

УДК 0004.04:576.08

**В.Г. Адамов (канд. техн. наук, доц.), К.И. Киселёв (магистр),
Е.В. Меркулова (канд. техн. наук, доц.)**

Донецкий национальный технический университет, г. Донецк
кафедра автоматизированных систем управления
E-mail: VGadamov@gmail.com; shofer1131@gmail.com

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЕРАТИНОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ КОМПЬЮТЕРНОЙ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ КЛЕТОК

В статье рассмотрена проблема культивирования и определения жизнеспособности клеток на разных этапах роста. Показана целесообразность деления выращиваемых кератиноцитов на три класса по уровню их функционального состояния. Использован энтропийный критерий для классификации изображений пластов культуры, приведены результаты исследований.

Ключевые слова: кератиноциты, энтропия, матрица совместной встречаемости, функциональное состояние.

Введение. В последние годы большой интерес вызывают исследования, связанные с изучением и применением стволовых клеток в медицине для заместительной клеточной терапии повреждённых тканей. В работах [1,2,3] показано, что искусственно полученная структура, способная в процессе лечения восстановить все функции кожи, должна соответствовать определённым требованиям. Необходимо наличие всех клеточных элементов, включающих в свой состав клетки эпидермального, мезенхимального происхождения 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 тяжело обожженных существенно улучшились.

В настоящее время при искусственном выращивании клеток применяют, главным образом, различные модификации метода Грина [4]. 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. Укрупнено технологию выращивания кератиноцитов можно разделить на следующие этапы:

- 1) отбор и измельчение биопрепаратов;
- 2) создание питательной среды для кератиноцитов на специальном матрасе;
- 3) формирование пласта в течение нескольких дней;
- 4) оценка текущего функционального состояния клеток и срока созревания;
- 5) отслоение готового пласта от матраса и помещение его на марлю с парафином;
- 6) трансплантация на рану и лечение.

Общая постановка проблемы. Восстановление кожного покрова пересадкой выращенных слоёв кератиноцитов является многоэтапной и сложной технологией. Ключевым моментом является жизнеспособность — способность клеток к дальнейшему развитию после пересадки. 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. Поверхность незрелого пласта зарастает клетками неравномерно. В разных частях пласт имеет неодинаковое количество слоев клеток. Обработка диспазой такой культуры приводит к тому, что пласт снимается неравномерно, с дырами. Эффективность такой трансплантации невысокая. При трансплантации перезрелого пласта нарушается питание кератиноцитов базального слоя. Существуют факторы, влияющие на качество материала при выращивании: нарушение температурного режима, неправильная концентрация диспазы и др. Регулярный контроль функционального состояния культивируемого пласта поможет своевременно заметить возможные отклонения и принять решение о сохранении качественного фрагмента пласта или засеивании 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 возможны в нашем регионе.

Постановка задачи. Задачей является определение функционального состояния кератиноцитов в процессе роста. Существующие подходы к оценке функционального состояния клеток в большинстве своем основываются на цитохимических, биохимических и цитоэнзиматических методах. Эти методы используют обработку клеток химическими препаратами для выявления различной степени интенсивности специфической окраски и позволяют оценивать количество и локализацию исследуемых веществ в составе клеток. К недостаткам этих методов относятся 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 взаимодействовавших с ними клеток. 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 этого используются новые методики определения функционального состояния клеток с использованием компьютерных технологий, путем обработки изображений пластов, полученных при помощи микроскопа. Важными факторами, определяющими эффективность компьютерных технологий, являются алгоритмы обработки и классификации изображений, а также способы принятия решений о сохранении или замене пласта. Для решения поставленной задачи ключевым звеном является классификация изображений с целью определения текущего функционального состояния кератиноцитов. Входными данными являются снимки матрасов с клетками, полученные при помощи микроскопа. В качестве результатов компьютерная система будет выдавать сведения о функциональном состоянии кератиноцитов. Изображение с микроскопа, размером 512x512 пикселей, поступает на вход системы, где выполняется предварительная обработка, в результате которой цветность приводится 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. Таким образом, важным этапом при решении задачи контроля качества выращиваемой культуры является выбор математического аппарата для формирования признака принадлежности клеток к определенному классу функционального состояния.

