# Nichtlineare Reaktionsdiffusionssysteme und ihre Anwendung zur Bewertung von dreidimensionalen Gewebskulturen

Jens-Peer Kuska und Bernhard Frerich[1]

Institut für Informatik
Universität Leipzig, 04109 Leipzig
[1]Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie,
Universität Leipzig, Nürnberger Str. 57, 04103 Leipzig

**Zusammenfassung.** Ein Verfahren für die Auswertung der beim Tissue engineering von Weichgewebe aufgenommenen Volumendaten für Kapillaren und Muskeln wird vorgestellt. Die Volumendaten werden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskop gewonnen. Für die Quantifizierung und Optimierung der Wachstumsparameter ist es notwendig den Bedeckungsgrad des Kapillargewebes mit Muskelzellen zu bestimmen. Für die Glättung und Ausheilung der Daten werden zwei gekoppelte nichtlineare anisotrope Diffusionsgleichungen gelöst.

## 1 Einleitung

Zielsetzung unserer Arbeiten [1,2] ist das Tissue engineering von Weichgeweben (Fettgewebe) für die plastisch rekonstruktive Chirurgie. Dabei ist ein wesentlicher Punkt die Ausbildung eines Blutgefäßnetzes, das die Versorgung des Gewebes übernehmen kann. Wir arbeiten dazu mit einem dreidimensionalen Gewebemodell, in dem die Ausbildung eines kapillarartigen Netzwerkes im konfokalen Laser Scanning Mikroskop dargestellt wird. Wesentliche Gesichtspunkte sind zum einen die Stabilisierung kapillarartiger Strukturen in einem solchen Modell, zum anderen die Funktionalität im Sinne einer verbesserten Oxygenierungs- und Ernährungssituation. In bisherigen Arbeiten wurde die Länge kapillarartiger Strukturen pro Volumeneinheit ausgemessen und als Parameter für Angiogenese und vor allem Stabiliserung der Strukturen über den zeitlichen Verlauf der Kulturen gewählt. Indirekt waren über die Gesamtlänge zusammenhängender Einzelstrukturen auch Aussagen über den Vernetzungsgrad möglich. Diese Daten wurden interaktiv erhoben, die Erhebung ist somit zeitaufwendig und mit Ungenauigkeiten behaftet.

Beim künstlichen Wachstum von Fettgewebe kommt es darauf an, Gewebeproben zu erzeugen, deren Zellen durch ein Geflecht von Kapillaren optimal mit Nährstoffen versorgt werden. Für die Stabilität der Kapillaren ist es notwendig, das diese von Muskelgewebe umschlossen werden. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen ist es notwendig den Bedeckungsgrad der Kapillaroberfläche mit Muskelzellen quantitativ zu bestimmen.

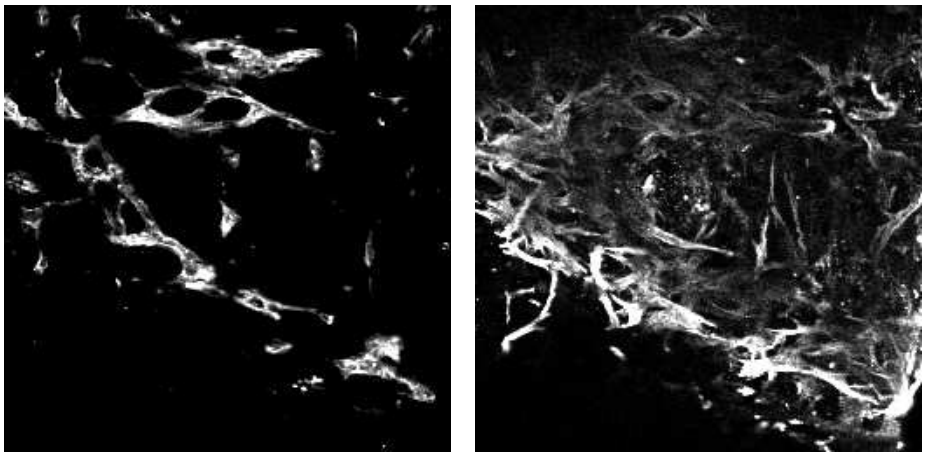

**Abb. 1.** Ein Schnitt durch die Volumedaten der Kapillaren (links) und Muskelzellen (rechts), die Datensätze haben jeweils eine Aufösung von $256 \times 256 \times 41$

