

7.1.2 2-D-3-D Registrierung durch *Mutual Information*

Für die beschriebenen Daten liegt also ein 2-D zu 3-D intermodales Registrierungsproblem vor. Die Schnittebene aus der Präparation für die MALDI-Messung ist dabei unbekannt und soll aus der Registrierung bestimmt werden. Dazu können als starre Transformationen der Form

$$\mathcal{T}(\varphi) := R\mathbf{x} + \mathbf{t} \quad (7.1)$$

$\varphi \in \mathbb{R}^6$ mit drei Drehwinkeln und Translation im Raum (wie oben) zugrunde gelegt werden (die 2-D Koordinaten werden $\mathbf{x} := (x_1, x_2, c)$ augmentiert). Dabei wird lediglich die Koordinatenmenge des 2-D Bildes transformiert und zur Abtastung der 3-D Bildfunktion benutzt.

Für die Metrik zur Quantifizierung der Bildähnlichkeit können a priori keine Annahmen über die Bildintensitäten gemacht werden. Zur Fassung eines allgemeinen Zusammenhangs werden Intensitäten im Bild I (etwa $a \in 2^N$) an Bildpunkten als Zufallsvariablen $P(a)$ betrachtet und auf den Dichten die *Entropie*

$$H(I) := - \int p_I(a) \log p_I(a) da, \quad (7.2)$$

und mit der Verbundwahrscheinlichkeit $P(a, b)$ von Intensitätswerten (a, b) mit den Dichten $p(a, b)$ die *Verbundentropie* zweier Bilder I_1, I_2

$$H(I_1, I_2) := \int p_{(I_1, I_2)}(a, b) \log p_{(I_1, I_2)} da db \quad (7.3)$$

definiert. Die Verbundentropie liefert ein beschränktes Maß für die Unsicherheit zwischen zwei Zufallsvariablen, aufgrund der Beschränktheit gilt

$$H(I_1, I_2) < H(I_1) + H(I_2), \quad (7.4)$$

und damit als Maß für einen allgemeinen Zusammenhang der Intensitäten beider Modalitäten

$$D_{MI}(I_1, I_2) := H(I_1) + H(I_2) - H(I_1, I_2). \quad (7.5)$$

als zu *maximierende* Transinformation (*Mutual Information*, MI) zwischen Bildern, und ist von VIOLA und WELLS für die Registrierung vorgeschlagen [VIOLA und WELLS III, 1997] worden.

Mit dieser Definition kann nun theoretisch die inter-modale Bildregistrierung wieder im gleichen Rahmenwerk betrieben werden, wie in Kapitel 3 beziehungsweise wie im Flussdiagramm Abb. 3.2 dargestellt.

Bezüglich der Numerik des Verfahrens ergeben sich jedoch einige Implikationen: Die Schätzung der gemeinsamen und marginalen Wahrscheinlichkeitsdichten im direkten Ansatz aus dem Verbundhistogramm ist sehr rechenzeitaufwendig, die für die Nutzung gradientenbasierter Optimierungsverfahren notwendige Ableitung der Metrik $\partial D / \partial \varphi_i$ beziehungsweise H nach den Transformationsparametern benötigt eine hinreichend glatte Darstellung der Verbundwahrscheinlichkeiten. Die Wahrscheinlichkeitsdichten müssen daher aus einer Menge S zufällig abgetasteter Bildpunkte durch Kerndichteschätzung

$$p_I(a) := \frac{1}{S} \sum_{i=1}^{|S|} k(a - s_i) \quad (7.6)$$

mit entsprechenden Kernfunktionen k bestimmt (s. [PLUIM et al., 2003] und Referenzen darin) werden¹. Insgesamt liefert die Registrierung mittels Transformation einen wesentlich weniger robusten Ansatz als direkte Bildmetriken: Durch die zufällige Bildpunktziehung wird die Metrik stochastisch, durch die iterierte Schätzung der Dichten auf der (transformierten) Stichprobe der Metrikverlauf unstetig (vgl. [MAES et al., 1999] für eine Untersuchung der Konvergenzeigenschaften). Dies resultiert in der praktischen Anwendung in erhöhten Iterationszahlen und erhöhter Anfälligkeit gegenüber lokaler Minimumseinstellung.

7.2 Inter-Modale Registrierung durch Regression im Merkmalsraum

Die Transinformation als Bildmetrik liefert durch den statistischen Ansatz zunächst ein allgemeingültiges Schema für die Registrierung multi-modaler Daten. Der Vorteil, beliebig gelagerte, statistische Zusammenhänge der Intensitätenverteilungen quantifizieren zu können, wird jedoch mit Nachteilen in punkto Stabilität und Geschwindigkeit in der Transformationsparametersuche „erkauft“. In der Anwendung des Verfahrens ergeben sich daraus Nachteile: Soll in der Verarbeitung großer Datensätze die Möglichkeit von Fehlregistrierung und lokaler Minimumseinstellung mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, im Sinne einer verlässlichen, automatischen und wiederholten Registrierung, müssen beispielsweise *Multistart*-Ansätze in der Optimierung verwendet werden, was die Laufzeit weiter erhöht.

Die Annahme, dass bezüglich der Intensitätscharakteristiken der Modalitäten nichts bekannt ist, ist zu stark: Die Grundlage und Motivation der MI-Metrik durch eine „Regelmäßigkeit“ aus den Bildgebungsverfahren gilt, das heißt, auch für „ähnliche“ Probeobjekte kann entsprechend die Ähnlichkeit der erhaltenen Intensitätsverteilungen in Bezug zum Bildinhalt angenommen werden, und damit auch für eine zumindest für eine Klasse von Probeobjekten gültige, feste Beziehung zwischen den Modalitäten.

Damit ist zunächst über die Gestalt der Beziehung wieder nichts bekannt, die Grundlage für ein „Lernen“ eines mathematischen Modells ist jedoch gegeben. Dies kann nun in Form eines überwachten Ansatzes geschehen: Die Existenz von manuellen Registrierungen durch den Experten als Referenzen wird in Studien als gegeben angenommen und diese können, innerhalb eines subjektiven Fehlers als tatsächlich korrekt betrachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass lediglich eine Referenzstichprobe vorliegt, welche wiederum den Varianzen der Bildgebung selber unterliegt, sollte das Modell selbst Unsicherheiten darin berücksichtigen und die beobachteten Beziehungen generalisieren können. Sind Modell und -parameter bestimmt, kann dieses zur Transformation der multi-modalen Eingangsdaten benutzt werden, um in der eigentlichen Registrierung robustere, uni-modale Bildmetriken zu benutzen, das *intra*-modale Registrierungsproblem wird auf ein einfacheres *inter*-modales zurückgeführt.

7.2.1 Intensitätsvorhersage aus *Gabor*-Bildrepräsentationen durch neuronale Netze

Anhand dieser Beschreibung liegt dem Lernen einer solchen Beziehung ein Problem der Funktionsapproximation zugrunde: Anhand unregelmäßig abgetasteter Werte soll eine möglichst allgemeingültige Funktion über den gesamten Wertebereich der Intensitäten gefunden werden. Um das Problem sinnvoll

¹In der frei verfügbaren *ITK* Bibliothek [IBANEZ et al., 2005] sind unterschiedliche Varianten zur Dichteschätzung für die Transinformation zwischen Bildern implementiert.

numerisch adressieren zu können, muss eine Klasse beziehungsweise ein Funktionenmodell zugrunde gelegt werden. Das daraus resultierende Regressionsproblem lautet nun, anhand einer gegebenen Stichprobe eine optimale Modellanpassung vorzunehmen, um die vorliegenden Daten zu erklären. Die Qualität oder Sicherheit einer Vorhersage für *unbekannte* Daten bestimmt sich dabei aus der Modellklasse, das heißt für angenommene optimale Parameter und gegebene Expressivität, im Sinne der Erklärung der Stichprobe, aus der Generalisierungsfähigkeit eines Modells f . Als Regressionsproblem liegt also für die *Regressor- X* und *Kriteriumvariable Y* , als Intensitäten aus der jeweiligen Modalität, ein Problem

$$Y := f(X) + \epsilon \quad (7.7)$$

beziehungsweise

$$f := \min_{f \in F} \epsilon_{X,Y,f} \quad (7.8)$$

vor.

Die Vorhersage wird nun auf Basis einer transformierten Darstellung des Eingabebildes erfolgen. Durch die Transformation soll idealerweise eine Zerlegung des Bildes dergestalt erhalten werden, dass unterschiedliche Signalanteile besser in Beziehung zu den Vorhersagewerten gesetzt werden können. Der Ansatz steht in direkter Verbindung zu Kapitel 4, dort wurden extrahierte Merkmale (-sbilder) als Eingabe zur Abbildung auf die Modalität „Gewebeklassen“ benutzt.

Dabei soll keine tatsächliche Zerlegung, wie etwa die durch die Waveletzerlegung erfolgen, da das Eingangssignal nicht rekonstruiert werden muss. In diesem Sinne kann eine Auswahl bestimmter Skalen und Orientierungen in Bildern durch den Ansatz von *Gabor*-Filtern erhalten werden (vgl. Abschn. 4.1), durch die Implementierung als Filterbank wird eine niedrige Laufzeitkomplexität und ein expliziterer Zugang zum Skalen- und Orientierungsparameter im Vergleich zur Waveletzerlegung erhalten.

Für f, θ, γ, η als Sinusfrequenz, Rotation von Gauß- und Sinusfunktion, und Filterbreite wird mit

$$\psi(x, y; f, \theta) = \frac{f^2}{\pi\gamma\eta} \exp \left(-\left(\frac{f^2}{\gamma^2} x'^2\right) + \left(\frac{f^2}{\eta^2} y'^2\right) \right)$$

$$x' = x \cos \theta + y \sin \theta \quad y' = -x \sin \theta + y \cos \theta \quad (7.9)$$

und Faltung

$$R_I(\vec{x}; f, \theta) = \psi(\vec{x}; f, \theta) * I(x) \quad (7.10)$$

für unterschiedliche Parameter die *Gabor*-Repräsentation $G : \Omega \mapsto \mathbb{R}^p$

$$\mathbf{G}(\vec{x}) = \begin{pmatrix} R(\vec{x}; f_0, \theta_0) \\ R(\vec{x}; f_0, \theta_1) \\ \vdots \\ R(\vec{x}; f_0, \theta_{n-1}) \\ \vdots \\ R(\vec{x}; f_{m-1}, \theta_0) \\ \vdots \\ R(\vec{x}; f_{m-1}, \theta_{n-2}) \\ R(\vec{x}; f_{m-1}, \theta_{n-1}) \end{pmatrix} \quad (7.11)$$

des Bilds I erhalten.

Ein Modell für die Regression beziehungsweise Intensitätsvorhersage aus dem transformierten Eingangsbild sollte nun *nicht-parametrisch* sein und aus den Daten selbst gelernt werden. MLP-Netze (s. Abschnitt 4.2) liefern für die nicht-parametrische Regression einen mächtigen Ansatz: Durch die Adaptivität des Konnektionismus kann eine Modellanpassung für Y anhand einer Stichprobe erklärender Variable x_i auch für komplexe Zusammenhänge gefunden werden, die eine geschlossene, parametrische Bestimmung nicht ermöglichen (vgl. [STERN, 1996, WHITE, 1990]). Das Netzwerkmodell liefert dabei durch die Transferfunktionen eine *Basis* aus logistischen Funktionen, aus denen in der Einstellung der Gewichtungen ein optimales Modell konstruiert werden kann (Theorem von KOLMOGOROV, bspw. in [KURKOVA, 1992]).

Für ein *feed-forward* Netzwerk, analog der Definition in Abschnitt 4.2.1 Gl. 4.23 ff. aus L Schichten und $M_l = 1, \dots, L - 1$ Neuronen je Schicht, und logistische Transferfunktionen $\psi : \mathbb{R} \mapsto [0, 1]$ $\psi(x) := 1/(1 + e^x)$, wird das Regressionsmodell durch die Ausgabe $F(x) := y_L$ erhalten, das heißt

$$Y' := F(x) + \epsilon. \quad (7.12)$$

Für eine Stichprobe gepaarter Beobachtungen $(X, Y) := \{(\mathbf{x}_1, \mathbf{y}_1), \dots, (\mathbf{x}_M, \mathbf{y}_M)\} | x_i \in \mathbb{R}^m, \mathbb{R}^n$ muss das Regressionsmodell nun \mathbf{Y} mittels \mathbf{X} erklären, so dass

$$\epsilon = \|Y - Y'\| \quad \text{und} \quad \epsilon \mapsto \min. \quad (7.13)$$

gilt, durch Fehlerrückführung und Adaption der Gewichte W_i .

Für *registrierte* Bilder I_1, I_2 zweier Modalitäten M_1, M_2 wird mit

$$\tilde{I}_1 = F(G(I_1)) + E \quad (7.14)$$

dann genau eine Intensitätsvorhersage für die Beobachtung von I_1 mittels M_2 getroffen, wenn F bezüglich einer Stichprobe $S \subset (G(I_1(\mathbf{x})), I_2(\mathbf{x}))$ adaptiert ist. Hierbei ist festzuhalten, dass die Eingaben $G(I(\mathbf{x}))$ zwar bildpunktweise berechnet aber unabhängig von ihren Bildkoordinaten sind, was für die Vorhersage von *unregistrierten* Bildern Voraussetzung ist.

In der Anwendung wird, unter der Annahme der Generalisierung der Vorhersage, entsprechend der *intra-modale* Ansatz

$$\varphi^* := \underset{\varphi}{\operatorname{argmin}} D_{\text{SSD}} \left(\tilde{I}'_1, I'_2 \circ \varphi \right) \quad (7.15)$$

für unregistrierte $I'_1 \in M_1, I'_2 \in M_2$ benutzt.

7.2.2 Integration von NMRi Daten

Aus biologischer Sicht sind für die Untersuchung von Differentiations- und Entwicklungsprozessen Verteilungen von *Protonen* beziehungsweise *Wasserstoffatomkernen* relevant, da sich hierdurch Rückschlüsse auf den vorliegenden Stoffwechsel ziehen lassen. Protonenverteilungen lassen sich mittels $^1\text{H-NMRi}$ (*nuclear magnetic resonance imaging*)² und tomographische Verfahren dreidimensional auflösen

²Das Verfahren ist identisch mit der *MRT*-Modalität (Magnetresonanztomographie) in der medizinischen Diagnostik, wobei *Magnetresonanz* nicht die physikalisch korrekte Bezeichnung ist und das Präfix „Nuklear“ aus Akzeptanzgründen vernachlässigt wird [HORNAK, 2010].

[STARK et al., 2007]. Dabei wird für mikroskopisch kleine Objekte in speziellen Detektoren eine räumliche Auflösung von $10 - 20\mu m$ erzielt. Die erhaltenen Bildvolumen lassen dabei *keinen* Rückschluss auf unterschiedliche Gewebeklassen wie in medizinischen Anwendungen zu. Zur systematischen Auswertung beziehungsweise Erfassung von Tendenzen in der Protonenverteilung in Probeobjekten ist daher im oben genannten Sinn externe Gewebe- und Strukturinformation nötig.

Der Regressionsansatz wurde dabei anhand von 1H -NMRi- (M_2 , $16\mu m/px$) und histologischen Schnittbildern (M_1) von *Hordeum* Karyopsen (7 DAF) validiert, wobei aus Gründen der rechnerischen Handhabbarkeit zunächst 2-D Bilder betrachtet wurden. Für die Transformation der Eingangsdaten (nach Abtastung auf identischem Bildgitter) wurde mittels *Gabor*-Filtern die Darstellung für unterschiedliche Skalen ($\{1, \frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{8}, \frac{1}{16}, \frac{1}{32}, \frac{1}{64}, \frac{1}{128}, \frac{1}{256}\}$), und Orientierungen ($\{0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ\}$) erhalten ($G \in \mathbb{R}^{36}$). Dabei konnte gezeigt werden, dass mittels des MLP ($L = 1, M_1 = 20$) in 10-facher Kreuzvalidierung des Referenzdatums mit einem durchschnittlichen quadratischen Fehler von 4.15 ($\in [0, 255]$) eine gute Vorhersage erhalten werden kann, die erwartete Verbesserung gegenüber dem MI Ansatz in puncto Stabilität und Laufzeit wurde dann mit dem Ansatz Gl. 7.15 erhalten (s.a. Anhang C, Tab. C.4 ff.).