Решение задачи. Для классификации текстур используются три группы методов: структурные, спектральные и статистические. Исследования показали, что для медицинских изображений наиболее эффективными являются статистические методы.[5] Учитывая сложную текстуру исследуемых изображений, целесообразно для классификации использовать энтропийные характеристики. Определение энтропии выполнялось путем обработка изображений с применением матрицы смежности [6]. Порядок обработки изображения слоя кератиноцитов следующий:

1. Полученное с микроскопа цветное изображение преобразуется в полутоновое.
2. Вычисляется матрица смежности для изображения. Она определяет распределение совместно встречающихся яркостей на заданном направлении и смещении.
3. Матрица смежности нормализуется.
4. Для полученной матрицы вычисляется энтропия.
5. Значения энтропии сравниваются с полученными опытным путём эталонными значениями и делается соответствующий вывод о пригодности биоматериала.

Цветное изображение преобразуем в полутоновое по стандартной формуле:

$$Y[i,j]=0.3*red+0.59*green+0.11*blue,$$

где red, green, blue значения соответствующих соответственно красного, зелёного и синего каналов.

Вычисляемая матрица смежности всех 256 уровней яркости представляет собой оценку плотности распределения вероятностей второго порядка. Элемент матрицы показывает количество переходов яркости i в яркость j на расстоянии d . Для обеспечения инвариантности к вращению используются несколько направлений, а именно 0, 45, 90, 135 градусов. Такое количество направлений достаточно для защиты от ошибок классификации, связанных с изменением угла поворота исследуемого объекта при съёмке. Математически элементы указанных матриц можно определить следующим образом:

$$\begin{cases} C_{\Delta x \Delta y}(i, j) = \sum_{p=1}^n \sum_{q=1}^m L(p, q) \\ L(p, q) = \begin{cases} 1, \text{если } I(p, q) = i \ \& \ I(p + \Delta x, q + \Delta y) = j \\ 0, \text{иначе} \end{cases} \end{cases}$$

где C_{ij} — элемент матрицы смежности, $I(p, q)$ — элемент матрицы яркостей изображения, Δx и Δy — величина смещения

Для направления 0 градусов и смещения 1 покажем вычисление схематично. На рисунке 1 показано как вычисляется значение элемента матрицы смежности $glcm(1,1)$. Этот элемент содержит значение 1, потому что есть только один случай совместного появления в горизонтальном расположении двух пикселей со значением 1. Элемент $glcm(1,2)$ принимает значение 2, поскольку в данном примере два раза встречается совместное появление пикселей со значениями 1 и 2 в горизонтальном размещении.

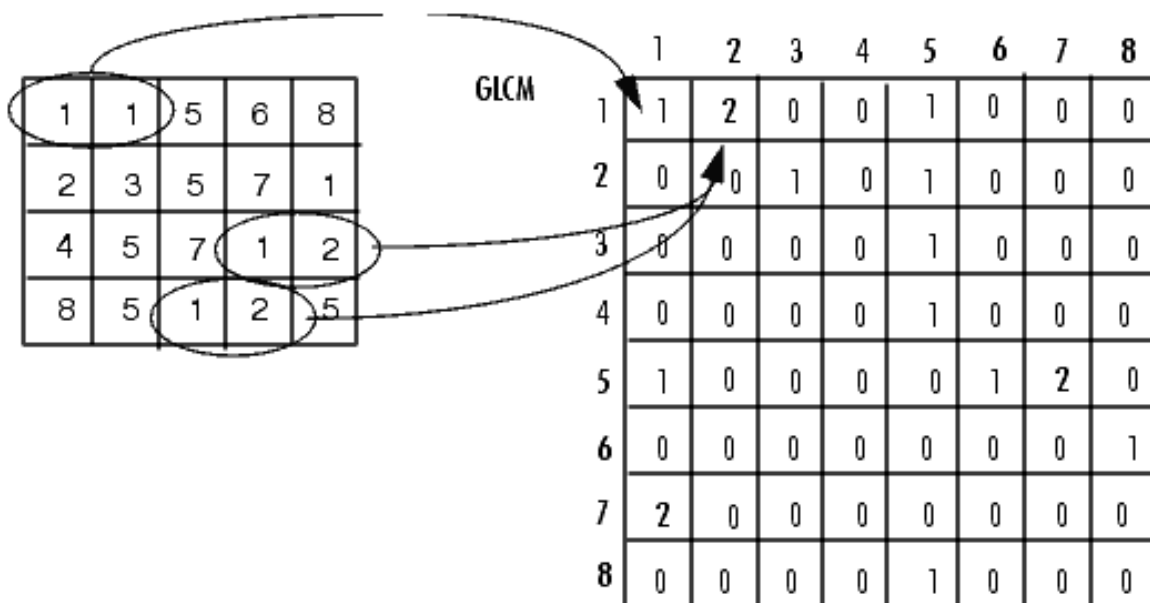


Рисунок 1 — формирование матрицы смежности

Схематично, вычисление матриц по другим направлениям показано на рисунке 2:

