

Drie-dimensionale beeldverwerking

J. de Lange

Het verwerken van beelden bestaande uit drie-dimensionale (3D) datasets is een opkomend onderzoeksgebied. Ook binnen het landbouwkundig onderzoek worden sinds enige tijd diverse technieken gebruikt voor het verkrijgen van ruimtelijke informatie, zoals *confocal scanning laser microscopy (CSLM)*, *computer assisted tomography (CAT)* en *magnetic resonance imaging (MRI)*. Om de onderzoeker inzicht te geven in de interne structuur van deze ruimtelijke datasets zijn de laatste jaren vele, zowel automatische als interactieve, visualisatie technieken beschikbaar gekomen. De mogelijkheid kwantitatief onderzoek op deze datasets te doen biedt op vele terreinen nieuwe perspectieven.

In dit artikel wordt beschreven wat drie-dimensionale is en wordt het onderzoek van TFDL-DLO op dit terrein belicht.

Inleiding

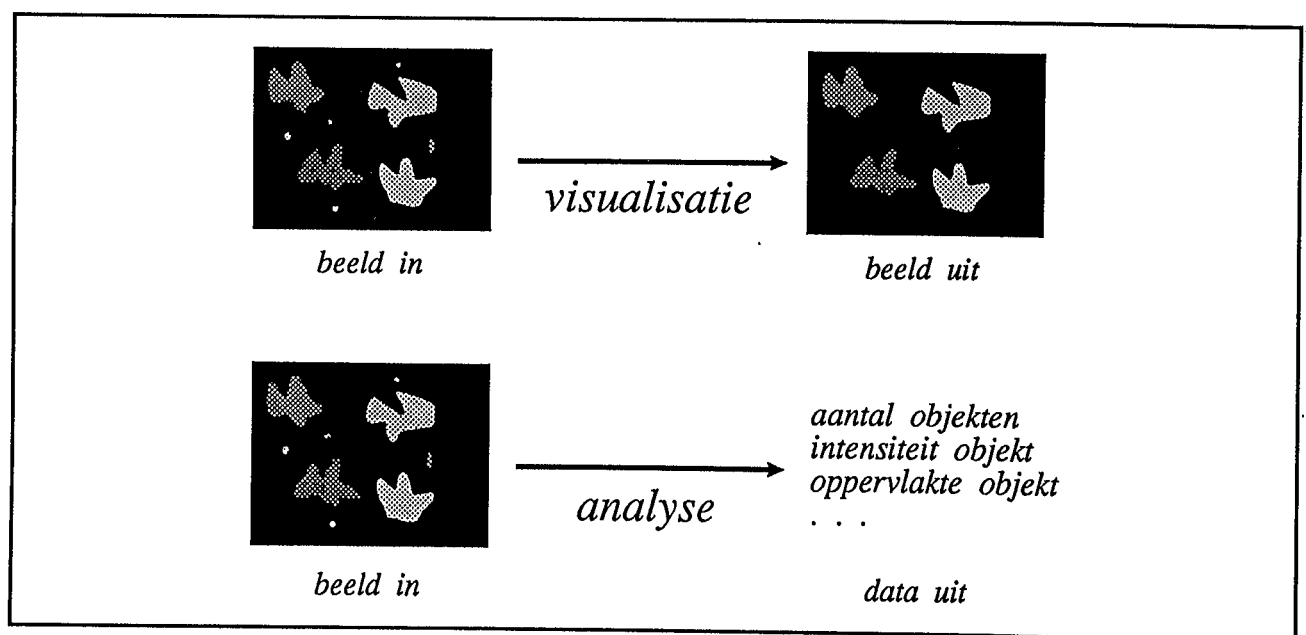
Het hele beeldverwerkingsproces kan worden gescheiden in vijf stappen: 1. Acquisitie 2. Voorbewerking 3. Restoratie 4. Segmentatie 5. Analyse. Dit proces is voor twee-dimensionale toepassingen in andere artikelen uitvoerig beschreven. Bij drie-dimensionale beeldverwerking zullen de toe te passen technieken veelal complexer zijn. De methoden en technieken voor de stap van 'real world' naar gedigitaliseerd beeld, de acquisitie fase, toegepast op drie-dimensionale data, wordt in de volgende paragraaf besproken en de meest voorkomende representaties voor deze volume datasets worden geschetst.

