

Department of Mathematics and Computer Science

Bioinformatics

Medical image analysis of the retina and evaluation of arterial vessel elasticity

Master Thesis by Viktor Dinkel

Gutachter:  
Prof. Dr. Piro

Prof. Dr. Britta J. Eickholt

22. Mai 2015

# Abstract

Index

[Abstract 2](#_Toc496468209)

[1. Introduction 5](#_Toc496468210)

[1.1 Detection of neurodegenerative diseases 5](#_Toc496468211)

[1.2 Currently no early detection CSIRO and retinal image analysis 5](#_Toc496468212)

[1.3 Motivation 5](#_Toc496468213)

[2. Methods 5](#_Toc496468214)

[2.1 Quality preprocessing 6](#_Toc496468215)

[2.2 Stabilize movement of the eye 7](#_Toc496468216)

[2.3 Single Image Width Measurement 11](#_Toc496468217)

[2.3.1 Dimensions 11](#_Toc496468218)

[2.3.2 Optic disc detection 11](#_Toc496468219)

[2.3.3 Vessel segmentation 12](#_Toc496468220)

[2.3.4 Skeletonization 14](#_Toc496468221)

[2.3.5 Definition of Vessel Width 15](#_Toc496468222)

[2.4 Adaption der Sequenzeigenheiten 16](#_Toc496468223)

[2.4.1 Modularisierung der Grundlage 16](#_Toc496468224)

[2.4.2 Vereinheitlichung der optischen Disk 17](#_Toc496468225)

[2.4.3 Vereinheitlichung der Gefäßmaske 17](#_Toc496468226)

[2.5 Extracting parameters from a Sequence of images 18](#_Toc496468227)

[2.6 Post processing of parameters 19](#_Toc496468228)

[4. Results 19](#_Toc496468229)

Abbildungs- Tabellenverzeichnis

# Introduction

## Detection of neurodegenerative diseases

Late onset Alzheimers Disease: PET & MRT

## Currently no early detection CSIRO and retinal image analysis

Vessel properties (width), correlation with diseases

Previously applied only on single images, expand into sequence

## Motivation

Develop new diagnosis method

Research vessel properties, measure vessel elasticity in IR sequence

# Methods

For the first time ever, a procedure had to be developed at the eHealth research center of the CSIRO in order to collect and evaluate information on the back of the eye, which was intended to be applied to a sequence of retinal images. The aim was to investigate whether the change in vessel width caused by the pulse was optically measurable. The basis for measuring the width of vessels in a single image was developed by Phd. Shaung Yu, so that this solution could be integrated.

The medium that is evaluated is a monochromatic infrared image of the human retina with a resolution of 1600x1200 pixels. Das zu messende Bild der Kamera wurde nach der Aufnahme auf eine Kugel gelegt, so dass die Konkave Fläche auf eine Ebene projiziert wird und somit Veränderungen durch die Perspektive bereits bei der Aufnahme korrigiert wurden.

To process a sequence of such images, a pipeline with three main steps and many sub steps has been developed. It is used to extract many different parameters from the image sequence, one of them being the change in vessel thickness over time. In addition, other pipeline-relevant methods are also implemented, which are mandatory for their regular flow as well as very helpful for the evaluation and verification of the intermediate step results.

|  |
| --- |
|  |
| Figure X Schematic representation of he pipeline. |
| (A) Grüner Kanal (MAP2) einer Originalaufnahme. (B) Ergebnis eines automatisch ermittelten Thresholds (40) mit dem IsoData - Algorithmus. Dendrit ist klar vom hintergrund hervorgehoben und scharf abgegrenzt. (C) Manuell gesetzter MAP2-Threshold von 10. Dendriten sind nicht mehr klar abgegrenzt und im Hintergrund ist eine fehlerhafte Schattierung deutlich erkennbar. |

In the following paragraphs, the most important methods of the pipeline for evaluating and analyzing vessel width are explained.

## Pipeline Specifications

Die Pipeline wurde primär mit Python Version 2.7 programmiert. Des Weiteren sind, neben einigen kleineren Packeten, diese Module zur Entwicklung erforderlich:

OpenCV zur allgemeinen Bildverarbeitung und -analyse

NumPy und SciPy als allgemeine Hilfsmittel für mathematische Operationen wie die Bildung von Mittelwerten und für fortgeschrittenere Matrix- und Array Datentypen

Matplotlib für die Visualisierung von Bildern und Zahlenreihen in Form von Plots

Mahotas und davon speziell die Methode hitmiss zum Abgleichen von Mustern während dem Erkennen von Verzweigungen und Endpunkten von Gefäßen.

Pymorph für die Dilation von Mustern bzw. Gefäßen

Peakutils ist ein Modul zum Erkennen von Spitzen innerhalb von Messreihen.

Mysql-python als Schnittstelle zwischen einer MySQL-Datenbank und der Python Umgebung. Hierüber werden die Queries an die Datenbank geschickt und gegebenenfalls die Ergebnisse empfangen.

## Quality preprocessing

The individual frames of the image series sometimes have strong differences in quality. These quality differences range from small contaminants or particles that hover over a certain area during the series and cover some vessels, up to large distortions of the entire image through rapid movement and blinking. Such frames must be identified and excluded beforehand so that the analysis can be applied to a series of images that are as undistorted and uncovered as possible. Therefore, it is very difficult to develop an automated method because of the different nature of the distortions that can occur. The estimation of when a frame of a series should be excluded must, therefore, be done manually and at one's own judgment. To do this, several frames are taken into account before and after a blinking or abrupt movement of the eye and identified where distortion such as stretching of the whole or part of the image can be seen. This step is of highest priority, as distortion changes the vessel width enormously and can ultimately lead to completely wrong measurement values. Removing individual frames from a series has no effect on the following pipeline except that fewer records are available and everything related to it. This could possibly cause inaccurate readings, as important events such as the systolic peak of a vessel could be overlooked. However, given the consequences of distortion and the fact that affected frames cannot be analyzed anyway, the influence of remote frames is neglected

|  |
| --- |
|  |
| Figure X Schematic representation of he pipeline. |
| (A) Grüner Kanal (MAP2) einer Originalaufnahme. (B) Ergebnis eines automatisch ermittelten Thresholds (40) mit dem IsoData - Algorithmus. Dendrit ist klar vom hintergrund hervorgehoben und scharf abgegrenzt. (C) Manuell gesetzter MAP2-Threshold von 10. Dendriten sind nicht mehr klar abgegrenzt und im Hintergrund ist eine fehlerhafte Schattierung deutlich erkennbar. |

.