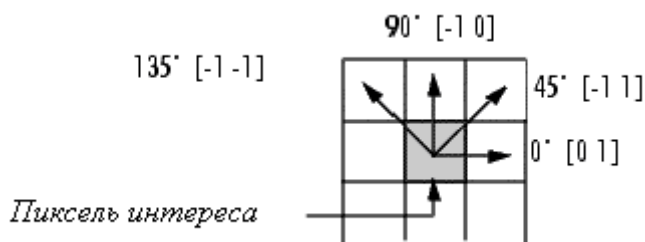


Рисунок 2 — направления для вычисления матриц

Полученные матрицы являются квадратными с размером, равным количеству уровней яркости изображения.

По матрице совместной встречаемости можно находить и другие текстурные признаки [7], но перед этим её необходимо нормализовать, чтобы значение энтропии было положительным. Для этого каждое значение матрицы делим на сумму всех значений. Энтропию вычисляем, используя стандартную формулу:

$$Entropy = -1 * \sum_{i=0}^k \sum_{j=0}^l C_{ij} \log C_{ij}$$

где C_{ij} — элемент матрицы смежности

Полученные результаты. В среде Embarcadero RAD Studio XE на языке Delphi была создана программа, реализующая данный метод и проведены машинные эксперименты со снимками разных возрастов и масштабов.

Для проверки работы в среде Embarcadero RAD Studio XE на языке Delphi была создана программа, реализующая данный метод и проведено 112 машинных экспериментов со снимками кератиноцитов разных возрастов. Для экспериментов были использованы эталонные снимки клеток в трёх и шестидневном возрасте, в масштабах 40, 100, 200, 400. Эти снимки были предварительно разделены экспертами на два класса: хорошие и плохие. Хорошие рекомендованы для дальнейшего произрастания и пересадки, а плохие рекомендовано пересеять, т.к. они с большой вероятностью погибнут к окончательному

сроку. Пороговые значения необходимо выделять отдельно для каждого возраста клеток и масштаба съемки, потому что во время роста происходят существенные изменения текстуры исследуемого пласта, а при изменении масштаба изменяется размер исследуемой области. В таблице 1 представлены значения энтропии, полученные по разным направлениям (0,45,90,135 градусов).

Таблица 1.

Увеличение 100, возраст клеток — трое суток										
угол №	Плохие					Хорошие				
	0	45	90	135	Среднее	0	45	90	135	Среднее
1	10.2570	10.5600	9.90635	10.53717	10.31514	10.96946	11.39729	10.87608	11.3508	11.14842
2	10.0028	10.3904	9.82055	10.35157	10.14137	11.68530	12.07509	11.55029	12.0535	11.84106
3	10.2294	10.7110	10.2020	10.61730	10.43994	11.64705	12.15355	11.69554	12.0594	11.88891
4	10.1543	10.4319	9.75123	10.42459	10.19051	11.62674	12.06623	11.62595	12.0863	11.85131
5	10.3661	10.7643	10.2554	10.74592	10.53296	11.87009	12.28340	11.82214	12.3087	12.07109
6	10.7107	11.0613	10.3616	10.97037	10.77602	12.29597	12.69978	12.18912	12.6723	12.46430
7	10.1098	10.4643	9.92216	10.46103	10.23932	11.14905	11.54798	11.09415	11.5823	11.34337
8	10.8609	11.2582	10.7610	11.24874	11.03224	11.50865	11.92654	11.43047	11.8909	11.68916
9	10.0056	10.2104	9.82011	10.45370	10.12248	11.37699	11.84608	11.44005	11.8567	11.62996

Представим полученные результаты графически на рис.3:

