

超音波影像實驗室

專題期末報告

指導老師：李百祺 教授

專題學生：電機 范○○ B04*****

目錄：

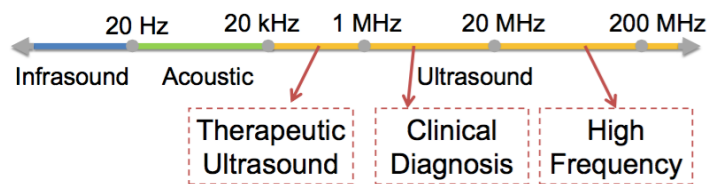
- I. 細胞實驗相關：
 - 甲、超音波系統理論
 - 乙、實驗原理與 Matlab 實驗數據分析
- II. Self-Learning part:
 - 甲、Matlab -- Array 處理與資料結構
 - 乙、Matlab -- 初階/進階繪圖
 - 丙、Matlab -- 影像處理
- III. 實驗 3 維影像 Data 處理
- IV. Practice project(實作)

一、細胞實驗相關：

甲、超音波影像理論：(0412)

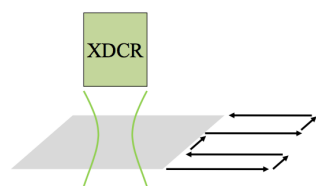
【超音波】

為什麼要特別使用超音波呢？因為其具有非侵入性、沒有游離輻射以及較低的成本，因此我們將它應用在醫學診斷的影像以及治療等。而其具有一般介質傳遞波動的性質，在細胞實驗中，細胞放在培養液中，基本超音波傳遞速度 1540m/s 左右，空氣傳遞約 343m/s 。其餘反射、折射與衰減現象與其他波動雷同，另外其高解析度，以及深度較深的特性是他的優勢(相對於光學)。



【細胞量測】Pulse-echo Measurement

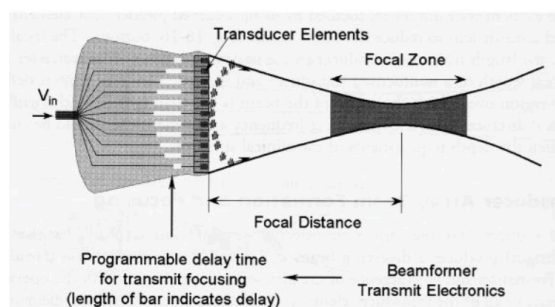
利用探頭接收到超聲波傳送的時間差以及能量差量測出細胞的影像。可分成 4 種重要的掃描方式：(1) **A-Mode: Amplitude** 掃描，這是單點的掃描模式，利用波動傳送時間差計算物體影像，波強度以振幅顯示。(2) **B-Mode: Brightness** 掃描，一維的掃描作業，並將回音收到的信號強度，用亮度表示。(3) **M-Mode: Motion** 掃描，跟 **A-Mode** 掃描類似，只是將收到訊號大小轉由亮度顯示，並且增加時間軸，重複進行掃描。(4) **C-Scan**: 相對於前幾個掃描方式，**C-Scan** 是二維掃描，用下圖



的方式做二維掃描，利用接收時間差重建二維影像。在實驗中，我們使用 **A-mode** 來量測輸入雷射能量，在使用 **C-scan** 二維掃描細胞影像。

【探頭】

這裏介紹兩種：一個為聚焦探頭、另一個是非聚焦探頭，在做實驗的時候，使用聚焦探頭，需要特別調整細胞位置在對焦區域。



乙、實驗原理與數據：

【實驗流程】

在細胞實驗裡面，實驗儀器流程大致為：雷射發射器發出後，經過染色儀器，再藉由分光鏡以及濾鏡，將每次注入雷射的能量控制在 20~200Uw(根據實驗不同能量不同)，當反射鏡反射雷射光並打到細胞培養器後，在細胞上面黏著的奈米金粒子，其會產生超音波訊號，再由聚焦是探頭接收，使用 Matlab 做數據處理。

【數據搜集及影像處理】(附檔)