7.3 Diskussion

Die automatische Integration funktionaler Bilddaten in Strukturdaten und -modelle liefert die Grundlage für eine biologische Auswertung im Sinne einer quantitativen, mathematischen Beschreibung der vorliegenden Messwerte. Dies konnte zunächst durch die Verwendung eines etablierten Verfahrens für Integration und gewebespezifische Analyse von MALDI-IMS Daten und die Findung von Kandidaten für eine weitere Untersuchung in *Hordeum* Karyopsen gezeigt werden. Dabei kann durch die Verwendung von Durchschnittsmodellen insbesondere die Tatsache adressiert werden, dass für die Erhebung funktionaler und struktureller Daten im Allgemeinen nicht dasselbe Probeobjekt betrachtet werden kann.

Durch die alternative Formulierung des Standardansatzes als Regressionsproblem mittels neuronaler Netze und der Transformation der Eingangsdaten wurde eine signifikante Verbesserung der Stabilität der Registrierung von multi-modalen Daten erhalten: Die Unsicherheiten in der Findung einer Intensitätsbeziehung und die eigentliche Optimierung der Transformationsparameter werden gewissermaßen entkoppelt. Der dabei entstehende Mehraufwand durch die Transformation und Abbildung ist durch die Implementierung als Faltung und Netzmodell in Anbetracht der „leichteren“ Optimierung und vor allem der Robustheit des Verfahrens gerechtfertigt. Die Anwendung für weitere Modalitäten bleibt zu untersuchen. Der Ansatz selbst ist zunächst universell, jedoch ist davon auszugehen, dass für andere Daten evt. andere Transformationen, Netzmodelle usw. verwendet werden müssen. In Anhang C sind beispielhaft weitere Anwendungen dargestellt.

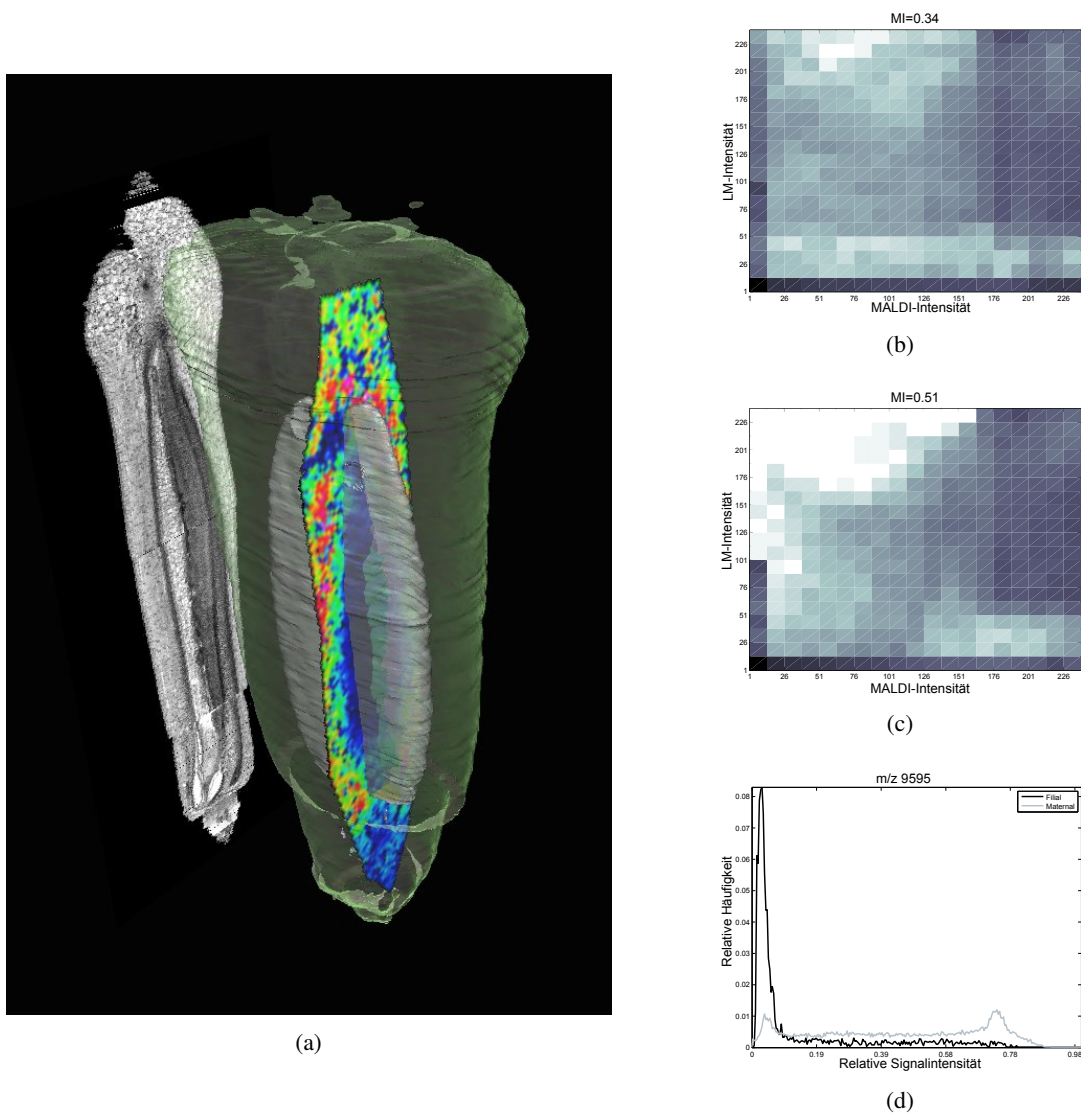


Abbildung 7.1: Integration von MALDI-IMS in Gewebedaten durch Maximierung der Mutual Information: Verbundhistogramm (rediskretisiert auf 2^4 Graustufen) vor 7.1b und nach der Registrierung der MALDI Daten. *Rendering* des registrierten MALDI 2-D Bildes im Gewebatlas. 7.1d Nutzung der Strukturinformation der Auswertung: differentielle Verteilung des unbekanntes Molekül(fragment) mit m/z 9595 in den *maternalen* und *filialen* Geweben in *Hordeum* Karyopsen.

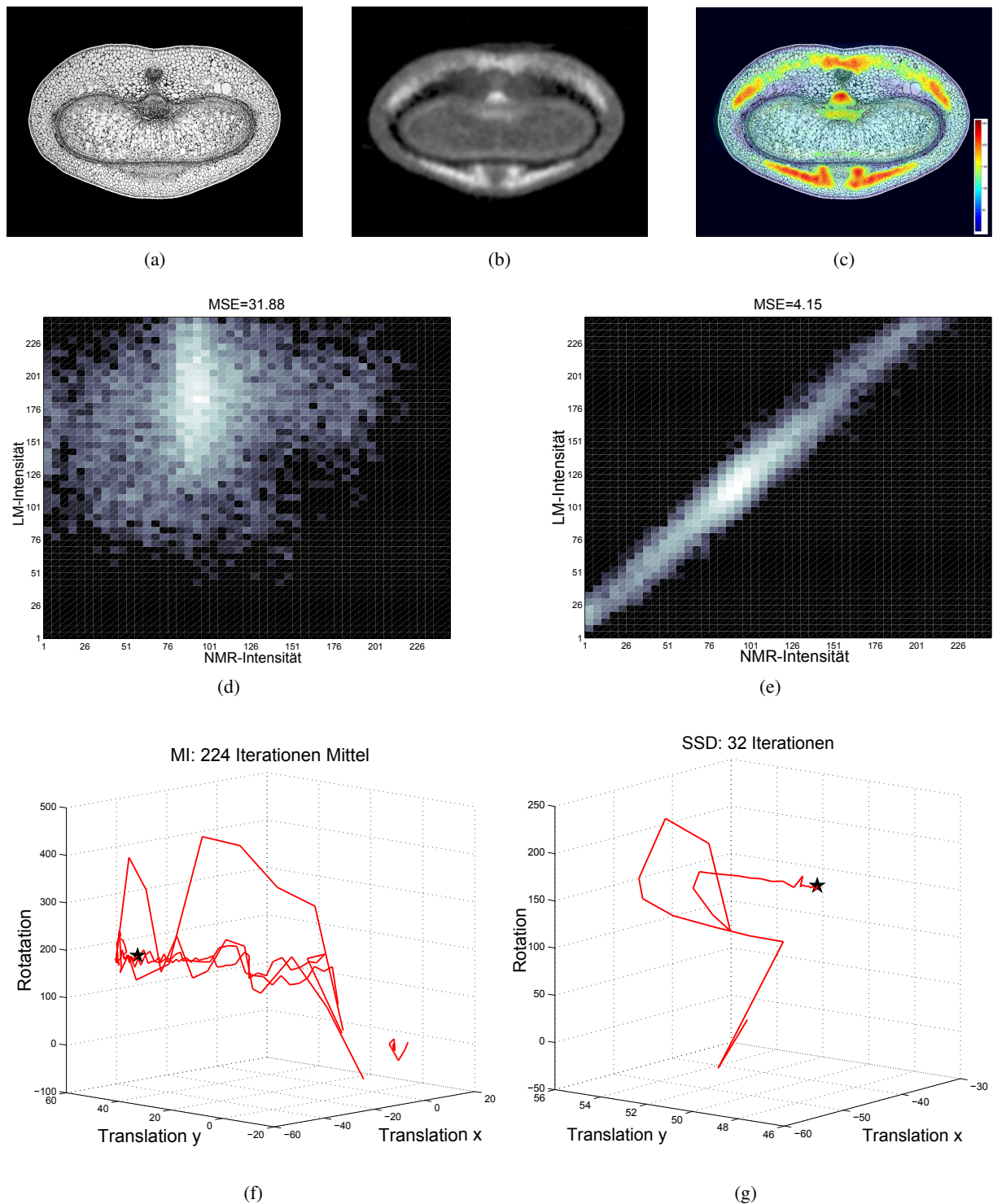


Abbildung 7.2: Multimodale Registrierung durch Regression: 7.2a-7.2b Histologiebild (lichtmikroskopisch, LM), Protonendichten im NMRi-Ausschnitt und Darstellung eines Registrierungsergebnisses. Intensitätsvorhersage: Verbundhistogramme von (I_1, I_2) (7.2d) und (\tilde{I}_1, I_2) (7.2e) eines Referenzdatums. Vergleich mit MI-Ansatz in der Registrierung (10 Wiederholungen): Optimierung im Transformationsraum, MI 7.2f und Regression-SSD 7.2g zur tatsächlichen Transformation (unterschiedliche Achsenbeschriftung) zeigt die erwartete Verbesserung bezüglich Laufzeit, lokaler Minima (7.2f u. rechts) und Stabilität (vgl. Tab. C.4).

Kapitel 8

Zusammenfassung und Ausblick

Die vorgestellten Arbeiten und Methoden stehen im Zusammenhang mit einem Forschungsprojekt und Entwicklungsanstrengungen die Nachteile herkömmlicher Laserpräparationstechniken aufzuheben. Um biologische Fragestellungen nach Funktion und Struktur gezielter als bisher untersuchen zu können ist dazu einerseits mit den Methoden der Biochemie die Möglichkeit von gewebereinen Aufschlussanalysen, und andererseits die Frage nach den phänotypischen morphologischen Varianzen der Gewebestrukturen maßgeblich. Dazu wurde ein prototypischer Aufbau eines 3-D-Cryo-LMD Systems mittels *Ultrakurz-puls*-Lasern entwickelt. In Tests konnten die angestrebten Dissektionsergebnisse mit der modellbasierten Ablationsteuerung erreicht werden, womit die Grundlagen für eine Produktentwicklung besteht. Der Informationsverarbeitung kommt in diesem Rahmen die Aufgabe zu, für solche automatischen motorisierten Präparationssysteme eine Schnittstelle zwischen Biologie und Maschinensteuerung herzustellen. Die vorliegende Dissertation beschreibt in diesem Zusammenhang die dazu notwendigen Methoden zur Erstellung dreidimensionaler geometrischer Modelle von Gewebestrukturen innerhalb von Probeobjekten. Die hierin beschriebenen Entwicklung dabei zunächst im oben genannten Zusammenhang motiviert, jedoch aus Sicht der digitalen Bild- und Informationsverarbeitung allgemeingültig. Für die Herstellung der Schnittstelle im oben genannten Sinn steht dabei auf der einen Seite zunächst die Beschreibung der Histologie, mit Strukturen und Gewebeorganisation in mikroskopischen Größenordnungen und auf anderen Seite die Notwendigkeit, Positionen im Raum entsprechend Mikrometern genau anzufahren. Die für die gewebereine Probenpräparation notwendige Auflösung der Strukturen konnte nicht mit 3-D Bildgebungen erreicht werden, die automatische Modellerstellung muss daher auf der Basis von 2-D Serienschnittbildern erfolgen. Aus den beobachteten biologischen Varianzen entspringt dabei die Notwendigkeit, für die Modellbildung unterschiedliche Zeitpunkte und darin Stichproben mehrere Individuen zur Erstellung von Interindividualmodellen zur statistischen Vorhersage in der Modellbildung zu berücksichtigen. Zur Rationalisierung und Zeitersparnis im wissenschaftlichen Arbeiten, aber auch um eine objektive und reproduzierbare Informationsverarbeitung sicherzustellen, kann die Modellerstellung daher nicht manuell oder interaktiv, sondern muss maximal automatisiert realisiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit werden in Kapitel 2 zunächst die Eigenschaften des Datenmaterials näher untersucht. Ob Farb- oder Graustufenbilder verwendet werden müssen, ist für das weitere Vorgehen entscheidend, dazu konnte mittels Farbraumanalyse für die vorliegenden *Hordeum*-Bild- und die

entsprechenden Präparations- und Kontrastierungsprotokolle gezeigt werden, dass mit Farbinformation kein Vorteil in der Verarbeitung zu erwarten ist. Daneben kommt der Anpassung der Bildintensitäten große Bedeutung zu: Da während der Aufnahme mehrerer tausend Schnittbilder eines Probeobjektes unweigerlich Schwankungen in der Beleuchtung beziehungsweise Mikroskopeigenschaften auftreten, muss durch adaptive Histogrammanpassung die homogene Quantisierung der Bilddaten sichergestellt werden. Diese Schwankungen begründen daneben auch die Notwendigkeit der inhaltsadaptiven Bildfusion beim erstellen von Mosaikbildern; das hierzu verwendete Werkzeug *Multiskalenanalyse* wird bei der Lösung unterschiedlicher Teilprobleme in dieser Arbeit mehrfach benutzt.

Die in Rohbildern auftretenden Störungen und Qualitätsschwankungen sind bei manueller Präparation unvermeidlich und wurden bei allen Bildgebungsmodalitäten beobachtet. Für die Segmentierung der Proben-ROI gegen den Bildhintergrund wurden zwei unterschiedliche Modelle entwickelt. Die Verwendung von Kantendetektoren, morphologischen Operatoren und nachgelagerter Objektklassifikation mittels einfachen Schwellwerten liefern als Verkettung von *low-level* Operatoren ein rechnerisch schnelles Verfahren, was jedoch sensitiv gegenüber der Parameterwahl, insbesondere in der Kantendetektion, beziehungsweise an die jeweilige Bildgebung angepasst ist. Als geschlossenes Modell erweist sich die variationelle Fassung mit aktiven Konturmodellen demgegenüber als wesentlich universeller. Um daneben praktikabel niedrige Laufzeiten in der Bildvorverarbeitung zu erhalten, wurde die Konturentwicklung in einem Mehrskalensmodell gefasst. Durch die Verwendung einer zusätzlichen Regularisierung der *level-set* Funktion wird in dem beschriebenen Ansatz die Iteration auf unterschiedlichen Auflösungsebenen der jeweiligen Skalen bestimmt, und so die Laufzeit stark verbessert. Durch die Implementierung der Konturen als Niveaumenge wird gegenüber der klassischen parametrischen Darstellung ein Modell erhalten, welches Topologieänderung während der Segmentierung gestattet. Da das verwendete Energiefunktional unabhängig vom Vorhandensein von skalenabhängiger Kanteninformation im Bild ist, wird auch bei „glatten“ Bildgebungen, wie beispielsweise den untersuchten Autoradiogrammen, eine präzise Vordergrundsegmentierung erhalten.

