

Automatische detectie van schade in skeletspierweefsel

Citation for published version (APA):

Kerckhoffs, R. C. P. (1997). *Automatische detectie van schade in skeletspierweefsel*. (DCT rapporten; Vol. 1997.053). Technische Universiteit Eindhoven.

Document status and date:

Gepubliceerd: 01/01/1997

Document Version:

Uitgevers PDF, ook bekend als Version of Record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.tue.nl/taverne

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

openaccess@tue.nl

providing details and we will investigate your claim.

Verslag interne stage WFW
25 juni 1997

Technische Universiteit Eindhoven

**Automatische detectie
van schade in
skeletspierweefsel**

R.C.P. Kerckhoffs

WFW report 97.053
Juni 1997

Faculteit Werktuigbouwkunde

Vakgroep Fundamentele Werktuigkunde

Stageperiode maart 1997 - juni 1997

Auteur: *R. Kerckhoffs*

Begeleiders: *C. Bouten*
C. Oomens
R. Petterson

Samenvatting

Om meer inzicht te krijgen in de oorzaak van decubitus (drukwonden) zijn aan de Universiteit Maastricht dierproeven met ratten uitgevoerd. Bij een onder narcose gebrachte rat wordt een mechanische belasting aangebracht op de voorste scheenbeenspier (m. tibialis anterior) en bovenliggende huid. De spier zal als gevolg hiervan beschadigd raken. Nadat de spier uit het diertje gehaald is en enkele bewerkingen ondergaan heeft (o.a. gekleurd met tuolidine blauw), wordt deze ingebed in plastic en in langsdoorsnede in plakjes (coupes) gesneden.

Schade - gedefiniëerd als degeneratie van huid en onderliggend weefsel als gevolg van een opgelegde mechanische belasting (National Pressure Ulcer Advisory Panel, 1989) - kan men onderverdelen in 2 soorten: primaire schade en secundaire schade. Primaire schade treedt na ongeveer 2 uur belasting (≥ 3 kPa) op en kenmerkt zich door het verdwijnen van dwarsstreping (kenmerkend voor skeletspiervezels) bij een vergroting van minstens 400x. Bij een lagere vergroting onderscheidt schade zich van gezond weefsel door een lichtere kleur. Na ongeveer een etmaal komen mononucleaire cellen het beschadigd weefsel opruimen. Het aanwezig zijn van deze infiltraten noemt men secundaire schade.

In deze coupes (zo'n 100 per spier) kan de opgetreden schade met behulp van een lichtmicroscop gelocaliseerd en gekwantificeerd worden. Het is echter gigantisch veel werk om dit met de hand te doen. Om schade automatisch te detecteren en te kwantificeren kan gebruik gemaakt worden van een digitaal beeldverwerkingssysteem. Na automatisering kan een optimum gezocht worden tussen meetnauwkeurigheid en praktisch gebruik hiervan in tegenstelling tot het handwerk.

Per coupe zijn gemiddeld 35 beeldjes van 512 bij 512 pixels nodig, indien een vergroting van ± 50 wordt toegepast. Hogere vergrotingen hebben meer beeldjes met meer geheugenruimte tot gevolg. Bij lagere vergrotingen is de schade nauwelijks waar te nemen.

Om schade bij de betreffende vergroting te onderscheiden van gezond weefsel kan er o.a. gebruik gemaakt worden van 2 detectie-methoden: thresholding en template-matching.

In het geval van thresholding maakt men gebruik van verscheidene grijswaarde-grenswaarden, waarmee een beeld gebinariseerd (uitsluitend wit en zwart) gemaakt wordt. Schade wordt bijvoorbeeld wit, gezond weefsel zwart.

Wanneer men gebruik maakt van template-matching, maakt men van een schadegebiedje een mini-beeldje: een template. Met behulp van 2 dimensionale correlatie wordt de template vergeleken met een coupe-beeldje. Daar waar schade aanwezig is, berekent men een hoge correlatie. Waar schade afwezig is een lage correlatie. Ook hier wordt tenslotte gebinariseerd: gebiedjes met een correlatie hoger dan 0,99 worden wit, de rest zwart.

Bovenstaande methoden hebben enkele nadelen. Indien op meer plaatsen in de spier tinten voorkomen die gelijk zijn aan de kenmerkende schade-tint, worden deze gebieden bij de toepassing van thresholding tot beschadigd weefsel gerekend. Het is namelijk moeilijk om coupes geheel homogeen te kleuren. Tevens is het automatisch instellen van een threshold erg moeilijk, omdat niet alle coupes volledig op dezelfde manier geprepareerd en gedigitaliseerd (bijv. belichting) worden.

Omdat schade nogal homogeen van kleur is, levert dit problemen op voor het template-matching. Men detecteert dan namelijk alle homogene gebieden in een coupe.

De template-match methode is erg geheugen- en rekenintensief en leidt niet tot bevredigende resultaten, doordat er erg veel schade gedetecteerd wordt die er niet is. Ook bij het thresholding kan er teveel schade gedetecteerd worden, echter niet zoveel als bij het template-matching. Het instellen van de thresholds gebeurt nog handmatig, maar zal indien mogelijk ook geautomatiseerd moeten worden, om het handwerk tot een minimum te beperken.

Inhoud

Samenvatting	ii
Inhoud	iii
Inleiding	v
Probleemstelling	v
Doelstelling	v
1. Skeletspieren	7
1.1 Anatomie	7
1.1.1 Spiervezels	7
1.1.2 Myofibrillen	7
1.1.3 Myofilamenten	8
1.1.4 Nomenclatuur	8
1.2 Beschadigd skeletspierweefsel	9
1.3 Preparering coupes	9
2. Digitale beeldverwerking	10
2.1 Image digitization	10
2.2 Image enhancement	11
2.2.1 Punt bewerkingen	11
2.2.2 Buur bewerkingen	11
2.2.2.1 Convolutie	11
2.2.2.2 Correlatie	12
2.2.2.3 Niet-lineaire filters	13
2.2.3 Morfologische bewerkingen	13
2.3 Image segmentation	13
3. Detectie van schade	14
3.1 Eisen	14
3.1.1 Toegepaste beelden	14
3.2 Detectie-methoden	15
3.2.1 Fourier-analyse	15
3.2.2 Thresholding	15
3.2.2.1 Procedure	16
3.2.3 Template-matching	16
3.2.3.1 Wraparound error	16
3.2.3.2 Aliasing	17
3.2.3.3 Template-homogeniteit	17
3.2.3.4 Procedure	17
Resultaten	18
Discussie	20

Conclusie	21
Aanbevelingen	22
Literatuurlijst	23
Internet-adressen	23
Bijlage 1: Thresholding. Detectie van primaire schade.	24
Bijlage 2: Voorbeeld data file van thresholdmethode	26
Bijlage 3: Voorbeeld data file van template matching	27
Bijlage 4: Origineel beeld en schade-beeld van coupe 880 m.b.v. thresholding	28
Bijlage 5: Origineel beeld en schade-beeld van coupe 880 m.b.v. template matching	29
Bijlage 6: Origineel beeld en schade-beeld van testcoupe 925 m.b.v. thresholding	30

Inleiding

Skeletspieren zullen beschadigd raken, indien zij gedurende een bepaalde tijd extern mechanisch belast (dat wil zeggen druk van buitenaf, uitgeoefend op huid en onderliggende weefsels) worden. Wanneer deze belasting voor een langere periode blijft aanhouden (enkele uren) kunnen deze beschadigingen extreme vormen aannemen en er ontstaan zgn. doorligwonden (decubitus). Dit fenomeen doet zich relatief veel voor bij ziekenhuisverblijf (bij langdurig bedverblijf, maar ook op de operatietafel), in de geriatrie, de orthopedie en de revalidatie. Hoe decubitus precies ontstaat is nog onbekend. Ook de kosten die gemoeid zijn met decubitus (verlengde verpleging, speciale bedden) kunnen aanzienlijke proporties aannemen (Haalboom, 1990; Molleman, 1995). Meer inzicht in het ontstaan van deze wonden is dan ook noodzakelijk.

De hypothese is dat een langdurig aangehouden externe drukbelasting leidt tot een herverdeling van vloeistof en een verandering van de concentraties moleculen en ionen in de interstitiële ruimte tussen cellen en capillairen. Hierdoor wordt de toevoer van voedingsstoffen en afvoer van afvalstoffen belemmerd. Twee strategieën worden aangewend om de hypothese te toetsen. De eerste is toetsing aan de hand van dierproeven, de tweede de ontwikkeling van een computermodel van huid, onderhuids vet- en spierweefsel, waarin verbanden tussen externe mechanische belasting en de in het weefsel optredende mechanische verschijnselen worden beschreven.

In het kader van de eerste strategie zijn er aan de Universiteit Maastricht dierproeven uitgevoerd, waarbij ratten verscheidene mechanische belastingen kregen opgelegd - verschillend in duur en intensiteit - door middel van een drukstaafje op de m. tibialis anterior. Na ongeveer 24 uur werden ze opgeofferd en haalde men de spieren uit de ratten, waarvan men vervolgens coupes (dikte 3 micron, om de 20-30 micron) van de langsdoorsnede maakte, om histologisch onderzoek uit te kunnen voeren.

Na een korte belasting blijkt al schade in de spier op te treden. Deze zgn. primaire schade kenmerkt zich door het kapotgaan van spiervezels en daarmee het verdwijnen van de typische dwarsstreping van skeletspieren. Na een langere tijd doet zich een volgend verschijnsel voor, waarbij infiltratie van mononucleaire cellen (voornamelijk macrofagen) optreedt die het beschadigde weefsel komen opruimen. Dit noemt men ook wel secundaire schade.

Probleemstelling

Al deze coupes - per spier al snel zo'n 100 stuks - moeten worden gecontroleerd op de aanwezigheid van primaire en secundaire schade. De schade zal ook moeten worden gekwantificeerd - oppervlakte van primaire schade en aantal macrofagen - welke gerelateerd wordt aan de grootte en duur van de belasting. Dit werk zal met de hand uren tijd kosten.