## Stabilize movement of the eye

If the quality of the image series is as undistorted as possible, it must be stabilized, because for an exact measurement of the parameters the vessels should be at a fixed position throughout the sequence. The reference is the optical disc, which can be easily recognized as the origin of the retinal vessels and by the dark circle. There is always a slight movement of the retina in every series of pictures. However, a wide range of movements is usually observed, be it simple movements such as the slow, continuous drifting of the retina from one point to another, or complicated movement patterns such as sudden twitching of the eye from one point to another in different directions. The latter can also result from the removal of individual frames from the quality selection, so that due to missing frames the retina suddenly appears at a different location in the image. Any kind of movement can interfere with the measurement and the resulting measurement values. Therefore, the series should always be stabilized. Several methods have been used and investigated to achieve the best possible result.

1. Python feature matching using OpenCV

This is an own implementation of image stabilization using OpenCV in Python. A brute force matcher with the SIFT descriptor is implemented for this purpose. The first frame of a series is the reference frame, on which all other frames are aligned. First, all features are identified in the reference image and in the frame which is to be stabilized and then paired with each other using the knnMatch function. The paired features of the two frames can then be used to determine their coordinates. The difference between the X and Y positions can then be used to determine how strongly and in which direction the frame which is to be stabilized deviates from the reference image. This displacement is applied inversely to the frame being aligned so that all vessels and the optical disc are in the same position as in the reference frame.

Once the X and Y shifts have been captured over the entire time interval, three translation methods have been implemented to correct them. One of the methods corrects the absolute displacement values. However, since OpenCV's feature matching can detect the features slightly shifted, as well as in different sizes, sometimes inaccurate or even strongly disturbed displacement values can occur. This can result in partially strong frame twitching which is not caused by any motion. Therefore, two further translation methods have been developed to smooth out the slight to severe translation disturbances: a linear and a polynomial regression through the X- and Y-coordinates respectively (Fig. X).

As soon as the functions for the X and Y coordinates have been determined by one of the three methods, an affine transformation of the frame that needs to be stabilized takes place. No rotation or scale operation is performed, only a linear translation in X and Y direction.   
This method does not require any additional information as input for the image sequence since it identifies the features completely dynamically and pairs them with each other.

1. Hugin Panorama Creator

This free software makes it possible to stabilize a series of images from a camera, for which it is apparently often used in filmmaking communities. After the camera and lens properties such as focal length or horizontal view factor have been configured, image sequences can be imported and further processed. The focus of this software lies on the lens parameters because the imported images are placed on a then generated globe, resulting in stronger affine transformations especially at the edges of the images. It is also theoretically possible to define feature points throughout the sequence, which will be matched to each other in different frames. The output is the stabilized set of images in a separate folder.

1. ImageJ Image Stabilizer by Kang Li

As the name implies, it is a plugin for the free software ImageJ, which is based on Java. It uses the Lucas-Kanade algorithm to stabilize jittery images and can be used for both color and monochromatic images. After the uncomplicated installation of ImageJ, the plugin can also be added without any further adjustments. The image sequence is imported as a stack and the currently displayed frame of the stack is the reference frame to which all others are aligned. The program then estimates the best geometrical transformation of all other slices to match them to the reference frame. Once stabilization has been completed, the stack can be exported from ImageJ as a sequence of frames.

1. ImageJ Template Matching

Another plugin for ImageJ, which comes with a little more setup effort, because it requires additional files in the ImageJ folder. The stabilization algorithm needs a selection of an area to be searched for in all the other frames. For this purpose, a normalized cross-correlation coefficient NCCC between 0 (no match) and 1 (absolute match) is calculated for each pixel in the frames, which need to be stabilized. In this way, the selected area of the reference frame is found in all other frames, so that they can be moved to the position where all selected and identified areas overlap. This NCCC has an inherent correction of different intensities, contrast and lighting conditions. Once stabilization has been applied, the stack can be exported as a sequence of individual images.  
Since mainly this plugin was used for analyzing a large number of sequences (see Results), it has been integrated into an own plugin, which minimizes the effort and the amount of manual intermediate steps. This own plugin takes over the import of an image series as a stack, the preselection of the rectangular selection tool and finally the export of the single images with the corresponding names to a separate folder. This reduces the manual effort to executing the plugin via the menu bar, selecting the first image of the series and selecting the optical disc with the rectangular selection tool. On the one hand, the optical disc is used for image stabilization and on the other hand, the information about the position and size of the disc is stored in a separate file, which is required during the further pipeline.

|  |
| --- |
|  |
| Figure X Schematic representation of the pipeline. |
| (A) Grüner Kanal (MAP2) einer Originalaufnahme. (B) Ergebnis eines automatisch ermittelten Thresholds (40) mit dem IsoData - Algorithmus. Dendrit ist klar vom hintergrund hervorgehoben und scharf abgegrenzt. (C) Manuell gesetzter MAP2-Threshold von 10. Dendriten sind nicht mehr klar abgegrenzt und im Hintergrund ist eine fehlerhafte Schattierung deutlich erkennbar. |

Um den Stabilisierungseffekt von animierten Sequenzen zu evaluieren, wurde ein webbasiertes Tool entwickelt, welches die Originalsequenz zum optischen Vergleich mit der stabilisierten Sequenz gegenüberstellt (Abb. X). Darüber hinaus ist wird an der Position des Mauszeigers ein Vergrößerungsglas eingeblendet, welches an der Position des Bildes hineinzoomt. Durch diese Hilfsmittel kann die Verbesserung besser evaluiert werden, welches das angewandte Stabilisierungsverfahren bewirkt hat.

Des Weiteren plottet die implementierte Methode 2.2.a die verschobenen X- und Y-Koordinaten in jedem Frame und animiert sie synchronisiert mit der stabilisierten Sequenz, so dass der Stabilisierungseffekt mit der Verschiebung der Variablen überprüft werden kann.