In Kapitel 3 wird dann erstmals die eigentliche Rekonstruktion dreidimensionaler Volumendaten aus Schnittbildstapeln betrachtet, und damit das ursprüngliche Probeobjekt mit den Genauigkeiten der zweidimensionalen Mikroskopie wiederhergestellt. Aufgrund des Bildmaterials wurde die Identifikation eindeutiger Punkte oder Landmarken zur Registrierung zugunsten des intensitätsbasierten Registrierungsansatzes verworfen; die Optimierung der verwendeten SSD-Bildmetrik im Transformationsraum wird dabei in einem Mehrskalensansatz durchgeführt. Für den praktischen Einsatz ist die Robustheit des Verfahrens gegenüber Fehlregistrierungen, die aus Artefakten in Bildern, beziehungsweise Korrespondenzfehlern und entsprechende lokale Minimaereinstellungen in der Optimierung der Metrik resultieren entscheidend. Das Problem wurde durch zwei unterschiedliche Ansätze adressiert: Durch den heuristischen Ansatz, das Problem auf eine gewichtete Nachbarschaft zu erweitern, wird die Fehlerwahrscheinlichkeit reduziert. Durch die Fassung des sequentiellen Problems in einer rekursiven *divide-and-conquer* Formulierung können Registrierungsfehler systematisch erfasst und Fehlregistrierungen, beziehungsweise fehlerhafte Einzelbilder einer Rückweisungsklasse zugeordnet, und die gesamte Rekonstruktion so gegen Fehler abgesichert werden. Die numerische Komplexität ist dabei nur geringfügig erhöht, beziehungsweise bleibt asymptotisch gleich der konventionellen Fassung. Anhand der Rekonstruktionsergebnisse, insbesondere

KAPITEL 8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

bei den mehrere tausend Einzelbilder umfassenden *Hordeum* Proben konnte gezeigt werden, dass mit den entwickelten Methoden eine vollautomatische Rekonstruktion geleistet wird und die Notwendigkeit einer Nutzerinteraktion wie in bestehenden Ansätzen entfällt.

Zentrale Bedeutung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Systems kommt dem in Kapitel 5 vorgestellten Segmentierungsalgorithmus zu. Die Erkennung unterschiedlicher Gewebeklassen im vorliegenden Bildmaterial wird in Kapitel 4 zunächst anhand einer merkmalsbasierten überwachten Klassifikation durchgeführt. In der Segmentierung der Bilddaten durch bildpunktweise Klassifikation mittels *Support Vector Maschinen* und *Mehrschichtperzeptren* in einem hochdimensionalen Merkmalsraum wurden zwei wesentliche Schwachstellen beobachtet: Das räumlich ungebundene Risiko einer Falschklassifikation und die hohe Laufzeitkomplexität in der Berechnung der Merkmalsdaten und deren Klassifikation.

Der neu entwickelte Ansatz basiert auf der wechselseitigen Registrierung und Segmentierung von Bildstapeln und der Bestimmung der Ähnlichkeit zu Referenzsegmentierungen anhand von Deformationsfeldern. Zur Lösung des mit einem Diffusionstern regularisierten Registrierungsproblem wird dabei eine Approximation der invertierten Ableitungsmatrix des Deformationsfeldes benutzt, und so eine Komplexität von $\mathcal{O}(N)$ je Iteration erhalten. In der Evaluierung auf Referenzdatensttzen zeigt sich, dass gegenüber den bestehenden bildpunktbasierten Verfahren mit dem entwickelten Algorithmus eine signifikant verbesserte Segmentierungsgenauigkeit von über 95% erreicht werden konnte, und damit, die für eine automatische Verarbeitung notwendigen Genauigkeiten hergestellt werden. Durch den Ansatz eines Mischmodells aus *globaler* deformationsbasierter Segmentierung und *lokaler* überwachter Bildpunkt-klassifikation wurden die Segmentierungsunsicherheiten beider Verfahren quantifiziert und entsprechend des geringstmöglichen Fehler in einem Mischmodell gewichtet, und damit eine nochmalige Verbesserung der Genauigkeit erreicht. Bei der detaillierten Untersuchung des verbleibenden Fehlers mittels einer distanzbasierten Gewichtung der Genauigkeit konnte gezeigt werden, dass durch den Deformationsansatz vor allem die wichtige räumliche Bindung des Segmentierungsfehlers erreicht wird. Insgesamt wird so, zusammen mit der numerischen Effizienz des Verfahrens die automatische Erstellung von Gewebemodellen ermöglicht, die letztlich Grundlage für die Zusammenführung zu interindividuellen Durchschnittsmodellen zur Beschreibung der morphologischen Varianzen der Gewebeverteilungen im Phänotyp der Probeobjekte ist.

Im letzten Teil der Arbeit werden die notwendigen Schritte und Methoden vorgestellt, um einerseits eine interindividuelle statistische Beschreibung der nun vorliegenden vollständig segmentierten Bildvolumen zu erhalten, und andererseits diese der technischen Anwendung verfügbar zu machen. Die primäre ingenieurstechnische Verwendung des vorgestellten Systems liegt in der Bereitstellung mikrometergenauer Anfahrkoordinaten zur Steuerung motorisierten Ablation in der 3-D-Cryo-LMD. Durch die Registrierung in ein gemeinsames Koordinatensystem anhand des Momententensors und die Beschreibung der interindividuellen Morphologie auf Basis eines stochastischen Bildvolumens wird sowohl für biologische motivierte Fragestellungen, wie 3-D Verteilungen und Volumetrie, als auch für die technische Aufgabengestaltung gewebereiner Dissektate statistisch sichere Zielvolumen zu erhalten, eine geeignete Darstellung entwickelt. Durch den SFM-Ansatz können diese Zielvolumina aus dem Modellen in der LMD Anwendung zu den Geometrien der realen Probe in Beziehung gesetzt, und damit die wichtige Verbindung von

Modell zurück zur realen Biologie hergestellt werden.

Die aus biologischer Sicht wichtige Untersuchung von Struktur-Funktion Beziehungen wird abschließend im letzten Kapitel behandelt: Die entwickelten Algorithmen zur Erstellung hochaufgelöster Gewebemodelle eröffnet die Möglichkeit, funktionale Messdaten wie MALDI-IMS und NMRi zur Verteilung von Metaboliten und Proteinen räumlich und gewebespezifisch auszuwerten. Durch statistische Bildmetriken zur inter-modalen 2-D/3-D Registrierung wurde dabei anhand von MALDI-IMS Aufnahmen zunächst die biologische Relevanz und Gültigkeit des Ansatzes gezeigt. Die dabei beobachteten Nachteile in punkto Stabilität und Laufzeit wurden durch einen neu entwickelten Ansatz zur inter-modalen Registrierung durch Regression mittels neuronaler Netze aufgehoben, und eine damit die automatische Datenintegration erheblich verbessert.

Zusammenfassend wird mit den im Rahmen der Arbeit entwickelten Methoden ein System erhalten, das die gesamte Verarbeitung zweidimensionaler Bilddaten hin zu dreidimensionalen Modellen der vorliegenden Gewebe, darauf basierende statistische Vorhersagen und den Bezug dieser zu realen, ungesehen Proben realisiert. Durch die Möglichkeit, interindividuelle Gewebemodelle zu erstellen ist, neben der rein biologischen Relevanz, damit die technische Voraussetzung für eine neuen Verfahren zur vollautomatischen mikroskopischen Probenpräparation gegeben, und damit ein wichtiger ingenieurstechnischer Beitrag zur Methodenentwicklung in den Lebenswissenschaften. Die hier vorgeschlagenen und getesteten Algorithmen, insbesondere zu wechselseitigen Registrierung und Segmentierung sind dabei allgemeingültig, und stellen einen Beitrag zum Stand der Technik in der Bild- und Informationsverarbeitung dar.

Ausblickend lassen sich für Verbesserung und Erweiterungen zwei Stoßrichtungen für aktuelle und zukünftige Arbeiten ausmachen: eine Optimierung der Implementierung der entwickelten Algorithmen, und Erweiterung der Methoden als solche. Erstgenannte Arbeiten werden zur Zeit im Rahmen eines drittmittelgeförderten Forschungsprojekts hin auf eine leistungsfähige Programmbibliothek in hardwarenaher paralleler Implementierung unter anderem für die Nutzung seitens des LMD Anbieters unternommen. Daneben sind einige Erweiterungen der eigentlichen Methoden denkbar: Die „Unsicherheiten“ beziehungsweise statistische Natur der Gewebeverteilungen innerhalb von Objektstichproben kann auf einzelne Individuen abgebildet werden: teilweise liegen zu Entwicklungszeitpunkten Gewebe- und Materialregionen vor, die innerhalb der Entwicklung noch nicht voll zu einer bestimmten Gewebeklasse differenziert sind. Hier können stochastische oder *fuzzy*-Segmentierungen eingesetzt werden, und damit bereits individuelle Unsicherheiten für die Beschreibung der gesamten Stichprobe berücksichtigt werden. Dazu sind bereits Untersuchungen erfolgt [BRÜSS et al., 2006a, SEIFFERT und BOLLENBECK, 2008], für eine praktische Anwendbarkeit im Hochdurchsatz sind hier jedoch noch signifikante Verbesserungen notwendig. Daneben sind für den Ansatz eines Mischmodells weitere Klassifikatoren einsetzbar. Ausserdem bleibt zu prüfen, in wie weit Merkmale und Parameter in einer überwachten Klassifikation jeweils innerhalb von ganzen Stichproben einer Objektklasse Gültigkeit haben.

KAPITEL 8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Anhang A

Multiskalenanalyse mittels Wavelettransformation

Die Multiskalenanalyse basiert auf dem Ansatz, eine Repräsentationwechsel des Signals durchzuführen, so daß dieses in eine Folge zunehmend glatterer Versionen einer darstellenden Funktion aufgespalten wird.

Die Zeit- und Frequenzauflösung einer Zerlegung unterliegt dem *WKS-Abtasttheorem* [LÜKE, 1999] bzw. der Auflösungsunschärfe

$$\Delta t \cdot \Delta \nu \geq \frac{1}{2}, \quad (\text{A.1})$$

d.h. die Auflösung im Zeit- bzw. Ortsbereich ist umgekehrt proportional zur Auflösung im Frequenzbereich.

Die Orts- und Frequenzauflösung ist abhängig von der Form des Fensters einer darstellenden Funktion bei einem Basiswechsel, der *Breite* im Zeit und Frequenzbereich, die durch Translation und Frequenzverschiebung durch Skalierung erhalten wird.

Ziel der Multiskalenanalyse ist eine der oben genannten Unschärferelation entsprechende Darstellung der Orts- und Frequenzauflösung als Folge von approximierenden Unterräumen V_j als skalierte Versionen des zentralen Unterraumes V_0 , das heißt.

$$\{0\} \subset \cdots \subset V_2 \subset V_1 \subset V_0 \subset V_{-1} \subset V_{-2} \cdots \subset L^2(\mathbb{R}^2) \quad (\text{A.2})$$

$$\bigcup_{j \in \mathbb{Z}} V_j = L^2(\mathbb{R}^2) \quad (\text{A.3})$$

$$\bigcap_{j \in \mathbb{Z}} V_j = \{0\} \quad (\text{A.4})$$

$$f \in V_j \leftrightarrow f(2^j \cdot) \in V_0. \quad (\text{A.5})$$

$\exists \phi \in V_0 : \phi_{0,n}$ ist orthornormale Basis in V_0

$$\phi_{j,n}(x) = 2^{-j/2} \phi(2^j x - n) \quad \forall j, n \in \mathbb{Z} \quad (\text{A.6})$$

Die Eigenschaften A.2-A.4 liefern die Basis für eine beliebig genaue Approximation, während die eigentliche multiskale Eigenschaft erst durch A.5 und die *Skalierungsfunktion* A.6 erhalten wird.

Grundlage der Multiskalen-Waveletanalyse ist nun, daß für eine Menge von Unterräumen mit den Eigenschaften A.2-A.4 (und der Invarianz von V_0 bezüglich ganzzahligen Verschiebungen) eine Basis orthogonaler Waveletfunktionen $\{\psi_{j,k}; j, k \in \mathbb{Z}\}$, $\psi_{j,k}(x) = 2^{-j/2}\psi(2^{-j}x - k)$ existiert, die für alle Skalen $j \in \mathbb{Z}$ das orthogonale Komplement W_j von V_j

$$V_{j-1} = W_j \oplus V_j \quad (\text{A.7})$$

und damit eine orthogonale Zerlegung der Skalierungsräume V_j

$$V_0 = W_1 \oplus V_1 = W_1 \oplus W_2 \oplus V_2 = \dots$$

beziehungsweise

$$V_J \oplus \bigoplus_{k=0}^{J-j-1} W_{J-k}, \quad j < J \quad (\text{A.8})$$

und mit A.2-A.3 eine Zerlegung des $L^2(\mathbb{R})$

$$L^2(\mathbb{R}) = \bigoplus_{j \in \mathbb{Z}} W_j \quad (\text{A.9})$$

bilden. Die detaillierte Herleitung und Konstruktion von Funktionen ψ mit diesen Eigenschaften findet sich in [DAUBECHIES, 1992].

Die Konstruktion einer Basis für eine bi-orthogonale Multiskalenanalyse im $L^2(\mathbb{R}^2)$ kann auf die Bildung des Tensorproduktes aus zwei eindimensionalen Multiskalenanalysen zurückgeführt werden. Das heißt es werden die Unterräume \mathbf{V}_j analog A.2-A.3 definiert mit

$$\mathbf{V}_0 = V_0 \oplus V_0 \quad (\text{A.10})$$

und das Tensorprodukt der Skalierungsfunktionen

$$\Phi_{j,k,m}(\mathbf{x}) = 2^{-j}\phi(2^{-j}x - k)\phi(2^{-j}y - m) \quad (\text{A.11})$$

liefert die orthormale Basen der Skalierungsunterräume \mathbf{V}_j , und wie im Eindimensionalen deren orthogonales Komplement \mathbf{W}_j analog A.7

$$\begin{aligned} \mathbf{V}_{j-1} &= V_{j-1} \oplus V_{j-1} = (V_j \oplus W_j) (V_j \oplus W_j) \\ &= V_j \oplus V_j \oplus ((V_j \oplus W_j) \oplus (W_j \oplus V_j) \oplus (W_j \oplus W_j)) \\ &= \mathbf{V}_j \oplus \mathbf{W}_j. \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

Der Waveletunterraum \mathbf{W}_j besteht also aus den drei Basen $\psi_{j,k}(x)\phi_{j,m}(y)$, $\phi_{j,k}(x)\psi_{j,m}(y)$ und $\psi_{j,k}(x)\psi_{j,m}(y)$ mit entsprechenden Waveletfunktionen

$$\begin{aligned} \Psi_{j;k,m}^H(\mathbf{x}) &= 2^{-j}\phi(2^{-j}x - k)\psi(2^{-j}y - m) \\ \Psi_{j;k,m}^V(\mathbf{x}) &= 2^{-j}\psi(2^{-j}x - k)\phi(2^{-j}y - m) \\ \Psi_{j;k,m}^D(\mathbf{x}) &= 2^{-j}\psi(2^{-j}x - k)\psi(2^{-j}y - m) \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

wobei $\{H, V, D\}$ eben genau die Zerlegung in *horizontale*, *vertikale*, und *diagonale* Komponenten im Zweidimensionalen anzeigt. Basierend auf der Wavelettheorie wird das Signal in einer N Multiskalenanalyse in den j -ten Skalenraum abgebildet

$$f_j(\mathbf{x}) := \begin{cases} \sum_{k,m} \langle f(\mathbf{x}), \tilde{\Phi}_{N;k,m}(\mathbf{x}) \rangle \Phi_{N;k,m}(\mathbf{x}) & \text{für } j = 0 \\ \sum_{k,m} \left(\langle f(\mathbf{x}), \tilde{\Psi}_{j;k,m}^H(\mathbf{x}) \rangle \Psi_{j;k,m}^H(\mathbf{x}) + \langle f(\mathbf{x}), \tilde{\Psi}_{j;k,m}^V(\mathbf{x}) \rangle \Psi_{j;k,m}^V(\mathbf{x}) \right. \\ \left. + \langle f(\mathbf{x}), \tilde{\Psi}_{j;k,m}^D(\mathbf{x}) \rangle \Psi_{j;k,m}^D(\mathbf{x}) \right) & \text{für } j = 1, \dots, N \end{cases} \quad (\text{A.14})$$

mit der Darstellung von f durch die entsprechenden Skalierungs- und Waveletfunktionen

$$\begin{aligned} \langle f(\mathbf{x}), \tilde{\Phi}_{N;k,m}(\mathbf{x}) \rangle &= \int \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{x}) \tilde{\Phi}_{N;k,m}(\mathbf{x}) d\mathbf{x} \\ \langle f(\mathbf{x}), \tilde{\Psi}_{N;k,m}(\mathbf{x}) \rangle &= \int \int_{-\infty}^{\infty} f(\mathbf{x}) \tilde{\Psi}_{N;k,m}(\mathbf{x}) d\mathbf{x}, \end{aligned} \quad (\text{A.15})$$

wird das rekonstruierte Signal durch Summation

$$f(\mathbf{x}) = \sum_{j=1}^N f_j(\mathbf{x}) \quad (\text{A.16})$$

erhalten. Für eine ortsdiskrete Zerlegung können die obigen Integrale durch diskrete Faltung mit den sogenannten *Entwicklungskoeffizienten* der Waveletfunktionen berechnet werden (s. [DAUBECHIES, 1992]). Zusammen mit den Eigenschaften aus der Skalierungsfunktionen ermöglicht den Ansatz der *schnellen Wavelettransformation* (*fast wavelet transform, FWT*). Die Entwicklungskoeffizienten der Skalierungs- und Waveletfunktionen werden zur Berechnung der Skalierungs- und Waveletkoeffizienten c_j, d_j durch diskrete Faltung entsprechend der Orientierungen A.12 benutzt

$$\begin{aligned} c_j(k) &:= \sum_m h_j(m - 2k) \cdot c_{j+1}(m) \\ d_j(k) &:= \sum_m g_j(m - 2k) \cdot c_{j+1}(m) \end{aligned} \quad (\text{A.17})$$

wobei die Filterkoeffizienten für $g(n)$ einem Tiefpass und für $h(n)$ einem Hochpass entsprechen. Bei gegebenen bandpassbeschränkten Eingangssignal erhalten die gewonnenen Koeffizientenfolgen die Abtastraten jeweils für den Hoch- und Bandpassanteil, wenn die Koeffizienten der nächsten Rekursionsebene $j - 1$ mit dem Faktor 2 unterabgetastet werden

$$\begin{aligned} c_j(k) &:= \frac{1}{\sqrt{2}} (\downarrow 2) \sum_m h_j(m - 2k) \cdot c_{j+1}(m) \\ d_j(k) &:= \frac{1}{\sqrt{2}} (\downarrow 2) \sum_m g_j(m - 2k) \cdot d_{j+1}(m) \end{aligned} \quad (\text{A.18})$$

was eben genau der geforderten multiskalen Zerlegung der Funktionraumes entspricht.