## 2 Aufbereitung der Daten und Auswertemethoden

Die Volumendaten liegen in zwei Datensätzen für die Kapillaren und Muskeln vor (Abb. 1). Obwohl die Voxelmengen für der Kapillarvoxel und der Muskelvoxel disjunkt sein sollten, da eine Zelle nicht gleichzeitig Gefäß- *und* Muskelzelle sein kann, kommt es bei den Volumendatensätzen zu einer Überlappung der beiden Voxelmengen. Die Bestimmung des Bedeckungsgrades erfordert daher neben der Reduktion des Rauschens eine simultane Ausheilung der Kapillaren- und Muskelstrkukturen mit der Nebenbedingung, daß am Ende der Ausheilung die Voxelmengen der beiden Datensätze disjunkt sind. Es ist zu beachten, das nur die Bedeckung der Aussenfläche der Kapillaren mit Muskelzellen bestimmt wird und die Innenflächen keinen Beitrag liefern.

Für die Ausheilung und Reduktion des Rauschens wird eine anisotrope nichtlineare Diffusion verwendet [3], welche die Korrelation entlang der Kapillaren erhält und verstärkt. Die Kopplung der Volumendaten für Muskeln und Kapillaren erfolgt dadurch, das die Grauwerte der beiden Datenstätze als Konzentrationen $u_m$ und $u_c$ der Stoffe $M$ und $C$ aufgefasst werden. Beide Stoffe führen neben der Diffusion noch eine chemische Reaktion $C + M \rightarrow C$ mit der Reaktionslaufzahl $k$ aus. Für die Bestimmung des Bedeckungsgrades wird das nichtlineare Reaktions-Diffusionsystem

$$
\begin{aligned}
\frac{\partial u_c}{\partial t}(r,t) &= \overleftarrow{\nabla}\,\hat{\mathcal{D}}_{c,\rho}(u_{c,\sigma})\overrightarrow{\nabla} u_c(r,t) \\
\frac{\partial u_m}{\partial t}(r,t) &= \overleftarrow{\nabla}\,\hat{\mathcal{D}}_{m,\rho}(u_{m,\sigma})\overrightarrow{\nabla} u_m(r,t) - k\,u_c\,u_m \\
u_c(r,0) &= u_{c,0}(r) \\
u_m(r,0) &= u_{m,0}(r) \\
\left.\frac{\partial u_c}{\partial \boldsymbol{n}}\right|_{r\in\Gamma} &= 0, \qquad \left.\frac{\partial u_m}{\partial \boldsymbol{n}}\right|_{r\in\Gamma} = 0
\end{aligned}
$$

$$r \in R^3, \quad t \in [0,T] \quad \{u_c, u_m : R \times R^3 \to R\}$$

über ein Zeitintervall $t \in [0, T]$ integriert. Die $u_{j,\sigma}$ sind dabei die mit einem Gauss-Kern der Breite $\sigma$ gefalteten Konzentrationen $u_j$. Der Diffusionstensor wird so bestimmt, daß die Diffusion in Richtung des Gradienten $u_{j,\sigma}$ unterdrückt wird, eine komponentenweise Faltung des Diffusionstensors mit einem Gauss-Kern der Breite $\rho$ garantiert dabei die Stetigkeit des Diffusionstensors als Funktion des Ortes.

Asymtotisch führt diese Reaktion zur Beseitigung der Muskelvoxel an den Orten, an denen sich Kapillarvoxel befinden. Da das Abfallen der Konzentration der Muskelvoxel während des Diffusionsprozesses erfolgt, wird bei der Rekonstruktion und Maskierung der Muskelvoxel die Umgebung der Voxel und die Kohärenz in den Datenätzen berücksichtigt. Der Diffusionsprozess hat so die Möglichkeit auch Muskelstrukturen zu verstärken, die bei einer direkten Maskierung der Muskeldaten mit den Kapillardaten verloren gehen würden. Da die Konzentration der Muskelzellen nur im Grenzwert $t \to \infty$ durch die Kapillarzellen verschwindet, muss für endliche Zeiten ein Schwellwert $\beta$ gesetzt werden. Voxel mit $u_m \prec \beta$ und $u_c \prec \beta$ werden als Hintergrundvoxel betrachtet.