Doelstelling

Automatisering van:

- Lokalisering van primaire schade;
- absolute en evt. relatieve kwantificering van primaire schade;
- kwantificeren van secundaire schade, evt. in relatie tot het primaire schade-oppervlak

met behulp van een beeldverwerkingssysteem, zodat een optimum gezocht kan worden tussen

meetnauwkeurigheid en praktisch gebruik in tegenstelling tot het handwerk.

In het volgend hoofdstuk wordt de anatomie van skeletspieren en de beschadiging van skeletspierweefsel nader bekeken. Ook de preparering van de coupes zal kort worden besproken. In het hoofdstuk daarna wordt digitale beeldverwerking behandeld. Vervolgens wordt er verder ingegaan op de detectie van schade in spieren en worden enkele detectie-methoden besproken.

1. Skeletspieren

1.1 Anatomie

Spiers, die verantwoordelijk zijn voor kracht en beweging, zijn opgebouwd uit gedifferentieerde cellen. Er zijn 3 soorten spierweefsel te onderscheiden: gladde spieren, hartspierweefsel en skeletspieren of dwarsgestreepte spieren.

Omdat de m. tibialis anterior een skeletspier is, zal alleen de bouw van de dwarsgestreepte spieren besproken worden .

1.1.1 Spiervezels

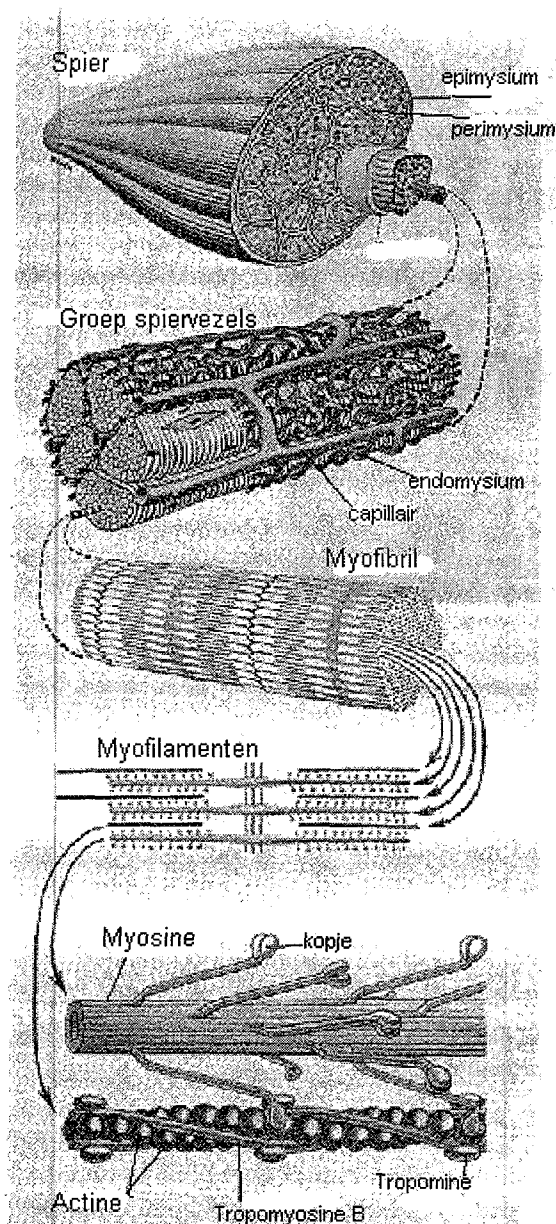
De dwarsgestreepte spieren zijn door pezen of peesbladen verbonden met de bewegende delen van het lichaam. In de meeste spieren lopen de spiervezels van pees tot pees, maar bij lange spieren eindigen of ontspringen zij aan bindweefselsepta in de spierbuik (Lohman, 1995).

De vezels zijn altijd in bundels (fasciculi) gelegen en verschillende bundels vormen een spierbuik. Deze wordt omgeven door een bindweefselmembraan, het epimysium of de spierfascie. Ook in het inwendige van de spierbuik bevindt zich bindweefsel tussen de spierbundels (het perimysium) en tussen de vezels van de bundels (het endomysium). Dit bindweefsel omgeeft en geleidt tevens de bloedvaten en zenuwen.

De 10 tot 100 micrometer dikke vezels zijn multinucleaire cellen die sarcoplasma en myofibrillen bevatten. De membraan van de spiercel noemt men het sarcolemma. De spierkernen liggen tegen het sarcolemma aan, aan de buitenzijde van de spiervezel en zijn ovaalvormig in de richting van de vezel. Een spiervezel is opgebouwd uit vele myofibrillen.

1.1.2 Myofibrillen

De dunne myofibrillen (ongeveer 1 micrometer dik) lopen over de gehele lengte van de spiervezel en liggen regelmatig door de gehele spiervezel verspreid. Lichtmicroscopisch vertonen zij over hun gehele lengte afwisselend lichte en donkere gedeelten: de dwarsstreping (zie figuur 1.2). De donkere gedeelten zijn optisch anisotroop en worden daarom A-banden genoemd, in tegenstelling tot de optisch isotrope lichte gedeelten: de I-banden. Het midden van de A-band, die iets lichter dan de beide zijden is, wordt H-zone genoemd, naar zijn ontdekker Hensen. De I-banden worden in het midden met elkaar verbonden door



Figuur 1.1: Anatomie van de spier (Vankan, 1996)

donkere, dwarslopende lijnen: de Z-lijnen. Deze verdelen de myofibril in een aantal segmenten of sarcomeren die een lengte hebben tussen de 2 en 3 micrometer.

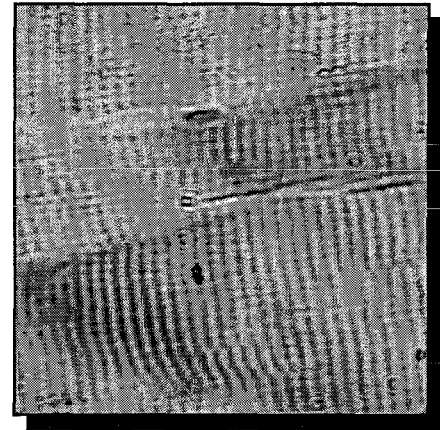
1.1.3 Myofilamenten

Uit elektronenmicroscopische opnamen is gebleken dat iedere myofibril weer is opgebouwd uit nog fijnere vezelstructuren, de myofilamenten. Hiervan kunnen twee typen worden onderscheiden: dikke filamenten (15 nm), die opgebouwd zijn uit het eiwit myosine, en dunne filamenten (5 a 6 nm), die overwegend uit het eiwit actine zijn opgebouwd.

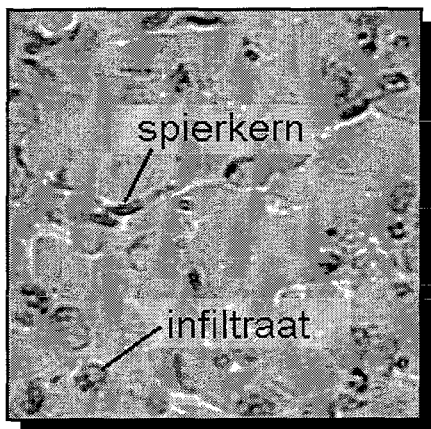
De beide typen filamenten overlappen elkaar gedeeltelijk, waardoor de dwarse streping te verklaren is die met een lichtmicroscop te zien is. In de I-band zijn alleen de dunne filamenten aanwezig. In de A-band zowel dunne als dikke. De dunne filamenten lopen echter niet door de H-zone, waardoor deze zone te zien is.

Tussen de beide filamenten, bevestigd aan de myosinefilamenten, komen op regelmatige afstanden schuine dwarsverbindingen voor.

De door Huxley in de jaren vijftig opgestelde hypothese, waarbij wordt aangenomen dat tijdens contractie de dikke en dunne filamenten niet veranderen van lengte, maar in elkaar schuiven, is nu algemeen aanvaard. De dunne filamenten komen verder in de A-band te liggen: de H-zone wordt steeds smaller totdat deze geheel verdwijnt. Op een gegeven moment kunnen bij verdere verkorting de dunne filamenten elkaar zelfs gaan overlappen. Het glijden van de filamenten komt tot stand door de tussenliggende dwarsverbindingen die, telkens hun aangrijpingspunt verplaatsend, de filamenten in elkaar doen schuiven, waarbij calcium een grote rol speelt. Deze filament-beweging is echter nog niet volledig begrepen.



Figuur 1.2: Dwarsstreping (500x)



Figuur 1.3: Beschadigd spierweefsel (500x)

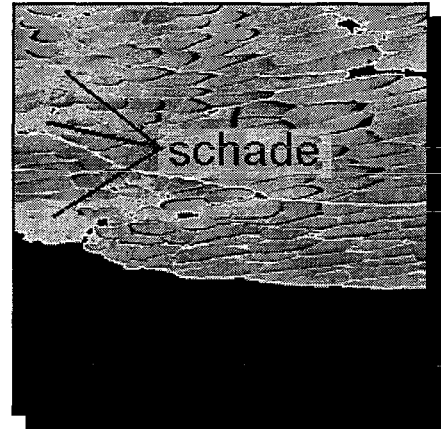
1.1.4 Nomenclatuur

Namen van spieren zijn willekeurig gekozen. Sommige duiden een plaats of ligging aan (m. subclavius, m. tibialis anterior), andere een bepaalde vorm (m. deltoideus) of een bepaalde functie (m. levator scapulae). Ook de grootte van een spier kan in de naam verwerkt zijn (m. latissimus dorsi) of het aantal koppen, waarmee de spierbuik van het skelet of andere structuren ontspringt (m. biceps brachii). Combinaties van aanduidingen komen ook voor.

De musculus tibialis anterior bevindt zich aan de voorzijde (anterior zijde) van het scheenbeen (tibia) in de achterpoot van de rat. Deze spier is gekozen omdat zij onder huid en tegen de tibia aanligt, zodat bij belasting met stempel de spier gecompriëerd wordt tussen stempel en tibia. Bovendien is deze spier gemakkelijk uit te nemen, eenvoudig van structuur en niet al te groot om het histologisch onderzoek te vereenvoudigen.