In de beeldverwerking kunnen twee doelstellingen onderscheiden worden: de verkregen data kan gevisualiseerd worden en kwantitatieve analyses kunnen gemaakt worden (zie fig.1).

Bij visualisatie is zowel de input als de output een beeld. De inputbeelden worden bewerkt en verwerkt om deze optimaal bruikbaar te maken. Doel is dan bij 3D beeldverwerking: het inzicht verschaffen in de ruimtelijke structuur van een bekeken object. Na acquisitie van een beeld vindt eventueel voorbewerking, restoratie en segmentatie plaats, waarna een bewerkt beeld gevisualiseerd wordt. Bij beeldanalyse is het doel de in het beeld opgeslagen informatie te kwantificeren, dus de analoge eigenschappen van objecten uit de digitale data te bepalen. De output van een beeldanalyse proces is een verzameling kenmerken van de opgenomen objecten. Hierbij wordt het hele schema van de beeldverwerking doorlopen. Bij het Expertise Centrum Informatie Technologie (TFDL-DLO) wordt onderzoek uitgevoerd naar toepasbare visualisatie tools en vindt onderzoek plaats op beeldanalyse terrein. In de volgende paragrafen wordt dit nader besproken.

Acquisitie en representatie 3D beelden

De tot nog toe meest gebruikte acquisitie technieken leveren twee-dimensionale (2D) informatie: een projectie van een ruimtelijk object of een afbeelding van een oppervlak. Meer ruimtelijke informatie wordt verkregen m.b.v. stereologie (2 1/2 D beeldverwerking): met 2 projecties vanuit verschillende gezichtspunten t.o.v. het object van onderzoek wordt de 3D oppervlaktestructuur gerekonstrueerd. Voor het bestuderen van complexe ruimtelijke structuren zijn deze technieken echter niet toereikend.



Figuur 1 - Doelstellingen van beeldverwerking

De technieken voor acquisitie van 3D beelden kunnen worden gescheiden in *destruktieve* en *niet-destruktieve technieken*. De eerste vraagstellingen voor niet-destruktieve 3D acquisitie apparatuur kwamen uit de medische wereld om niet-invasief het binnenste van de mens te kunnen bekijken. De meest bekende techniek is wel Computer Assisted Tomography (CAT), waarmee radiologische (Röntgen) beelden van willekeurige projecties door het lichaam worden geproduceerd. *Tomografie* is een techniek, waarbij een 3D beeld wordt gerekonstrueerd uit een serie projecties genomen vanuit verschillende gezichtspunten vanaf het object van onderzoek. De laatste 2 decennia zijn vele andere tomografische technieken ontwikkeld en met succes toegepast. Voorbeelden zijn magnetic resonance imaging (MRI of NMR), positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT) en ultrasound.

De *optische scheidingstechnieken* vormen een andere groep acquisitie technieken. Dit vereist meestal enigszins transparante objecten (transparant t.o.v. de imaging techniek, bv. licht, elektronen, geluidsgolven, etc.) en dat de opvolgende beeldvlakken kunnen worden gefocussed met de microscoop optiek. Een voorbeeld hiervan is de confocaal scanning laser microscoop (CSLM), een belangrijk acquisitie apparaat voor biologische objecten. Deze in de jaren 70 ontwikkelde techniek heeft de mogelijkheid optische coupes (afzonderlijke plakken) van een specimen te bekijken, door het onderdrukken van out-of-focus bijdragen van het specimen. De zo verzamelde data zijn alleen gerelateerd aan specifieke volume punten (voxels). Het begrip "confocaal" betekent, dat het punt van belichting en focusering dezelfde zijn.