Das Tool zur strukturierten Visualisierung der Stabilisierungsergebnisse vereint die webbasierten Technologien HTML, CSS, JavaScript und die JavaScript-Bibliothek jQuery sowie eine funktionale Vorlage dafür jquery-images-compare (https://www.npmjs.com/package/jquery-images-compare).

## Single Image Width Measurement

Die Grundlage zur Messung der Gefäßbreiten in einem einzelnen Frame hat Phd. Shuang Yu zur Verfügung gestellt. Dies beinhaltet die Python Module zur Erkennung der programmatischen Erkennung der optischen Disk, Unterteilung des Frames in drei Zonen (A, B und C), Identifizierung der Gefäße sowie deren Messung und Berechnung der ihrer Breite. Die Funktionsweise und die Modifizierungen der Module werden in den folgenden Absätzen erläutert.

### Dimensions

In jeder Iteration der Sequenzanalyse wird die Breite aller Gefäße in einem Frame gemessen. Die Maßeinheit ist in Pixeln und umfasst ein Spektrum der Gefäßbreite von 8 bis 23 Pixeln, was einer Breite von ca. 50 mM bis 150 mM entspricht. Das absolut eindeutige Verhältnis von Pixeln zu mM ist nicht bekannt, da die Infrarotbilder mit einem speziell angefertigten Kamerasystem aufgenommen wurden, welches unter anderem ein Arduino-Board mit eigener Software beinhaltete. Die Kamera- sowie Linseneigenschaften sind nicht bekannt und das Vergrößerungsmaß muss daher hergeleitet werden.

Die optische Disk (Fig X) hat einen Durchmesser von ca. 900mM und aus einem gemessenen Pixelradius von ca. 150 Pixeln ergibt sich somit ein Pixel zu:mM Verhältnis von ungefähr 1:6. Für jegliche relevanten Messungen und Berechnungen sind die absoluten Werte in mM nicht erforderlich, weshalb diese Schätzung des Größenverhältnisses für den Zweck der Elastizitätsschätzung ausreichend ist.

### Optic disc detection

Als feste Referenz und Orientierungspunkt ist die optische Disk der wichtigste Marker bei der Messung. Sie ist der Ursprung aller Gefäße und ist erkennbar durch eine relativ eindeutige Abgrenzung und eine Größe von ungefähr 150Pixeln bzw. 900 mM. In der Forschung des CSIRO wird ausgehend vom Zentrum und dem Radius der optischen Disk die Retina in die radialen Zonen A, B und C unterteilt (Fig. X). Die Grenzen der Zonen werden durch den Radius bestimmt, so ist Zone A der 2-Fache, Zone B der 3-Fache und Zone C der 5-Fache Radius der optischen Disk, ausgehend vom Zentrum. Die Gefäße haben etwas unterschiedliche Eigenschaften, je nach dem in welcher Zone sie sich befinden. In Zone A treten die Arterien aus der optischen Disk aus und die Venen in sie ein, weshalb sie hier am breitesten sind und den geringsten Verzweigungsgrad aufweisen. Je weiter sie sich vom Zentrum der Disk entfernen, desto mehr Verzweigungen werden gebildet und desto kleiner werden dementsprechend die Gefäße. Zur programmatischen Erkennung wurde eine Methode bereitgestellt, die aus verschiedenen Gründen (siehe Sequenz...) nicht verwendet wurde. Deshalb basiert die Erkennung der optischen Disk auf der manuellen Eingabe während dem Stabilisierungsschritts. Während die Disk zur Selektierung ausgewählt wird, werden die Diskparameter in einer Textdatei gespeichert und in diesem Schritt ausgelesen.

|  |
| --- |
|  |
| Figure X Schematic representation of the pipeline. |
| (A) Grüner Kanal (MAP2) einer Originalaufnahme. (B) Ergebnis eines automatisch ermittelten Thresholds (40) mit dem IsoData - Algorithmus. Dendrit ist klar vom hintergrund hervorgehoben und scharf abgegrenzt. (C) Manuell gesetzter MAP2-Threshold von 10. Dendriten sind nicht mehr klar abgegrenzt und im Hintergrund ist eine fehlerhafte Schattierung deutlich erkennbar. |

### Vessel segmentation

Zuerst wird das Originalbild auf 40% der Originalgröße herabskaliert und eine Maske wird parallel mit den Werten 0 bzw. 1 angelegt, die jeweils 20 Pixel von den äußeren Bildrändern die Werte 0 und im Rest 1 erhält. Die Maske dient der Definition eines validen inneren Bereichs, da am Bildrand öfter unerwünschte Verzerrungen zu beobachten sind. Dann wird nur der Grüne Kanal im weiteren Vorgang der Gefäßsegmentierung verarbeitet. Der Grund dafür ist, dass die Intensitätswerte des grünen Kanals am stärksten und differenziertesten ausgeprägt sind. Dieser grüne Kanal durchläuft eine Reihe von Methoden zur Verbesserung der Bildqualität und Hervorhebung relevanter Bildeigenschaften.

1. Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) wird mit einer Gittergröße von 8x8 Pixeln und einem Cliplimit von 2.0 angewandt. Das sorgt für ein breiteres und gleichmäßigeres Intensitätsspektrum, was den Bildkontrast erhöht.
2. Morphology opening was im Prinzip eine Erosion des Vordergrunds gefolgt von der Dilation ist, was dazu führt, dass die sogenannte Salzstörung (salt noise, kleine weiße Punkte) entfernt wird.
3. Median blur mit einer Kernelgröße von 5 Pixeln zur Kantenglättung
4. Morphology closing ist ähnlich wie das opening, nur dass zuerst eine Dilation stattfindet und anschließend die Erosion. Das bewirkt, dass im Vordergrund eingeschlossene Lärmpunkte entfernt werden.