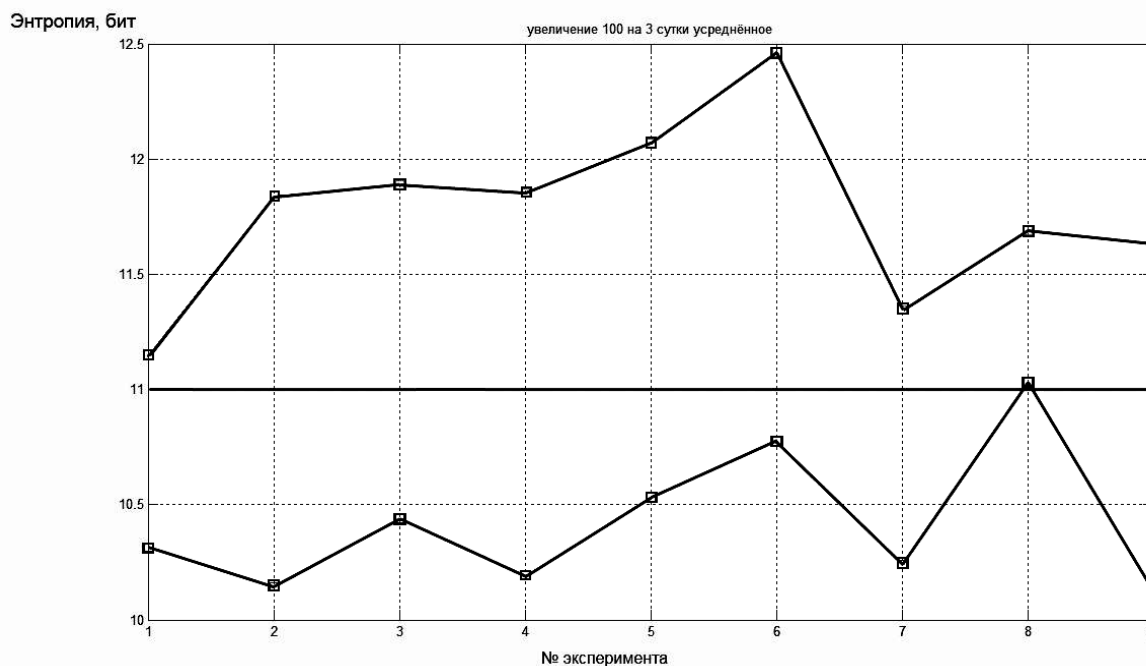


Рисунок 3 — Значения энтропии. Увеличение 100, возраст клеток — трое суток

На графике отчётливо можно выделить порог для энтропии равный 11. При этом значения энтропий хороших пластов находятся выше указанного порога. А значения энтропии плохих пластов находятся ниже. Исключение составляет эксперимент №8, который находится в граничной зоне, что приводит к погрешности. Таким образом, можно сказать, что разделение изображений на классы компьютерной программой, использующей энтропийный критерий, практически совпадает с мнением экспертов.

Были проведены эксперименты с этими же пластами в шестидневном возрасте при масштабе 100 и получено стопроцентное разделение на хороший и плохой классы. На представленном ниже графике (см. рис.4) по оси абсцисс обозначены дни экспериментов, по оси ординат значение энтропии.