Binnen het landbouwkundig onderzoek wordt de CSLM techniek veelvuldig toegepast. Ook MRI en CAT technieken worden gebruikt. Vele andere manieren voor het verkrijgen van ruimtelijke informatie zijn mogelijk, zoals transmissie elektronen microscopie (TEM; via tomografische rekonstruktie) en acoustische microscopie (confocaal principe).

Bij de toepassing van destruktieve methoden, zoals het snijden van plakjes wordt als acquisitie apparatuur veelal

een licht of electronen microscoop gebruikt. Voor harde monsters kan snijden onpraktisch zijn en kunnen opvolgende beelden van oppervlakten bijvoorbeeld gemaakt worden via het polijsten om lagen van het materiaal te verwijderen.

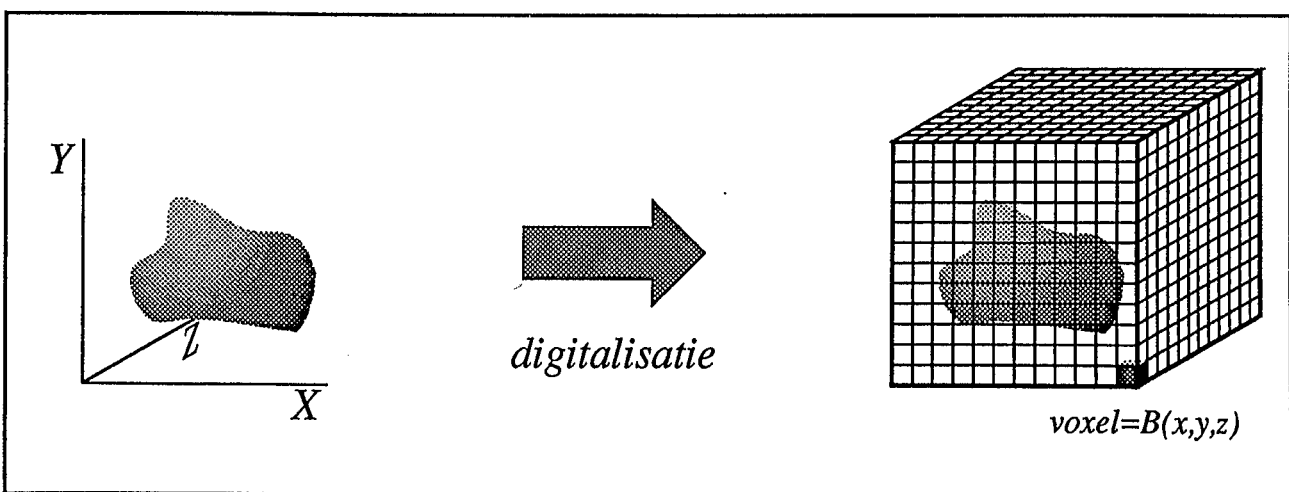
De dataset die met behulp van een 3D acquisitie technieken verkregen is, moet geconverteerd worden naar een 3D representatie. Het meest gebruikte model voor opslag van 3D beeldinformatie is de *voxel representatie*. Een voxel is een volume element, naar analogie met het 2D picture element (pixel). Ieder voxel beslaat een deel uit de ruimte en heeft als waarde een bepaalde eigenschap van dat deel van die ruimte, i.h.a. een scalar (zie fig. 2). Deze gemeten waarde wordt de dichtheid van het voxel genoemd. De betekenis van de voxeldichtheid is afhankelijk van de apparatuur waarmee de acquisitie is verricht. In CT bijvoorbeeld representeert de dichtheid van een voxel de mate waarin de Röntgenstraling door het voxel wordt tegengehouden door het weefsel in voxel. De grootte van een voxel (opname resolutie) is afhankelijk van de manier van bemonstering. Deze resolutie is meestal te onderscheiden in de laterale resolutie (afstand tussen middelpunten voxels in een beeldvlak) en axiale resolutie (dikte van een beeldvlak).