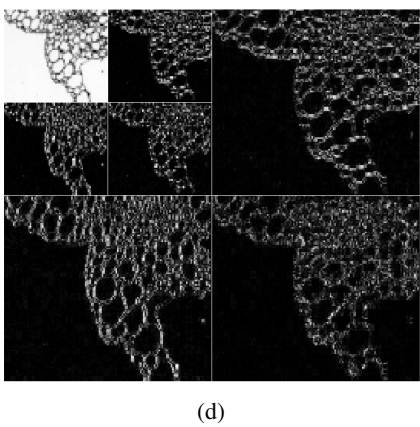
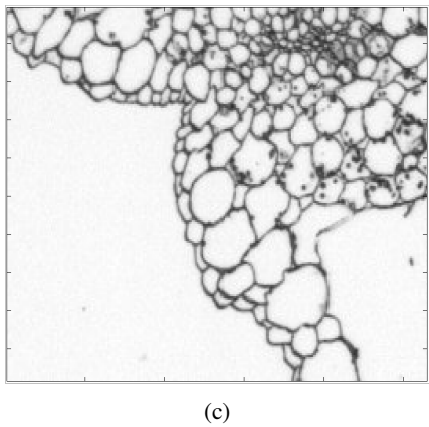
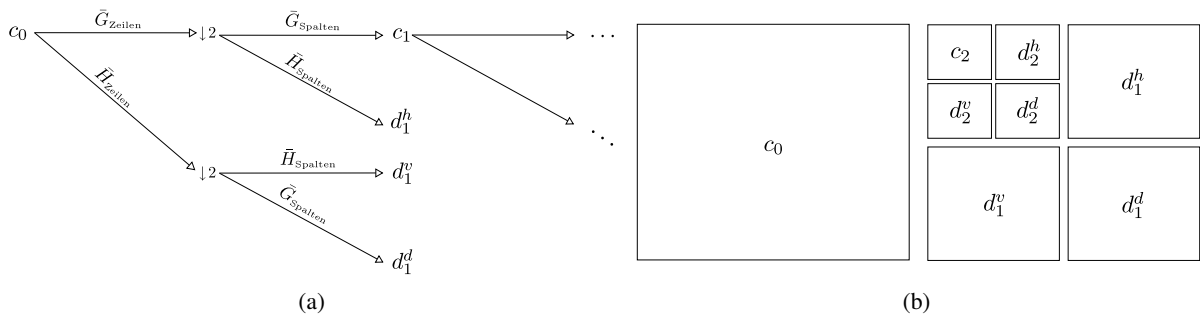


Abbildung A.1: Schema der zweidimensionalen Wavelettransformation als Tensorprodukt eindimensionaler DWT. A.1a: \bar{G}, \bar{H} bezeichnen die Tief- und Hochpassanteile des Eingangssignals. Entsprechend Gleichung A.13 werden die Koeffizienten H, V, D der jeweiligen Skale erhalten. A.1b Zeigt das Resultat der Unterabtastung der Zeilen und Spalten für die Entwicklung auf der jeweiligen Skale j : Die Anzahl der erhaltenen Koeffizienten ist gleich der Anzahl der Abtastpunkte des Eingangssignals. A.1c-A.1d: Wavelettransformation des Bildausschnitts aus Abbildung 2.6 für $j = 2$ Skalen mit $db6$ Wavelet ([DAUBECHIES, 1992]): Die Detailkoeffizienten $d_{1,2}^{h,v,d}$ und c_2 entsprechend der $\frac{1}{4}, \frac{1}{8}$ Unterabtastung.

Anhang B

Datensätze

Die verwendeten Datensätze zur Untersuchung der entwickelten Methoden werden im Folgenden kurz beschrieben. Ergebnisse und Darstellung berechneter Modelle und rekonstruierter Volumina sind dabei beispielhaft dargestellt, auf die vollständige Darstellung der prozessierten Daten muss verzichtet werden. Die Auflistung soll daher eher die Allgemeingültigkeit der Methoden vermitteln.

Hordeum vulgare Aus sich entwickelnden Gerstenkaryopsen wurde ein umfangreicher Datensatz zur Untersuchung und Modellierung der biologischen Entwicklung aufgenommen. Bilddaten wurden als Durchlichtaufnahmen erhalten, das gesamte Probenmaterial wurde histologisch kontrastiert (OsO_4) und mit einer lateralen Auflösung von $1.83 \times 1.83 \mu\text{m}/\text{px}$ (1200×1600) als 12 Bit Graustufenbilder digitalisiert. Dabei wurden 5 Entwicklungszeitpunkte 3, 5, 7, 10, 14 DAF mit je 5 Individuen betrachtet. Für eine Karyopse wurden dabei zwischen 1020 und 3095 Einzelschnitte erhalten. Ab dem Entwicklungstag 10 bestehen Schnitte bei gewählter $5\times$ Vergrößerung aus mehreren Teilbildern. Das Volumen des aufgenommenen Bildatendmaterials beläuft sich auf rund 100 GB. Der gesamte Datensatz wurde entsprechend rekonstruiert und in die Gewebetypen *Pericarp*, *Leitbündel*, *Endosperm*, *Transferzellen*, *Nucellare Projektion* segmentiert. Aus den erhaltenen Gewebemodellen wurde dann je Entwicklungszeitpunkt ein Durchschnittsmodell erstellt. Die gefundenen Gewebeverteilungen und deren Geometrien wurden für initiale 3D-Cryo-LMD Validierung benutzt.

Nicotiana benthamiana Als weiterer pflanzlicher Vertreter wurden Bilddaten von *Nicotiana benthamiana* verarbeitet. Dabei wurden neben Durchlichtmikrographen auch konfokale Aufnahmen betrachtet. Die Auflösung aus der Schnittbildgebung wurde hier wesentlich „schlechter“ gewählt: Statt einer isotropen Auflösung wurde reduzierte Schnittanzahlen verwendet, mit $30 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ transversaler gegenüber $5 \mu\text{m}$ lateraler Auflösung. Für Konfokal- und Durchlichtmikroskopie wurden dabei je Schnittdicke und Mikroskopie 250 Einzelbilder aufgenommen. In den rekonstruierten Volumina wurden *Phloem*- und *Xylem*gewebe segmentiert. Aus den Gewebesegmentierung erstellte geometrische Modelle zeigen, in wie weit sich die anisotrope Auflösung nachteilig auf die Moedellerstellung auswirkt. In der Oberflächenrekonstruktion müssen dann große Distanzen extrapoliert werden, was unter Umständen zu Inkonsistenzen im erhaltenen Modell führt.

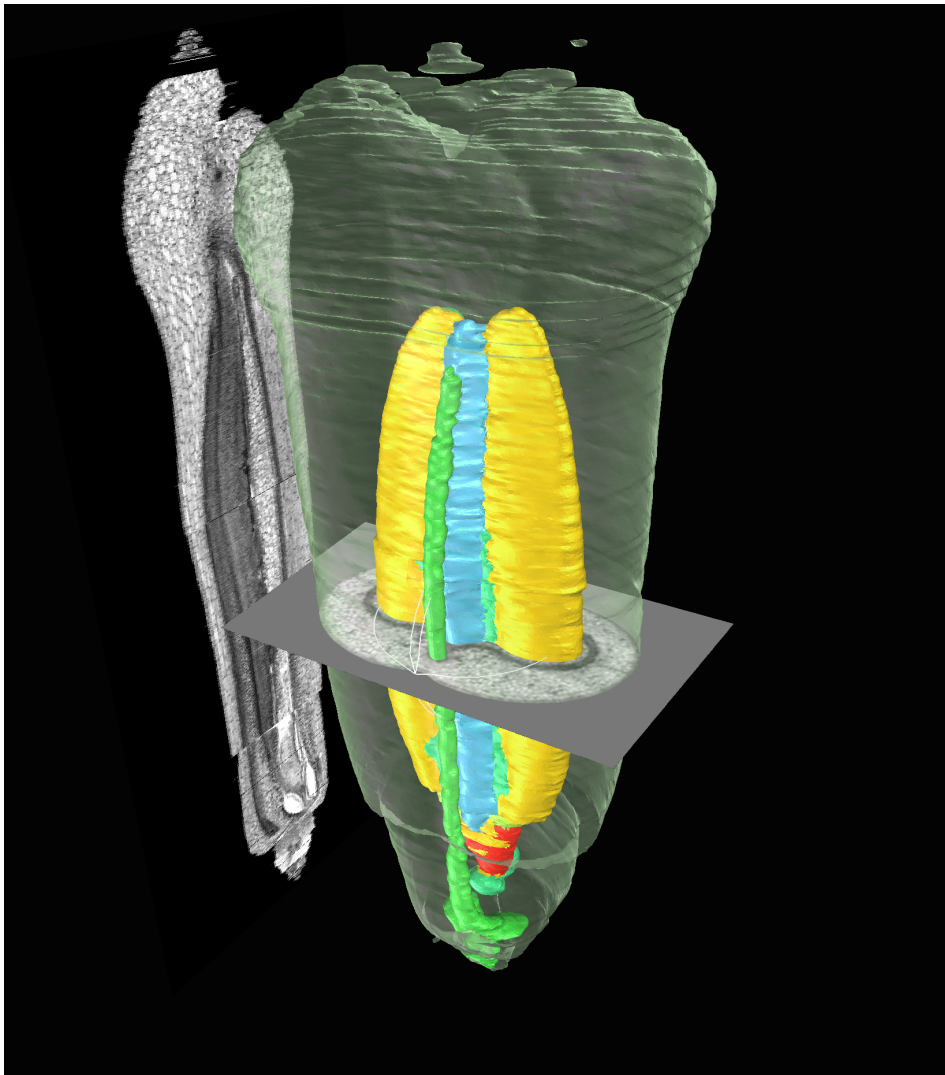
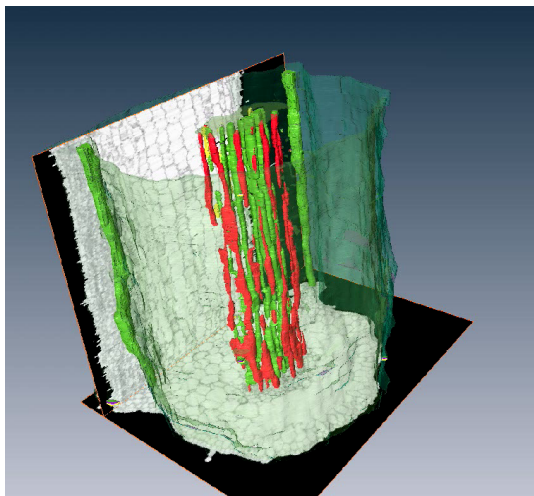
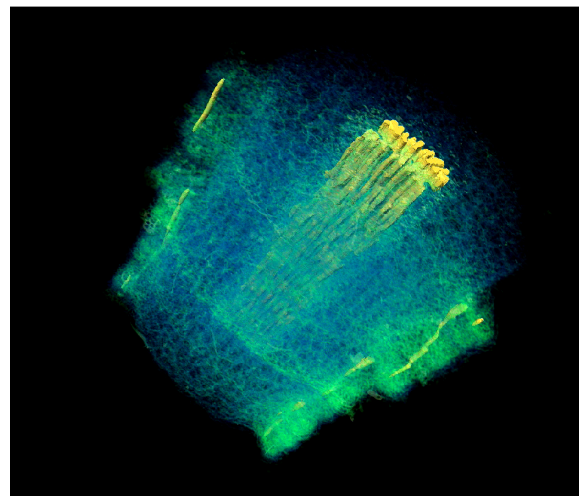


Abbildung B.1: 3-D Rendering *Hordeum* Gewebemodell 7-DAF, 17.4mg, $1.83 \times 1.83 \times 3.0 \mu\text{m}/\text{px}$, 1792 Schnitte: Virtueller Lateralschnitt, Gewebe: *Pericarp* (transparent), *Leitbündel* (grün), *Endosperm* (gelb), *Transferzellen* (türkis), *Nucellare Projektion* (blau).

Maus Als tierische Objekte wurden Schnittbilddaten von Mausgehirnen betrachtet. Als Bildgebungsverfahren diente dabei detektierte α -Strahlung aus in den lebenden Organismus eingebrachten ^{13}C Isotopen. Diese liefern in den Hirnschnittpräparaten dann Muster der Stoffwechselaktivität. Die räumliche Auflösung ist dabei mit $16 \times 16 \times 16 \mu\text{m}/\text{px}$ wesentlich größer als bei den übrigen Aufnahmen. Der betrachtete Datensatz besteht aus 320 Einzelschnittbildern. Die Autoradiogrammbilder wurden vor der Verarbeitung einer anwendungsspezifischen Entfaltung unterzogen.

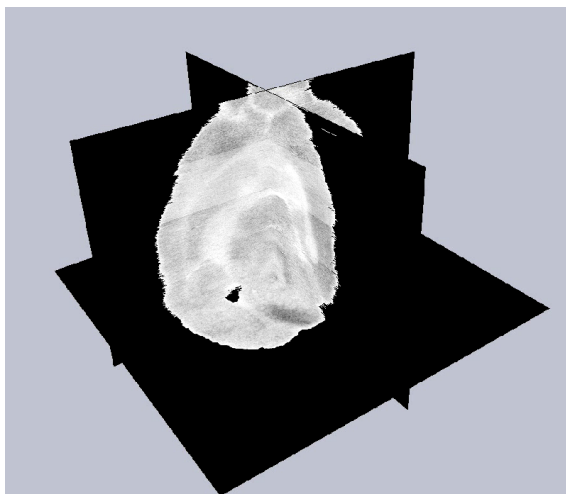


(a)

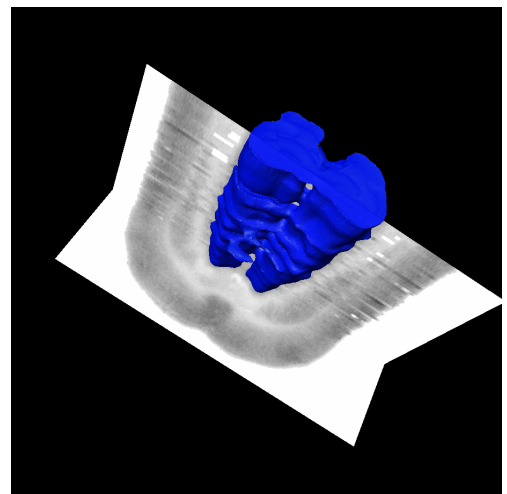


(b)

Abbildung B.2: *Nicotiana* Gewebemodell: Lichtmikroskopische und konfokale Bildstapel, segmentierte *Phloem*- und *Xylem*gewebe, anisotrope Auflösung $5 \times 5 \times 50 \mu\text{m}/\text{px}$, 250 Einzelschnitte.