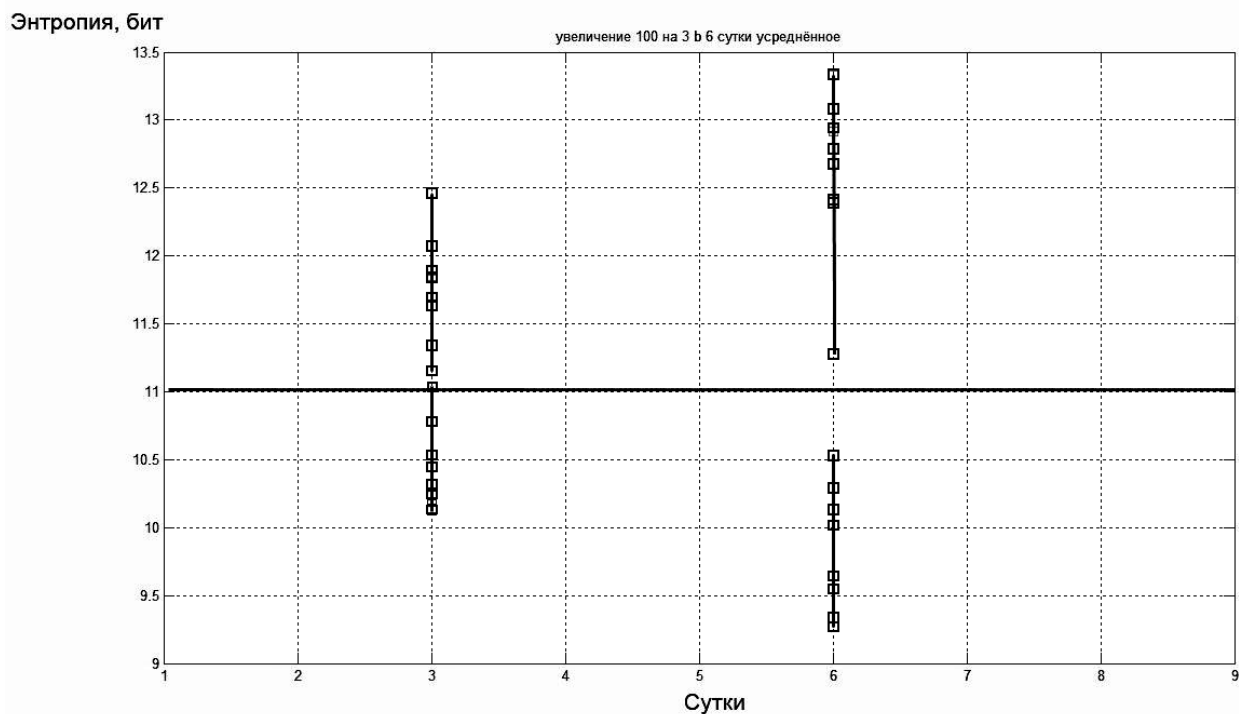


Рисунок 4 — Значения энтропии. Увеличение 100, возраст клеток — трое и шесть суток

При сравнительном анализе кератиноцитов на третьи и шестые сутки их роста можно отметить увеличение дифференцирования между плохим и хорошим классами по мере роста культуры. С течением времени хорошая культура развивается, и значения её энтропии увеличивается, при этом у культуры с худшим функциональным состоянием значения энтропии снижаются. Таким образом, подтверждается предположение о том, что значение энтропии изображения напрямую зависят от функционального состояния клеток. Для дальнейшей проверки эффективности работы программы проведены эксперименты со снимками этих же пластов, но с другими масштабами.

В результате обработки снимков с масштабом 200 выделено пороговое значение энтропии равное 10.5 для разделения на классы «хорошие» и «плохие». При этом нужно отметить снижение порогового значения энтропии при масштабе 200 по сравнению с результатом, полученным при масштабе 100. Происходит также увеличение дифференцирования характеристик плохих и хороших классов по мере роста культуры. Пересечение между классами в этой серии всего одно, на третий день роста клеток, что можно объяснить промежуточным состоянием клеток. Клетки, попадающие в область вблизи порогового значения, в дальнейшем могут повести себя неоднозначно, а именно, предположительно хорошие клетки могут начать умирать из-за воздействия неконтролируемых факторов, а предположительно плохие могут стабилизироваться и при

дальнейшем росте перейти в класс однозначно хороших. Следовательно, клетки находящиеся вблизи порогов необходимо сохранять и вести дальнейшее наблюдение за их ростом до тех пор, пока не станет возможным их однозначное разделение.

С помощью разработанной программы проведено исследование снимков кератиноцитов класса «хорошие». Было установлено, что из совокупности этих клеток можно выделить часть клеток, имеющих большую энтропию нежели остальные. Эти кератиноциты были отнесены к классу «очень хорошие». Таким образом, установлена возможность деления кератиноцитов по их функциональному состоянию на три класса: «плохие», «хорошие» и «очень хорошие». Класс «очень хорошие» является материалом с гарантированно высоким качеством, а класс «хорошие» может иметь более низкие характеристики. Отсюда вытекает решение очень важной задачи, а именно, выделение кератиноцитов очень высокого качества, которые можно будет применять для трансплантации больным, имеющим большую площадь ожогов и нестабильное состояние. Культуры, которые будут отнесены к классу «хорошие», возможно использовать для лечения пострадавших с небольшой ожоговой поверхностью, находящихся в стабильном состоянии. Клетки, которые на ранних стадиях роста отнесут к классу «плохие», будут использоваться для того, чтобы делать засев новых пластов.