De opvolgende vlakken van het 3D beeld zullen veelal geen continue delen van de ruimte beslaan. Voor goede interpretatie zal het dan veelal nodig zijn de afzonderlijke vlakken via interpolatie technieken te verbinden. Hierbij wordt de onbekende, tussenliggende structuur geschat.

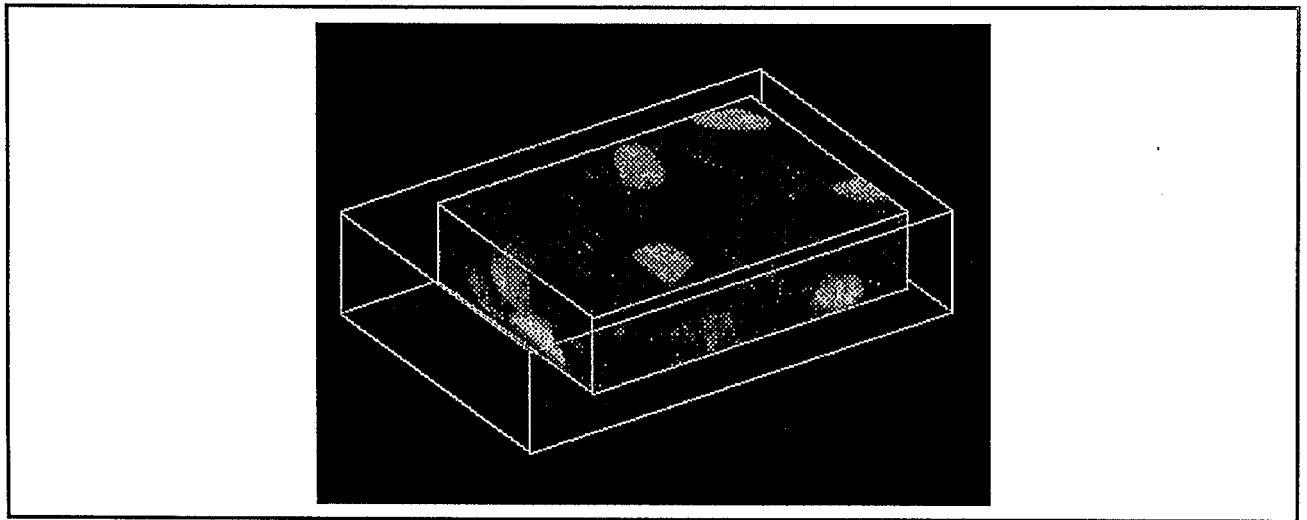
Voor grafische weergave technieken wordt meestal gebruik gemaakt van oppervlakte representaties, m.b.v. 3D polygonen (en gerelateerd 3D vectoren). Deze zijn populair door het beschikbaar komen van snelle grafische processoren, betaalbare werkstations en de vele interessante software tools.

3D visualisatie tools en technieken

De bij acquisitie verkregen dataset wordt gerekonstrueerd om het echte object zoveel mogelijk te gelijken, wat betekent dat er eventuele ruis ontstaan bij acquisitie, wordt verwijderd, te visualiseren eigenschappen kunnen ver-



Figuur 2 - Digitalisatie 3D structuur en representatie via voxelarray.



Figuur 3 - Orthogonale vlakken van Feulgen-gekleurde wortelcellen van een ui (opname CSLM)

sterkt worden, en interessante objecten kunnen uit de 3D dataset genomen worden (segmentatie) om deze apart af te beelden. Hierna moet de 3D dataset op een geschikte manier getoond worden.

Een indeling in drie klassen kan gemaakt worden:

- *Slice imaging*: 2D informatie wordt gebruikt uit de volume data om een 2D beeld op te bouwen;
- *Projective imaging*: alle volume data wordt gebruikt om een 2D beeld op te bouwen;
- *Volume imaging*: een 3D beeld wordt opgebouwd, waarbij gebruik wordt gemaakt van een technologie als holografie.