1.2 Beschadigd skeletspierweefsel

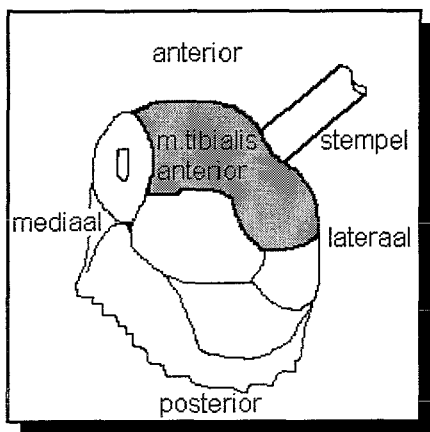
Schade (degeneratie van huid en onderliggend weefsel, veroorzaakt door een langdurige mechanische belasting) uit zich primair in beschadiging van de myofibrillen en van het cytoskelet na ongeveer 2 uur. Spiervezels verdwijnen en daarmee de dwarsstreping bij een vergroting van 500 (zie figuur 1.3). Bij een lagere vergroting (50x) heeft beschadigd weefsel een homogeen uiterlijk en is lichter van kleur in vergelijking met omliggend gezond weefsel (zie figuur 1.4). Na ongeveer een etmaal komen infiltraten (o.a. macrofagen met een diameter van 4 tot 6 μm) het beschadigde weefsel opruimen. Dit zijn de secundaire gevolgen van de belasting.



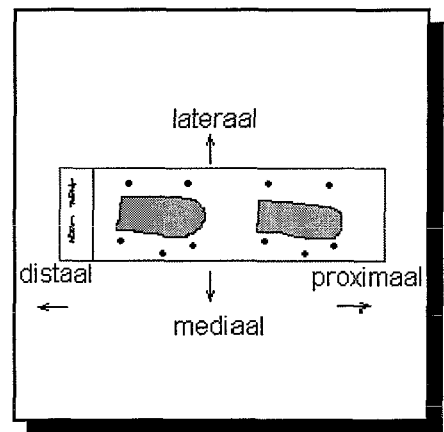
Figuur 1.4: Beschadigd spierweefsel (50x)

1.3 Preparering coupes

In figuur 1.5 is een dwarsdoorsnede getekend van het onderbeen van de rat met daarin de m. tibialis anterior donker weergegeven. Deze spier wordt uitgenomen en losgemaakt van de pezen aan de uiteinden. Na wat bewerkingen wordt de spier gekleurd met tuolidine blauw en ingebed in een polymeer met de anterior zijde naar boven. Hiervan worden vervolgens in lengterichting om de 30 micron plakjes gesneden van 3 micron dik. Daar waar schade verwacht wordt (in het gebied in de buurt van de stempel) wordt er om de 20 micron gesneden. Teseamen met de spier zijn er ook 5 grafietstaafjes aan weerszijden ingebed, loodrecht op de snijrichting, zodat later de onderlinge ligging van de coupes later gereconstrueerd kan worden. In figuur 1.6 is een microscoopglasje getekend met daarop 2 coupes. De coupes zijn in het midden van de spier ongeveer 15 mm lang.



Figuur 1.5: Dwarsdoorsnede achterpoot rat met daarin de m. tibialis anterior donker gekleurd. Mediaal = binnenkant, lateraal = buitenkant, anterior = voorzijde, posterior = achterzijde



Figuur 1.6: Twee coupes. Distaal = richting lijf, proximaal = richting uiteinde poot

2. Digitale beeldverwerking

Grofweg gezegd is digitale beeldverwerking het manipuleren van beelden met behulp van computers. Een beeld is een representatie van de werkelijkheid. Omdat een computer numerieke waarden nodig heeft om te kunnen werken, wordt een beeld opgedeeld in kleine discrete deelgebiedjes, pixels genaamd (picture elements). Een pixel kan meerdere getallen bevatten, welke de lichtintensiteit weergeeft op die bepaalde plek van het beeld. Een grijswaarden-beeld wordt voorgesteld als een 2 dimensionale functie $f(x,y)$, waarin de grijswaarden worden aangegeven als functie van de plaats (x,y) . In het geval van de digitale beeldverwerking zijn $f(x,y)$, x en y discreet. De hoogte en breedte van een beeld worden in aantal pixels gegeven, waarbij het nulpunt in de linkerbovenhoek ligt met de x -as meestal verticaal en de y -as horizontaal, zoals de aanduiding van elementen in een matrix. Beelden worden normaliter als matrices behandeld. Dit is echter sterk afhankelijk van het toegepaste beeldverwerkingsprogramma. Het aantal waarden van de pixels in f is meestal een macht van 2. In berekeningen wordt zwart meestal op 0 gesteld en wit op 1. Alles daartussenin zijn meestal grijsstinten, opgeslagen als een 8 bits integer, zodat er 256 discrete waarden beschikbaar zijn.

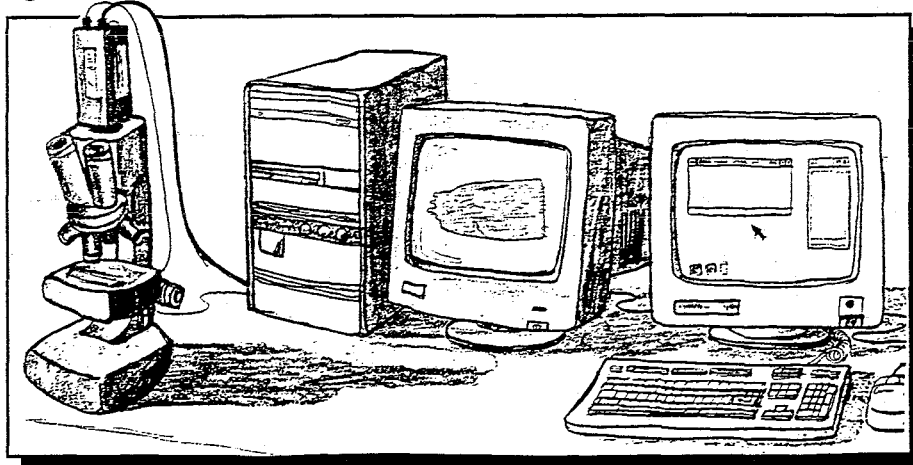
Beelden kunnen in het plaatsdomein - de normale representatie van een beeld - of in het frequentiedomein (door middel van een 2 dimensionale discrete Fourier-transformatie) bewerkt worden. In principe kan elke bewerking in allebei de domeinen uitgevoerd worden. Welk domein wordt toegepast is voornamelijk afhankelijk van de bewerkingssnelheid.

De Fouriertransformatie is oorspronkelijk bedoeld voor oneindige functies. Omdat beelden eindig zijn gaat na een transformatie (weinig) informatie verloren en is volledige reconstructie van het origineel onmogelijk.

Verder kan het beeld-analytisch terrein in 3 gebieden worden ingedeeld:

- 1) Image digitization;
- 2) image enhancement;
- 3) image segmentation. (Gonzales & Wintz, 1977).

2.1 Image digitization



Figuur 2.1: Opstelling

De werkelijkheid moet ten eerste gevangen worden in een toestand waarmee computers kunnen werken. Hiervoor zijn vele apparaten beschikbaar en de eerste stap van werkelijkheid naar digitaal beeld is de zwart/wit CCD-camera (Charged Coupled Device). Deze camera bevat vele lichtgevoelige cellen, gerangschikt in een matrix-patroon. Het analoge beeld dat op deze matrix geprojecteerd wordt door middel van een lensstelsel wordt gesampled/gedigitaliseerd door deze cellen. Elke cel levert 1 intensiteit (grijswaarde) voor 1 pixel. In figuur 2.1 staat het principe van de opstelling afgebeeld, waarmee de beelden van de coupes gemaakt zijn.

Een CCD-camera, gemonteerd op een lichtmicroscop is verbonden met een frame-grabber dat zich in een PC bevindt. Voor de representatie van de inhoud van de frame-grabber is meestal een 2e monitor aanwezig.

2.2 Image enhancement

Image enhancement, oftewel beeldversterking, bestaat uit het op een bepaalde manier bewerken van beelden, zodat het bruikbaar wordt voor een specifieke toepassing. Het image enhancement kan weer onderverdeeld worden in 3 deelgebieden, naar de soort van de bewerking. Deze zijn:

- Punt bewerkingen (point operations);
- buur bewerkingen (neighbourhood operations);
- morfologische bewerkingen.

2.2.1 Punt bewerkingen

Dit zijn bewerkingen die betrekking hebben op 1 pixel, onafhankelijk van andere pixels. Voorbeelden van puntbewerkingen zijn:

- De inverse van een beeld: $g(x,y) = 1 - f(x,y)$. Deze bewerking heeft betrekking op 1 beeld en men noemt dit dan ook een *unary* bewerking.
- Logische operatoren, zoals logische AND, OR, XOR, enz. Hiervoor zijn 2 beelden nodig en heet een *binary* bewerking.
- Thresholding. Hiermee wordt het beeld 2 kleurig (meestal zwart en wit) gemaakt door het beeld een bepaalde grijswaarde-grens (threshold) op te leggen. Alle grijswaarden boven deze threshold worden wit, alles daaronder zwart. Het beeld wordt *binair* maar de bewerking heet *unary*, omdat ook deze bewerking - net als de inverse - maar betrekking heeft op 1 beeld.

2.2.2 Buur bewerkingen

Dit zijn bewerkingen op een pixel, waarbij zijn buurpixels meegenomen worden in de berekening. Twee lineaire voorbeelden zijn 2 dimensionale convolutie en correlatie.