(a)



(b)

Abbildung B.3: Mauseutoradiogramme (^{13}C Isotopenmarkiert) $16.5 \times 16.5 \times 16.5 \mu$, vollständig rekonstruierter Bildstapel, und Beispielsegmentierung in einem Substapel.

Anhang C

Laufzeiten und Numerische Experimente

Tabelle C.1: Vergleich der Laufzeiten der AOS-Approximation gegen direkte Inversion von pro Iteration in Sekunden. Die tatsächliche Laufzeit skaliert nicht in $\mathcal{O}(n^3)$ für die direkte Lösung, aktuelle Verfahren zur Inversion sind etwas schneller. Daneben bringen die Bildverarbeitungsoperationen (Interpolation und Ableitung) entsprechende Konstanten ein.

Bild	$I_{75 \times 100}$	$I_{150 \times 200}$	$I_{300 \times 400}$	$I_{600 \times 800}$	$I_{1200 \times 1600}$	$I_{2400 \times 3200}$
AOS - $\sum(A_i)^{-1}$	2.15	10.24	43.33	161.09	220.40	342.23
Naiv - $(\sum A_i)^{-1}$	4.322	89.937	123.317	163.685	297.44	1638.479

Tabelle C.2: Gewebesegmentierung zur Rekonstruktion in der simultanen Registrierung und Gewebesegmentierungen (DIF): Dargestellt sind die Anzahlen der Zielfunktionsauswertung D_{CMM} und D_{SSD} der Label- und Intensitätsbilder bis zur Lösungseinstellung für verschiedene Transformationsparameter mit $t_{\max} = 4$ Skalenstufen.

Translation/ Rotation	Metrik, Bildtyp	0°	10°	45°	90°	180°
(0, 0)	D_{CMM}	39	46	95	12	25
	D_{SSD}	40	48	56	328	21
(20, 0)	D_{CMM}	65	71	76	20	55
	D_{SSD}	63	78	85	127	50
(0, 20)	D_{CMM}	64	111	102	36	35
	D_{SSD}	52	61	91	42	50
(50, 50)	D_{CMM}	51	33	71	31	48
	D_{SSD}	66	503	163	136	87
(50, -50)	D_{CMM}	45	83	34	88	67
	D_{SSD}	244	210	77	189	71
(50, 0)	D_{CMM}	88	96	33	47	44
	D_{SSD}	138	130	121	109	120
(0, 50)	D_{CMM}	90	106	55	33	63
	D_{SSD}	68	85	634	36	83

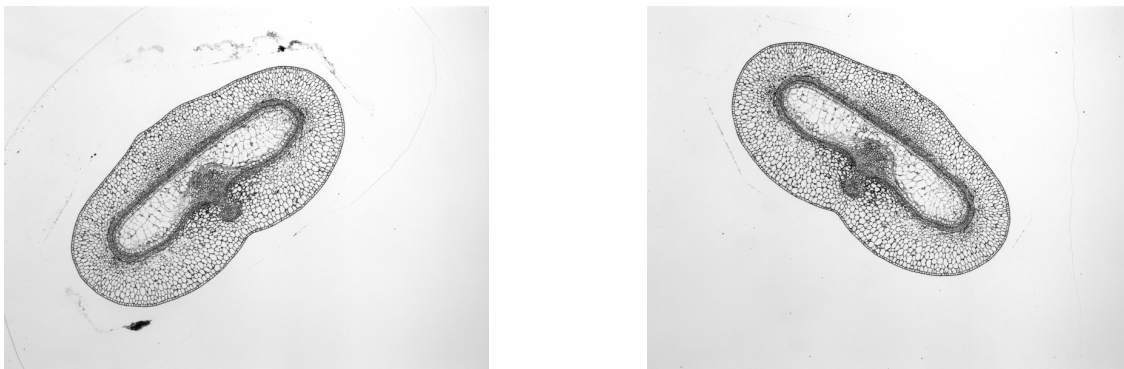


Abbildung C.1: Betrachtung verschiedener Optimierungsverfahren: Zwei konsekutive Rohbilder als Eingang für die Rekonstruktion

ANHANG C. LAUFZEITEN UND NUMERISCHE EXPERIMENTE

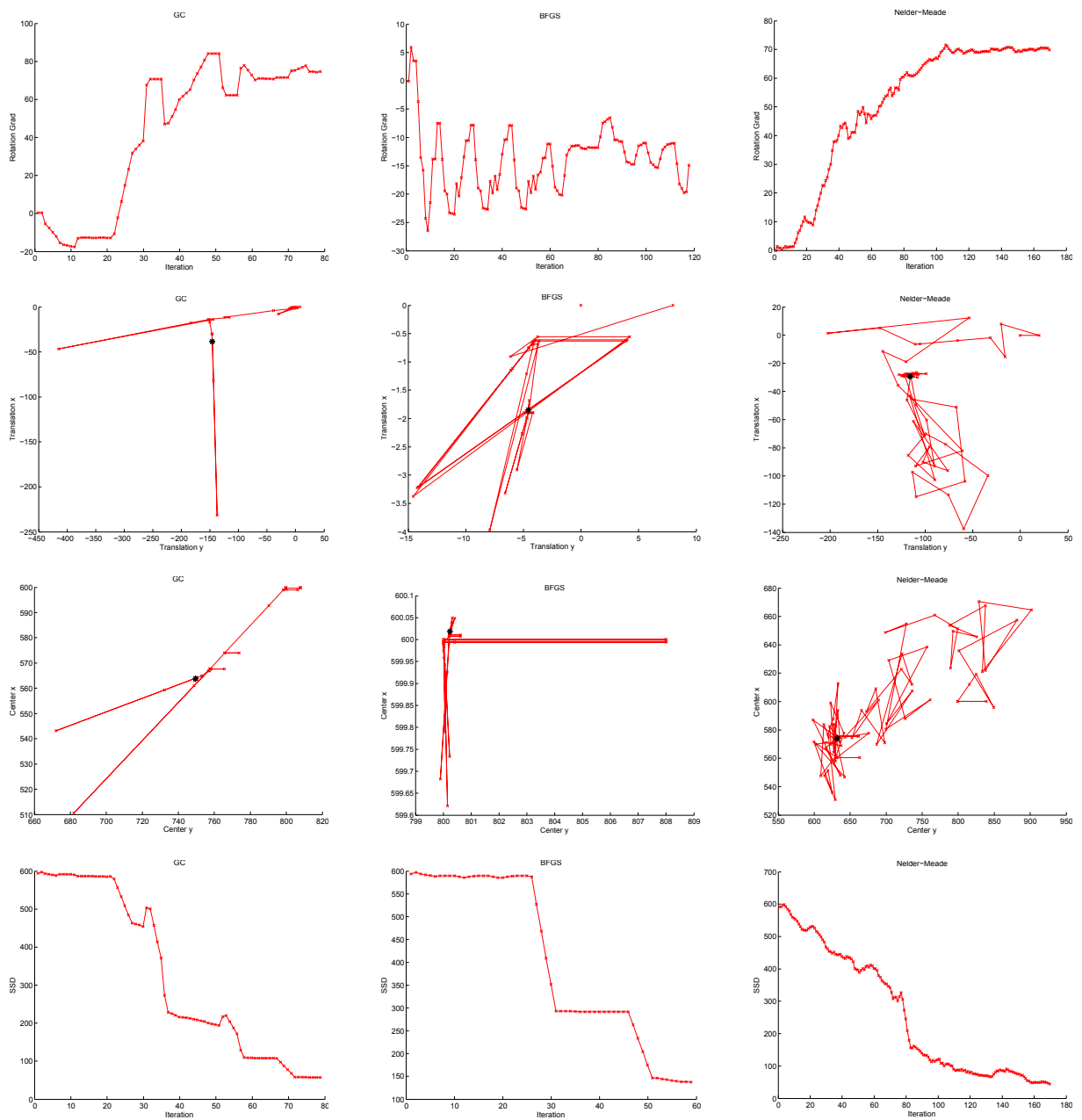
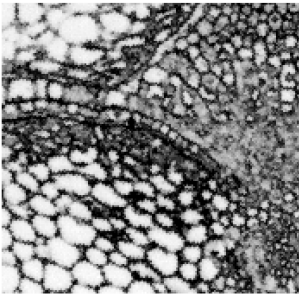
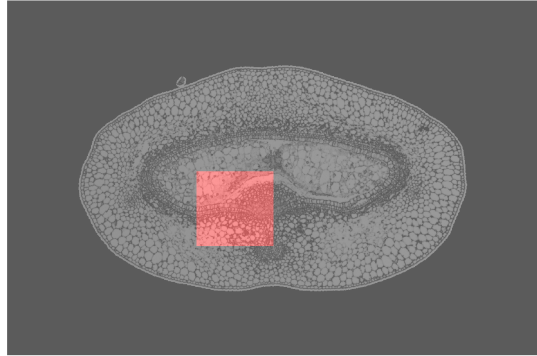
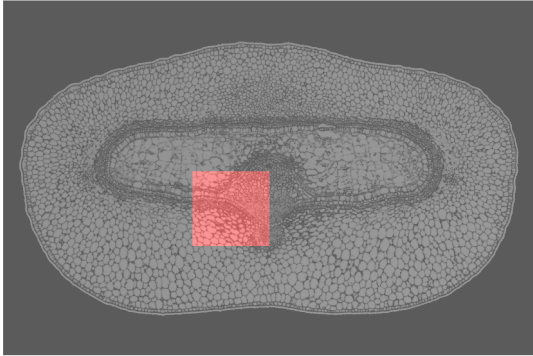
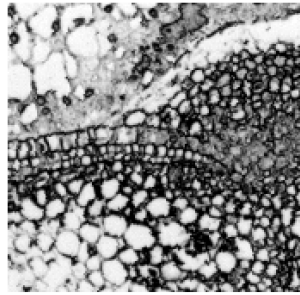


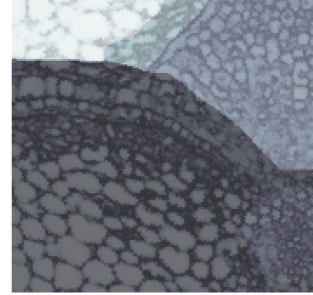
Abbildung C.2: Verhalten verschiedener Optimierungsverfahren aus Tab. 3.1 im Transformationsraum: *Nelder-Meade*, *konjugierte Gradienten*, und *Quasi-Newton* (BFGS) im Vergleich. Die Abbildungen zeigen die Bewegung im Transformationsraum für das Bildpaar aus Abb. C.1. Quasi-Newton Verfahren scheinen für das vorliegende Bildmaterial nicht geeignet, und sind anfälliger für lokale Minima. Das GC-Verfahren ist als Kompromiss zwischen Robustheit und Konvergenzrate zu betrachten (4 Skalenstufen, Eingangsbilder $1200 \times 1600px$)



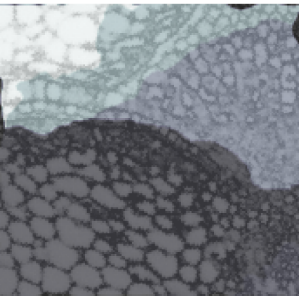
$\alpha=50000 \quad \tau=2e-05$



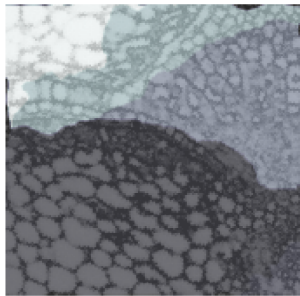
$\alpha=50000 \quad \tau=2e-05$



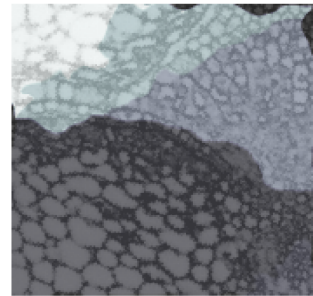
$\alpha=50000 \quad \tau=0.0002$



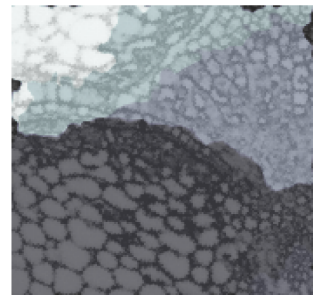
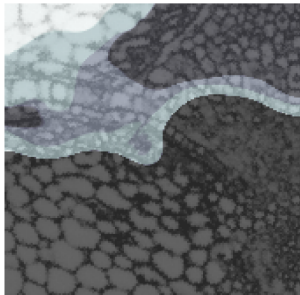
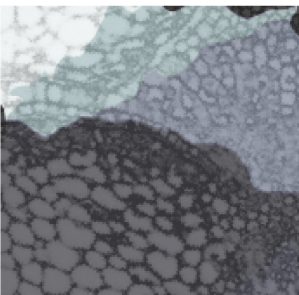
$\alpha=50000 \quad \tau=0.002$



