

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДЕЛИ ПРОЦЕССА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

Меркулова Е.В.

Донецкий национальный технический университет, г. Донецк
кафедра автоматизированных систем управления
E-mail: kate@kita.dgtu.donetsk.ua

Abstract

Merculova K.V. Research of cells viability definition process model. The importance of definition problem of a cells functional condition is described and the new approach of its decision is offered. The method of cells monolayers structures classification – log-polar wavelet energy signatures is described. Experiments by definition of accuracy classification with various parameters are lead.

Понятие “состояние” широко используется в различных областях науки, однако его исчерпывающего определения не существует. С философских позиций “состояние” есть количественно-качественная совокупность свойств, мера существования вещи или мера определенной стороны движения. С помощью состояния процесс изменения и развития вещей и явлений сводится к изменению их свойств. Совокупность таких свойств и отношений определяет состояние исследуемого объекта или явления. В современной медицине состояние определяют как интегральную характеристику количественно-качественной совокупности свойств и функций. При этом предполагается, что если исследуется состояние клеток, то используется понятие “функциональное состояние” [1].

Исследования функционального состояния клеток являются важной частью биомедицины и имеют огромное значение для медицины в целом, так как нарушение жизнедеятельности организма человека всегда связано с изменением функционирования клеток. Изучение патологий и изменений, происходящих на клеточном уровне, помогает разобраться в первопричинах болезней людей, выявить наличие инфекций, оценить эффективность лечения и общее состояние здоровья. Патологическое изменение жизнедеятельности клеток неблагоприятно отражается на состоянии организма и должно быть ликвидировано как можно быстрее. В настоящее время многие медицинские учреждения имеют в своем составе специальные лаборатории, которые занимаются исследованием на клеточном уровне и помогают в лечении и постановке диагноза пациентам больниц. А в таких областях биомедицины, как клеточная и тканевая инженерия, исследование жизнеспособности клеток является текущим и неотъемлемым процессом. Основной задачей этого направления является выращивание *in vitro* клеток тканей и органов для последующей их трансплантации и имплантации на поврежденные ткани человека. Для Донбасса, с его многочисленной металлургической и горнодобывающей промышленностью, развитие направления клеточной и тканевой инженерии имеет особое значение. Количество людей, получающих ожоги на предприятиях, увеличивается с каждым годом. И это могут быть не только ожоги от огня, но и от пара, кипятка, электрического тока, химических реактивов и даже радиоактивных источников. Лечение ожоговых больных осуществляется при помощи современных достижений хирургии, комбустиологии и клеточной инженерии.

Существенная роль в поддержке принятия врачом диагностических решений о функциональном состоянии клеток при использовании автоматизированных систем диагностики принадлежит математическим методам комплексного определения состояний. Однако общего подхода к решению проблемы создания математического обеспечения для диагностики функционального состояния клеток, до настоящего времени не существовало.

Предлагается новый подход определения жизнеспособности фибробластов, -

монослой аллофибробластов рассматривается как текстура, с характерными признаками и особенностями. Текстурный анализ – одна из главных задач в распознавании образов, так как большинство объектов состоит из различных видов текстурных поверхностей. Современные исследования с использованием пространственно-частотного анализа, такие как вейвлет-преобразования представили интересные аналитические методы текстурного анализа и классификации. Экспериментальные результаты показывают, что такие подходы могут обеспечить точную оценку и классификацию [2].

Вейвлеты – это особые функции, имеющие вид коротких волновых пакетов с нулевым интегральным значением, локализованных по оси независимой переменной и способных к сдвигу по ней и масштабированию [3]. Прямое вейвлет-преобразование следует рассматривать как разложение сигнала по всем возможным сдвигам и растяжениям/сжатиям сигнала. Почти все существующие вейвлеты не имеют аналитического представления в виде одной формулы, а задаются итерационными выражениями. Для обеспечения использования вейвлетов необходимо четко представлять достоинства и недостатки их базисных функций, для чего можно использовать их классификацию (рис.1).