2.2.2.1 Convolutie

Convolutie is een krachtige bewerking waarmee vele resultaten bereikt kunnen worden. Weegwaarden in een mask, masker, window of venster $w(x,y)$ van bepaalde afmetingen (bijv. 3×3 pixels, in ieder geval met oneven afmetingen, zodat er altijd een middelste pixel bestaat) worden met $x(x,y)$ binnen het beeld $f(x,y)$ vermenigvuldigd, voor elke pixel binnen $f(x,y)$. Alvorens deze

1	1	1	-1	-2	-1	0	-1	0
1	1	1	0	0	0	-1	4	-1
1	1	1	1	2	1	0	-1	0
	a		b			c		

Figuur 2.2: 3 bij 3 vensters: a) Smoothing (uniform filter) b) Verticale gradiënt c) 2e afgeleide berekening (Laplace)

bewerking plaatsvindt, wordt het venster eerst gespiegeld. Deze vermenigvuldigen worden vervolgens allemaal bij elkaar opgeteld. Dit resultaat is de nieuwe pixelwaarde op de plaats waar het venster zich bevindt. De formule luidt:

$$C_{x,y} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n f(i,j) \cdot w(i,j)$$

Met behulp van convolutie kunnen beelden wazig (smoothed, fig 2.2a) of scherp (sharpened) gemaakt worden (dit is resp. low-pass filtering en high-pass filtering). Men kan lijnen detecteren, gradiënten (fig 2.2b) en 2e afgeleiden berekenen (fig 2.2c). Bij het smoothen middelt men meerdere pixels die binnen het venster liggen. Bij het verscherpen worden verschillen tussen de middelste pixel en de omliggende pixels in rekening gebracht.

Convolutie is echter een zeer rekenintensieve operatie. Voor een m bij n venster zijn er $m \cdot n$ vermenigvuldigingen nodig en $m \cdot n - 1$ sommen *per* pixel van een beeld. Stel we hebben een beeld met afmetingen van 512 bij 512 pixels en een venster met afmetingen 15 bij 15. Er zijn dan $15^2 \cdot 512^2 = 58\,982\,400$ vermenigvuldigingen en $(15^2 - 1) \cdot 512^2 = 58\,720\,256$ sommen nodig. In totaal zijn dit bijna 118 miljoen bewerkingen en is dus erg tijdrovend!

Convolutie in het plaatsdomein komt echter overeen met vermenigvuldiging in het frequentie-domein en andersom. Het convolutie-theorema luidt als volgt:

$$\begin{aligned} f(x,y) \circledast w(x,y) &\Leftrightarrow F(u,v) W(u,v) \\ f(x,y) w(x,y) &\Leftrightarrow F(u,v) \circledast W(u,v) \end{aligned}$$

Hierin is f het beeld, w het venster, F de Fourier getransformeerde van f en W de Fourier getransformeerde van het venster.

Wanneer men een 2 dimensionaal FFT-algoritme (Fast Fourier Transform) toepast op allebei de matrices om naar het frequentiedomein te gaan, hier de getransformeerden elementsgewijs met elkaar vermenigvuldigt en tenslotte weer terugtransformeert, spaart men tijd. De afmetingen van de matrices moeten dan een macht van 2 zijn. Het aantal bewerkingen voor het FFT-algoritme is $n^2 \log n$, waarbij n het aantal elementen in de matrix voorstelt. In ons voorbeeld hebben we nu nog slechts $3 \cdot (512^2)^2 \log(512^2) + 512^2 = 14\,417\,920$ berekeningen. Op deze manier zijn we dus een factor 8 sneller. Het venster moet daarbij nog met nullen aangevuld worden tot de afmeting van het beeld bereikt is, zodat de Fourier-getransformeerde matrices dezelfde grootte hebben en ze elementsgewijs met elkaar vermenigvuldigd kunnen worden.

2.2.2.2 Correlatie

Correlatie is zeer nauw verwant aan convolutie. Het enige verschil is dat het venster niet gespiegeld wordt van tevoren en het resultaat van een correlatie wordt meestal genormeerd, zodat - net als in de statistiek - de uiteindelijke uitkomsten tussen 0 en 1 liggen. Wanneer de inhoud van het venster puntsymmetrisch is, is correlatie - zonder normering - identiek aan convolutie. De formule is:

$$R_{x,y} = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n f(i,j) \cdot w(i,j)}{\sqrt{\sum f[i,j]^2} \sqrt{\sum w[i,j]^2}}$$

Meestal bevat het venster zelf een kleine afbeelding en men noemt deze methode dan template matching. Ook deze bewerking kan in het frequentie-domein plaatsvinden met behulp van het correlatie-theorema:

$$\begin{aligned} f(x,y) * w(x,y) &\Leftrightarrow F(u,v) W^*(u,v) \\ f(x,y) w^*(x,y) &\Leftrightarrow F(u,v) * W(u,v) \end{aligned}$$

Correlatie van f met w in het plaatsdomein komt overeen met elementsgewijze vermenigvuldiging in het frequentiedomein van de Fourier getransformeerde F met de complex geconjugeerde Fourier getransformeerde W^* . Ook hier gaat het correleren een stuk sneller wanneer er van het FFT-algoritme gebruik gemaakt wordt.

2.2.2.3 Niet-lineaire filters

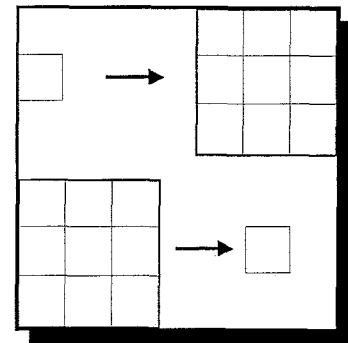
Voorbeelden van niet-lineaire smoothing-filters zijn het maximum-, minimum-, mediaan- en het kuwara-filter, waarbij de eerste 3 nauw aan elkaar verwant zijn: ten eerste worden alle pixels binnen het weeggebied van lage naar hoge waarde gerangschikt. De pixel in het midden van het venster krijgt vervolgens resp. de hoogste, laagste of middelste waarde. Het kuwara-filter werkt hetzelfde als het uniform-filter, waarbij echter gebruik wordt gemaakt van een grenswaarde (threshold). Als het verschil van het berekende gemiddelde met de originele pixelwaarde te groot is, blijft de pixel zijn originele waarde behouden. Op deze manier gaan scherpe overgangen niet verloren.

Voor het verwijderen van ruis kunnen het beste de niet-lineaire filters gebruikt worden, omdat de lineaire filters extreme pixelwaarden niet volledig verwijderen, maar deze "uitsmeren".

2.2.3 Morfologische bewerkingen

Dit soort operaties hebben betrekking op binaire beelden (beelden met wit en zwart). Ze beïnvloeden - zoals de naam al zegt - vormen in een beeld. Aan elkaar gekoppelde witte pixels worden tot 1 object gerekend. In een beeld kunnen natuurlijk meerdere objecten voorkomen. Er zullen in het kort maar 2 morfologische bewerkingen besproken worden: erosie en dilatatie.

Erosie is het verwijderen van randpixels - witte pixels die grenzen aan zwarte pixels - van een object. Deze pixels worden zwart: het object krimpt. Dilatatie is het omgekeerde: aan de rand van een object worden zwarte pixels wit gemaakt: het object wordt groter. Wanneer eerst een of meerdere erosie(s) plaatsvinden, gevolgd door een of meerdere dilatatie(s), noemt men deze operatie "opening": kleine objecten zullen namelijk geheel verdwijnen als gevolg van het eroderen. Na dilatatie zijn er dan geen pixels meer om pixels aan toe te voegen. De objecten zijn gewist. Wordt de omgekeerde volgorde toegepast, noemt men de operatie - geheel verrassend - "closing". Gaten in objecten verdwijnen als gevolg van het dilateren. Na erosie krijgt het object zijn normale afmetingen terug, maar de gaten blijven weg.



Figuur 2.3: Dilatatie (boven) op 1 pixel en erosie (onder).

2.3 Image segmentation

Het doel van segmentatie is het beeld onderverdelen in gebieden die een bepaalde overeenkomst vertonen. In deze context is het scheiden van gezond en beschadigd weefsel hier een voorbeeld van.

De volgende 2 segmentatie-methoden zijn al als bewerking behandeld in vorige paragrafen:

- Thresholding (§2.2.1) en
- template matching (§2.2.2).

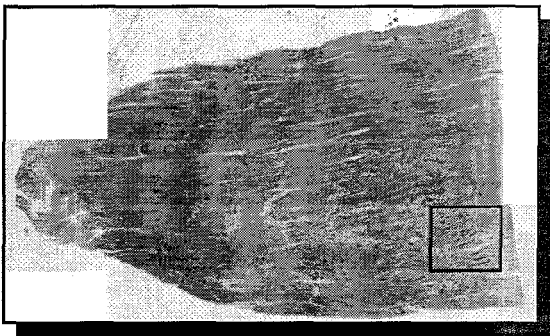
3. Detectie van schade

Er zijn verschillende mogelijkheden om te komen tot de uiteindelijke scheiding van gezond en beschadigd spierweefsel door middel van het analyseren van beelden en de kwantificatie hiervan. Eerst zullen eisen worden gesteld aan de kwaliteit van de beelden, welke sterk afhankelijk is van de apparatuur waarmee zij gemaakt worden. Daarna worden verscheidene mogelijkheden besproken en verder uitgewerkt.

3.1 Eisen

De spier moet met voldoende resolutie en vergroting gediscetiseerd worden om infiltraten te detecteren. Dit stelt niet alleen eisen aan de discrete resolutie van de camera ($n \times n$ pixels), maar ook aan het onderscheidend vermogen van de microscooplenzen.

De vergroting mag ook niet te groot zijn, omdat anders teveel beelden nodig zijn om een volledige coupe (lengte ± 15 mm) te digitaliseren. Een klein voorbeeldje: voor een 50-voudige vergroting zijn er bijna 40 beelden nodig. Bij een vergroting van 500 zijn dan per coupe 4000 beelden nodig. 100 coupes per spier betekent 400 000 beelden per spier!