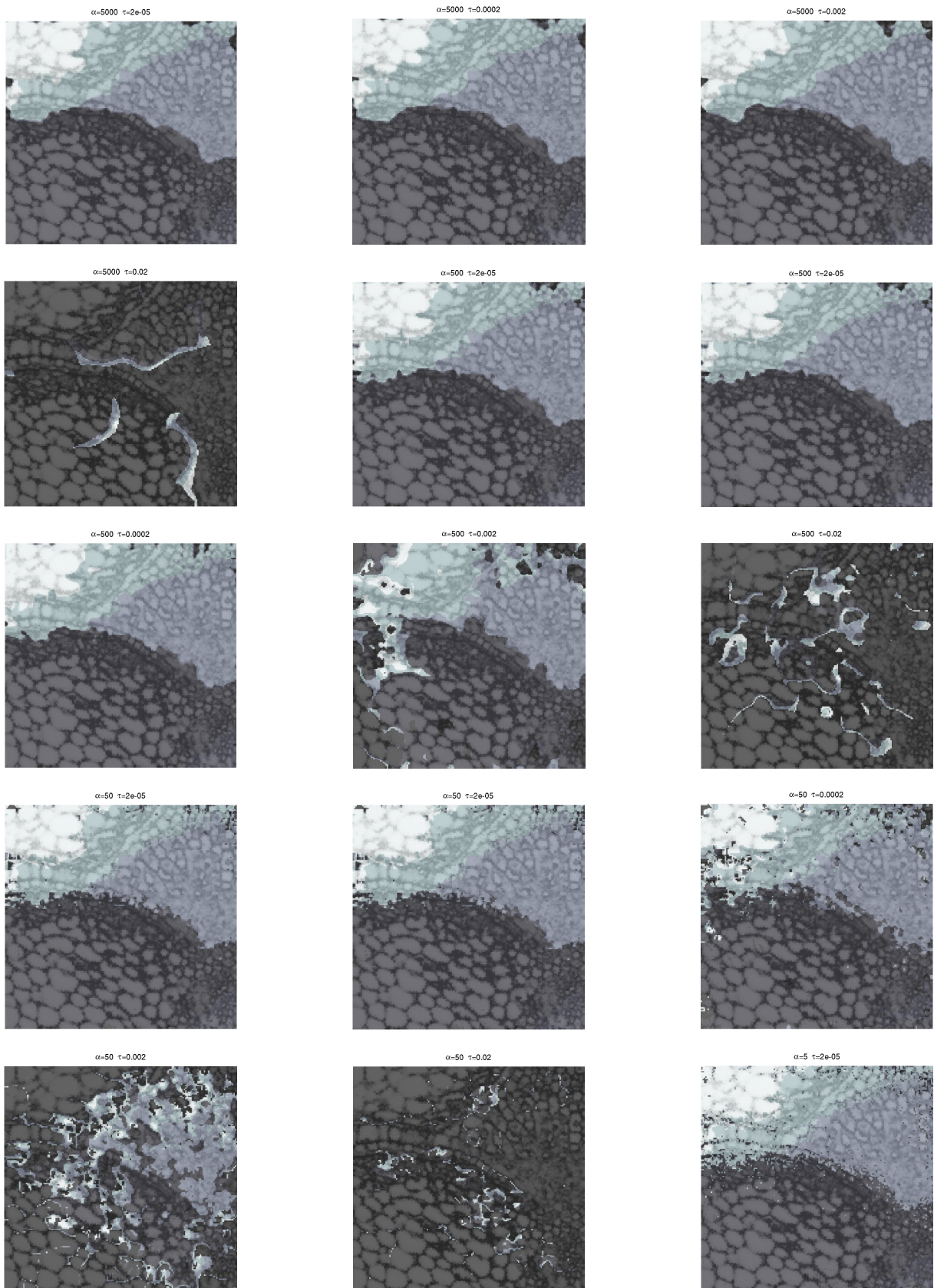
$\alpha=50000 \quad \tau=0.02$



$\alpha=5000 \quad \tau=2e-05$



ANHANG C. LAUFZEITEN UND NUMERISCHE EXPERIMENTE



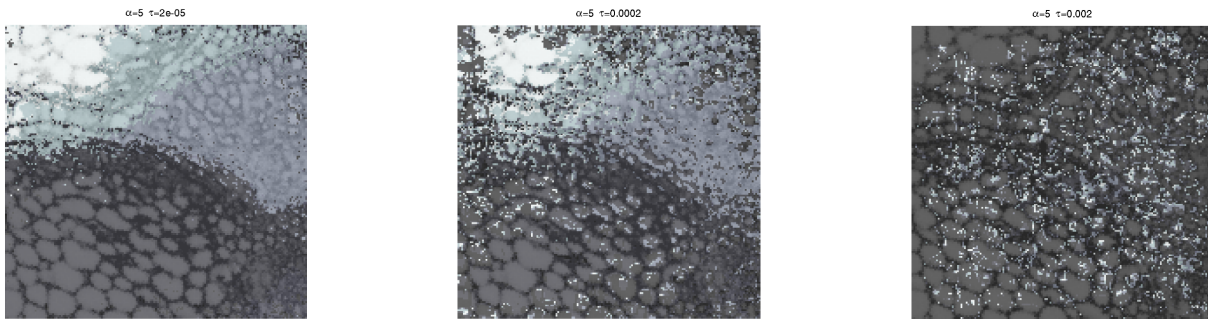
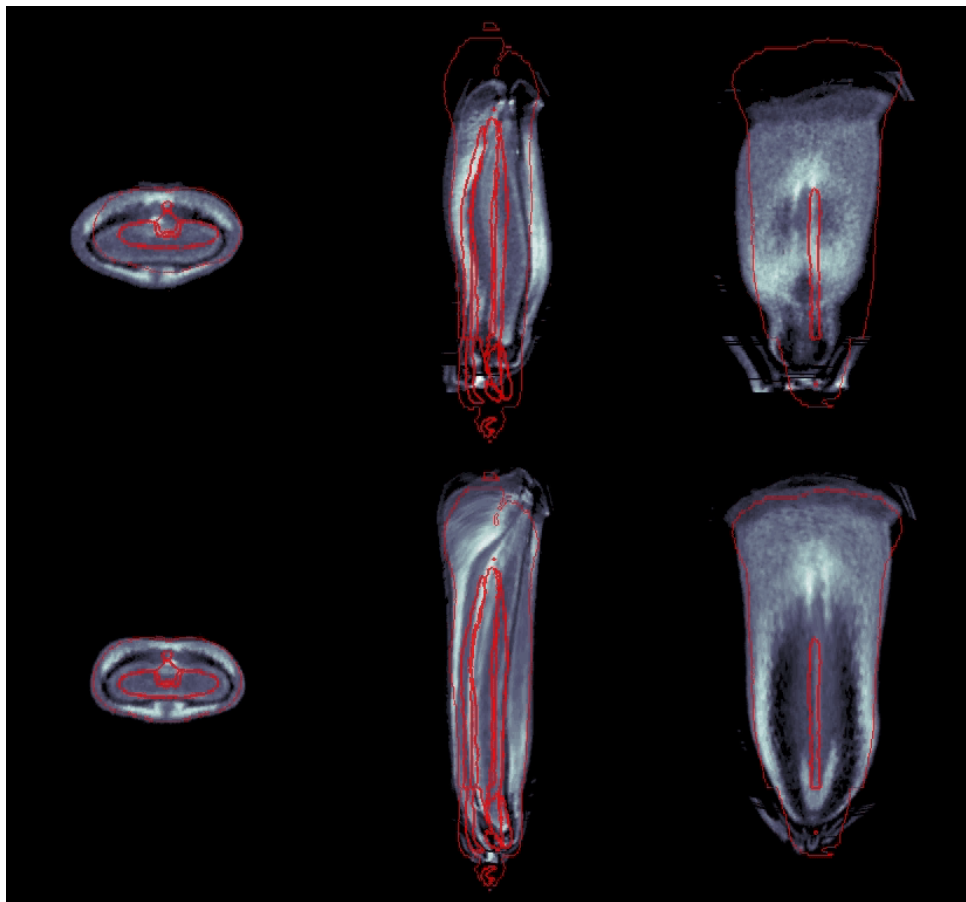


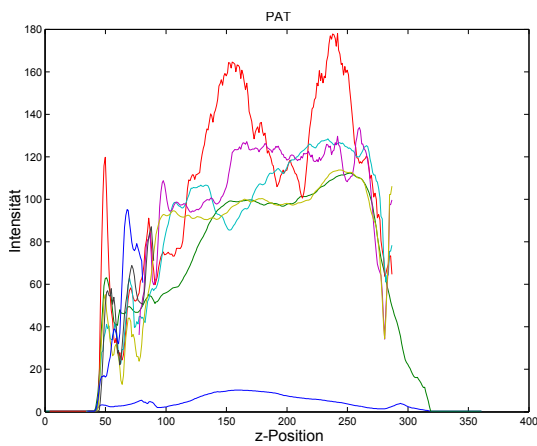
Abbildung C.3: Deformationsverhalten DIF im Detail für unterschiedliche Parameter, Ausschnitte aus zwei Schnittbildern, tatsächlichen Segmentierung und Ergebnisse.

Tabelle C.3: Eigenschaften der Deformation $\|U\|$ für unterschiedliche Parameter aus Abb. C.3.

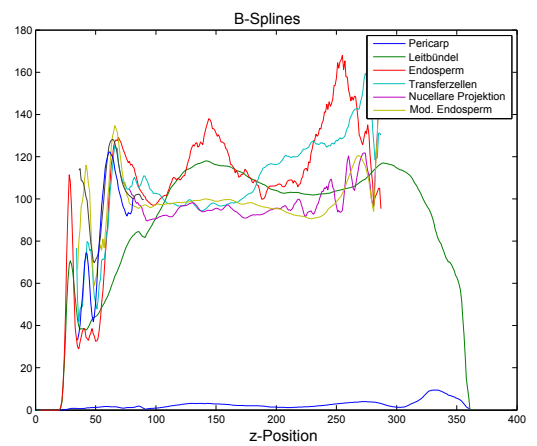
α/τ		$2.0E - 05$	0.0005	0.0002	0.0001	0.002	0.02
50000	$\mu_{\ U\ }$	0.464	1.089	1.071	0.883	1.0921	1.245
	$\sigma_{\ U\ }$	± 0.825	± 1.661	± 1.646	± 1.467	± 1.656	± 2.517
20000	$\mu_{\ U\ }$	0.637	1.435	1.398	1.141	1.382	2.19
	$\sigma_{\ U\ }$	± 1.091	± 2.103	± 2.043	± 1.856	± 2.230	± 5.131
10000	$\mu_{\ U\ }$	0.761	1.673	1.588	1.289	1.693	4.147
	$\sigma_{\ U\ }$	± 1.324	± 2.406	± 2.250	± 2.0385	± 2.399	± 7.521
5000	$\mu_{\ U\ }$	0.936	1.829	1.694	1.33	2.003	5.721
	$\sigma_{\ U\ }$	± 1.567	± 2.529	± 2.465	± 2.244	± 2.789	± 9.84
2000	$\mu_{\ U\ }$	1.18	1.695	1.582	1.452	2.009	8.258
	$\sigma_{\ U\ }$	± 1.815	± 2.704	± 2.588	± 2.409	± 3.218	± 14.466
1000	$\mu_{\ U\ }$	1.393	2.045	1.792	1.661	3.104	18.390
	$\sigma_{\ U\ }$	± 1.991	± 2.946	± 2.765	± 2.599	± 4.426	± 31.302
500	$\mu_{\ U\ }$	1.830	3.112	2.641	2.251	5.999	44.125
	$\sigma_{\ U\ }$	± 2.286	± 4.066	± 3.479	± 3.127	± 8.228	± 80.012
50	$\mu_{\ U\ }$	5.660	32.057	16.372	12.578	76.715	55.740
	$\sigma_{\ U\ }$	± 4.861	± 26.689	± 15.145	± 10.913	± 86.649	± 159.274
5	$\mu_{\ U\ }$	9.552	220.816	137.370	60.866	179.536	91.358
	$\sigma_{\ U\ }$	± 6.470	± 200.387	± 68.473	± 25.101	± 246.713	± 274.222



(a)



(b)



(c)

Abbildung C.4: NMR Registrierung mit 3-D BSplines: C.4a Integration in das Inderindividualmodell zur gewebespezifischen Auswertung, die Gewegrenzen sind rot dargestellt (PAT oben B-Splines unten). Durchschnittliche laterale Protonendichte der Gewebe für PAT C.4c und B-Spline Registrierung C.4a.

Tabelle C.4: Untersuchung der regressionsbasierten Registrierung: Vergleich mit MI für NMRi 2-D Bilder (10-fach wiederholt).

Bild/Transformation	Real	MI	Regression
T1	$[0, 0] \mu m$	$[1.56, 1.13] \mu m$ $\pm[1.55, 0.84]$	$[0.02, 0.13] \mu m$ ± 0.0
	-5°	$-4.72^\circ \pm 2.39$	$-5.02^\circ \pm 0.0$
	0	46 ± 27	29 ± 0.0
T2	$[-5, 15] \mu m$	$[-4.06, 13.34] \mu m$ $\pm[1.08, 1.69]$	$[-4.99, 14.98] \mu m$ ± 0.0
	0°	$2.77^\circ \pm 1.25$	$-0.04^\circ \pm 0.0$
	0	38 ± 13	29 ± 0.0
T3	$[-5, -15] \mu m$	$[-3.15, -14.18] \mu m$ $\pm[0.49, 2.91]$	$[-3.81, -15.34] \mu m$ ± 0.0
	-5°	$-3.23^\circ \pm 1.59$	$-5.07^\circ \pm 0.0$
	0	40 ± 21	26 ± 0.0
T4	$[0, 0] \mu m$	$[1.78, -0.27] \mu m$ $\pm[2.37, 1.51]$	$[-0.31, 0.40] \mu m$ ± 0.0
	-180°	$-176.94^\circ \pm 3.72$	$-179.68^\circ \pm 0.0$
	0	388 ± 108	19 ± 0.0
T5	$[-50, 50] \mu m$	$[-48.51, 49.65] \mu m$ $\pm[1.47, 8.39]$	$[-49.92, 49.99] \mu m$ ± 0.0
	0°	$-1.94^\circ \pm 2.04$	$0.15^\circ \pm 0.0$
	0	321 ± 137	34 ± 0.0
T6	$[-50, 50] \mu m$	$[-37.21, 37.88] \mu m$ $\pm[19.13, 24.67]$	$[-46.97, 49.59] \mu m$ ± 0.0
	-180°	$-190.82^\circ \pm 4.17$	$-179.53^\circ \pm 0.0$
	0	400 ± 138	45 ± 0.0

Literaturverzeichnis

- [ALPERT et al., 1990] ALPERT, N.M., J. F. BRADSHAW, D. KENNEDY und J. A. CORREIA (1990). *The Principal Axes Transformation - A Method for Image Registration*. The Journal of Nuclear Medicine, 31:1717–1722. (S. 38, 110)
- [ANDERSEN und MARTINEZ, 2002] ANDERSEN, T. und T. MARTINEZ (2002). *Cross Validation and MLP Architecture Selection*. Neural Networks, 1999. IJCNN'99. International Joint Conference on, 3:1614–1619. (S. 91)
- [BENTLEY, 1975] BENTLEY, J.L. (1975). *Multidimensional Binary search trees used for associative searching*. Communications of the ACM, 18(9):509–517. (S. 114)
- [BERGH et al., 2007] BERGH, J., F. EKSTEDT und M. LINDBERG (2007). *Wavelets mit Anwendungen in Signal-und Bildbearbeitung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (S. 25)
- [BESL und MCKAY, 1992] BESL, P.J. und N. MCKAY (1992). *A Method for Registration of 3-D Shapes*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 14(2):239–256. (S. 114)
- [BEYLKIN et al., 1991] BEYLKIN, G., R. COIFMAN und V. ROKHLIN (1991). *Fast wavelet transforms and numerical algorithms I*. Communications on Pure and Applied Mathematics, 44(2):141–183. (S. 27)
- [BISHOP, 1995] BISHOP, C.M. (1995). *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford University Press, USA. (S. 69, 73, 90, 91)
- [BOLLENBECK et al., 2009a] BOLLENBECK, F., S. KASPAR, H. MOCK, D. WEIER und U. SEIFFERT (2009a). *Three-Dimensional Multimodality Modelling by Integration of High-Resolution Interindividual Atlases and Functional MALDI-IMS Data*. In: *Bioinformatics and Computational Biology*, Bd. 5462/2009 d. Reihe LNBI, S. 126–138. Springer. (S. 119)
- [BOLLENBECK et al., 2009b] BOLLENBECK, F., R. PIELOT, D. WEIER, W. WESCHKE und U. SEIFFERT (2009b). *Inter-modality registration of NMRi and histological section images using neural networks regression in Gabor feature space*. In: *Computational Intelligence for Image Processing, 2009. CIIP'09. IEEE Symposium on*, S. 27–32. IEEE. (S. 119)
- [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2008] BOLLENBECK, F. und U. SEIFFERT (2008). *Fast registration-based automatic segmentation of serial section images for high-resolution 3-D plant seed modeling*.