Für die Bestimmung des Bedeckungsgrades wird das nichtlineare Reaktions-Diffusionsystem über ein Zeitinterval $t \in [0, T]$ integriert. Das äussere Volumen wird durch das markieren der Verbundenen Komponenten des Hintergrundes in den Volumendaten mit der Kapillaren bestimmt, die größte verbundene Hintergrundkomponente wird dabei dem äusseren Volumen zugeordnet. Der Schwellwert $\beta$ dient dazu, ein Voxel als Zelle eines bestimmten Typs identifizieren. Dieser Schwellwert hängt von den Messdaten und von den Parametern der Diffusion ab. Die günstigste Methode zur Festlegung des optimalen Schwellwertes besteht in der Bestimmung des Bedeckungsgrades für einen variierenden Schwellwert. Die maximale Bedeckung legt den optimalen Schwellwert fest (Abb. 3), da bei einem zu geringen oder zu grossen Schwellwert die sich die Aussenflächen der Strukturen nicht berühren und somit kein Beitrag zur Bedeckung liefern. Die Position des optimalen Schwellwertes erweist sich auch für grösse Zeiten stabil.

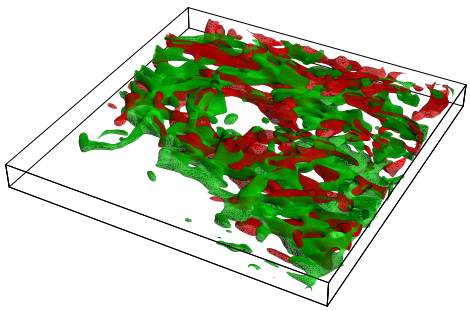

**Abb. 2.** Die Kapillaren (grün/hell) und die Muskeln (rot/dunkel) nach der Glättung und Ausheilung durch den Diffusionsprozess mit $\epsilon = 1 \cdot 10^{-4}$, $\sigma = 0.5$, $\rho = 5$, $k = 0.0003$, $t = 8$

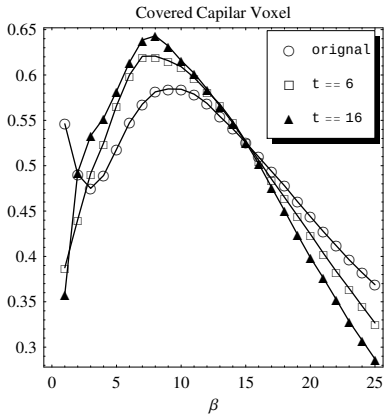


**Abb. 3.** Bedeckungsgrad der Kapillaroberfläche in Abhängingkeit vom Schwellwert $\beta$ für die beiden Konzentrationen für die Diffusion bei $t = 0, 6\, t = 16$ und Zeiteinheiten

## 3 Schlussfolgerung

Der Diffusionsprozess reduziert das Rauschen in den Bildern ohne dabei die Struktur des Kapillargeflechtes zu zerstören. Die dreidimensionale Rekonstruktion der beiden Geflechte (Abb. 2) ermöglicht eine qualitative Bewertung des Wachstumsprozesses. Die Muskelvoxel werden im Verlaufe der Diffusion aus Regionen entfernt, in denen Kapillarvoxel vorhanden sind. Nach Ablauf der anisotropen Diffusion kann der Bedeckungsgrad der Kapillaroberfläche in den betrachteten Datensätzen $\approx 0.63$ bestimmt werden.

Die entwickelte Methode der Kopplung zweiter anisotroper Diffusionsprozesse über ein Reaktionssystem ermöglicht eine Quantifizierung des Wachstums der Kapillaren aus den Volumendatensätzen und kann dazu benutzt werden, die Wachstumsbedingungen für das Gewebe zu optimieren.

## References

1. Frerich B, Kurtz-Hoffmann J, Lindemann N, Müller S: Untersuchungen zum Tissue engineering vaskularisierter knöcherner und weichgewebiger Transplantate. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 4 Suppl 2:490-2495, 2000
2. Frerich B, Lindemann N, Kurtz-Hoffmann J, Oertel, K: In vitro vascular stroma model for the engineering of vascularized tissues. Int J Oral Maxillofac Surg, angeommen, 2000
3. Weickert J: Anisotroptic Diffusion in Image Processing. Teubner, Stuttgart, 1998.