Figuur 3.1: Totaalbeeld van een coupe. Het vierkant omgeeft een van de 36 beelden, welk in figuur 3.2 is afgebeeld

3.1.1 Toegepaste beelden

De uiteindelijke beelden (in TIFF-formaat) zijn bij de vakgroep Anatomie en Embryologie aan de Universiteit Maastricht gedigitaliseerd met behulp van een hoge-resolutie Leika microscoop en CCD-camera. Er zijn in totaal 10 coupes gedigitaliseerd van een linkerpoot, die gedurende 2 uur belast werd met 3 kPa. De spier werd na 18 uur uitgenomen en bevat dus infiltraten. Tevens is er 1 controle-coupe gedigitaliseerd van de rechterpoot die niet belast werd. In totaal zijn er meer dan 300 beelden gemaakt. Zij hebben een resolutie van 512 bij 512 pixels en een diepte van 256 grijswaarden. De beelden zijn zo nauwkeurig mogelijk (op 2 á 3 pixels) gescand, zodat als ze naast elkaar gelegd worden de gehele coupe

reconstrueren. Het digitaliseren van elk beeldje is nog met de hand gebeurd. Later zal dit mogelijk zijn met behulp van een automatische xy-tafel. De beelden zijn genoemd naar de plaats van de coupe in de spier (in micrometer) plus een beeldnummer (bijv. c850-2.TIF, c850-3.TIF, c1030-36.TIF). Ze krijgen een vast nummer, afhankelijk van hun plaats, zodanig dat ze als totaalbeeld in een 5 bij 10 "matrix" gerangschikt kunnen worden. De bovenste rij beelden loopt van *rechts naar links* van 1 tot 10, de volgende rij ook van rechts naar links van 11 tot 20, enz. Zie figuur 3.1 voor een totale coupe.

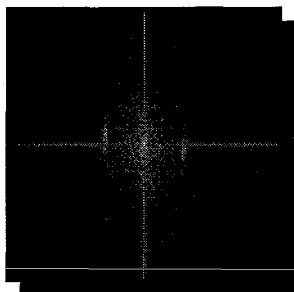
3.2 Detectie-methoden

Met de specifieke schade-kenmerken in het achterhoofd zijn er enkele manieren te bedenken om deze te detecteren:

- Fourier-analyse met betrekking tot afwezigheid van dwarsstreping en vezels;
- Thresholding met betrekking tot afwijkende kleur van beschadigd weefsel. Ook infiltraten (en spierkernen) kunnen op deze manier gedetecteerd worden;
- Template-matching (met behulp van correlatie).

3.2.1 Fourier-analyse

Door een Fourier-transformatie te maken van een beeld waarin dwarsstreping aanwezig is, ontstaan er piekjes bij de frequentie van het aantal sarcomeren dat zich in het beeld bevindt. Wanneer deze piekjes afwezig zijn in het frequentiedomein, zou men kunnen stellen dat hier het weefsel beschadigd is. Deze methode heeft echter enkele nadelen: ten eerste moet er gebruik gemaakt worden van aanzienlijke vergrotingen (minstens 400x) wil men dwarsstreping detecteren. Dit impliceert vele beeldjes per coupe. Een andere moeilijkheid waarmee men te maken krijgt, is de aanwezigheid van bloedvaten, bindweefsel, etc. Deze komen bij dit soort vergrotingen prominent in beeld en zorgen na een Fouriertransformatie voor afwezigheid van de karakteristieke dwarsstrepingfrequentie, wat onterecht als schade geïdentificeerd wordt. Deze methode is niet toegepast.



Figuur 3.4:
Fouriertransformatie van
figuur 3.3.

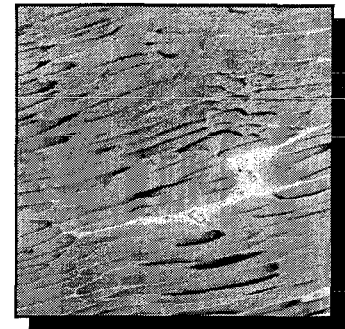
3.2.2 Thresholding

Door het beeld binair te maken, m.b.v. een boven- en ondergrens die kenmerkend zijn voor schade, wordt deze meteen zichtbaar gemaakt. Ook de macrofagen (plus enkele spiercelkernen) kunnen m.b.v. van thresholding gedetecteerd worden. Er wordt gebruik gemaakt van 4 thresholds:

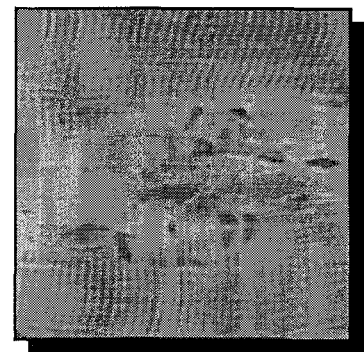
- Threshold t1: bovengrens schade;
- Threshold t2: ondergrens schade;
- Threshold t3: kerndetectie;
- Threshold t4: spierdetectie.

De nadelen genoemd bij de Fourier-analyse zijn hier niet van toepassing. Hier steken andere problemen de kop op. Op sommige plaatsen in een spier-coupe - vooral aan de rand - komen dezelfde grijswaarden als de schade voor. Ondanks een streng protocol ter vervaardiging van deze coupes kan een inhomogene kleuring van de coupe niet helemaal voorkomen worden. In dit geval wordt dus teveel schade gedetecteerd.

Een ander probleem is het automatiseren van de thresholdkeuze. Niet alle coupes worden onder dezelfde omstandigheden geprepareerd en gedigitaliseerd (denk resp. aan kleuring en belichtingssterkte). Het relateren van de thresholds aan bijv. de mediaan blijkt niet te werken. Wanneer alleen de belichting de storende factor zou zijn, zou deze methode goed kunnen werken. Voor een bepaalde (normerings-)coupe wordt de mediaan uitgerekend en de 4 thresholds worden met de hand gezocht, waarna 4 omrekenfactoren c_1 , c_2 , c_3 en c_4 uitgerekend zijn: $c_1 = t_1/\text{mediaan}$, $c_2 = \text{etc.}$ De thresholds voor andere coupes zouden dan bepaald kunnen worden door hun mediaan te vermenigvuldigen met deze factoren. De thresholds zijn nog met de hand ingesteld.



Figuur 3.2: Beeld c880-31 van coupe 880. Vergroting 50.



Figuur 3.3: Beschadigde sarcomeren met spierkernen en macrofagen (vergroting 500).

Voor coupes waarin geen schade aanwezig was, maar toch een schade-threshold gekozen moest worden, zijn dezelfde thresholds ingesteld als een coupe met wel schade en dezelfde belichtingsterkte.

3.2.2.1 Procedure

De volgende stappen worden ondernomen om met behulp van thresholding tot schade-detectie te komen, waarbij gebruik gemaakt wordt van de technieken die in hoofdstuk 2 besproken werden:

Spier detectie, te beginnen bij het originele beeld

- *maximum filteren* om scherpe spierranden te verkrijgen;
- *minimum filteren* van vorig beeld (max-filter) om randen weer op oorspronkelijke plaats te krijgen;
- toepassen van *threshold t4* om spier van niet-spier te onderscheiden: spier=zwart, niet-spier=wit;
- spieroppervlakte berekenen door tellen van zwarte pixels;
- vorig (binair) beeld aftrekken van originele beeld: niet-spier is nu zwart. Dit beeld heet vanaf nu beeld A.

Detectie van primaire schade

- homogeniseren van beeld A met behulp van een 11 bij 11 *uniform filter*. Het bindweefsel wordt op deze manier verwijderd;
- toepassen van *threshold t1* op vorig beeld: dit is de bovengrens van de schade;
- vorig beeld aftrekken van beeld A;
- toepassen van *threshold t2*, zodat schade wit wordt en de rest zwart;
- *3x erosie*-bewerking gevolgd door een *3-voudige dilatatie* om laatste kleine deeltjes te verwijderen;
- berekenen van schade-oppervlakte door de witte pixels te tellen;

Detectie van macrofagen (en spiercelkernen)

- *inverteren* van binair schade-beeld: schade=zwart, rest=wit;
- dit geïnverteerde schade-beeld optellen bij beeld A: alle schade-gebieden blijven onaangetaast, terwijl de rest wit wordt. Hierbij moet overflow niet voorkomen worden: pixels die boven de grijswaarde 255 uitkomen, moeten gewoon 255 worden;
- toepassen van *threshold t3*: infiltraten en spierkernen worden zwart, rest wit. Vervolgens worden ze geteld. Om de werkelijke hoeveelheid infiltraten (los van spierkernen) te weten, zal eerst nog bepaald moeten worden hoeveel spierkernen per oppervlakte-eenheid normaal voorkomen in gezond weefsel, zodat uitgerekend kan worden hoeveel infiltraten (statistisch) aanwezig zijn.

De threshold-methode is geprogrammeerd in TIMWin. Het programma heet *detect .cmd*. De procedure staat in bijlage 1 grafisch weergegeven. Elk schade-beeld wordt 5 maal verkleind en opgeslagen in een 1023 bij 512 beeld, zodat daarin de gehele coupe met schade te zien is. Het gereconstueerde schade-beeld van de gehele coupe wordt als .im-file of .tif file opgeslagen. Tevens wordt een data-file met gegevens (o.a. schade per beeld, schade voor gehele coupe, aantal kernen, tijden, enz.) opgeslagen als .dat. In bijlage 2 staat een voorbeeld van een thresholding data-file.

3.2.3 Template-matching

Bij gebruik van deze methode wordt van een stukje schade een template gemaakt. Met behulp van het correlatie-theorema wordt een correlatiebeeld verkregen, ook wel intensiteitsfunctie genaamd. Het uiteindelijke doel is een intensiteitsfunctie te verkrijgen, waar hoge correlaties (>0,99) overeenkomen met schade. Aan deze methode zitten echter nogal wat haken en ogen, die betrekking hebben op de schade-detectie en de Fouriertransformatie.

3.2.3.1 Wraparound error

Omdat gebruik gemaakt wordt van discrete, eindige functies treedt het verschijnsel wraparound error op. De Fourier-transformatie is in principe bedoeld voor ontleding van periodieke, oneindige functies. Wanneer deze

toegepast wordt op discrete eindige functies (wiens domein als 1 periode opgevat kan worden), wordt zij in het frequentie-domein periodiek met een bepaalde periode M . Wanneer de individuele perioden A en B van de te correleren functies f en g worden gekozen zodat $M \geq A+B-1$ treedt er geen overlap in de periode M op. Dit wordt gedaan door de functies f en g aan te vullen met nullen totdat de lengte M bereikt is.

In het 2d geval geldt bovenstaande in x en y richting: Matrix f heeft afmetingen $A*B$; matrix g $C*D$. f en g krijgen afmetingen $M*N$ door nullen toe te voegen totdat $M \geq A+C-1$ en $N \geq B+D-1$.