在數據處理上，我們在 z 軸上依照細胞高度切成 9 段，在每一層上掃描數次，然後再 Matlab 上頭做以下處理：

(1) 將所有資料建構成 3 維的陣列存取

(2) 在每一層資料裡面，依序通過一個 Bandpass filter

```
% 3D data 處理 (濾波、取樣) 放在project 3 dim array中
for m = 1:filenumber
    filename2 = [file(m).name '.mat'];
    load(filename2);
    %save the 3D array data dim.
    [Nscanline Nsample Nframe] = size(y);
    dx = 160*(Vpp*2)/Nscanline; %for Nscanline=100,Vpp=0.5 dx=1.6
    x_axis = (0:Nscanline-1)*dx; % mm % one-dim array 0~160 (not contain 160)
    y_axis = x_axis; %2D array 160*160

    for k = 1:Nframe %for Nframe=100
        for j = 1:Nscanline
            %在二維陣列中，將每筆資料做bandpass filter濾波，結果為2 dims.
            filt_Data(:,j) = conv(y(j,:,k)',b,'same');
        end
        %將filt_Data做hilbert transformation
        DM_Data(:,j,k) = abs(hilbert(filt_Data));
        project(:,k,m) = max(DM_Data(Cutsample,:,k)); %pickup the sample 10~100 to find Max
    end
end
```

(3) 將每層的數值做 normalization 把小於某個 threshold 當作雜訊濾掉

```
DR=30;
project_max = max(project(:));
project_nor = project/project_max;
%convert mag. to dB type
project_db = mag2db(project_nor);
project_db= project_db + DR;
%找出在經過mag.dB converter & 平移 DR參數之後，仍然小於0的數字，存取位置，。並設成0。
f = find( project_db< 0 );
project_db(f) = 0;
img=zeros(100,100,filenumber/repeat_times); % img == 2D zero arrays
```

(4) 在該層上面的多次掃描，做平均後，疊合成 image(gray)

```
for n = 1:filenumber/repeat_times
    % flipplr flip array left to right. # size(A)=100,100,3
    A(:,:,repeat_times*n-(repeat_times-1):(repeat_times*n)) =
    flipplr(project_db(:,:,repeat_times*n-(repeat_times-1):(repeat_times*n)));
    temp=zeros(100,100);
    temp = A(:,:,repeat_times*n);

    temp = [A(:,:,1)+A(:,:,2)+A(:,:,3)]/3
    temp=(A(:,:,repeat_times*n-(repeat_times-1))+A(:,:,repeat_times*n-(repeat_times-2))+A(:,:,repeat_times*n))./re

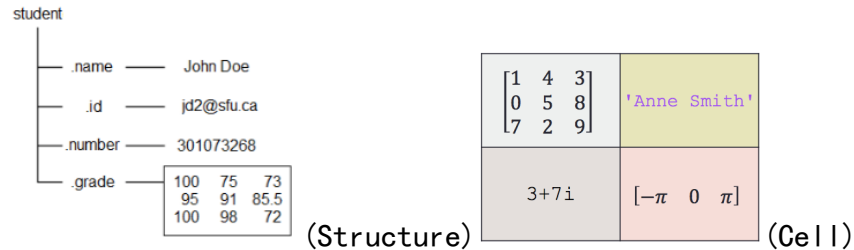
    figure about temp(average(A)) #A is the flip of project_db
    figure, image(x_axis,y_axis, temp);
    colormap(gray(DR));colorbar;
    xlabel('X position (μm)','fontsize',16);
    ylabel('Y position (μm)','fontsize',16);
    title(' figure 1 ');
    set(gca,'fontsize',14);
    axis square;

    img(:,:,n)=temp;
```

二、Self-Learning section 學習筆記：

甲、Array 處理與資料結構：(Array 作為基本結構)

Structure: 可以存取 heterogeneous data 利用不同的 field 包裝可以建立巢狀結構。



Cell: 可以存取不同的 data 形式，像是建構出不同的小 cell 存取。

語法: $A(m, n) = \{\text{cell 存取內容}\}$ 。(實作 1)

【資料存取】

High/Low level:

High: 使用 load & save 進行讀取和寫入，架構較固定。

Low: 使用 fopen, fclose, fscanf 等讀取、寫入。

使用 fscanf 時，會由上到下，由左到右每一個單位讀取，我們通常會搭配 ~feof 來讀取整個資料(實作 2)

乙、初/進階繪圖

【初階繪圖】

在 matlab 繪圖中，主要物件分成三個部分: (1) figure (2) Line

(3) Object，三的部分。除了利用最基本的 plot, subplot 之外，我們要改變個別的部件或是瞭解其細部內容可以使用 get() 和 set()

(實作 3)

【進階繪圖】

內容: log plot, Histogram graph, bar chart, Pie chart, polar chart, stair & stem chart 以及 plot3() 之三維做圖。

(實作 4)

丙、影像處理

【分析 hist 頻譜&亮度與對比調整】

使用 hist 可以觀察在灰階影像中，不同 pixel 的數值分佈，亮度可以藉由將每個值都乘上某一個固定數值調整，對比可以只用 histeq() 調整，他會將原本的 hist 分佈範圍拉長在 0~256 之間分佈，使其對比變大。(實作 5)

【去背景處理&影像辨識(數多少個細胞)】

在影像辨識中，最基本的部分是我們必須在 hist 頻譜裡面，找出 threshold 來將兩個不同的物體切割開來，在使用 connected-component labeling 將連續的部分依序標號碼，如此可以數出整個照片中的細胞數量。過程中可能需要找出 background 的分佈，並將其去除才可以提高細胞辨識率。(實作 6)

三、實驗三維影像 data 處理：

這次三維 data 處理，一共有 9 層的資料，我們主要將 z 軸上不同高度的影像資料，利用 gif 動畫做成一個連續的照片呈現。處理步驟簡易如下：

(1) 濾波和最大值投影

```
for i = 1:9
    filename=[filename '-Z' int2str(i) '.mat'];
    load(filename);
    %save the 3D array data dim.
    [x_line y_line Nframe] = size(y);

    for k = 1:Nframe %for Nframe=100
        for j = 1:x_line

            %在二維陣列中，將每筆資料做bandpass filter濾波，結果為2 dims.
            filt_Data(:,j) = conv(y(j,:,k)',b,'same');
        end
        %[Maximum projection] 將filt_Data做hilbert transformation
        DM_Data(:,k) = abs(hilbert(filt_Data));
        %pickup the sample 10~100 to find the Max. in the each column of a
        %two dim. maxtrix
        project(:,k,i) = max(DM_Data(Cutsample,:,k));
    end
end
save(['projection_' filename '.mat'],'project')
```

(2) 將 data 做 normalization，並把太小的數據刪除掉。

```
project_max = max(project(:));
project_nor = project/project_max;
%convert mag. to dB type
project_db = mag2db(project_nor);
project_db= project_db + DR;
%找出在經過mag.dB converter & 平移 DR之後，仍然小於0的數字，存取位置，。並設成0。
f = find( project_db < 0 );
project_db(f) = 0;
img_3D = zeros(100,100,Nframe); % img == 3D zero arrays
```

(3) 把每層的资料做 flip, 使其和光學影像方向一致

```
[Xscanline Yscanline Nframe] = size(project_db);  
for i = 1: Nframe  
    A(:, :, i) = fliplr(project_db(:, :, i));  
end
```

(4) 做圖並使用 gif 檔

```
figure;  
name = ['N7-1-25nJ.gif'];  
for n = 1:Nframe  
    removal(:, :) = double(bwareaopen(temp(:, :, n), 7)); %後面數字控制相連的pixel  
    [row column] = find(removal(:, :));  
    for i = 1:length(row)  
        img_3D(row(i), column(i), n) = temp(row(i), column(i), n);  
    end  
    image(x_axis, y_axis, img_3D(:, :, n))  
    xlabel('X position (μm)', 'fontsize', 16)  
    ylabel('Y position (μm)', 'fontsize', 16)  
    title(['Z = ' int2str((n-1)*2) ' μm'], 'fontsize', 14)  
    colormap(gray(DR)); colorbar;  
    set(gca, 'fontsize', 14);  
    axis square  
  
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%  
    shg %make the current figure visible and raises it above all other figures.  
    drawnow %update figures and processes any pending cackbacks.  
    frame = getframe(1); %save the frame date in the frame  
    im = frame2im(frame); %return img date associated with movie frame  
    [imind, cm] = rgb2ind(im, 256); %convert RGB img to indexed img  
    %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
if n == 1  
    imwrite(imind, cm, name, 'gif', 'Loopcount', inf, 'delaytime', dt);  
else  
    imwrite(imind, cm, name, 'gif', 'WriteMode', 'append', 'delaytime', dt);  
end  
end
```