Dieser prozessierte grüne Kanal stellt die Grundlage für die Erkennung der Gefäße. Der Vorgang basiert auf einer Linienerkennung in einem stark verschwommenen Bild. Die beiden Außenwände werden dabei als eine durchgehende Linie erkannt. Es ist daher wichtig, dass das Bild vorher auf 40% herunterskaliert wird, so dass die beiden Außenwände so nah beieinander sind, dass sie durch die Verschwommenheit verschmelzen. Das Ziel dieses Schrittes ist es, eine binäre Maske zu erstellen, in der nur die Gefäße weiß hervorgehoben sind (Fig X). Diese binäre Maske wird fortan als Gefäßmaske bezeichnet.

|  |
| --- |
|  |
| Figure X Schematic representation of the pipeline. |
| (A) Grüner Kanal (MAP2) einer Originalaufnahme. (B) Ergebnis eines automatisch ermittelten Thresholds (40) mit dem IsoData - Algorithmus. Dendrit ist klar vom hintergrund hervorgehoben und scharf abgegrenzt. (C) Manuell gesetzter MAP2-Threshold von 10. Dendriten sind nicht mehr klar abgegrenzt und im Hintergrund ist eine fehlerhafte Schattierung deutlich erkennbar. |

### Skeletonization

Um die einzelnen Gefäße nun zu erkennen, wird eine Verdünnung der binären Gefäßmaske vorgenommen. Die Methode basiert auf (Siehe Quelle zur Verdünnung). Der Algorithmus wird mehrmals auf das Bild angewandt, wobei Pixel entfernt werden, auf die bestimmte Kriterien zutreffen. So müssen nach dem Entfernen weiterhin mindestens Acht verbundene Komponenten sowie Flächen von 2x2 Pixeln bestehen bleiben. Das Resultat davon ist ein Skelett der Gefäße. Um die einzelnen Gefäße zu definieren, werden zunächst Start- und Endpunkte eines jeden Zweiges bestimmt. Dafür gibt es Acht unterschiedliche Orientierungen von 3x3-Array Templates, wie Endpunkte aussehen können, welche auf das gesamte Skelett abgeglichen werden. Als nächstes werden Verzweigungen erkannt, in dem ein ähnliches Verfahren angewandt wird. In diesem Fall werden drei Orientierungen von X-Förmigen und acht Orientierungen von Y- und T-Förmigen Verzweigungen innerhalb des Skeletts erkannt. In beiden Fällen, dem Erkennen der Endpunkte als auch der Verzweigungen, wird die Methode hitmiss des Paketes Mahotas auf das Skelett angewandt. Sind diese Features bekannt, wird das Skelett mittels einer Dijkstra-Wegermittlung gestutzt, so dass Kreise vermieden und überschneidende Gefäße unterschiedlichen Ursprungs sich voneinander abgrenzen.

Vessel skeleton, remove branches

Partition eye into zones A, B, C

Definition der Gefäße

Ist nun das gestutzte Skelett gegeben, so wird es wieder auf die Originalgröße skaliert und auf das unveränderte IR-Bild gelegt. Dann wird entlang jeder Mitte der Gefäßmaske entlanggegangen und ein zentrales spline gelegt, so dass ein Skelett der Gefäße geschaffen wird. An Stellen, wo sich charakteristische Verzweigungen des Skeletts befinden, werden keine Gefäße identifiziert, da sie keine verlässlichen Messdaten liefern. Zusätzlich zu jedem zentralen Punkt eines Gefäßes werden die zwei äußeren Ränder, also die Gefäßwände, mittels eines Gradienten identifiziert. Dafür wird der Farbverlauf orthogonal in beide Richtungen zum Anstieg des aktuellen 4

Punktes gemessen und an den Stellen, wo sich der größte Sprung des Gradienten befinden, werden die Punkte für die Außenwände gelegt. Ein Gefäß ist also definiert durch eine eindeutige Bezeichnung und eine Reihe von Koordinaten des Gefäßzentrums, die jeweils eine linke und eine rechte Gefäßwandkoordinate besitzen. Für folgende Referenz werden diese

als zentrale, linke und recht Splines definiert.

### Definition of Vessel Width

Zur Ermittlung der Breite wird der Abstand zwischen den zugehörigen linken und rechten splinekoordinaten berechnet. Dies wird für alle linken- bzw. rechten splinepunkte eines Gefäßes durchgeführt und im Anschluss wird der Durchschnitt daraus gezogen, um die einzelnen eventuellen Messfehler zu begradigen. Ein Breitewert eines Gefäßes ist also das Mittel aller punktuellen Entfernungen seiner Außenwände in Pixeln. Dies wird für jedes Gefäß eines Frames durchgeführt. Der Gefäßanfang und das Ende sind bestimmt durch seinen identifizierten Start- und Endpunkt. Durchläuft ein Gefäß eine oder zwei Zonengrenzen, so wird es an den entsprechenden Stellen geteilt und die resultierenden Teilstücke werden als separate Gefäße mit eigener Gefäßbreite betrachtet.

|  |
| --- |
|  |
| Figure X Schematic representation of the pipeline. |
| (A) Grüner Kanal (MAP2) einer Originalaufnahme. (B) Ergebnis eines automatisch ermittelten Thresholds (40) mit dem IsoData - Algorithmus. Dendrit ist klar vom hintergrund hervorgehoben und scharf abgegrenzt. (C) Manuell gesetzter MAP2-Threshold von 10. Dendriten sind nicht mehr klar abgegrenzt und im Hintergrund ist eine fehlerhafte Schattierung deutlich erkennbar. |

## Adaption der Sequenzeigenheiten

Die Erfassung der Veränderung der Gefäßbreite über einen bestimmten Zeitraum hat zusätzliche Anforderung, die über einfache Messungen der Gefäße eines Bildes hinausragen. Der gesamte Ablauf sollte auf eine Reihe von Bildern anwendbar sein, möglichst genaue Ergebnisse liefern und eine minimalen Aufwand an Betreuung erfordern. Neben essentiellen Modifikationen der Verfahrensweise einiger Methoden zur Messung der Gefäßbreite musste zusätzlich die Gesamtstruktur des Programms überarbeitet werden.