Slice imaging technieken zijn eenvoudig te implementeren en de volume imaging technieken zijn minder bruikbaar in de onderzoeksomgeving. Wat de visualisatie betreft wordt in het vervolg van dit artikel geconcentreerd op de projective imaging technieken. Aangezien de volume data geen direct zichtbare manifestatie hebben, is impliciet in het visualisatie proces opgenomen de creatie van een tussenrepresentatie dat een beeld kan produceren. Voorbeelden van tussenrepresentaties zijn: punten, lijnen, oppervlakten, enz. De projective imaging technieken kunnen globaal in drie categorieën worden ingedeeld, waarbij de karakteristieken van iedere categorie worden bepaald door de gebruikte tussenrepresentatie:

- *Surface-based technieken*: de oppervlakten van objecten in de volume data worden expliciet bepaald, gerepresenteerd door geometrische primitieven (bv. polygonen) en tenslotte wordt deze geometrische representatie weergegeven.
- *Binary voxel technieken*: deze technieken beginnen met het thresholden van de volume data om een 3D binair array te krijgen. Diverse algoritmen kunnen worden toegepast om dit array te visualiseren.
- *Volume rendering technieken*: bij deze technieken wordt in het volume niet expliciet een object (of oppervlakte) gedefinieerd. De echte

volume data worden gebruikt om de objecten direct uit de voxels af te beelden.

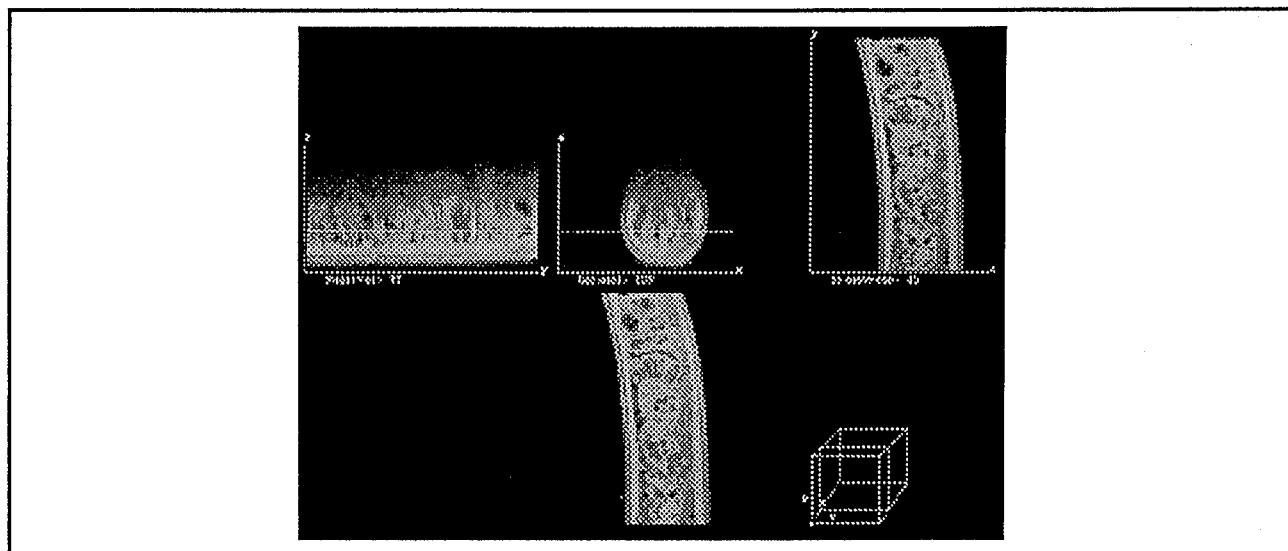
De laatste decennia zijn er vele 3D visualisatie technieken ontwikkeld voor visualisatie van 3D datasets, vooral de volume rendering technieken lijken van groot nut te zijn. De toepassing van de meer geavanceerde technieken, zoals volume rendering, vindt nog slechts op kleine schaal plaats, doordat de uit te voeren berekeningen met de huidige processoren vaak tijdrovend zijn.