結果如 N7-1-25nJ. gif 檔

四、Practice Project:

實作 1. Array cell 形式輸入

Create a cell array B that has the following structure

'This is the first cell' (String)	[5+j*6 4+j*5] (1x2 complex number array)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 (3x3 integer array)	{'Tim', 'Chris'} (1X2 string array)

```

B(1,1)={"This is the first cell"}
B(1,2)={ [5+j*6 4+j*5] }
B(2,1)={ [1,2,3;4,5,6;7,8,9] }
B(2,2)={ {'Tim', 'Chris'} }

%B{2,1} is the element value in {2,1}cell
%B(2,1) is cell type
    
```

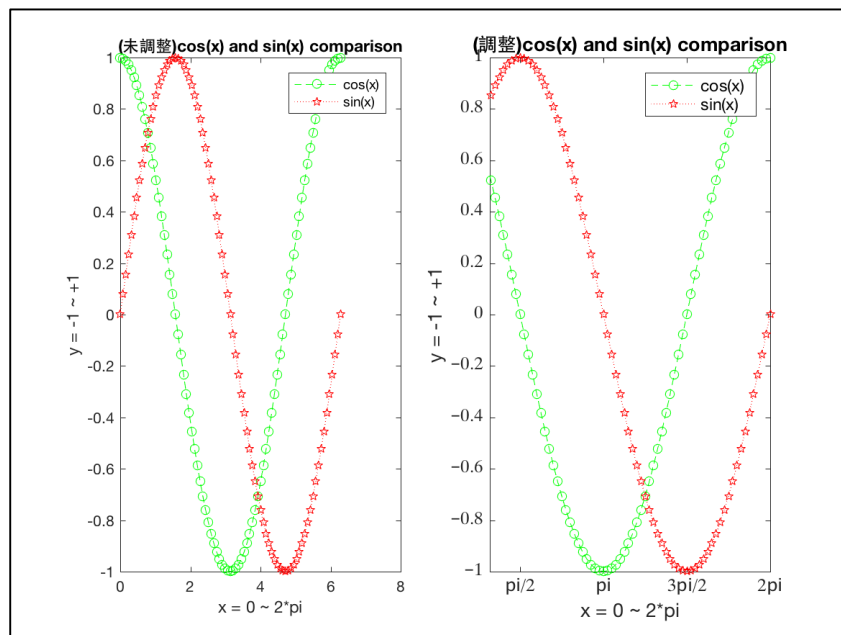
實作 2. 讀取 student file 並放入不同的

David	40.2	90.6	22.1	67.3
Tom	55.3	26.2	44.0	59.3
Marry	89.2	77.4	35.1	77.8
Sherry	77.3	65.3	48.9	99.3

```

fid = fopen('student.txt','r');
i = 1;
while ~feof(fid)
    name(i,:) = fscanf(fid,'%c',1);
    test1(i) = fscanf(fid,'%g',1);
    test2(i) = fscanf(fid,'%g',1);
    test3(i) = fscanf(fid,'%g',1);
    test4(i) = fscanf(fid,'%g\n',1);
    i=i+1;
end
fclose(fid);
    
```

