

ИССЛЕДОВАНИЕ И ВЫБОР МЕТОДОВ КЛАССИФИКАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ КЕРАТИНОЦИТОВ С ЦЕЛЬЮ ОЦЕНКИ ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ

Киселёв К.И., Адамов В.Г.

Донецкий национальный технический университет, г. Донецк
кафедра автоматизированных систем управления

E-mail: shofer1131@mail.ru

Аннотация.

Киселёв К.И., Адамов В.Г. Исследование и выбор методов классификации изображений кератиноцитов с целью оценки их жизнеспособности. Рассмотрена проблема культивирования и определения текущего состояния кератиноцитов. Проведён обзор наиболее перспективных методов обработки и классификации изображений пластов культуры для оценки её функционального состояния.

Введение. В последние годы большой интерес вызывают исследования, связанные с изучением и применением стволовых клеток в медицине для заместительной клеточной терапии повреждённых тканей. Как указано в многочисленных медицинских источниках [2,4,5], для искусственного формирования полноценной структуры, способной в процессе лечения восстановить все функции кожи, она должна соответствовать определённым требованиям (необходимо наличие всех клеточных элементов, включающих в свой состав не только клетки эпидермального и мезенхимального происхождения, но и элементы внеклеточного матрикса). В последнее время все большее внимание уделяется созданию сложных структур и композиций. Условно клеточные композиции, получаемые биотехнологическими методами, можно разделить на две группы. Первая — это варианты живого эквивалента кожи, состоящие из, так называемого, дермального эквивалента (коллагенового геля с инокулированными в его состав живыми фибробластами), на поверхности которого культивируются клетки эпидермиса. И вторая — культивируемые заместители кожи, например кератиноциты. Кератиноцит — [клетка эпителиальной ткани эктодермального происхождения](#), [промежуточные филаменты](#) которой представлены белком [кератином](#). Кератиноциты составляют основную массу [эпидермиса](#) кожи млекопитающих. В связи с развитием биотехнологических методов восстановления кожного покрова результаты лечения тяжелообожженных существенно улучшились. В настоящее время применяют, главным образом, различные модификации метода Грина[5]. Этот метод позволяет в сравнительно короткие сроки выращивать эпителиальные пласты, значительно превосходящие по площади размеры исходного лоскута кожи. Метод Грина получил заслуженное признание при лечении пострадавших с обширными ожогами, у которых имел место дефицит донорских ресурсов кожи. Посредством пересадки выращенных клеточных пластов можно быстро восстановить кожный покров на большой площади. Общая схема данного метода состоит из следующих этапов:

- 1) отбор и измельчение биопрепаратов;
- 2) создание питательной среды для кератиноцитов на специальном матрасе;
- 3) формирование пласта в течении нескольких дней;

- 4) оценка текущей готовности;
- 5) отслоение готового пласта от матраса и помещение его на марлю с парафином;
- 6) трансплантация на рану и лечение.

Общая постановка проблемы. Как видно из общей схемы, восстановление кожного покрова пересадкой выращенных слоёв кератиноцитов является многоэтапной и сложной технологией. На каждом этапе могут быть допущены ошибки, сводящие на нет проведенную работу. Одной из причин неудачных трансплантаций эпителиальных пластов, является недостаточная готовность пластов к пластике или несвоевременная трансплантация. Оптимальным является пласт, состоящий из 8—12 слоев клеток[2]. При пересадке незрелого пласта, как правило, поверхность культурального флакона зарастает клетками неравномерно. В разных частях пласт имеет неодинаковое количество слоев клеток. Обработка диспазой такой культуры приводит к тому, что пласт снимается неравномерно, с дырками. Эффективность такой трансплантации невысокая. При трансплантации перезрелого пласта нарушается питание кератиноцитов базального слоя. Также существуют другие факторы влияющие на качество материала при выращивании: нарушение температурного режима, неправильная концентрация диспазы и др. Регулярный контроль жизнеспособности культивируемого пласта, поможет своевременно заметить возможные отклонения и принять решение о сохранении качественного фрагмента пласта или засевании матраса новой культурой. Проблема заключается в том, что несвоевременное освобождение матрасов от заведомо некачественных культур ведёт к потере значительных финансовых средств, а главное времени, которое зачастую является решающим фактором при лечении больных с обширными повреждениями кожного покрова. Количество оборудования для выращивания кератиноцитов, как правило, ограничено, а материал для пересадки, который нельзя сделать про запас, зачастую необходим в большом количестве и в сжатые сроки, например во время техногенных катастроф, которые распространены в нашем регионе и стране.