### Modularisierung der Grundlage

Die programmatische Grundlage zur Analyse eines IR-Bildes musste für eine Sequenz von Einzelbildern in eine iterative Anwendung umgewandelt werden. Außerdem mussten viele Optimierungen vorgenommen werden, weil eine Sequenz aus bis zu dreißig Einzelbildern bestehen kann und die Laufzeit mehrere Minuten dauern konnte. Besonders erschwert wurde dadurch die Entwicklung und Kontrolle der späteren Programmteile, da zuvor erst die gesamte Sequenzanalyse durchlaufen werden musste. Deshalb musste das Programm modularisiert und für eine Konfigurationsbasis ausgelegt werden. Einzelne Module sind dabei unabhängig aufrufbar, besitzen also eine Laden- und Speichern Funktion. Jedes der Module kann über einen eigenen Konfigurationseintrag aktiviert bzw. deaktiviert werden.

### Vereinheitlichung der optischen Disk

Durch spezielle Anforderung an eine Sequenz von Bildern hat sich die Vorlage zur programmatischen Erkennung der optischen Disk als unzureichend erwiesen. In manchen Fällen wird die Disk nicht richtig erkannt. Außerdem führt eine individuelle Erkennung der Disk per Frame einer Sequenz zu jeweils leicht bis stark unterschiedliche Radien, so dass die Gefäße nicht ordnungsgemäß bzw. nicht einheitlich den Zonen zugeordnet werden können. Das wesentliche Problem dabei ist, dass die Länge der Gefäße durch die Verschiebung der Zonengrenzen unterschiedlich ist, da sie dort im Prinzip "zerschnitten" werden (mehr dazu in Teil X). Tatsache ist, dass die Gefäße vom Zentrum her nach außen hin dünner werden, wenn sich also die Zonengrenzen verschieben, dann wird ein Gefäß auch entsprechend dünner bzw. breiter. Dementsprechend erzeugt ein auch nur leicht abweichendes Zentrum bzw. Radius der Disk per Frame eine pulsierende Veränderung der Messwerte, die mit dem eigentlichen Puls interferieren und die Echten Werte entweder verstärken oder auslöschen können. Deshalb ist es sehr wichtig, dass die optische Disk absolut richtig und konsistent die gesamte Sequenz hindurch identifiziert wird. Um das sicherzustellen, wird im Stabilisierungsteil (X) die Disk mit einem Rechteck selektiert und die exportierten Werte als einheitliche Parameter für die gesamte Sequenz verwendet.

### Vereinheitlichung der Gefäßmaske

Kein Frame einer Sequenz ist absolut identisch zum vorherigen und selbst minimalste Abweichungen während der Gefäßsegmentierung (X) führen dazu, dass die Registrierung der Gefäße unterschiedlich ist, so dass sie unterschiedliche Identifikationsnummern bei der Durchnummerierung bekommen. Es entsteht nämlich die Problematik, leicht bis stark unterschiedliche Koordinaten jedes Gefäßes in jedem Frame miteinander zu mappen, um deren Messwerte einander richtig zuordnen zu können. Dafür wurden die zentralen Spline-Koordinaten aller Gefäße eines Frames und des folgenden Frames in jeweils einer Matrix gespeichert. Daraus wurde die Eulersche Distanzmatrix der X- und Y-Koordinaten der zentralen Splines ermittelt. Anschließend wurden die paarweise kürzesten Distanzen der Splines ermittelt und miteinander gemappt, wobei darauf geachtet werden musste, dass immer das kleinere Gefäß auf das größere passen sollte (da die Distanz des großen Gefäßes zum kleinen sehr hoch sein kann). Dieser Ansatz wurde zwar umgesetzt, jedoch in der finalen Version nicht verwendet, da sich die Komplexität dieser Angelegenheit als zu hoch bzw. das Resultat als zu inkonsistent herausgestellt hat. Der Grund liegt bei den vorkommenden Sonderfällen der Unterschiede der Splines. Ein solcher Sonderfall ist, dass Gefäße in manchen Frames überhaupt nicht erkannt werden oder erst inmitten einer Sequenz auftauchen. Außerdem können große Gefäße im Laufe der Sequenz als zwei kleinere betrachtet werden und auch irgendwann wieder als ein großes. Das kommt zum Beispiel vor, wenn ein Fremdkörper in Form einer dunklen Wolke über ein Gefäß gleitet. Wenn das Auge in eine Richtung Zuckt, dann werden die Gefäße auf einer Seite drastisch gekürzt und auf der anderen Seite verlängert oder es tauchen gar neue auf. In jeder Sequenz kann eine Vielzahl solcher schwer vorhersehbaren Faktoren auftauchen und das Abfangen dieser Spezialfälle beim mapping der Splines hat sich als sehr inkonsistent erwiesen. Die Fragestellung ist, ab wann ein Spline ein Bruchteil eines vorherigen, ein komplett neues Spline oder Teil des sehr naheliegenden bzw. überlappenden Nachbargefäßes ist. Rein programmatisch ist es nicht mit einheitlichen Schwellenwerten und Fallunterscheidungen lösbar, so kam beim Testen der Probesequenzen zum Vorschein, dass inmitten der Sequenz ein Gefäß plötzlich eine andere Identifikationsnummer bekommen hat und folglich die Werte einem anderen bzw. neuen Gefäß zugeordnet wurden.

Für die dynamische Gefäßermittlung per Frame sind einerseits die Daten zu stark gestört, zum anderen sind die natürlichen Gefäßeigenschaften wie Überlappungen, Kreuzungen und Verzweigungen programmatisch einfach nicht konsistent erfassbar. Daher wurde beschlossen, die Segmentierung der Gefäße (X) lediglich beim ersten Frame durchzuführen. So wurde nämlich das zentrale Spline per Gefäß immer gleich definiert und konsistent in jeder Sequenz erfasst. Doch die Gefäßbreite, also die Erfassung der Außenwände mittels Gradienten, wurde weiterhin dynamisch auf das individuelle Frame angewandt. Diese Maßnahme löst zwar die Problematik Konsistenz bei der Gefäßdefinition, legt aber ein sehr hohes Gewicht auf die Sequenzstabilisierung. Denn wenn im Laufe der Sequenz die Maske des ersten Frames (Abb. X) nicht mehr oder nur schlecht auf ein anderes Frame passt, dann werden die Außenwände und folglich die Gefäße nicht mehr ordentlich erkannt. Das führt im Extremfall zu fehlenden Werten eines Gefäßes oder zum Kurzzeitigen Auftauchen von neuen Gefäßen, falls ein Gefäß gespalten wird. Daher wurde ein so großer Fokus auf die Ermittlung eines sehr guten Stabilisierungsverfahrens gelegt.