實作 3. 畫出 $\sin(x)$ 和 $\cos(x)$, 並嘗試調整其物件特性, 作出比較。



```

theta = 0:pi/40:2*pi;
y1 = cos(theta);
y2 = sin(theta);
subplot(1,2,1);plot(theta,y1,'o--g',theta,y2,'p:r');
legend('cos(x)','sin(x)');
xlabel('x = 0 ~ 2*pi');
ylabel('y = -1 ~ +1');
title('(未調整)cos(x) and sin(x) comparison');

subplot(1,2,2);plot(theta,y1,'o--g',theta,y2,'p:r');
legend('cos(x)','sin(x)');
xlabel('x = 0 ~ 2*pi');
ylabel('y = -1 ~ +1');
title('(調整)cos(x) and sin(x) comparison');
set(gca,'FontSize',12);
set(gca,'XTick',0:pi/2:2*pi);
set(gca,'FontName','symbol');
set(gca,'XTickLabel',{'0','pi/2','pi','3pi/2','2pi'});
xlim([1,2*pi])

saveas(gcf,'cos(x)&sin(x)','png');
    
```

實作 4. 將細胞的 2 為數據在三維空間中呈現。

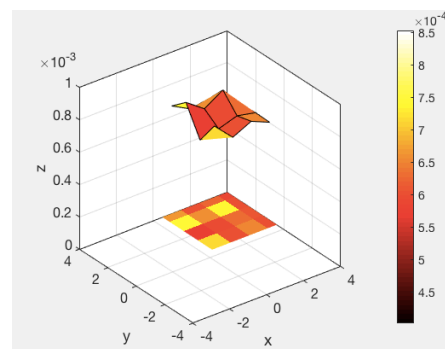
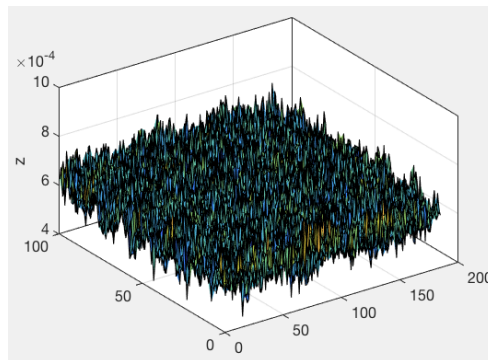
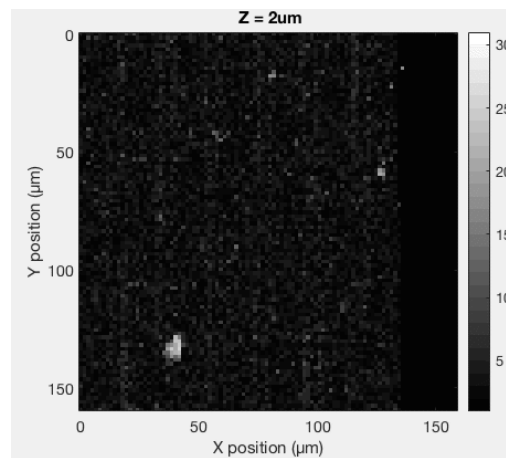
```

a=size(data)
data_sum=zeros(100,186);
for i = 1:a(3)
    data_sum(:, :) = data_sum(:, :) + data(:, :, i);
end

data = data_sum;
data_avg = data./a(3);

[x, y] = meshgrid(1:1:186,1:1:100);
%z = data_avg(x,y);
%mesh(x,y,data_avg);hold on;
surf(x,y,data_avg); box on; set(gca,'FontSize', 16); zlabel('z');
%set(gca,color,'r')
colorbar;
colormap(hot);
xlim([-4 4]); xlabel('x'); ylim([-4 4]); ylabel('y');
hold on;
imagesc(data_avg); axis square; xlabel('x'); ylabel('y');