3.2.3.2 Aliasing

Bij sampling krijgt men te maken met de Nyquist-frequentie. Dit is de maximale te samplen frequentie. In een beeld is dit de helft van het aantal pixels in x en y richting. In een beeld van 1024 bij 256 kan men dus nog een frequentie van 512 detecteren in x -richting en 128 in y -richting.

De afmeting van het Fourier-beeld is dezelfde als de afmeting van het beeld in het plaatsdomein en laat dus frequenties boven de Nyquistfrequentie zien. Deze waarden zijn echter niet te vertrouwen. Erger nog, deze frequenties vervuilen het gebied onder de Nyquistfrequentie doordat de hoge frequenties gespiegeld worden om de Nyquistfrequentie in het lage-frequentie gebied. Voordat een beeld gemaakt wordt, moeten de hoge frequenties dus hardware-matig weggefilterd worden met behulp van een low-pass filter. Dit kan simpelweg door de microscoop niet precies gefocuseerd in te stellen, maar door de coupe iets uit focus te digitaliseren.

3.2.3.3 Template-homogeniteit

Template-matching werkt het beste wanneer de template veel contrast bevat. Indien dit niet het geval is en de template een vrij homogeen karakter heeft (allemaal pixels van ongeveer dezelfde grijswaarde), zoals primaire schade, detecteert men *alle* homogene gebieden. Hoe kleiner de template gekozen wordt, des te homogener zij wordt en hoe meer (niet-schade) gebieden gedetecteerd worden. Is de template te groot, dan vinden we in de intensiteitsfunctie alleen daar schade, waar de template uitgenomen is.

3.2.3.4 Procedure

De template-match procedure vindt als volgt plaats:

Detecteren van spier

Zie de threshold-procedure

Detecteren van schade

- Een template maken van karakteristieke primaire schade - evt. zonder macrofagen - uit de normeringscoupe. Deze wordt vervolgens voor alle coupes gebruikt;

- beeld en template aanvullen met nullen, resp. f_e en g_e , zodat zij afmetingen krijgen die de som zijn van hun individuele afmetingen minus 1 in verband met voorkomen van wraparound error, afgerond naar boven tot een macht van 2 in verband met het FFT-algoritme. Bij de 11 coupes zijn alleen de templates aangevuld met nullen tot deze de afmetingen hadden van het beeld (512 bij 512). Wil men wraparound voorkomen wil dit zeggen dat de matrices 1024 bij 1024 worden. Het geheugengebruik nam echter gigantisch toe, zodat dit niet gedaan is. In de resultaten is als gevolg hierdoor een beetje wraparound aanwezig;

- transformatie van beeld en template naar frequentie-domein m.b.v. FFT, resp. F_e en G_e ;

- nemen van complex geconjugeerde van de template-transformatie: G_e^* ;

- elementsgewijze vermenigvuldiging van F_e en G_e^* ;

- berekenen van inverse FFT van dit resultaat, zodat de intensiteitsmatrix wordt verkregen;

- thresholden om de hoogste correlaties mee te laten tellen als schade.

De template-match methode is geschreven in Matlab. Het programma heet `detect.m`. Het maakt gebruik van `corr2.m` (de correlatiefunctie) en van enkele functies uit de Image Processing Toolbox van Matlab. Ook hier wordt een totaal schade-beeld als een 1023 bij 512 matrix opgeslagen in een `.mat` file en een datafile met gegevens. Zie bijlage 3 voor een voorbeeld van een template match data-file.

Resultaten

In tabel 1 staan de resultaten weergegeven van de 11 coupes voor de 2 methodes. T925 is de testcoupe. De resultaten zijn: oppervlakte primaire schade in pixels; verhouding primaire schade tot coupe oppervlakte en aantal kernen in het primaire schade-gebied. In bijlage 4 staat het schade-beeld van coupe 880 met behulp van thresholding. In bijlage 5 het schade-beeld van coupe 880 met behulp van het template matching. In bijlage 6 het schadebeeld van de testcoupe.

Coupe	Thresholding m.b.v. mediaan			Thresholding met hand ingesteld			Template matching	
	oppervlak [pixels]	verhouding schade tot coupe-opp [%]	aantal kernen	oppervlak [pixels]	verhouding schade tot coupe-opp [%]	aantal kernen	oppervlak [pixels]	verhouding schade tot coupe-opp [%]
c130	507662	22	1332	275619	11	176	293762	11
c370	1531960	30	7856	26900	0	519	32916	1
c670	877795	17	3088	31091	1	0	849314	14
c850	852505	14	2340	433053	7	3699	1050011	17
c880	558063	8	2184	558063	8	3026	1070399	16
c1030	623264	11	1643	694171	12	5401	1186628	20
c1220	758653	16	3439	217363	4	1037	416242	8
c1380	519780	14	3028	7187	0	60	154377	3
c1540	704110	26	6122	2223	0	50	5216	0
c1700	87467	13	580	7202	1	65	39241	4
t925	592337	9	5043	120258	2	903	174708	2

Tabel 1: Resultaten van thresholding (m.b.v. mediaan en handinstelling) en template matching.

De oppervlakte van de schade wordt nu nog in pixels weergegeven, omdat de exacte vergroting niet bekend was. Het is echter een kleine stap om deze alsnog te bepalen en de oppervlakte in het vervolg in μm^2 weer te geven.

In tabel 2 staan enkele rekestijden afgebeeld. Hierbij moet in acht genomen worden dat de tijden sterk afhankelijk zijn van:

- 1) het besturingssysteem dat op een computer draait in samenwerking met het beeldverwerkingsprogramma. De combinatie Windows95 (32 bit) en Matlab (16 bit) is langzamer dan Windows3.11 (16 bit) en Matlab;
- 2) de hoeveelheid intern geheugen. Voor de template-match methode is minstens 32 Mb nodig;
- 3) het gebruikte beeldverwerkingsprogramma. TIMWin compileert de programma's, Matlab niet.

Rekentijden	Template matching in Matlab		Thresholding in TIMWin	
	1 beeld	gemiddelde coupe	1 beeld	gemiddelde coupe
80486, 66 Mhz	15 minuten	7,5 uur	30 seconden	15 minuten
80586, 100 Mhz	3 minuten	1,5 uur		
Cyrix, 120 Mhz	2 minuten	1 uur		
80686, 200 Mhz	50 seconden	25 minuten		

Tabel 2: Rekestijden

Discussie

Zoals de procedures van het thresholding en template matching nu zijn uitgevoerd, lijken ze veel op mekaar: in de thresholdprocedure wordt op een gegeven moment in de stap van de schade-detectie het beeld gefilterd met een 11 bij 11 uniform filter. Bij het template matching bestaat de template uit een stukje primaire schade. Deze schade is homogeen (deze bezit pixels met allemaal ongeveer dezelfde waarde) en is dus ook uniform gevuld. Convolutie en correlatie lijken veel op elkaar en zijn zelfs nagenoeg identiek wanneer de templates (vensters) puntsymmetrisch zijn, op de normering na. M.a.w: de template-match methode detecteert dezelfde schadegebieden als de threshold-methode. Echter, als gevolg van de normering detecteert de template-match methode nog meer "schade", nl. alle homogeen gekleurde gebieden.

De beste resultaten worden bereikt als de thresholds met de hand worden ingesteld en het kost nog redelijk wat tijd om de goede thresholds in te stellen. Van gehele automatisering is dus nog geen sprake en kan waarschijnlijk ook niet helemaal voorkomen worden. Het automatiseren van de xy-tafel zal gemakkelijker te realiseren zijn.

De nauwkeurigheid van de methode zal nog bepaald moeten worden met behulp van een specialist.

Conclusie

In allebei de methoden wordt meer schade gedetecteerd dan er in werkelijkheid aanwezig is (en dus ook teveel infiltraten en spierkernen in het schadegebied). Bij het thresholding komt dit doordat meer pixels dezelfde grijswaarden bevatten die kenmerkend zijn voor beschadigd spierweefsel. Vooral aan de randen van de spier, bij scheuren binnen de spier en bij spier-bindweefsel overgangen doet zich dit verschijnsel voor. Echter, kleine bindweefselplaten worden door middel van uniforme filters en erosie-dilatatie algoritmen voldoende verwijderd. Bij het template-matching wordt in sommige coupes veel te veel "schade" gedetecteerd, nl. alle homogene gebieden.

Maar schade die er is, wordt ook wel degelijk gedetecteerd met allebei de methoden.

Het combineren (logische AND tussen beide resultaten) van beide methoden heeft niet veel zin, omdat ze qua procedure (uniforme filter bij het thresholding en homogene template bij correlatie) veel op elkaar lijken.

Het template matching tot slot is erg reken- en geheugenintensief. Een snelle computer (pentium) met veel intern geheugen (minstens 32 Mb) is zeker nodig.

Zoals de detectiemethoden nu uitgevoerd worden, is men niet veel sneller dan men met de hand de detectie zou uitvoeren. Vooral het digitaliseren en het instellen van de thresholds kost veel tijd (per coupe ruim een uur). Echter, wanneer het digitaliseren - en daarmee het bewegen van de xy-tafel van de microscoop - geautomatiseerd zou worden is men al een stuk sneller. Indien het automatiseren van de thresholds ook gerealiseerd kan worden, is het handwerk al terug gebracht tot het plaatsen van de coupe onder de microscoop en het programma starten.