## Gefäßklassifizierung

Gefäße werden in zwei Klassen unterteilt, Arterien und Venen, die das Blut vom bzw. zum Herzen führen. Diese unterscheiden sich maßgeblich in Ihrem messbaren Verhalten. Arterien sind direkte Empfänger des Systolischen Drucks des Herzens, weshalb sie einen wesentlich stärkeren und schnelleren Ausschlag verzeichnen. Erst wenn dieser Impuls durch die Arterien und die Mikrovaskulatur geflossen ist, fließt er mit einer wesentlichen Dämpfung durch die Venen. Das heißt die systolische Spitze ist nicht mehr so stark ausgeprägt und ist dafür länger anhaltend und gleichmäßiger. Die optisch messbaren Eigenschaften sind aber nicht der einzige Grund für eine Gefäßklassifizierung. In Bezug auf die Ursache oder Symptom von Alzheimer wird vermutet, dass insbesondere die Beeinträchtigung der Arterien eine Rolle spielt (Quelle). Erklärt wird es dadurch, dass Neurotoxine wie Beta-Amyloid durch die Erstarrung der Arterien und der erhöhten Pulswellengeschwindigkeit schlechter abtransportiert werden kann. Das wiederum begünstigt die Ansammlung und Entstehung des Alzheimer markers Beta-Amyloid-Plaue. Hinsichtlich der Analyse von Gefäßeigenschaften und deren Veränderung zwischen unterschiedlichen Zuständen ist es also unabdingbar, die Gefäße in ihre Klassen zu unterteilen.

### Manuelle Klassifizierung mit Assistenzprogramm

Die Methode zur Gefäßklassifizierung ist im Endeffekt eine manuelle Erfassung mit einem assistierenden Programm. Nachdem alle Splines einer Sequenz bzw. des ersten Frames einer Sequenz erfasst wurden, kann die Methode darauf angewandt werden. Es wird ein Fenster angezeigt, welches alle Splines in grüner Farbe auf die Gefäße des Originalframes plottet. Nun ist es an den Anwender, mit der linken Maustaste auf die Gefäße zu klicken, die er als Arterie klassifizieren möchte und mit der rechten Maustaste als Venen. Dabei werden die Arterien rot eingefärbt und die Venen blau. Durch Drücken der mittleren Maustaste wird die Klassifizierung aufgehoben und der Spline färbt sich wieder grün. Diese optische und manuelle Evaluierung ist Zeitaufwendig bei der Analyse vieler Sequenzen, jedoch absolut notwendig für eine möglichst genaue Klassifizierung. Außerdem wurde dabei verdeutlicht, dass es kaum möglich ist, einen programmatischen Klassifizierer dafür zu entwickeln (Abbildung X). Gefäße haben ihren Ursprung in der optischen Disk und breiten sich von ihr aus in absolut mehrdeutigen Art und weisen. Zur optischen Erfassung wäre die Helligkeit der Gefäße, da Venen dunkler sind als Arterien. In den monochromatischen Infrarotbildern sind diese Intensitätsunterschiede jedoch nur bei wenigen und absolut Eindeutigen Venen erfassbar. Sind diese identifiziert, so können die restlichen Gefäße nach der Regel, dass sich Arterien und Venen abwechseln, klassifiziert werden. Es kommt nicht häufig vor, dass zwei Venen oder Arterien direkt und das gesamte Bild nebeneinanderliegen. Diese alterierende Eigenschaft muss allerdings für jede Sequenz individuell evaluiert werden. So kann zum Beispiel erst am äußersten Bildrand festgestellt werden, wie die genaue Ausrichtung und der Verlauf der Gefäße ist. In näherer Nachbarschaft des Zentrums aber auch teilweise weiter Außen sind die Gefäße oft sehr stark verwoben und überlappend. Um also ein eindeutiges Regelwerk zur programmatischen Klassifizierung der Gefäße zu definieren, müssen alle Gefäße eindeutig vom Ursprung bis zum Bildrand verfolgt werden. Allein das ist ein Forschungsgebiet für sich und es gibt noch kein Verfahren, welches absolut eindeutig, richtig und ohne manuellem Einschreiten funktioniert. Für die Erfassung der Gefäßbreiten und der Veränderung über Zeit ist es aber von größter Wichtigkeit, dass keine Vene fälschlicherweise als Arterie definiert wird. Sowas würde die Messwerte enorm herabskalieren und das Ergebnis zu falschen Schlüssen ziehen, da Venen schwächeren Kräften ausgesetzt sind. Ein manuelles vorgehen ermöglicht eine genauere Klassifizierung, hat jedoch die Gefahr von Inkonsistenz. Daher muss bei der Klassenbestimmung darauf geachtet werden, dass absolute Gewissheit zur Gefäßklasse besteht und wenn dies nicht gegeben ist, dann wird das Gefäß nicht Klassifiziert (grün markiert) und somit aus jeglicher Analyse ausgeschlossen.

### Klassifizierung durch Sinus Offset

Es wurde ein Verfahren getestet, welches eine programmatische Klassifizierung der Gefäße auf Grund der Verschiebung des beobachteten Herzrhythmus. Wie in (X) beschrieben, wird eine Sinusfunktion auf die Veränderung der Breite eines Gefäßes geschätzt. Diese Sinusfunktion hat einen Offset, welcher die Verschiebung ihrer Nullpunkte beschreibt. Da die systolische Spitze in den Arterien früher als die Spitze der Venen auftaucht, sollte auch der Offset dementsprechend kleiner sein. Zumindest ist davon auszugehen, dass ein klarer Unterschied zwischen den beiden Klassen herrschen sollte. Ein einfaches eindimensionales Clusterverfahren wurde implementiert, in dem die Offsets aller Gefäße sortiert wurden und an der Stelle einmalig geteilt, an welcher der größte Wertesprung stattgefunden hat. Daraus wurden die zwei Klassen definiert. Ein Testlauf hat eine Genauigkeit von lediglich 60% ergeben und es war ersichtlich, dass auch diese Methode keine programmatische Klassifizierung gewährleisten kann. Für die unzureichende Quote sind in erster Linie die schlechten Schätzungen der Sinusfunktion bei Messungen mit mittlerer bis schlechter Qualität (Siehe Parameter X) verantwortlich, da der Offset direkt von ihr abhängig ist. Außerdem haben Gefäße unterschiedliche Positionen und da sich der Puls vom Zentrum ausbreitet, hängt der Zeitpunkt der systolischen Spitze direkt vom Abstand zum Ursprung ab. Bei Arterien erhöht sich die Zeit bis zur Spitze mit größerer Entfernung und bei Venen tritt die Spitze früher in den Außenbereichen ein und erst später am Zentrum. Der Zeitpunkt der Spitze im Außenbereich ist also für Arterien und Venen beinahe gleich. Diese Logik wurde nicht implementiert, da bereits die fehlende Genauigkeit der geschätzten Sinusfunktion dafür sorgt, dass diese Methode keine absolut richtige Klassifizierung generieren wird. Aus diesem Grund wurde das manuelle Verfahren