- In: *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on*, S. 352–355. IEEE. (S. 15, 67, 70, 74, 81, 86)
- [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2009] BOLLENBECK, F. und U. SEIFFERT (2009). *Computational Intelligence in Biomedical Image Processing*. In: ABRAHAM, A.J., A.-E. HASSANIEN und V. SNASEL, Hrsg.: *Foundations of Computational Intelligence*, Bd. 5 d. Reihe *Studies in Computational Intelligence*, S. 197–222. Springer, Berlin/Heidelberg. (S. 15, 36, 82, 89)
- [BOLLENBECK und SEIFFERT, 2010] BOLLENBECK, F. und U. SEIFFERT (2010). *Joint Registration and Segmentation of Histological Volume Data by Diffusion-Based Label Adaption*. In: *Proceedings 20th International Conference on Pattern Recognition - ICPR 2010*, S. 2440–2443. IEEE. (S. 82, 93)
- [BOLLENBECK et al., 2009c] BOLLENBECK, F., D. WEIER, W. SCHOOR und U. SEIFFERT (2009c). *From Individual Intensity Voxel Data to Inter-Individual Probabilistic Atlases of Biological Objects by an Interleaved Registration-Segmentation Approach*. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Computer Vision and Theory and Applications*, Bd. 1, S. 125–129. (S. 106)
- [BORN, 1883] BORN, G. (1883). *Die Plattenmodellierungsmethode*. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 22:584–599. (S. 44)
- [BRACEWELL und KAHN, 1966] BRACEWELL, R. und P. KAHN (1966). *The Fourier transform and its applications*. *American Journal of Physics*, 34(8):712–. (S. 24)
- [BRO-NIELSEN und GRAMKOW, 1996] BRO-NIELSEN, M. und C. GRAMKOW (1996). *Fast Fluid Registration of medical images*. In: HÖHNE, KARL und R. KIKINIS, Hrsg.: *Visualization in Biomedical Computing*, Bd. 1131 d. Reihe *Lecture Notes in Computer Science*, S. 265–276. Springer Berlin / Heidelberg. 10.1007/BFb0046964. (S. 45)
- [BROIT, 1981] BROIT, C. (1981). *Optimal registration of deformed images*. Doktorarbeit, Dept. Computer and Information Science, U. of Pennsylvania. (S. 45, 83)
- [BROWN, 1992] BROWN, L.G. (1992). *A survey of image registration techniques*. *ACM Computing Surveys (CSUR)*, 24(4):325–376. (S. 45, 47)
- [BRÜSS et al., 2006a] BRÜSS, C., F. BOLLENBECK, F.-M. SCHLEIF, W. WESCHKE, T. VILLMANN und U. SEIFFERT (2006a). *Fuzzy Image Segmentation with Fuzzy Labelled Neural Gas*. In: *Proceedings of the 14. European Symposium on Artificial Neural Networks ESANN 2006*, S. 563–568. D-Side Publications. (S. 132)
- [BRÜSS et al., 2006b] BRÜSS, C., M. STRICKERT und U. SEIFFERT (2006b). *Towards Automatic Segmentation of Serial High-Resolution Images*. In: *Proceedings Workshop Bildverarbeitung für die Medizin*, S. 126–130. (S. 76)
- [BURT und ADELSON, 1983] BURT, P.J. und E. ADELSON (1983). *A multiresolution spline with application to image mosaics*. *ACM Transactions on Graphics*, 2(4):217–236. (S. 25, 26)

LITERATURVERZEICHNIS

- [CANNY, 1986] CANNY, J. (1986). *A computational approach to edge detection*. IEEE Transactions Pattern Analysis and Machine Intelligence, 8(6):679 – 714. (S. 30, 31, 46)
- [CHAN et al., 2000] CHAN, T.F., B. SANDBERG und L. VESE (2000). *Active Contours without Edges for Vector-Valued Images*. Journal of Visual Communication and Image Representation, 11(2):130–141. (S. 113)
- [CHAN und VESE, 2001] CHAN, T.F. und L. VESE (2001). *Active Contours Without Edges*. IEEE Transactions on Image Processing, 10 (2):266–277. (S. 34, 35, 95)
- [CHANG und LIN, 2001] CHANG, C.C. und C. LIN (2001). *LIBSVM: a library for support vector machines*. <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>, Stand 11/2010. (S. 75)
- [CHEN et al., 1994] CHEN, Q., M. DEFRISE und F. DECONINCK (1994). *Symmetric phase-only matched filtering of Fourier-Mellin transform for image registration and recognition*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 16:1156–1168. (S. 47)
- [COHEN et al., 1993] COHEN, A., I. DAUBECHIES, B. JAWERTH und P. VIAL (1993). *Multiresolution analysis, wavelets and fast wavelet transform on an interval*. Comptes Rendus de l'Académie des sciences. Série 1, Mathématique, 316(5):417–421. (S. 25)
- [COIFMAN und WICKERHAUSER, 1992] COIFMAN, R.R. und M. WICKERHAUSER (1992). *Entropy-based algorithms for best basis selection*. IEEE Transactions on Information Theory, 38(2):713–718. (S. 67)
- [CORTES und VAPNIK, 1995] CORTES, C. und V. VAPNIK (1995). *Support-vector networks*. Machine Learning, 20(3):273–297. (S. 74)
- [DAUBECHIES, 1988] DAUBECHIES, I. (1988). *Orthonormal bases of compactly supported wavelets*. Communications on Pure and Applied Mathematics, 41(7):909–996. (S. 25)
- [DAUBECHIES und SWELDENS, 1998] DAUBECHIES, I. und W. SWELDENS (1998). *Factoring wavelet transforms into lifting steps*. Journal of Fourier Analysis and Applications, 4(3):247–269. (S. 25)
- [DAUBECHIES, 1992] DAUBECHIES, INGRID (1992). *Ten lectures on wavelets*, Bd. 61 d. Reihe CBMS-NSF Regional Conferences series in Applied Mathematics. Society for Industrial Mathematics, Philadelphia, 3 Aufl. (S. 68, 136, 137, 138)
- [DAUGMAN, 1985] DAUGMAN, J.G. (1985). *Uncertainty relation for resolution in space, spatial frequency, and orientation optimized by two-dimensional visual cortical filters*. Journal of the Optical Society of America A, 2(7):1160–1169. (S. 66, 67)
- [DE CASTRO und MORANDI, 1987] DE CASTRO, E. und C. MORANDI (1987). *Registration of translated and rotated images using finite Fourier transforms*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 9(5):700–703. (S. 23, 26, 47)

- [DE RUMELHART und WILLIAMS, 1986] DE RUMELHART, G.E.H. und R. WILLIAMS (1986). *Learning Internal Representations by Error Propagation*, Bd. 1, Kap. Parallel distributed processing: Explorations in the microstructure of cognition, S. 318–362. MIT Press. (S. 73)
- [DERCKSEN et al., 2008] DERCKSEN, V.J., C. BRÜSS, D. STALLING, S. GUBATZ, U. SEIFFERT und H.-C. HEGE (2008). *Towards automatic generation of 3D models of biological objects based on serial sections*. In: LINSEN, L., H. HAGEN und B. HAMANN, Hrsg.: *Visualization in Medicine and Life Sciences*, S. 3–25. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (S. 44, 50, 58, 76)
- [DOUGHERTY, 1993] DOUGHERTY, E.R. (1993). *Mathematical Morphology in Image Processing*. CRC Press. (S. 32)
- [DUCHENE und LECLERCQ, 1988] DUCHENE, J. und S. LECLERCQ (1988). *An optimal transformation for discriminant and principal component analysis*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 10(6):978–983. (S. 70)
- [DUDA et al., 2001] DUDA, R.O., P. HART und D. STORK (2001). *Pattern Classification*. Wiley-Interscience; 2. Aufl. (S. 76)
- [EMMERT-BUCK et al., 1996] EMMERT-BUCK, M.R., R. BONNER, P. SMITH, R. CHUAQUI, Z. ZHUANG, S. GOLDSTEIN, R. WEISS und L. LIOTTA (1996). *Laser capture microdissection*. Science, 274(5289):998. (S. 2)
- [FIALA, 2005] FIALA, JC (2005). *Reconstruct: a free editor for serial section microscopy*. Journal of Microscopy, 218(1):52–61. (S. 44)
- [FISCHER und MODERSITZKI, 2002] FISCHER, B. und J. MODERSITZKI (2002). *Fast diffusion registration*. Inverse problems, Image Analysis, and Medical Imaging, 3:117–127. (S. 45, 84, 85)
- [FISCHLER und BOLLES, 1981] FISCHLER, M.A. und R. BOLLES (1981). *Random sample consensus: A paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography*. Communications of the ACM, 24(6):381–395. (S. 46)
- [FISHER et al., 1936] FISHER, R.A. et al. (1936). *The use of multiple measurements in taxonomic problems*. Annals of Eugenics, 7:179–188. (S. 70)
- [FLUSSER und SUK, 1993] FLUSSER, J. und T. SUK (1993). *Pattern recognition by affine moment invariants*. Pattern Recognition, 26(1):167–174. (S. 37)
- [FRIEDMAN, 1991] FRIEDMAN, J.H. (1991). *Multivariate adaptive regression splines*. The Annals of Statistics, 19(1):1–67. (S. 68)
- [FRIGO und JOHNSON, 2005] FRIGO, M. und S. JOHNSON (2005). *The design and implementation of FFTW 3*. Proceedings of the IEEE, 93(2):216–231. (S. 27)
- [GABOR, 1946] GABOR, D. (1946). *Theory of communication. Part 1: The analysis of information*. Electrical Engineers-Part III: Radio and Communication Engineering, Journal of the Institution of, 93(26):429–441. (S. 66)

LITERATURVERZEICHNIS

- [GARLAND, 2009] GARLAND, M. (2009). *QSlim Simplification Software*. <http://www.cs.cmu.edu/afs/cs.cmu.edu/Web/People/garland/quadratics/qlsim.html>, Stand 8/2010. (S. 109)
- [GARLAND und HECKBERT, 1997] GARLAND, MICHAEL und P. S. HECKBERT (1997). *Surface simplification using quadric error metrics*. In: *Proceedings of the 24th annual Conf. on Computer Graphics and interactive Techniques, SIGGRAPH '97*, S. 209–216. ACM Press/Addison-Wesley Publishing Co. (S. 108)
- [GIBLIN und WEISS, 1987] GIBLIN, P. J. und R. S. WEISS (1987). *Reconstructions of surfaces from profiles*. In: *Proceedings 1st International Conference on Computer Vision*, S. 136–144. Computer Society Press of the IEEE. (S. 114)
- [GLIDEWELL, 2006] GLIDEWELL, S. M. (2006). *NMR imaging of developing barley grains*. *Journal of Cereal Science*, 43:70–78. (S. 6)
- [GOLUB und VAN LOAN, 1983] GOLUB, G.H. und C. VAN LOAN (1983). *Matrix computations*. Johns Hopkins Univ. Press. (S. 39, 69)
- [GOMES und FAUGERAS, 2000] GOMES, J. und O. FAUGERAS (2000). *Reconciling distance functions and level sets*. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 11(2):209–223. (S. 35)
- [GONZALEZ und WOODS, 2007] GONZALEZ, R.C. und R. WOODS (2007). *Digital Image Processing*. Prentice-Hall, Upper Sadle River, New Jersey. (S. 20, 48, 64, 67)
- [GRACIAS et al., 2009] GRACIAS, N., M. MAHOOR, S. NEGAHDARIPOUR und A. GLEASON (2009). *Fast image blending using watersheds and graph cuts*. *Image and Vision Computing*, 27(5):597–607. (S. 25)
- [GREEN und SWETS, 1966] GREEN, D.M. und J. SWETS (1966). *Signal detection theory and psychophysics*. Wiley New York. (S. 76)
- [GRIGORESCU et al., 2002] GRIGORESCU, S.E., N. PETKOV und P. KRUIZINGA (2002). *Comparison of texture features based on Gabor filters*. *IEEE Transactions on Image processing*, 11(10):1160–1167. (S. 67)
- [GRIMSON, 1982] GRIMSON, WEL (1982). *A computational theory of visual surface interpolation*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 298(1092):395–427. (S. 82)
- [GRÜNWARD et al., 2005] GRÜNWARD, P.D., I. MYUNG und M. PITT (2005). *Advances in Minimum Description Length: Theory and Applications*. The MIT Press. (S. 91)
- [GUBATZ et al., 2007] GUBATZ, S., V. J. DERCKSEN, C. BRÜSS, W. WESCHKE und U. WOBUS (2007). *Analysis of barley (*Hordeum vulgare*) grain development using three-dimensional digital models*. *The Plant Journal*, 52(4):779–790. (S. 3)
- [GUIMOND et al., 2000] GUIMOND, A., J. MEUNIER und J. THIRION (2000). *Average brain models: A convergence study*. *Computer Vision and Image Understanding*, 77(2):192–210. (S. 105)

- [HAJNAL et al., 2001] HAJNAL, J.V., D. HAWKES und D. HILL (2001). *Medical image registration*. In: *The Biomedical Engineering Series*. CRC Press. (S. 48)
- [HARALICK, 1979] HARALICK, R.M. (1979). *Statistical and structural approaches to texture*. Proceedings of the IEEE, 67(5):786–804. (S. 65)
- [HARRIS und STEPHENS, 1988] HARRIS, C. und M. STEPHENS (1988). *A combined corner and edge detector*. In: *Proceedings of the 4th Alvey Vision Conference*, Bd. 15, S. 147–151. Manchester, UK. (S. 46)
- [HORN und SCHUNCK, 1981] HORN, B.K.P. und B. SCHUNCK (1981). *Determining optical flow*. Artificial Intelligence, 17(1-3):185–203. (S. 84)
- [HORNAK, 2010] HORNAK, JOSEPH (2010). *The Basics of MRI*, <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/index.html>. (S. 124)
- [HSU und WU, 1996] HSU, C.T. und J. WU (1996). *Multiresolution mosaic*. IEEE Transactions on Consumer Electronics, 42(4):981–990. (S. 26)
- [HU, 1962] HU, M.K. (1962). *Visual pattern recognition by moment invariants*. IRE Transactions on Information Theory, 8(2):179–187. (S. 37)
- [HUGHES, 1968] HUGHES, G. (1968). *On the mean accuracy of statistical pattern recognizers*. IEEE Transactions on Information Theory, 14(1):55–63. (S. 68)
- [IBANEZ et al., 2005] IBANEZ, L., W. SCHROEDER, L. NG und J. CATES (2005). *The ITK Software Guide*. Kitware, Inc., <http://www.itk.org/ItkSoftwareGuide.pdf>, Second Aufl. (S. 122)
- [JÄHNE, 2005] JÄHNE, B. (2005). *Digitale Bildverarbeitung*. Springer. (S. 18, 30)
- [JAIN und FARROKHANIA, 1991] JAIN, A.K. und F. FARROKHANIA (1991). *Unsupervised texture segmentation using Gabor filters*. Pattern Recognition, 24(12):1167–1186. (S. 67)
- [JU et al., 2006] JU, T., J. WARREN, J. CARSON, M. BELLO, I. KAKADIARIS, W. CHIU, C. THALLER und G. EICHELE (2006). *3D volume reconstruction of a mouse brain from histological sections using warp filtering*. Journal of Neuroscience Methods, 156(1-2):84–100. (S. 50)
- [KASPAR et al., 2010] KASPAR, S., D. WEIER, W. WESCHKE, H. MOCK und A. MATROS (2010). *Protein analysis of laser capture micro-dissected tissues revealed cell-type specific biological functions in developing barley grains*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, S. 1–11. (S. 2)
- [KASS et al., 1988] KASS, M., A. WITKIN und D. TERZOPOULOS (1988). *Snakes: Active contour models*. International Journal of Computer Vision, 1(4):321–331. (S. 33)
- [KOENDERINK, 1984] KOENDERINK, J.J. (1984). *The structure of images*. Biological Cybernetics, 50(5):363–370. (S. 30)
- [KRAMME, 2002] KRAMME, R. (2002). *Medizintechnik: Verfahren, Systeme, Informationsverarbeitung*. Springer. (S. 6)

LITERATURVERZEICHNIS

- [KUGLIN und HINES, 1975] KUGLIN, CD und D. HINES (1975). *The phase correlation image alignment method*. In: *Proceedings of the 1975 International Conference on Cybernetics and Society*, Bd. 4, S. 163–165. (S. 23)
- [KURKOVA, 1992] KURKOVA, V. (1992). *Kolmogorov's theorem and multilayer neural networks*. *Neural Networks*, 5(3):501–506. (S. 124)
- [LAGARIAS et al., 1999] LAGARIAS, J.C., J. REEDS, M. WRIGHT und P. WRIGHT (1999). *Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions*. *SIAM Journal on Optimization*, 9(1):112–147. (S. 52)
- [LEE et al., 2006] LEE, K., J. AVONDO, H. MORRISON, L. BLOT, M. STARK, J. SHARPE, A. BANGHAM und E. COEN (2006). *Visualizing plant development and gene expression in three dimensions using optical projection tomography*. *The Plant Cell Online*, 18(9):2145–2156. (S. 6)
- [LI et al., 2005] LI, CHNUMING, C. XU, C. GUI und M. D. FOX (2005). *Level Set Evolution Without Re-initialization: A New Variational Formulation*. In: *Proceedings of the 2005 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05)*. (S. 35)
- [LINDBERG, 1990] LINDBERG, T. (1990). *Scale-space for discrete signals*. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. (S. 30, 54)
- [LOEVE, 1978] LOEVE, M. (1978). *Probability Theory, Vol. II*, Bd. 46. Springer-Verlag. (S. 69)
- [LORENSEN und CLINE, 1987] LORENSEN, W. E. und H. E. CLINE (1987). *Marching cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm*. In: *SIGGRAPH '87: Proceedings of the 14th annual conference on Computer graphics and interactive techniques*, S. 163–169. ACM Press. (S. 106)
- [LOWE, 1999] LOWE, D.G. (1999). *Object recognition from local scale-invariant features*. In: *Proceedings of the 1999 International Conference on Computer Vision ICCV*, Bd. 2, S. 1150–1157. IEEE. (S. 31, 46)
- [LÜKE, 1999] LÜKE, H.D. (1999). *The origins of the sampling theorem*. *IEEE Communications Magazine*, 37(4):106–108. (S. 135)
- [MAES et al., 1999] MAES, F., D. VANDERMEULEN und P. SUETENS (1999). *Comparative evaluation of multiresolution optimization strategies for multimodality image registration by maximization of mutual information*. *Medical Image Analysis*, 3(4):373–386. (S. 122)
- [MARQUARDT, 1963] MARQUARDT, D.W. (1963). *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, 11(2):431–441. (S. 73)
- [MARR und HILDRETH, 1980] MARR, D. und E. HILDRETH (1980). *Theory of edge detection*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 207(1167):187–217. (S. 30)

