

Department of Mathematics and Computer Science

Bioinformatics

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

Master Thesis by Viktor Dinkel

Gutachter:  
Prof. Dr. Piro

Prof. Dr. Britta J. Eickholt

22. Mai 2015

# Abstract

Index

[Abstract 2](#_Toc495169840)

[1. Introduction 5](#_Toc495169841)

[1.1 Detection of neurodegenerative diseases 5](#_Toc495169842)

[1.2 Currently no early detection CSIRO and retinal image analysis 5](#_Toc495169843)

[1.3 Motivation 5](#_Toc495169844)

[2. Methods 5](#_Toc495169845)

[2.1 Quality preprocessing 6](#_Toc495169846)

[2.2 Stabilize movement of the eye 7](#_Toc495169847)

[2.3 Single Image Width Measurement 11](#_Toc495169848)

[2.3.1 Optic disc detection 11](#_Toc495169849)

[2.4 Extracting parameters from a Sequence of images 11](#_Toc495169850)

[2.5 Post processing of parameters 11](#_Toc495169851)

[4. Results 12](#_Toc495169852)

Abbildungs- Tabellenverzeichnis

# Introduction

## Detection of neurodegenerative diseases

Late onset Alzheimers Disease: PET & MRT

## Currently no early detection CSIRO and retinal image analysis

Vessel properties (width), correlation with diseases

Previously applied only on single images, expand into sequence

## Motivation

Develop new diagnosis method

Research vessel properties, measure vessel elasticity in IR sequence

# Methods

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

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

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

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

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

## Quality preprocessing

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

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

.

## Stabilize movement of the eye

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

1. Python feature matching using OpenCV

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

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

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

1. Hugin Panorama Creator

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

1. ImageJ Image Stabilizer by Kang Li

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

1. ImageJ Template Matching

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

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

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

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

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

## Single Image Width Measurement

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

### Dimensions

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

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

### Optic disc detection

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

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

**Vessel segmentation**

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

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

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

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

Skeletonization

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

Vessel skeleton, remove branches

Partition eye into zones A, B, C

Definition der Gefäße

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

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

als zentrale, linke und recht Splines definiert.

Messung der Gefäßbreite

Zur Ermittlung der Breite wird der Abstand zwischen den zugehörigen linken und rechten splinekoordinaten berechnet. Dies wird für alle linken- bzw. rechten splinepunkte eines Gefäßes durchgeführt und im Anschluss wird der Durchschnitt daraus gezogen, um die einzelnen eventuellen Messfehler zu begradigen. Ein Breitewert eines Gefäßes ist also das Mittel aller punktuellen Entfernungen seiner Außenwände in Pixeln. Dies wird für jedes Gefäß eines Frames durchgeführt.

**Vessel width measurement**

Spline along the skeleton

Gradient points along the spline, averaging

## Extracting parameters from a Sequence of images

Die Erfassung der Veränderung der Gefäßbreite über einen bestimmten Zeitraum hat zusätzliche Anforderung, die über einfache Messungen der Gefäße eines Bildes hinausragen.

Durch spezielle Anforderung an eine Sequenz von Bildern hatte sich die Vorlage als unzureichend erwiesen.

In manchen Fällen wurde die Disk nicht richtig erkannt, so dass die Gefäße nicht ordnungsgemäß den Zonen zugeordnet werden konnten. Das wesentliche Problem

lag allerdings darin, dass die Gefäßlängen durch die Verschiebung der Zonengrenzen ebenfalls unterschiedlich waren, da sie dort im Prinzip "zerschnitten" wurden

(mehr dazu in Teil X). Deshalb ist es sehr wichtig, dass die optische Disk absolut richtig und eindeutig die gesamte Sequenz hindurch identifiziert wird.

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

## Post processing of parameters

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

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

# Results

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

SOURCES:

<https://docs.opencv.org>

Verdünnungsalgorithmus:

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

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

pp. 359-373, 1989.

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

Methodologies-A Comprehensive Survey," IEEE Transactions on

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

September 1992, p. 879