## Extracting vessel properties from a Sequence of images

Die Methoden 2.1 – 2.6 dienen dem Zweck, jedem Frame einer Sequenz die Gefäßbreiten zu entnehmen. In diesem Abschnitt der Parameterextraktion wird erläutert, wie diese Messungen einzelner Frames weiter prozessiert werden. Das beinhaltet Kombination und Verarbeitung von Messwerten zu informationshaltigen Parametern sowie deren Speicherung zur weiterführenden Analyse.

2.6.1 Zeitliche Zuordnung

Jedes Frame hat einen definierten Zeitpunkt, in dem es geschossen wurde. Diese Zeitangaben sind in einer Datei mit der Bezeichnung meta.txt gespeichert. Der Dokumentinhalt ist im JSON-Format, mit der Ausnahme, dass es wegen einer fehlenden schließenden Klammer nicht valide ist. In diesem Dokument sind zu jedem Frame die zeitlichen Angaben hinterlegt, so dass sie einfach ausgelesen und den Frame- bzw. Bildnamen zugeordnet werden können. Die zeitlichen Intervalle sind im 100ms-Bereich und nicht äquidistant. Außerdem kommt es vor, dass zwei aufeinanderfolgende Frames den absolut identischen Zeitstempel besitzen. Das führt zu einem Problem, da die Zeitstempel als Identifikationen für alle gemessenen Werte eines Frames gehandhabt werden. Hat also das darauffolgende Frame den selben Identifikationsschlüssel, so werden die vorherigen Werte überschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei zwei identischen Zeitstempeln um einen technischen Fehler handelt. Um das zu beheben, wird in einem solchen Fall der folgende Zeitschlüssel (basierend auf der Reihenfolge, in der die Bilder geschossen werden) um eine Millisekunde erhöht. Das hat auf die optische Repräsentanz der Messwerte, da es an solchen Stellen im Plot eine deutliche Stauchung gibt. Da es aber keine sonstige Auswirkung hat, wurde es in Kauf genommen, da auf diese Weise die Störung als Nebeneffekt gut visualisiert werden konnte.

Des Weiteren gibt es Messlücken einzelner Gefäße zu bestimmten Zeitpunkten. Das kommt vor, wenn sich die Bildeigenschaften im Verlauf der Sequenz an einem bestimmten Zeitpunkt so weit verändern, dass ein Gefäß nicht mehr als solches erkannt wird. Diese Lücken können über ein oder mehrere Frames spannen und sowohl innerhalb einer Gefäßmessung auftauchen, als auch ab einem bestimmten Zeitpunkt bis zum Ende der Messung. In diesen Fällen werden die fehlenden Messwerte mit NaN-Werten ersetzt, so dass dennoch eine Kontinuität der zeitlichen Abfolge erhalten bleibt.

2.6.2 Frequenz und Amplitude

Die einzelnen Messwerte eines Gefäßes in einer Sequenz sind in den seltensten Fällen so genau, dass sie einen oder mehrere kardiale Zyklen perfekt beschreiben. Verschiedene Messungen haben ergeben, dass pro Sequenz in etwa ein bis zwei Gefäße vorhanden sind, die einem beinahe perfekten Zyklus entsprechen. Alle anderen Gefäße haben viele Ausreißer oder sind sogar einfach nur ein Zick-Zack Muster. Um zu sehen, wie repräsentativ die Messwerte sind, wurde eine Methode entwickelt, um die Herzfrequenz aus den Messwerten zu bestimmen. Der natürliche Kurvenverlauf eines kardialen Zyklus einer Arterie hat einige charakteristische Eigenschaften, wie Systole und Diastole (X). Insbesondere durch dieses wiederkehrende Muster ist die Sinusfunktion eine ungefähre Repräsentation des Verlaufs, welche gut genug interpoliert werden kann. Für diesen Zweck wird die eindimensionale diskrete Fourier Transformation (Numpy FFT) implementiert, um aus den Messwerten programmatisch eine Frequenz für die Sinusfunktion zu schätzen. Dafür ist Voraussetzung, dass die Messwerte äquidistant sind. Es wird also die erste zeitliche Differenz von zwei Messwerten errechnet und für alle folgenden Abstände übernommen. Für den Regelfall ist das Resultat sehr gut aber in bestimmten Fällen etwas störungsanfällig. Wenn zum Beispiel während dem Quality Preprocessing (X) ein oder mehrere Bilder entfernt werden mussten, so gibt es eine Verschiebung der zugrundeliegenden kardialen Funktion, so dass die Messwerte einen Sprung aufzeichnen. Das kann Einfluss auf die Schätzung haben, hat sich aus den Analysen jedoch als vernachlässigbar in Bezug auf die resultierende Funktion herausgestellt. Viel mehr ist es ein Problem, wenn die Messwerte so gestört sind, dass sie eine Zick-Zack Funktion annehmen und die Fourier Transformation nicht die Möglichkeit hat, die korrekte zugrundeliegende Frequenz zu schätzen. Daraus folgt eine entweder zu hoch oder zu niedrig frequentierte Sinusfunktion. Um dem entgegenzuwirken, wird die Schätzung der Frequenz auf das menschlich mögliche Spektrum gedeckelt. Dies wird an zwei Stellen vorgenommen, bei der initialen Schätzung der Frequenz mit FFT auf das Intervall [0.3, 0.5] und bei der finalen Festlegung der Frequenz auf maximal 0.7. Diese Werte wurden empirisch ermittelt und lieferten die besten Schätzungen.