Постановка задачи. Важным этапом для проведения успешной операции, является определение жизнеспособности материала. Существующие подходы к оценке жизнеспособности клеток в большинстве своем основываются на цитохимических, биохимических и цитоэнзиматических методах. Эти методы предполагают обработку клеток химическими препаратами для выявления различной степени интенсивности специфической окраски и позволяют оценивать количество и локализацию исследуемых веществ в клетках. К недостаткам этих методов причисляют временные затраты и субъективность получаемых результатов. В последнее время интенсивно развиваются иммунологические методы анализа клеточной деятельности, например, с помощью моноклональных антител. Клетки обрабатывают моноклональными антителами и подсчитывают количество провзаимодействовавших с ними клеток. Однако теряется информация о локализации – распределении по пласту исследуемых элементов. Рассмотренные методы имеют общий недостаток - они предполагают оказание физического воздействия на клетки. Клетки, лишённые среды пребывания получают дополнительную нагрузку, стресс и последствия этого, как правило, отрицательные. Во избежание таких последствий и для сохранения целостности исследуемых клеточных систем, ведется поиск новых методик определения жизнеспособности клеток с использованием компьютерных технологий, а именно обработка изображений пластов, полученных при помощи микроскопа. Сама по себе идея использования снимков не является новой[3], новизна будет заключаться в использовании новых алгоритмов обработки и классификации изображений, а также новых способов принятия решений о сохранении или замене пласта на новый. В работе была поставлена задача создания специализированной компьютерной системы контроля жизнеспособности

выращиваемых кератиноцитов, а также прогнозирования сроков их окончательного созревания, ключевым звеном которой будет классификация изображений, для определения текущей жизнеспособности пласта кератиноцитов. Входными данными для системы являются снимки матрасов с клетками, полученные при помощи микроскопа. В качестве результатов программа будет выдавать сведения о жизнеспособности культур: процентное содержание живых клеток на матрасе и предложение о дальнейшем выращивании или засевании новых культур. После получения изображения с микроскопа, оно поступает на вход системы контроля качества выращиваемой культуры, где подаётся в блок предварительной обработки. Изображение представляет собой графический файл размером 512x512 пикселей. В этом блоке его цветность будет приведена к оттенкам серого. На данном этапе возможно увеличение резкости, дополнительное контрастирование или изменение яркости, а также другие способы повышения качества снимков. Далее должны быть получены характерные признаки изображения, которые будет возможно использовать для его классификации. Как указано в работе [1], получить такой признак при помощи гистограммы яркостей изображения либо стандартных методов оконтуривания невозможно, потому что яркость клеток на изображении практически равна яркости его фона. Поэтому основной задачей при реализации системы контроля качества выращиваемой культуры является выбор математического аппарата формирования признака принадлежности клеток к живым или мёртвым.

Решение задачи. Изображение слоя кератиноцитов имеет специфическую текстуру. К тому же при получении изображений велико влияние оператора, который может развернуть микроскоп и установить его на разный масштаб. Поэтому классифицирующие признаки должны быть инвариантны к повороту и изменению масштаба. Подобные задачи рассматривались в работе [3], при исследовании фибробластов. Для решения проблем связанных с поворотом и масштабом, планируется исходное изображение монослоя кератиноцитов конвертировать в лог-полярное изображение для устранения эффектов поворота. Полученное лог-полярное изображение станет наклон-инвариантным (угол наклона может составлять от 0 до 360) и практически масштаб-инвариантным. Полярная форма $p(a,r)$ данного $N \times N$ изображения $f(x,y)$ вычисляется по формуле (1). Затем рассчитывается лог-полярное изображение для заданного $N \times N$ изображения (2):

$$p(a,r) = f\left(\left[\frac{N}{2}\right] + \left[r * \cos\left(\frac{2\pi a}{S}\right)\right], \left[\frac{N}{2}\right] - \left[r * \sin\left(\frac{2\pi a}{S}\right)\right]\right) \quad (1)$$