Aanbevelingen

- Wegens de detectie van alle homogene gebieden wordt het template matching afgeraden.
- Beweging xy-tafel en digitalisering automatiseren. Daarmee kan ook een nauwkeurigere aaneensluiting van beelden binnen een coupe gerealiseerd worden. Dit is nu nog met de hand gebeurt.
- Schade in beelden eventueel real-time detecteren - tijdens het digitaliseren. Op deze manier zou men kunnen overwegen om de beelden niet op te slaan - alleen het totaal schade-beeld - om extern geheugen te sparen.
- Coupes onder zoveel mogelijk dezelfde omstandigheden digitaliseren, dus steeds dezelfde belichtingssterkte, enz. om het instellen van thresholds te vergemakkelijken. Tevens moet er nog een manier gevonden worden om het instellen van de thresholds te automatiseren.
- De coupes zijn nu gedigitaliseerd met een zwart/wit CCD-camera. Het dient zeker ter aanbeveling om eens een kleurencamera toe te passen. Men verkrijgt dan informatie in drie kleuren: rood, groen en blauw. Misschien dat schade in het kleurgebied iets anders afwijkt van gezond weefsel, op een manier wat niet met het blote oog of in grijswaarden te zien is.
- Andere gebieden van beeldverwerking onderzoeken:
 - * Multiresolutie technieken met behulp van een waveletdecompositie. Wavelets zijn de laatste jaren "in". Een wavelet is een in de tijd - in de beeldverwerking in plaats - gelocaliseerde golf in tegenstelling tot een normale golf, die tot in het oneindige doorloopt. Hierop is de Fourier-transformatie gebaseerd. Wavelets bieden enkele voordelen boven het Fourier transformeren. Eén daarvan is het zonder informatieverlies terug transformeren van een decompositie.
 - * Neurale netwerken. Dit soort programma's bezitten een leereffect. Men zou het systeem vele beelden van schade kunnen voorleggen, zodat later het programma zelfstandig schade zou kunnen detecteren.

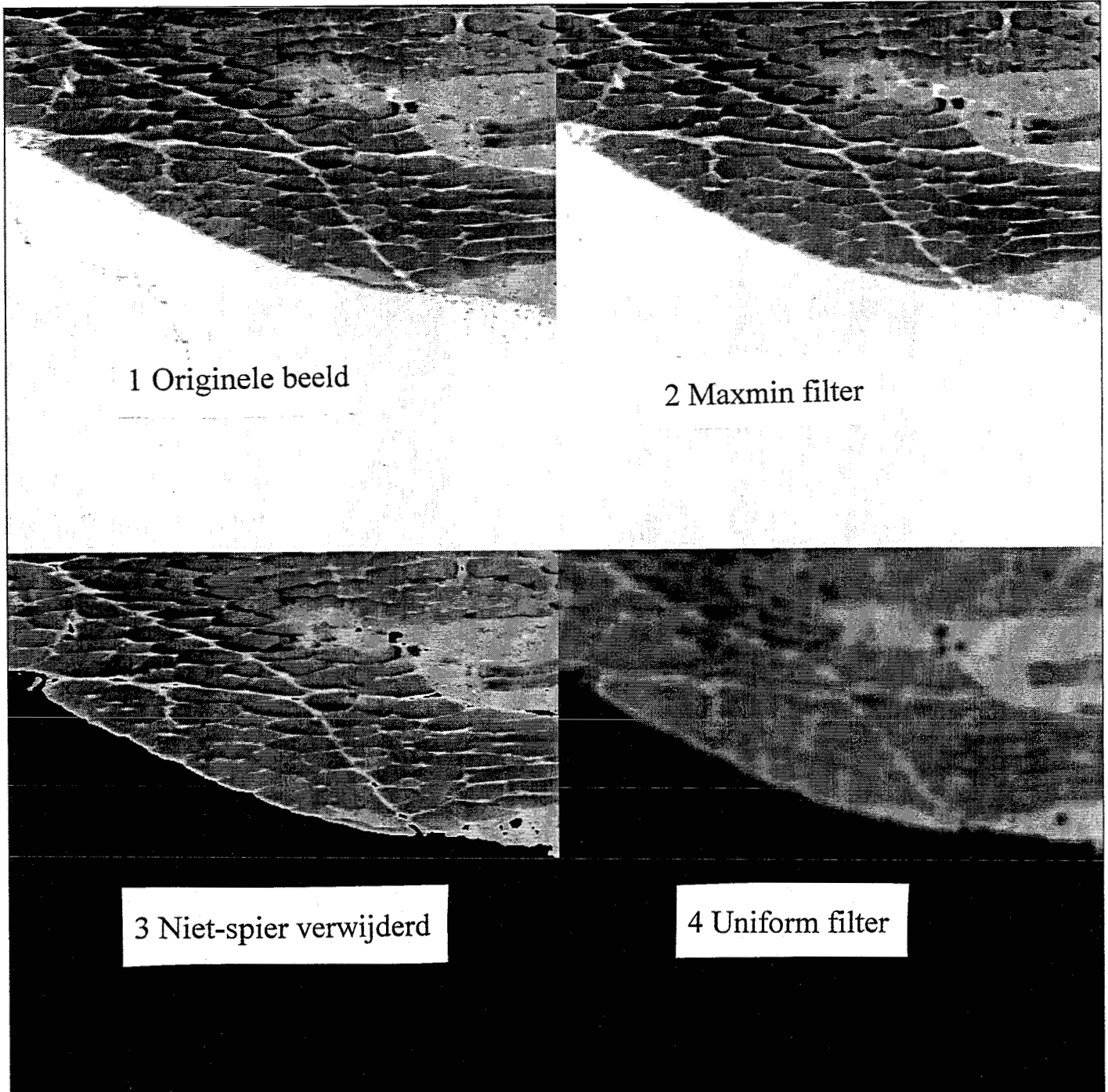
Literatuurlijst

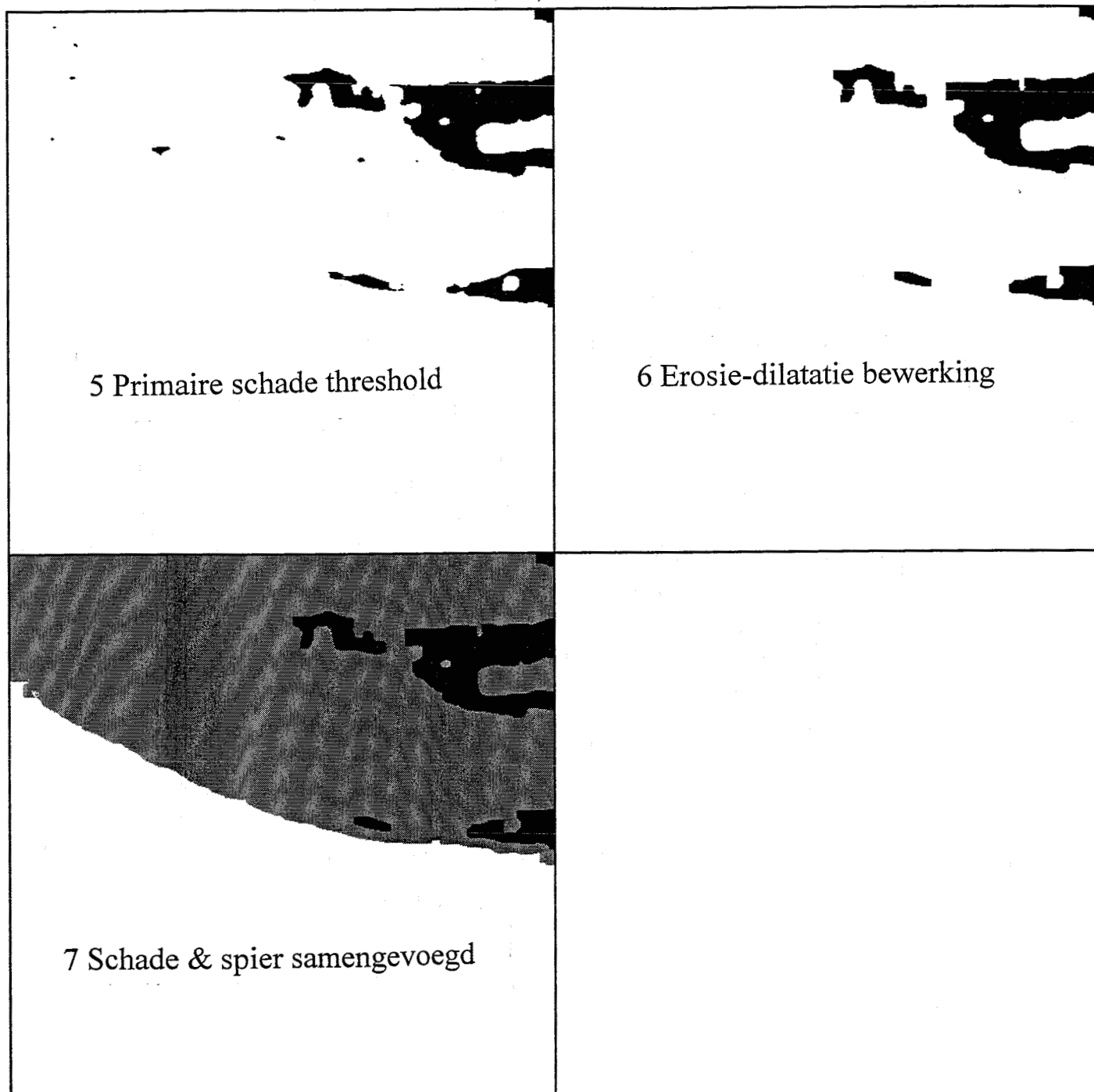
- Fröhlich J., Weickert J. "Image processing using a wavelet algorithm for nonlinear diffusion" Tech. Rep. 104, Laboratory of Technomathematics, Univ. of Kaiserslautern, Duitsland, Maart 1994.
- Gonzales R.C., Wintz P. "Digital Image Processing". 6e druk. Addison-Wesley publishing company Inc, Reading. 1977
- Haalboom J.R.E. "Kostenaspecten van decubitus". In: H.Bakker, W.J.den Ouden, C.Pons (eds.) *Toekomstig decubitus onderzoek*, Rijswijk. Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, p 7-9. 1990
- ter Haar Romeny B.M. "Front-End Vision and Multiscale Image Analysis: Introduction to Scale-Space Theory." Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997.
- Lohman A.H.M. "Vorm en beweging". 8e druk. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten/Diegem 1995
- Molleman G. "Van lage status tot hoge prioriteit". Algemeen Dagblad, 20 oktober 1995
- Niessen W.J. e.a. "Comparison of multiscale representations for a linking-based image segmentation model," in Proceedings IEEE Workshop on Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis, San Francisco, p 263-272, 1996.
- Vankan W.J. "A finite element model of blood perfused contracting skeletal muscle". proefschrift, Eindhoven. 1996

Internet-adressen

- <http://www.wavelet.org/wavelet> Waveletpagina
- <http://www.cv.ruu.nl> Site van Image Sciences Institute in Utrecht.