```

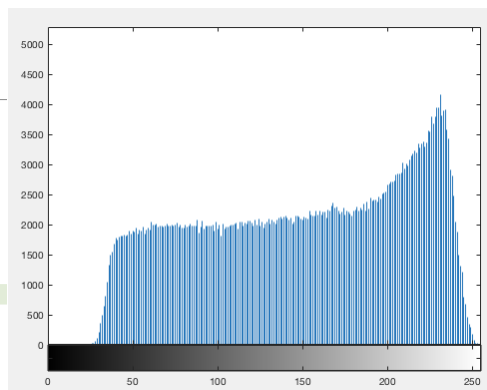


實作 5. 將 T-cell 的影像轉為 gray 並且做對比與亮度的調整。

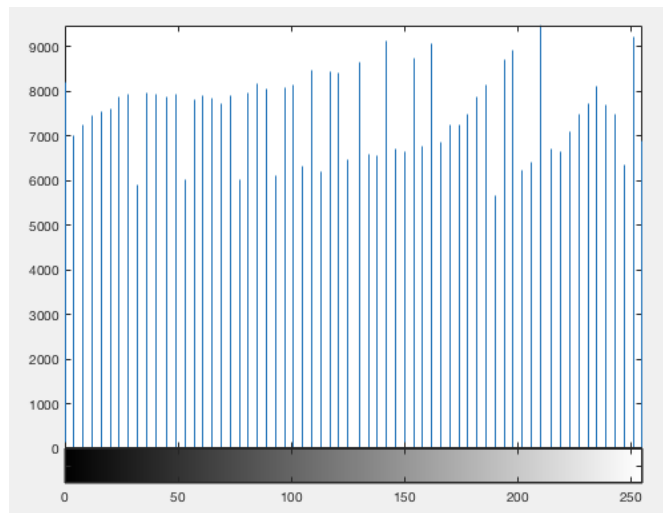
```

clear all; close all;
clc;
I=imread('T-cell.jpg');
I_gray=rgb2gray(I);
subplot(1,1,1); imhist(I_gray);
hold on;
subplot(1,3,1); imshow(I_gray);
title("gray (normal)");
J_gray=immultiply(I_gray,1.5);
K_gray=histeq(I_gray);
subplot(1,3,2); imshow(J_gray);
title("gray (multiply 1.5)");
subplot(1,3,3); imshow(K_gray);
title("gray (histeq())");

```



(hist 分析)

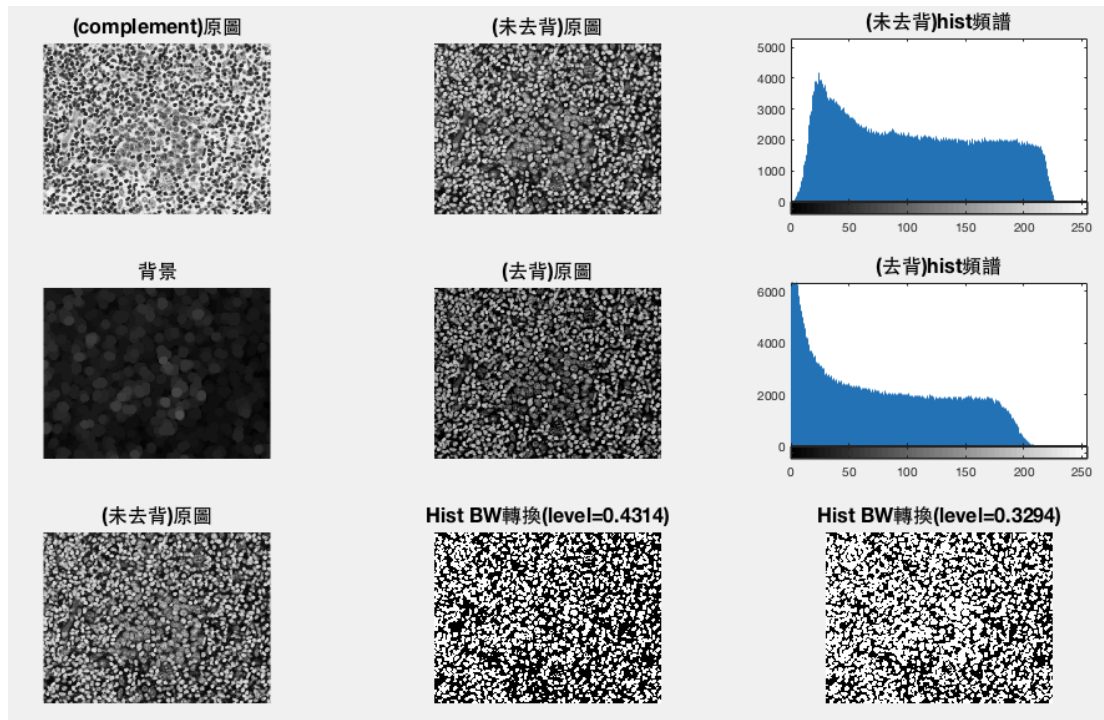


(histeq 之後結果)