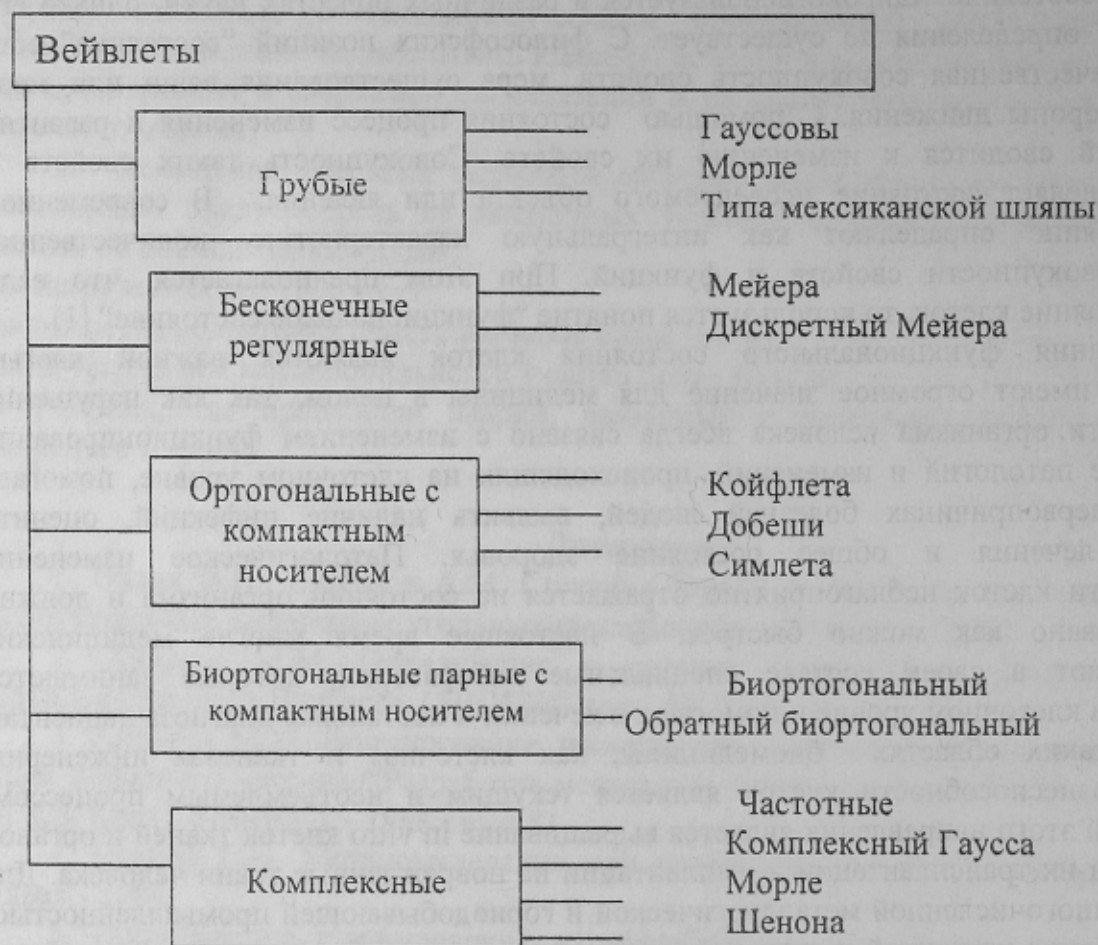


Рисунок 1 - Классификация вейвлетов.

Каждый класс вейвлетов, приведенных на рис.1 уникален по своим свойствам. Например, свойством быстрого вычисления обладают только ортогональные и биортогональные вейвлеты. Обилие классов вейвлетов и их конкретных реализаций в каждом классе позволяет использовать для решения конкретной практической задачи наиболее подходящий тип вейвлета.

При обработке изображений вейвлет-анализ помогает сгладить или выделить детали, выделить важные детали и даже выявить некоторые особенности изображения. Для обработки изображений используют ортогональные (например, для фильтрации шумов и

даже целых объектов на изображениях) и биортогональные вейвлеты (например, для сжатия изображения). Производимый в таких случаях вейвлет-анализ является многомасштабным, а используемые вейвлеты дискретными.