Bijlage 1: Thresholding. Detectie van primaire schade.





Bijlage 2: Voorbeeld data file van thresholdmethode

Results coupe 1380 by means of thresholding
12/06/97 Time start: 14:35:17

t1 = 122
t2 = 77
t3 = 66
t4 = 122

Beeldnr.	Aantal macrof. & spierkernen	Spieropp. [pixels]	Schadeopp. [pixels]	Perc. [%]
2	0	2783	0	0
3	255	146635	55541	38
4	199	164538	33737	21
5	108	121767	16203	13
6	102	47683	17912	38
7	1	1839	409	22
12	61	32933	12485	38
13	443	210191	90087	43
14	224	252842	46035	18
15	131	253568	17628	7
16	271	246942	28621	12
17	117	105716	18754	18
22	169	92537	30132	33
23	298	236354	47991	20
24	177	254938	22347	9
25	34	258520	4747	2
26	35	253937	5906	2
27	65	59918	10973	18
32	163	109739	34781	32
33	122	252645	18280	7
34	41	256877	6065	2
35	11	240091	1142	0
36	1	134734	4	0
Totaal	3028	3737727	519780	14

Endtime: 14:47:11

Bijlage 3: Voorbeeld data file van template matching

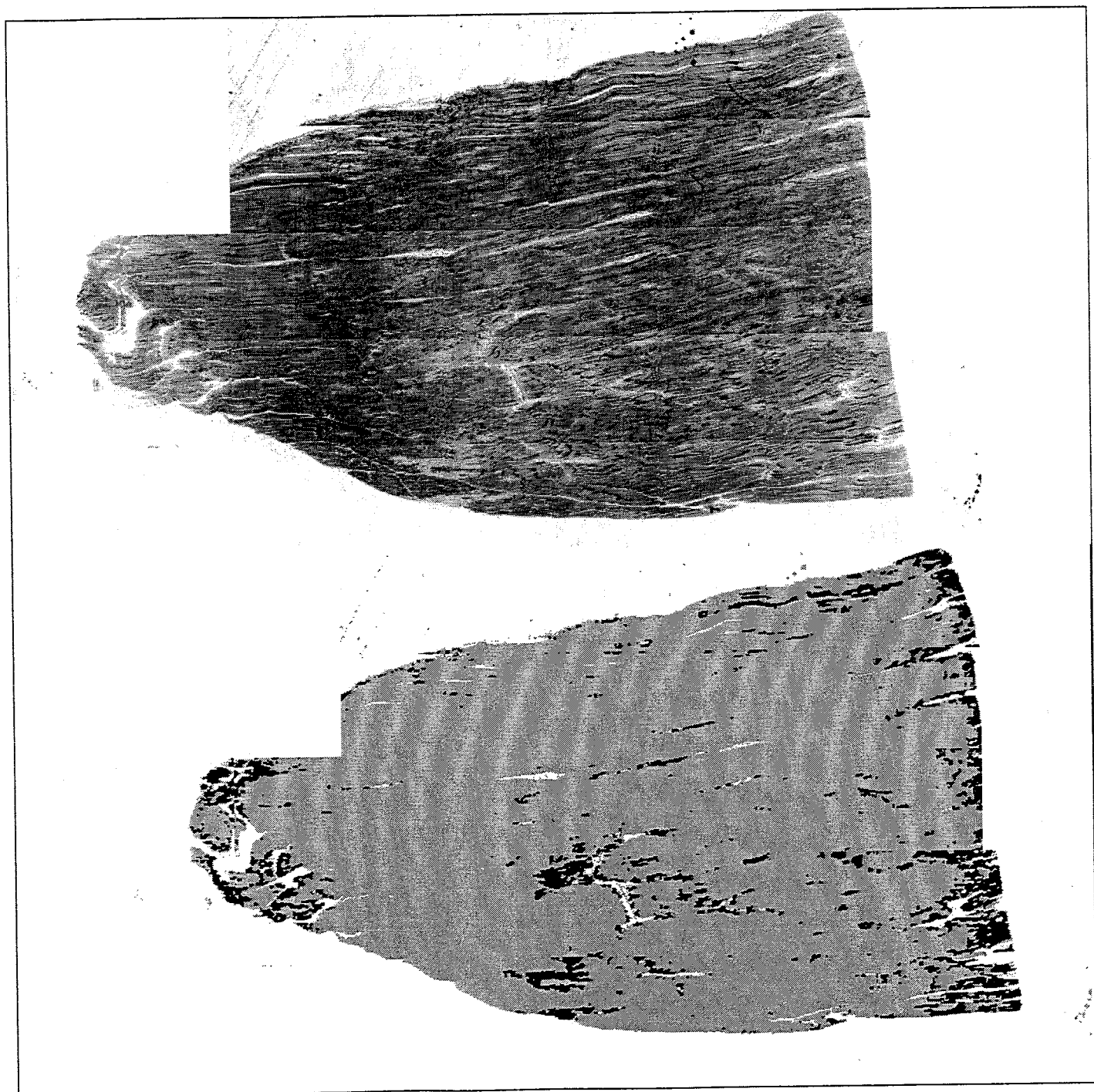
Results coupe c1540. Detection by means of template-matching
19-6-1997 9:7.6

Template size: 15 x 15
Correlation-threshold: 254
Overlap in x-direction: 0
Overlap in y-direction: 5
Name of Damage-image: tmc1540

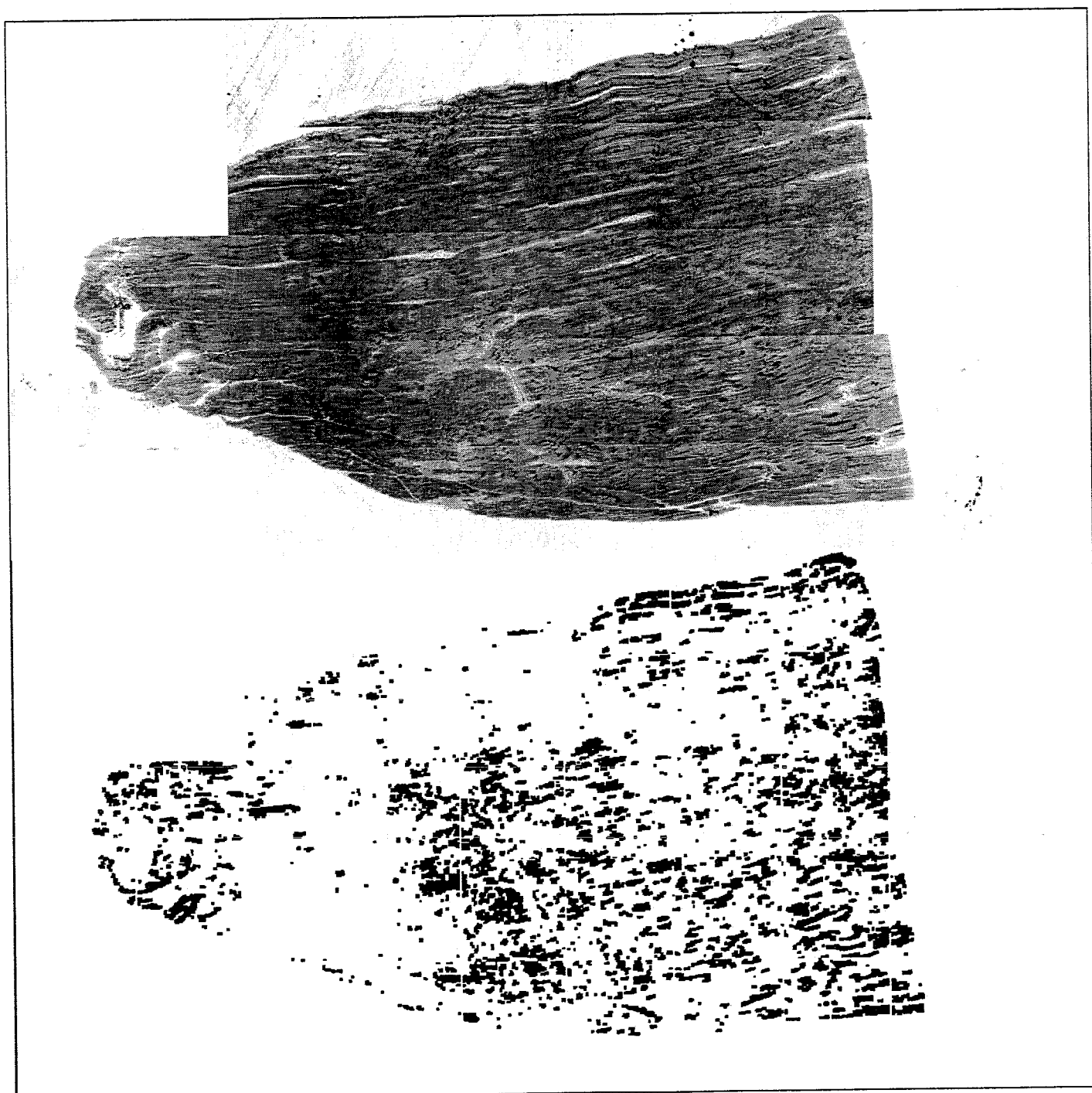
Image#	Muscle-area [pixels]	Damage-area [pixels]	Ratio [%]
2	145300	782	1
3	196537	108	0
4	162033	0	0
5	110868	769	1
6	14107	770	5
12	186851	438	0
13	261746	0	0
14	261026	0	0
15	257332	0	0
16	108853	1060	1
22	213180	117	0
23	257196	0	0
24	260750	0	0
25	207267	0	0
26	33479	0	0
32	46054	1172	3
33	48000	0	0
34	43590	0	0
Total	2814169	5216	0

Elapsed time: 0 hours 13 minutes and 46 seconds

Bijlage 4: Origineel beeld en schade-beeld van coupe 880 m.b.v. thresholding



Bijlage 5: Origineel beeld en schade-beeld van coupe 880 m.b.v.
template matching



Bijlage 6: Origineel beeld en schade-beeld van testcoupe 925 m.b.v. thresholding