Eine Weitere Maßnahme, um die Schätzung der Sinusfunktion von Störfaktoren zu schützen, ist die erweiterte Bestimmung der Amplitude. Die Amplitude ist zwar in der finalen Pipeline keine Messgröße, aber um eine möglichst genaue Repräsentanz der echten Werte zu erreichen mit der potentiellen Möglichkeit, diese sogar zu ersetzen, wurde dafür eine verbesserte Methode entwickelt. Normalerweise wird einfach die Standardabweichung der Messwerte von ihrem Durchschnitt herangezogen. Das hat des Öfteren zur Folge, dass Ausreißer einen zu hohen Einfluss auf die zu schätzende Funktion haben. Die geschätzte Amplitude tendierte dazu, die gemessenen Werte zu übersteigen. Insgesamt hat sich dadurch auch die Problematik offenbart, zuverlässig die Grenzen der Gefäßausdehnung zu bestimmen (siehe X). Die dort besprochene Lösung würde zwar auch hierfür gehen, eine alternative Methode hat sich allerdings als etwas genauer und besser geeignet herausgestellt. Die Ober- und Untergrenze wird nicht aus der Standardabweichung, sondern aus dem Mittel der identifizierbaren Maxima in Form von Spitzen bestimmt (detect\_peaks).

Wenn allerdings die Daten sehr gestört sind, dann führt auch das Deckeln der Frequenzwerte zu keinem befriedigenden Ergebnis. Die Frequenz ist in vollständigen Durchläufen der Sinusfunktion pro Sekunde angegeben.

2.6.3 Beats per Minute

Aus der Frequenz können die Herzschläge pro Minute errechnet werden mit der Formel Frequenz \* 60. Aus einer Frequenz von 1 ergibt sich also die Herzfrequenz von 60 Schlägen pro Minute. Bei wenig gestörten Messwerten wird die Herzfrequenz sehr genau bestimmt, wobei das wegen starken Qualitätsschwankungen für nur wenige Gefäße einer Sequenz der Fall ist.

2.6.4 Offset bzw. mittlere Gefäßbreite

Um eine Angabe über die allgemeine Breite eines Gefäßes zu bekommen, wird dafür das Mittel aller Messwerte berechnet.

2.6.4 Minimum, Mittel und Maximum der Gefäßbreite

Da die Schätzung der Frequenz (X) und somit die errechnete Herzfrequenz fehlerhaft sein kann, wird zur Ermittlung der maximalen und minimalen Gefäßbreite nicht die Amplitude der Frequenz herangezogen. Eine Exklusion der Gefäßmessungen auf Grund von nicht charakteristischen Messverlauf würde dazu führen, dass sehr viele Gefäße diese Qualitätsanforderung nicht erfüllen würden. Eine so drastische Reduzierung der Resultate führt ebenfalls zu einer unerwünschten Voreingenommenheit und Nichtrepräsentanz der Ergebnisse. Wenn zum Beispiel nur ein oder zwei Gefäße diese Anforderung erfüllen, dann repräsentieren sie die gesamte Sequenz und ihre individuelle Abweichung vom tatsächlichen Mittel aller Gefäße führt zu einer Fehlinterpretation bei der Auswertung. Daher werden die Minimal- und Maximalwerte eines Gefäßes folgend separat berechnet:

Mittlere Gefäßbreite = Durchschnitt aller Messwerte

(frequenz, bpm, phase, offset)

2.6.3 Definition von Elastizität

(width, min, max)

* + 1. Definition der Elastizität
    2. Trace the vessel width (FrameTime, remove NaN)
    3. Get vessel parameters
       1. Curve fitting = frequency, bpm, phase
       2. Vessel width = estimate min, max
       3. Vessel elasticity

DB & DB-definitionen!

## Post processing of parameters

* + 1. Outlier identification
       1. By hierarchical clustering (bpm, phase, elasticity)
       2. By thresholds (bpm, elasticity, fitting score)
          1. Reject outliers
    2. Vessel classification
       1. Arteries/Veins by largest phase shift
    3. SQL Database for gathering data
       1. SQL Browsing tool
       2. Verification of vessel parameters (elasticity, plot, vessel class)
    4. Estimate vessel elasticity change across vessels
       1. Vessel width-elasticity plot for each zone
       2. Linear regression through points
       3. Compare plots of zones B and C, esp. of both eyes
       4. Average both zones

Classification of elasticity data

* + 1. Big six => prioritize thicker vessel elasticity (threshold for low elasticity)
    2. slope of the function for overall elasticity

## Analyse von Individuen

### Herkunft der Daten

Exceldatei von Shaun, echte Patienten der Klinik. Beschreibung der Dateneigenschaften (alte Menschen etc.) und der hergezogenen Parameter (Hypertension, E2, E4, SUVR …)

2.8.2 Erfassung der Werte in Datenbank

Tabellendefiniton

Vergleich der Individuen bzw. Plots

# Results

1. Dataset
2. Select from 32 subjects with ca. 2 sequences each (both eyes)
   * 1. Final amount of subjects, vessels etc.
3. Blind dataset (not known, which condition)
4. Task supervision
   * 1. Movement translation
     2. Optic disc detection
     3. Result verification
5. Elasticity
   * 1. …
     2. accuracy
6. Classification
   * 1. …
     2. Comparison with clinical data
     3. Accuracy
7. Runtime
8. Discussion
   1. Does the vessel elasticity measurement support the correlation to diseases?
   2. What is the impact/future of this research project?

SOURCES:

<https://docs.opencv.org>

Verdünnungsalgorithmus:

[1] Z. Guo and R. W. Hall, "Parallel thinning with

two-subiteration algorithms," Comm. ACM, vol. 32, no. 3,

pp. 359-373, 1989.

[2] Lam, L., Seong-Whan Lee, and Ching Y. Suen, "Thinning

Methodologies-A Comprehensive Survey," IEEE Transactions on

Pattern Analysis and Machine Intelligence, Vol 14, No. 9,

September 1992, p. 879