De laatste ontwikkelingen betreffen het in één afbeelding tonen van beelden opgenomen met verschillende soorten acquisitie apparatuur (bv. MRI en CAT).

Projecten ECIT

Binnen het landbouwkundig onderzoek waren tot voor kort weinig visualisatie tools beschikbaar. De direct aanwezige technieken voor visualisatie van 3D datasets beperken zich meestal tot het bekijken van de afzonderlijke coupes, een projectie van een serie beelden en rood/groen stereo beelden. Hoewel op deze manieren alle informatie in de originele volume data weergegeven kan worden, is het moeilijk een indruk te krijgen van de 3D structuur. Om meer inzicht te krijgen in de ruimtelijke structuur zijn meer geavanceerde methoden nodig. Om effectief volumes te visualiseren is het belangrijk de beelden vanuit verschillende gezichtspunten te kunnen zien en schaduw toe te voegen, zodat oppervlakten en kleine veranderingen in dichtheid en doorlaatbaarheid zichtbaar worden. Als doel is gesteld het presenteren en beschikbaar maken van tools en technieken en deze toepasbaar te maken binnen het landbouwkundig onderzoek. Aangezien er steeds meer 3D acquisitie apparatuur beschikbaar komt wordt de vraag naar tools, die de gegevens ook op een inzichtelijke manier kunnen presenteren steeds groter. Het is van groot belang dat deze visualisatie tools dan direct op de werkplek van de onderzoeker beschikbaar zijn.

Het afgelopen jaar zijn vele technieken gepresenteerd en beschikbaar gemaakt voor het visualiseren van 3D



Figuur 4 - Visualisatie van inwendige structuur van nematode via selectie van verschillende doorsneden (opname CSLM)

datasets, zowel m.b.v. het visualisatie pakket Analyze, als met eigen software, o.a.:

- weergave van orthogonale vlakken (fig. 3);
- weergave van willekeurige doorsneden;
- snel achter elkaar tonen van parallelle doorsnijdingen;
- stereoprojekties met liquid crystal stereo display;
- vele volume rendering technieken;
- vele surface based technieken;
- diverse grafische tools.

Middels demonstraties zijn deze tools getoond aan potentiële gebruikers en op diverse gebieden toegepast, waarvan hieronder een aantal voorbeelden.

Toepassing:

- *Inwendige structuur nematoden.*
Opname van een serie beelden met fluorescentie CSLM, 60 x objectief, middelen van beelden voor ruisvermindering. Dataset: 64 beelden van 192 * 256 pixels, 8 bits/pixel (256 grijswaarden). Restauratie technieken voor vermindering lichtintensiteit in de diepte van het preparaat eerste orde interpolatie om kubische voxels te krijgen Resultaat: in het gerekonstrueerde 3D beeld interactieve selectie van willekeurige doorsneden, om inwendige structuur te kunnen bekijken (zie fig. 4).
- *Vorm en ligging chromosomen*
Opname van een serie beelden met fluorescentie CSLM, 60 x objectief, middelen van beelden voor ruisvermindering. Dataset: 12 beelden van 512 * 384 pixels, 8 bits/pixel. Vergroting van contrast. Resultaat: weergave via stereo projekties met rood/groen beeld en liquid crystal stereo display.
- *DNA verdeling in plantekern*
Opname van een serie beelden met fluorescentie CSLM, 60 x objectief, middelen van beelden voor ruisvermindering. Dataset: 24 beelden van 384 * 512 pixels, 8 bits/pixel. Restauratie technieken voor ruisver-

mindering en vermindering lichtintensiteit in de diepte van het preparaat, eerste orde interpolatie om kubische voxels te krijgen. Resultaat: weergave van volume rendered beelden.