實作 6. 將上述 cell.jpg 檔進行 hist 分析，利用影像辨識 (connected-component)，計算途中細胞數量，並觀察去除背景，以及沒有去除背景的数量差異準確度，哪一個較為正確？試解釋。

```
clear all; close all;
clc;
I=imread('T-cell.jpg');
I_gray_noncompl=rgb2gray(I);
I_gray=imcomplement(I_gray_noncompl);
%I_gray=I_gray_noncompl;
subplot(3,3,1); imshow(I_gray_noncompl);
title("(complement) 原圖", 'FontSize', 16);
subplot(3,3,2); imshow(I_gray);
title("(未去背) 原圖", 'FontSize', 16);
subplot(3,3,3); imhist(I_gray);
title("(未去背) hist 頻譜", 'FontSize', 16);
level1=graythresh(I_gray);
I_bw=im2bw(I_gray, level1);
%remove the background
BG = imopen(I_gray, strel('disk', 15));
subplot(3,3,4); imshow(BG);
title("背景", 'FontSize', 16);
I2_gray = imsubtract(I_gray, BG);
level2=graythresh(I2_gray);
I2_bw=im2bw(I2_gray, level2);
subplot(3,3,5); imshow(I2_gray);
title("(去背) 原圖", 'FontSize', 16);
subplot(3,3,6); imhist(I2_gray);
title("(去背) hist 頻譜", 'FontSize', 16);
subplot(3,3,7); imshow(I_gray);
title("(未去背) 原圖", 'FontSize', 16);
subplot(3,3,8); imshow(I_bw);
title("Hist BW 轉換 (level=0.4314)", 'FontSize', 16);
subplot(3,3,9); imshow(I2_bw);
title("Hist BW 轉換 (level=0.3294)", 'FontSize', 16);
%I2_bw=imcomplement(I2_bw);
[labeled, numObjects]=bwlabel(I_bw, 8);
[labeled2, numObjects2]=bwlabel(I2_bw, 8);
```



level1	0.4314
level2	0.3294
numObjects	714
numObjects2	362

實際 count 出來數量，未去除背景者:714 顆、去除背景者:362 顆。
會有如此現象，我們可以從 hist 圖中看出端倪，在去背之後，因為背景和原本 cell 的顏色部分地方太過於接近，所以再去背景之後，level 取值容易讓一些集中在原本背景很亮的地方，必去除掉。整體而言使用未去除背景的辨識度較高。

整學期心得：

整學期很快的就過去了，一開始進入實驗室的時候，感覺得出來這裏和其他實驗室有很不一樣的感覺，一方面是生物相關，很多理論知識其實我還需要學習，另外一方面就是在這裡想做的東西其實是很自由的。在學期初幾次還學姊的討論之後，我決定要學習在細胞時候之後的數據處理，也就是使用 matlab 這個強大的處理工具，學姊分成兩個部分指導我，一個是瞭解超音波影像他裡論的部分，像是掃描方法等等，另外一部分就是藉由每次實驗完之後的數據處理來讓我練習，第一次看 code 的時候其實非常的不習慣和難理解，因為其實沒有受過完整的 matlab 訓練，再經過網路線上課程之後，我對 matlab 才逐漸有瞭解，第二次練習 3D 的處理的時候，就上手很多。另外自己也在網路課程裡面，做一些而外的練習，來補足練習機會。很謝謝老師和學長姐的幫忙，一學

期之後，算是給自己一個管道和進度壓力，必須去主動學習新知識，這樣的學習方式是以前從來沒有的，應該算是大學部和研究所的銜接模式，讓自己逐漸可以尋找問題、找出解決辦法、自我學習以成自己的獨立思考。