- [MASCHINO et al., 2006] MASCHINO, EMERIC, Y. MAURIN und P. ANDREY (2006). *Joint registration and averaging of multiple 3D anatomical surface models*. Computer Vision and Image Understanding, 101(1):16–30. (S. 105)
- [MATTES et al., 2001] MATTES, DAVID, D. R. HAYNOR, H. VESSELLE, T. K. LEWELLYN und W. EUBANK (2001). *Nonrigid multimodality image registration*. In: SONKA, MILAN und K. M. HANSON, Hrsg.: *Proceedings SPIE*, Bd. 4322, S. 1609–1620. SPIE. (S. 48)
- [MAURER und FITZPATRICK, 1993] MAURER, C.R. und J. FITZPATRICK (1993). *A review of medical image registration*. Interactive Image-guided Neurosurgery, S. 17–44. (S. 38)
- [MEYER, 1992] MEYER, Y. (1992). *Wavelets and Operators*. Cambridge University Press. (S. 25)
- [MMI, 2008] MMI, MMI GMBH MOLECULAR MACHINES & INDUSTRIES 8152 GLATTBRUGG (CH) (2008). *US Pat. 12256341: Method and Device for Three Dimensional Microdissection*. (S. 2, 4)
- [MMI, 2006] MMI, MOLECULAR MACHINES & INDUSTRIES AG 8152 GLATTBRUGG (CH) (2006). *Verfahren und Vorrichtung zum Schneiden und Sammeln von Dissektaten, EP 1887340A1*. (S. 2)
- [MODERSITZKI, 2004] MODERSITZKI, J. (2004). *Numerical Methods for Image Registration*. In: GOLUB, G.H., C. SCHWAB und E. SÜLI, Hrsg.: *Numerical Mathematics and Scientific Computation*. Oxford University Press. (S. 46, 83)
- [NARENDRA und FUKUNAGA, 2006] NARENDRA, PM und K. FUKUNAGA (2006). *A branch and bound algorithm for feature subset selection*. IEEE Transactions on Computers, 100(9):917–922. (S. 68)
- [NELDER und MEAD, 1965] NELDER, J.A. und R. MEAD (1965). *A simplex method for function minimization*. The Computer Journal, 7(4):308–313. (S. 52, 95)
- [OSHER und SETHIAN, 1988] OSHER, S. und J. A. SETHIAN (1988). *Fronts propagating with curvature-dependent speed: Algorithms based on Hamilton-Jacobi Formulation*. Journal of Computational Physics, 79:12–49. (S. 33)
- [OURSELIN et al., 2001] OURSELIN, S., A. ROCHE, G. SUBSOL, X. PENNEC und N. AYACHE (2001). *Reconstructing a 3D structure from serial histological sections*. Image and Vision Computing, 19(1-2):25–31. (S. 44)
- [PAPOULIS und PILLAI, 2002] PAPOULIS, A. und S. PILLAI (2002). *Probability, Random Variables, and Stochastic Processes*. McGraw-Hill Companies. (S. 38)
- [PEARSON, 1901] PEARSON, K. (1901). *LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space*. Philosophical Magazine Series 6, 2(11):559–572. (S. 69)
- [PLATT, 1998] PLATT, J. (1998). *Sequential minimal optimization: A fast algorithm for training support vector machines*. Advances in Kernel MethodsSupport Vector Learning, 208:1–21. (S. 75)

LITERATURVERZEICHNIS

- [PLUIM et al., 2003] PLUIM, J.P.W., J. MAINTZ und M. VIERGEVER (2003). *Mutual-information-based registration of medical images: a survey*. IEEE Transactions on Medical Imaging, 22(8):986–1004. (S. 122)
- [POHL et al., 2005] POHL, K.M., J. FISHER, J. LEVITT, M. SHENTON, R. KIKINIS, W. GRIMSON und W. WELLS (2005). *A unifying approach to registration, segmentation, and intensity correction*. Medical Image Computation and Computer-Assisted Intervention–MICCAI 2005, S. 310–318. (S. 82)
- [POLAK, 1971] POLAK, E. (1971). *Computational Methods in Optimization*. Academic Press, New York. (S. 52)
- [POYNTON, 2003] POYNTON, C.A. (2003). *Digital video and HDTV: Algorithms and Interfaces*. Morgan Kaufmann. (S. 18)
- [PRESS et al., 2007] PRESS, W.H., B. FLANNERY, S. TEUKOLSKY, W. VETTERLING et al. (2007). *Numerical Recipes*. Cambridge University Press. (S. 52, 54, 57, 85, 114)
- [PREWITT, 1970] PREWITT, J.M.S. (1970). *Object enhancement and extraction*. Picture Processing and Psychopictorics, S. 75–149. (S. 30)
- [RADCHUK et al., 2009] RADCHUK, V.V., L. BORISJUK, N. SREENIVASULU, K. MERX, H. MOCK, H. ROLLETSCHEK, U. WOBUS und W. WESCHKE (2009). *Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain*. Plant physiology, 150(1):190–204. (S. 7)
- [RAMSHAW und CENTER, 1987] RAMSHAW, L. und D. E. C. S. R. CENTER (1987). *Blossoming: A connect-the-Dots Approach to Splines*. Digital Systems Research Center. (S. 106)
- [ROBERTS, 1965] ROBERTS, L.G. (1965). *Machine perception of three-dimensional solids, Optical and Electro-optical Information Processing*. Doktorarbeit, MIT. (S. 30)
- [ROHR, 2001] ROHR, K. (2001). *Landmark-Based Image Analysis: Using Geometric and Intensity Models*. Kluwer Academic Publishers. (S. 47)
- [ROSENBLATT, 1958] ROSENBLATT, F. (1958). *The perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain*. Psychological review, 65(6):386–408. (S. 72)
- [ROSENBLATT, 1962] ROSENBLATT, F. (1962). *Principles of neurodynamics: Perceptrons and the theory of brain mechanisms*, Bd. 115. Spartan books Washington, DC. (S. 72)
- [ROSTEN und DRUMMOND, 2006] ROSTEN, E. und T. DRUMMOND (2006). *Machine learning for high-speed corner detection*. International Conference on Computer Vision - ECCV 2006, S. 430–443. (S. 46)
- [ROWLAND, 2007] ROWLAND, R.S. (2007). *Fast Registration of Medical Imaging Data Using Optimised Radial Basis Functions*. Doktorarbeit, School of Computing Sciences, University of East Anglia. (S. 94)

- [RUECKERT et al., 1999] RUECKERT, D., L. SONODA, C. HAYES, D. HILL, M. LEACH und D. HAWKES (1999). *Nonrigid Registration Using Free-Form Deformations: Application to Breast MR Images*. IEEE Transactions on Medical Imaging, 18(8):712–721. (S. 82)
- [RUSINKIEWICZ und LEVOY, 2001] RUSINKIEWICZ, S. und M. LEVOY (2001). *Efficient variants of the ICP algorithm*. In: *3rd International Conference on 3-D Digital Imaging and Modeling*, S. 145–152. Published by the IEEE Computer Society. (S. 114)
- [SCHMITT et al., 2006] SCHMITT, O., J. MODERSITZKI, S. HELDMANN, S. WIRTZ und B. FISCHER (2006). *Image Registration of Sectioned Brains*. International Journal of Computer Vision, 73(1):5–39. (S. 44)
- [SCHÖLLKOPF und SMOLA, 2001] SCHÖLLKOPF, B. und A. SMOLA (2001). *Learning with Kernels: Support Vector Machines, Regularization, Optimization, and Beyond*. MIT Press, Cambridge, MA, USA. (S. 75)
- [SCHORMANN et al., 1997] SCHORMANN, T., A. DARBINGHAUS und Z. A. (1997). *Extension of the principle axes theory for the determination of affine transformations*. In: PAULUS, E. und F. M. WAHL, Hrsg.: *Proceedings of the 19. DAGM-Symposium*, S. 384–391. Springer. (S. 40)
- [SCHORMANN und ZILLES, 1997] SCHORMANN, T. und K. ZILLES (1997). *Limitations of the principal-axes theory*. IEEE Transactions on Medical Imaging, 16(6):942–947. (S. 40)
- [SEIFFERT und BOLLENBECK, 2008] SEIFFERT, U. und F. BOLLENBECK (2008). *Fuzzy image segmentation by potential fields*. In: *Fuzzy Systems, 2008. FUZZ-IEEE 2008. (IEEE World Congress on Computational Intelligence)*. IEEE International Conference on, S. 1118–1123. IEEE. (S. 132)
- [SOILLE, 1999] SOILLE, P (1999). *Morphological Image Analysis: Principles and Applications*. Springer-Verlag. (S. 32)
- [SREENIVASULU et al., 2010] SREENIVASULU, N., L. BORISJUK, B. JUNKER, H. MOCK, H. ROLLETSCHEK, U. SEIFFERT, W. WESCHKE und U. WOBUS (2010). *Barley grain development toward an integrative view..* International Review of Cell and Molecular Biology, 281:49–89. (S. 3)
- [STARK et al., 2007] STARK, M., B. MANZ, A. EHLERS, M. KUPPERS, I. RIEMANN, F. VOLKE, U. SIEBERT, W. WESCHKE und K. KONIG (2007). *Multiparametric high-resolution imaging of barley embryos by multiphoton microscopy and magnetic resonance micro-imaging*. Microscopy Research and Techniques, 70(5):426–432. (S. 125)
- [STERN, 1996] STERN, H.S. (1996). *Neural Networks in Applied Statistics*. Technometrics, 38:205–214. (S. 124)
- [STRICKER und ORENGO, 1995] STRICKER, M. und M. ORENGO (1995). *Similarity of Color Images*. Proceedings SPIE, 2420:381–392. (S. 17)
- [STUPPY et al., 2003] STUPPY, W.H., J. MAISANO, M. COLBERT, P. RUDALL und T. ROWE (2003). *Three-dimensional analysis of plant structure using high-resolution X-ray computed tomography*. Tr. in Plant Science, 8(1):2–6. (S. 6)

LITERATURVERZEICHNIS

- [SU et al., 2004] SU, M.S., W. HWANG und K. CHENG (2004). *Analysis on multiresolution mosaic images*. IEEE Trans. on Image Processing, 13(7):952–959. (S. 26)
- [SURI et al., 2002] SURI, J.S., S. SETAREHDAN und S. SINGH (2002). *Advanced algorithmic approaches to medical image segmentation: state-of-the-art applications in cardiology, neurology, mammo-graphy and pathology*. Springer Verlag. (S. 98)
- [TEAGUE, 1980] TEAGUE, M.R. (1980). *Image analysis via the general theory of moments*. J. Optical Society Am., 70:920–930. (S. 37)
- [TEH und CHIN, 1988] TEH, C.H. und R. CHIN (1988). *On image analysis by the methods of moments*. IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 10(4):496–513. (S. 37)
- [THIEL et al., 2010] THIEL, J., D. WEIER und D. WESCHKE (2010). *Laser capture microdissection of developing barley seeds and cDNA array analysis of selected tissues*. In: MURRAY, G. I., Hrsg.: *Laser capture microdissection: methods and applications*. Springer New York, 2. Aufl. (S. 2)
- [TIBSHIRANI, 1996] TIBSHIRANI, R. (1996). *A comparison of some error estimates for neural network models*. Neural Computation, 8(1):152–163. (S. 91)
- [VALENSI, 1958] VALENSI, G. (1958). *Color Television System with Coding, US 2982811*. (S. 18)
- [VAPNIK und CHERVONENKIS, 1974] VAPNIK, V. und A. CHERVONENKIS (1974). *Theory of pattern recognition*. Nauka, Moscow. (S. 74)
- [VEMURI et al., 2003] VEMURI, BC, J. YE, Y. CHEN und C. LEONARD (2003). *Image registration via level-set motion: Applications to atlas-based segmentation*. Medical Image Analysis, 7(1):1–20. (S. 82)
- [VINCENT, 1993] VINCENT, L. (1993). *Morphological Grayscale Reconstruction in Image Analysis: Applications and Efficient Algorithms*. IEEE Trans. on Image Processing, 2(2):176–201. (S. 32)
- [VIOLA und WELLS III, 1997] VIOLA, P. und W. WELLS III (1997). *Alignment by Maximization of Mutual Information*. Intl. J. of Computer Vision, 24(2):137–154. (S. 48, 121)
- [WANG et al., 2007] WANG, H., S. YAN, D. XU, X. TANG und T. HUANG (2007). *Trace ratio vs. ratio trace for dimensionality reduction*. In: *IEEE Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition, 2007. CVPR'07*, S. 1–8. IEEE. (S. 70)
- [WEBER et al., 2010] WEBER, H., N. SREENIVASULU und W. WESCHKE (2010). *Molecular Physiology of Seed Maturation and Seed Storage Protein Biosynthesis*. In: PUA, E.C. und M. DAVEY, Hrsg.: *Developmental Biology - Biotechnological Perspectives: Volume 2*. Springer, Berlin. (S. 7)
- [WEICKERT, 1998] WEICKERT, J. (1998). *On discontinuity-preserving optic flow*. In: *In Proceedings Computer Vision and Mobile Robotics Workshop, CVMR '98*, S. 115–122. (S. 84, 85)
- [WEICKERT und HAGEN, 2006] WEICKERT, J. und H. HAGEN (2006). *Visualization and processing of tensor fields*. Springer Berlin. (S. 17)

- [WEST et al., 2001] WEST, J.B., J. FITZPATRICK, S. TOMS, C. MAURER JR und R. MACIUNAS (2001). *Fiducial point placement and the accuracy of point-based, rigid body registration*. Neurosurgery, 48(4):810–817. (S. 46)
- [WESTON und WATKINS, 1998] WESTON, J. und C. WATKINS (1998). *Multi-class support vector machines*. Technical Report CSD-TR-98-04, University of London, Department of Computer Science, Egham, Surrey, TW200EX, England. (S. 74)
- [WHITE, 1990] WHITE, H. (1990). *Connectionist nonparametric regression: multilayer feedforward networks can learn arbitrary mappings*. Neural Networks, 3(5):535–549. (S. 124)
- [WITKIN et al., 1987] WITKIN, A., D. TERZOPOULOS und M. KASS (1987). *Signal matching through scale space*. Int. J. of Computer Vision, 1(2):133–144. (S. 33)
- [WITKIN, 1983] WITKIN, A.P. (1983). *Scale-space filtering*. In: *Proceedings 8th International Joint Conference on Artificial Intelligence - IJCAI*, S. 1019–1022. Kaufmann. (S. 30)
- [WOLF, 1983] WOLF, P.R. (1983). *Elements of Photogrammetry*. McGraw-Hill. (S. 22)
- [WONG, 2001] WONG, K.-Y. K. (2001). *Structure and Motion From Silhouettes*. Doktorarbeit, University of Cambridge. (S. 114)
- [WONGSRITONG et al., 1998] WONGSRITONG, K., K. KITTAYARUASIRIWAT, F. CHEEVASUVIT, K. DEJHAN und A. SOMBOONKAEW (1998). *Contrast enhancement using multipeak histogram equalization with brightness preserving*. In: *Circuits and Systems, 1998. IEEE APCCAS 1998. The 1998 IEEE Asia-Pacific Conference on*, S. 455–458. (S. 21)
- [WÖRZ und ROHR, 2007] WÖRZ, S. und K. ROHR (2007). *Hybrid Spline-Based Elastic Image Registration Using Analytic Solutions of the Navier Equation*. In: *Proceedings Bildverarbeitung für die Medizin*, S. 151–155. Springer. (S. 47)
- [ZITOVÁ und FLUSSER, 2003] ZITOVÁ, B. und J. FLUSSER (2003). *Image registration methods: a survey*. Image and Vision Computing, 21(11):977–1000. (S. 23, 45, 46, 48, 83)

Lebenslauf

persönliche Angaben

Name Felix Bollenbeck
Geboren 11.02.1980 in Bonn
Familienstand ledig

Schulbildung

1992-1999 Europaschule Bornheim (Rheinld.)
Abitur 1999

Hochschulbildung

2000-2006 Studium der Bioinformatik an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2006 Diplomarbeit *Wahrscheinlichkeitsbasierte Bildsegmentierung*;
Abschluss als Diplom-Bioinformatiker

Berufstätigkeit

2006-2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Leibniz Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Gatersleben, Arbeitsgruppe Mustererkennung.
2008-heute wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Fraunhofer Institut für Fabrikbetrieb und -automatisierung
Magdeburg, Abteilung Biosystems Engineering

Magdeburg, 28. Juli 2011,

Felix Bollenbeck