- *Poriënstructuur in bodem*

Opnamen gemaakt met Computer Assisted Tomography. Dataset: 23 beelden van 256 * 256 pixels, 16 bits/pixel, segmentatie van bodem met lage dichtheden (rand detectie en drempeling). Resultaat: surface rendered weergave: door simulatie van lichtbron schijnend op het oppervlak worden schaduwen geproduceerd, waardoor structuurverschillen zichtbaar worden.

Beeldanalyse

Bij beeldanalyse is het doel de in het beeld opgeslagen informatie te kwantificeren, dus de analoge eigenschappen van objecten uit de digitale data te bepalen. Voorbeelden zijn bepaling van volume, oppervlakte, dichtheidsverdeling, lengte, etc.

De fundamentele kennis van de verschillende fasen in 3D beeldverwerking is verre van compleet, veel operaties zijn erg complex en vaak is een 2D concept niet naar 3D uit te breiden. De bestaande 3D analyse methoden zijn veelal ad hoc ontwikkeld en niet optimaal. Commercieel zijn nog weinig analyse tools beschikbaar, waardoor algoritmen zelf geïmplementeerd dienen te worden. De segmentatie fase, d.i. het selekteren van de objecten die geanalyseerd gaan worden, kan vaak niet volautomatisch worden uitgevoerd, door de complexiteit van de beelden. Het is dan van belang om interactieve tools te hebben om de segmentatie betrouwbaar uit te voeren.

Projecten ECIT:

- *Mogelijkheden kwantitatief onderzoek met de CSLM.*
De CSLM wordt nu nog voornamelijk gebruikt voor 2D visualisatie (coupes): weinig is bekend over de kwantitatieve eigenschappen van deze microscoop. Er is o.a. veel aandacht besteed aan de juiste calibratie van de

CSLM. Getest is op x-lineariteit, lineariteit in z-richting (stepping motor), juiste vergroting en evenredige belichting. Niet alleen voor betrouwbaar kwantitatief onderzoek, maar ook voor visualisatie doeleinden moet de microscoop hierop goed worden getest. Geïntegreerde intensiteits metingen op latexbollen, die een bekende, homogene fluorescentie intensiteit hebben. Deze test gaf goede resultaten, die perspectief bieden voor het uitvoeren van soortgelijke metingen op plantekernen.

- "Bepaling nucleaire DNA-gehalte van plantecellen via 3D rekonstruktie van CSLM beelden"

Samenwerkingsproject met CPRO-DLO (voorheen ITAL), Wageningen.

Doelstelling: Voor vele processen, die zich in plantecellen afspelen, is het nucleaire DNA-gehalte van groot belang. Het ploëdie niveau kan zeer ver uiteenlopen tussen verschillende celtypen in planteweefsels en is een kritieke eigenschap voor de veredeling. Het bepalen van het DNA-gehalte van b.v. blad kan op een eenvoudige wijze gebeuren via flowcytometrie, waarbij geïsoleerde kernen stoichiometrisch gekleurd worden met een DNA-specifiek fluorochroom. De fluorescentie intensiteit is dan recht evenredig met het DNA-gehalte van de kern. Met deze methode is het echter niet mogelijk om celspecifieke metingen binnen weefsels te verrichten. Tot nu toe is microdensitometrische analyse van Feulgen gekleurde preparaten de enige manier om nauwkeurige metingen te verrichten. Deze zijn echter zeer bewerkelijk en tijdrovend. Met een CSLM is het mogelijk om optische coupes te maken van weefsels, die met een fluorochroom gekleurd zijn. Indien het mogelijk is m.b.v. een CSLM een Z-serie van coupes van cellen gekleurd met een DNA-specifiek fluorochroom te rekonstrueren, is het in principe mogelijk het DNA-gehalte nauwkeurig te bepalen, terwijl er ook cytologische analyse mogelijk is.

Door het toevoegen van een interne standaard, kan niet alleen de intensiteit bepaald worden, maar ook het absolute DNA-gehalte. De juiste kleuring bindt specifiek en proportioneel aan de DNA in de kernen en heeft, voor de bruikbaarheid van een standaard, een fluorescentie intensiteit in dezelfde orde van grootte als deze standaard.