где $a=0,\dots,S-1$; $r=0,\dots,[N/2]-1$; $S=R=N$.

$$lp(i,j) = p\left(i, \left[\frac{\log_2(j+2)}{\log_2(R+2)}\right] * \left[\frac{N}{2}\right]\right) \quad (2)$$

где $i=0,\dots,S-1$; $j=0,\dots,R-1$.

Лог-полярное изображение получается путем сдвига по ряду исходного, при этом яркостные значения исходных пикселей остаются прежними, а меняются координаты их расположения. Лог-полярные изображения текстур с разными углами поворота и масштабом кажутся имеющими только сдвиг по рядам, когда сравниваются с исходной, не повернутой лог-полярной текстурой. Далее полученное лог-полярное изображение подвергается вейвлет преобразованию[6], с использованием пары квадратурных зеркальных фильтров (высокочастотных и низкочастотных). Это вейвлет преобразование отличается от стандартного двумерного вейвлет пакетного преобразования тем, что является адаптивным и

инвариантным к сдвигу ряда (полученном при создании лог-полярного изображения). Как сказано в [6], главным недостатком двумерного дискретного вейвлет пакетного преобразования является зависимость от сдвига входного сигнала благодаря его двунаправленной структуре, а также чувствительность к повороту, т.е. одно и то же изображение в разных наклонах и незначительном изменении масштаба будет иметь разные вейвлет коэффициенты. Особенность данного вейвлет разложения заключается в расчете избыточного количества наборов коэффициентов для получения инвариантности к вращению и масштабу. Вначале необходимо вычислить максимально возможное количество уровней разложения, для изображения $N \times N$ (3):

$$p \leq \min(\log_2(N)), p \in \mathbb{N} \quad (3)$$

Для каждого уровня, рассчитывается 4 периодических изображения без сдвига, по формулам для вычисления стандартного 2-мерного дискретного вейвлет пакетного преобразования, $C_{8k,(i,j)}^{p+1}, C_{8k+1,(i,j)}^{p+1}, C_{8k+2,(i,j)}^{p+1}, C_{8k+3,(i,j)}^{p+1}$. Для получения инвариантности ряда к сдвигу рассчитываются еще 4 периодических изображений (4), (5), (6), (7), каждое со сдвигом на один ряд:

$$N_{8k+4,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n h(m)h(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p \quad (4)$$

$$N_{8k+5,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n h(m)g(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p \quad (5)$$

$$N_{8k+6,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n g(m)h(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p \quad (6)$$

$$N_{8k+7,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n g(m)g(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p \quad (7)$$

где $i=0, \dots, N/2p+1-1$; $j=0, \dots, M/2p+1-1$;

$g(m)$ и $h(n)$ - пара квадратурных зеркальных фильтров высокочастотного и низкочастотного соответственно;

$N_{0,(i,j)}^0 = x_{(i,j)}$ - задается серыми уровнями изображения, полученного лог-полярным преобразованием.

