

УДК 0004.04:576.08

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЕРАТИНОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНТРОПИЙНОГО КРИТЕРИЯ ДЛЯ КЛАССИФИКАЦИИ

Киселёв К.И., Адамов В.Г.

*Донецкий национальный технический университет,
кафедра автоматизированных систем управления
shofer1131@mail.ru*

Определение жизнеспособности кератиноцитов с использованием энтропийного критерия для классификации. 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. В работах [1, 2, 3] показано, что для искусственно сформированная полноценная 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. 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 [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. 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. 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 жизнеспособности, 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 жизнеспособности кератиноцитов в процессе роста. 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. 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. Для решения поставленной задачи используется такая методика, ключевым звеном которой является классификация изображений, для определения текущей жизнеспособности пласта кератиноцитов. Входными данными для системы являются снимки матрасов с клетками, полученные при помощи микроскопа. В качестве результатов система будет выдавать сведения о жизнеспособности культур: процентное содержание живых клеток на матрасе и предложение о дальнейшем выращивании или засеивании новых культур. Изображение с микроскопа, размером 512x512 пикселей, поступает на вход системы, где возможна предварительная обработка. 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, если это необходимо. Далее должны быть получены характерные признаки изображения, которые будут 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 основной задачей при реализации системы контроля качества выращиваемой культуры является выбор математического аппарата

формирования признака принадлежности клеток к живым или мёртвым.

Решение задачи

Для классификации текстур используются три принципиально разных метода: структурный, спектральный и статистический. Исследования показали, что для медицинских изображений наиболее эффективными являются статистические методы.[5] Учитывая высокую исчерченность исследуемых изображений, стоит исследовать его энтропийные характеристики. Определение энтропии непосредственно по изображению не дало однозначных результатов, поэтому будем обрабатывать изображение по следующему плану[6]:

1. Полученное с микроскопа цветное изображение преобразуем в полутоновое.
2. Вычисляем матрицу смежности для изображения. Она определяет распределение совместно встречающихся яркостей на заданном направлении и смещении.
3. Матрицу смежности нормализуем.
4. Для полученной матрицы вычисляем энтропию.
5. Значения энтропии сравниваем с полученными опытным путём эталонными значениями и делаем соответствующий вывод о пригодности биоматериала.

Цветное изображение преобразовываем 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.

Вычисляем матрицу смежности всех 256 уровней яркости, которая 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 будем использовать 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:

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

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

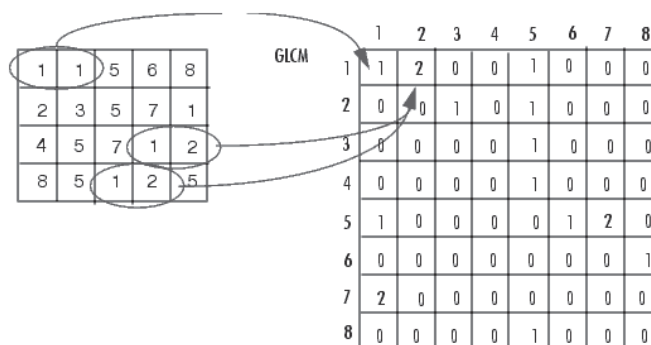


Рисунок 1. формирование матрицы смежности

1 и 2 в горизонтальном размещении. Схематично вычисление матриц по другим направлениям показано на рис. 2.

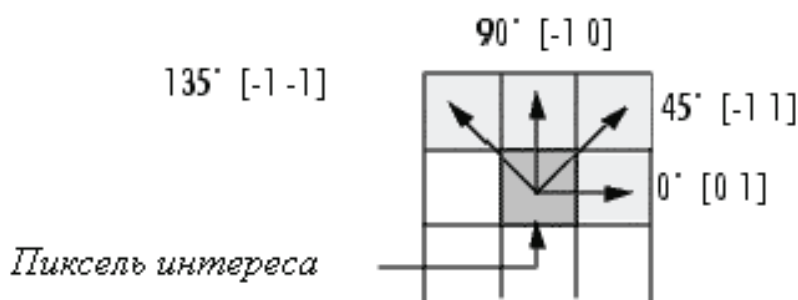


Рисунок 2. Направления для вычисления матриц

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. После этого вычисляем энтропию используя стандартную формулу:

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

где C_{ij} – элемент матрицы смежности

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.

Выводы

Анализ полученных при помощи машинных экспериментов данных показал хорошую работоспособность метода, инвариантность к вращению снимков. Недостатком данного метода является его вычислительная сложность, т.к. размерность матриц совместной встречаемости равна количеству уровней яркости. Для уменьшения вычислительных объёмов можно провести процедуру уменьшения уровней яркости.

Литература

- [1] 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
- [2] 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 г. -№ 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 текстуры
- [6] Robert M Haralick, K Shanmugam, Its'hak Dinstein. «Textural Features for Image Classification». IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics SMC-3 (6): 610–621./ [Текст]
- [7] Яковлев А.В., Пантелеев С.В. Применение методов цифровой обработки в контроле качества металлопродукции / [Текст]