Belangrijke fase in het beeldverwerkingsproces is de rekonstruktie: correctie voor intensiteitsvermindering bij opname van diepere lagen in het preparaat. Een eerste orde correctie is gerealiseerd door vermenigvuldiging van de gedetekteerde intensiteit van iedere laag met een empirisch bepaalde maat, zodat de verkregen intensiteit op de alle lagen ongeveer gelijk wordt. Een theoretische correctie, op grond van de karakteristieken van het specimen, moet nog bepaald worden.

Nadat het totale DNA gehalte van de plantekernen bepaald is, zal de lokale verdeling van DNA in een kern bestudeerd worden.

- "Methodenontwikkeling t.b.v. het bodemstruktuuronderzoek"

Samenwerkingsproject met het Staring Centrum/STI-BOKA, Wageningen. Doel is het onderzoeken van de toepassingsmogelijkheden van beeldvormende radio-

diagnostische scanningstechnieken (CAT en MRI) en drie-dimensionale analyse methoden voor onderzoek naar de bodemstructuur en bodemtransportprocessen. Diverse bodemmonsters zijn getest op bruikbare technieken voor segmentatie van macroporiën. Lage dichtheden in de bodem zijn gesegmenteerd en gevisualiseerd m.b.v. surface rendering technieken; dit geeft een goed inzicht in de lokale verschillen in dichtheidsverdeling.

Conclusies

Door het beschikbaar komen van 3D acquisitie apparatuur wordt de vraag naar bruikbare methoden voor visualisatie en analyse van de zo verkregen volume datasets steeds groter.

Drie-dimensionale visualisatie tools kunnen zeer waardevol zijn bij het bestuderen van 3D structuren; diverse tools zijn reeds getest en gepresenteerd. Momenteel zijn de meer geavanceerde visualisatie tools nog niet direkt op de plaats van 3D beeld acquisitie aanwezig, wat gerealiseerd moet worden. De mogelijkheid tot interactief genereren en real time bekijken van beelden zal hierbij noodzakelijk zijn. Huidige problemen qua verwerkingssnelheid en geheugencapaciteit zullen in de nabije toekomst waarschijnlijk verdwijnen, door de ontwikkeling van steeds snellere grafische processoren en de betaalbaarheid van werkstations. Het gebruikersinterface zal zeer belangrijk zijn om interactief objecten te kunnen segmenteren, interessante gebieden in de volume data te kunnen aangeven en vrij in de volume data te kunnen kijken. Dit is tevens van groot belang voor de stap naar kwantitatief driedimensionaal onderzoek. Om kwantitatief onderzoek te kunnen uitvoeren moet in het algemeen een segmentatie op de in de data aanwezige objecten worden uitgevoerd, wat vaak niet volautomatisch gelukt. Verwacht wordt, dat binnen afzienbare tijd voldoende 3D beeldanalyse methoden beschikbaar zijn om meer informatie te kunnen halen uit de 3D datasets, die met huidige acquisitie technieken kunnen worden verkregen.

Een terrein van onderzoek dat ook binnen het landbouwkundig onderzoek van belang zal worden is het combineren van meerdere types data (bv. CAT & MRI, CSLM & SEM) in één beeld, om de voordelen van de verschillende technieken te combineren. □

Literatuur

Fuchs, H., Levoy, M., Pizer, S.M., *Interactive visualization of 3D medical data*, Augustus 1989, IEEE Computer, pp. 46-50.

Russ, J.C., 1990, *Computer Assisted Microscopy: the measurement and analysis of images*, Plenum Press.

Wilson, T., 1990, *Confocal Microscopy*, Academic Press.

Proceedings 'First conference on visualization in biomedical computing', mei 1990, Atlanta, Georgia, IEEE Computer Society Press.

Mw. drs. J. de Lange is werkzaam bij TFDL/ECIT, Postbus 356, 6700 AJ Wageningen, tel. 08370-76705.