С помощью разработанной программы исследованы снимки пластов кератиноцитов с масштабами 40, 100, 200, 400 и получены пороговые значения энтропии для деления по функциональному состоянию клеток на три класса. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

масштаб	«плохие»	«хорошие»	«очень хорошие»
40	11.5 и ниже	11.5 – 12.5	12.5 и выше
100	11 и ниже	11 – 12	12 и выше
200	10.5 и ниже	10.5 – 11.5	11.5 и выше
400	9.5 и ниже	9.5 – 10.5	10.5 и выше

Чтобы оценить точность работы данного метода, выполнено сравнение полученных результатов с мнением экспертов(см. табл. 3).

Таблица 3.

Увеличение 40 на шестые сутки			
№	Энтропия класса «плохие»	Энтропия класса «хорошие»	Энтропия класса «очень хорошие»
1	10.41004	11.62627	12.61264
2	10.66008	12.32320	12.89835
3	11.15998		12.76498
4	11.24770		13.03207
5	11.09470		12.95728
6	10.93963		12.93647
7	10.78791		12.62188
8	11.79927		
9	11.15443		
Всего правильно классифицировано %	88 %	100%	100%

Выводы. Анализ полученных при помощи машинных экспериментов данных показал эффективность использования энтропийного критерия при классификации кератиноцитов по уровню их функционального состояния. С помощью разработанной программы обработки

снимков кератиноцитов определены пороговые значения энтропии для деления выращиваемых клеток на три класса — «плохие», «хорошие» и «очень хорошие». Недостатком полученной программы является вычислительная сложность, т.к. размерность матриц совместной встречаемости равна количеству уровней яркости. Для уменьшения вычислительных объёмов можно провести процедуру уменьшения уровней яркости.

Список использованной литературы

1. Смирнов С. В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов. [Текст] / С.В. Смирнов, И.В. Киселев, А.В. Васильев, В.В. Терских // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. — С. 25.
2. Меркулова Е.В. Создание модели процесса определения жизнеспособности культивируемых фибробластов для автоматизированной системы [Текст] / Е.В. Меркулова // Вестник Херсонского Государственного технического университета. — 2004. — № 1(19).
3. Лаборатория проблем клеточной пролиферации [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://idbras.comcor.ru/Celllab/techn.htm>.
4. Биотехнологические методы моделирования полнослойной структуры кожи [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.rusmedserver.ru/ojogi/72.html>.
5. Яковенко М.К. Статистические описатели текстур / М.К. Яковенко.
6. Robert M Haralick Textural Features for Image Classification / Robert M Haralick, K Shanmugam, Its'hak Dinstein // IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics (SMC). — № 3 (6). — P. 610–621.
7. Яковлев А.В. Применение методов цифровой обработки в контроле качества металлопродукции / А.В. Яковлев, С.В. Пантелеев [Текст].

Надійшла до редакції:
16.01.2012 р.

Рецензент:
д-р техн. наук, проф. Скобцов Ю.О.

V.G. Adamov, K.I. Kiselyov, E.V. Merkulova. The definition of the functional state of keratinocytes using a computer image processing In this paper the definition of the functional state of keratinocytes using a computer image processing approach to the problem of cultivation of cells and determine the viability of cells at different stages of growth. The expediency of dividing keratinocytes grow into three classes according to their level of functional status. Entropy criterion used for classifying the image layers of the culture, results are presented.

Keywords: keratinocytes, entropy, co-occurrence matrix, functional status.

В.Г. Адамов, К.І. Кисельов, К.В. Меркулова. Визначення функціонального стану кератинцитів за допомогою комп'ютерної обробки зображень клітин. У статті розглянута проблема культивування та визначення життєздатності клітин на різних етапах росту. Показана доцільність поділу вирощуваних кератиноцитів на три класи за рівнем їх функціонального стану. Використано ентропійний критерій для класифікації зображень пластів культури, наведено результати досліджень.

Ключові слова: кератиноцити, ентропія, матриця сумісної зустрічаємості, функціональний стан.

© Адамов В.Г., Киселёв К.И., Меркулова Е.В., 2012