Для повышения эффективности вейвлет преобразования выбираются определенные диапазоны разложенного изображения для декомпозиции в дальнейшем, вместо декомпозиции каждого изображения. Лучший базис представления получается эффективным рекурсивным процессом отбора, который определяет лучшую декомпозицию изображения, основываясь на локальной минимизации функции цены информации. Лучший базис для изображения вычисляется по формуле (8):

$$A_k^p = \left\{ \begin{array}{l} C_k^p, \text{ if } M(C_k^p) \leq \frac{1}{2} \sum_{i=0}^7 M(A_{8k+i}^{p+1}) \\ \sum_{i=0}^7 A_{8k+i}^{p+1} \end{array} \right\} \quad (8)$$

Функцией цены информации, в данной работе, выбрана энтропия Шеннона (9):

$$M(\{x_i\}) = - \sum_{i, x_i \neq 0} x_i^2 \ln x_i^2 \quad (9)$$

Генерируемые вейвлет коэффициенты являются инвариантны к повороту и почти инвариантны к масштабу. Однако, большое число вейвлет коэффициентов непригодно для устойчивой текстурной классификации. Уменьшение коэффициентов производится расчетом величины энергии сигнатуры для каждой субзоны. Таким образом, число энергетических сигнатур равно числу субзон, генерируемых адаптивным преобразованием вейвлет пакетного сдвига ряда. Число сигнатур может варьироваться, в зависимости от массы полезной информации, заложенной в них. Таким образом, в результате лог-полярного и вейвлет пакетного преобразования, инвариантного к повороту и масштабу, получается заданное заранее количество энергетических сигнатур, характеризующих изображение. В работе планируется использовать две энергии сигнатуры – величины среднего значения (10) и стандартного отклонения (11).

$$e_1 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N |C_k| \quad (10)$$

$$e_2 = \sqrt{\frac{1}{N^2} \sum_{k=1}^N (C_k - \mu)^2} \quad (11)$$

Для решения задачи текстурной классификации изображений монослоя фибробластов выбраны классификатор Махаланобиса (12) и метод сравнения Евклидовых расстояний (13).

$$d(x, v_i) = (x - v_i)^T * C^{-1} * (x - v_i) \quad (12)$$

$$d(x) = \sum_{i=1}^N (x - v_i)^2 \quad (13)$$

где x – классифицируемый вектор, v_i – вектор средних для эталонного класса.

Эффективность предложенных лог-полярных вейвлет сигнатур для классификации текстур монослоя клеток, а также методы классификации проверены были проверены другими специалистами при исследовании фибробластов.

Выводы. В результате проведенного анализа были отобраны предположительные методы оценки жизнеспособности кератиноцитов. Рассмотрены перспективные методы обработки и классификации изображений пластов культуры, которые позволяют оценивать их жизнеспособность без физического воздействия на клетки, а именно лог-полярное и вейвлет преобразования, для создания инвариантности изображения к повороту и масштабу, а также классификатор Махаланобиса и метод сравнения Евклидовых расстояний, для текстурной классификации. В дальнейшем планируется проведение машинных экспериментов с эталонными снимками кератиноцитов, с целью проверки эффективности выбранных методов.

Список литературы

1. Адамов В.Г., Каира В.В. Компьютерная система прогнозирования сроков созревания кератиноцитов [Текст]/ Адамов В.Г., Каира // Моделювання та керування станом екологоекономічних систем регіону. – Київ: Міжнародний науково-навчальний центр інформаційних технологій та систем НАН України та МОН України, 3 вип., 2006. - С. 234
2. Смирнов С. В., Киселев И. В., Васильев А. В., Терских В. В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов. [Текст]/ Смирнов С. В., Киселев И. В., Васильев А. В., Терских В. В. // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова - С. 25
3. Меркулова Е.В. Создание модели процесса определения жизнеспособности культивируемых фибробластов для автоматизированной системы [Текст]/ Меркулова Е.В. // Вестник Херсонского Государственного технического университета. - Херсон: ХГТУ.- 2004 р. -№ 1(19).
4. Лаборатория проблем клеточной пролиферации / [Интернет-ресурс]- Режим доступа: <http://idbras.comcor.ru/Celllab/techn.htm>
5. Биотехнологические методы моделирования полнослойной структуры кожи / [Интернет-ресурс]- Режим доступа: <http://www.rusmedserver.ru/ojogi/72.html>
6. Яковлев А. Н. Примеры вейвлет-преобразований.[Текст]/ Яковлев А. Н. // Введение в вейвлет-преобразования - Новосибирск -2003 г