Выращивание диплоидных клеток человека, как и любых других клеточных культур, требует определенных лабораторных условий, оборудования, специалистов и представляет собой кропотливую и ответственную работу. Существует ряд факторов, влияющих на жизнеспособность клетки, и только постоянное наблюдение за функциональным состоянием клетки помогает по возможности принять меры для дальнейшего успешного роста культуры, если таковые требуются. Нарушение жизнедеятельности клетки и ее повреждение могут быть вызваны отсутствием кислорода, чрезмерно низким значением pH, низким осмотическим давлением в окружающей среде, действием ультрафиолетовой или ионизирующей радиации, высокой или низкой температурой среды, видимым светом, пищевой недостаточностью, а иногда даже бактериальным проростом [4]. Однако качество выращиваемого материала зависит не только от условий содержания и качества питательной среды, но и от таких характеристик самой культуры, как число пройденных пассажей, периодичность и равномерность пассирования, наличия контактного торможения (снижения пролиферативной активности клеток при достижении ими критической плотности) и т.д. На рис.2 показаны фрагменты текстуры монослоя аллофибробластов пройденных 14 пассажей и 24 соответственно (2а и 2б).

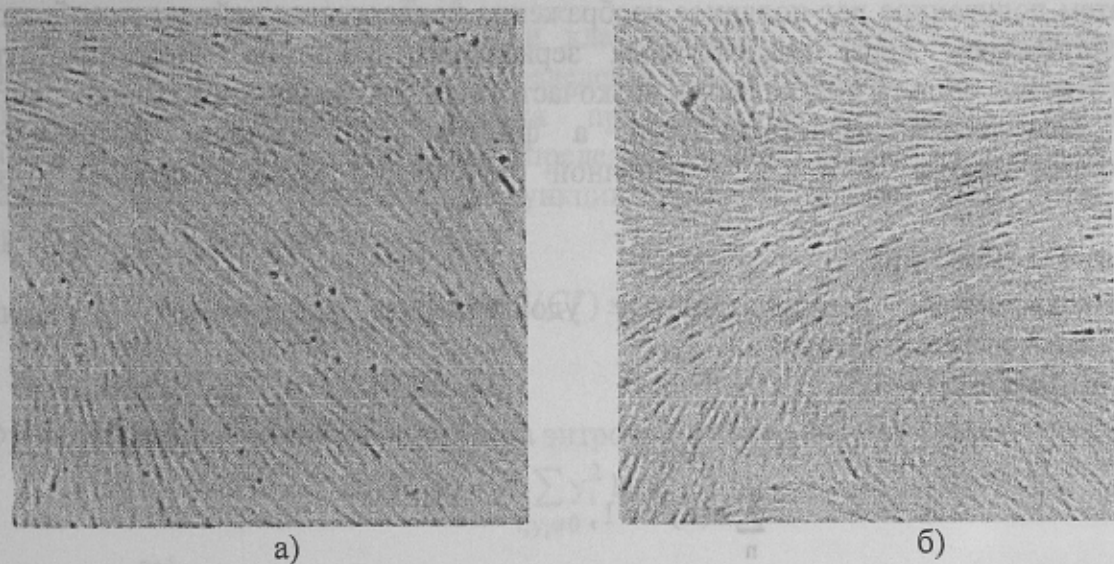


Рисунок 2 - Фрагменты текстуры фибробластов, прошедших 14 пассажей (рис. 1.а) и 24 пассажа (рис.1.б)

Обе культуры являются пригодными для дальнейшего использования как в качестве материала для медицинских нужд, так и в качестве исходного материала для культивирования. Однако культура после 14 пассажа является более молодой и соответственно функциональное состояние клеток этой культуры оценивается немного выше. У зрелых культур, прошедших более 20 пассажей несколько снижается пролиферативная активность клеток, сами клетки имеют чуть больший размер и количество вакуолизированных клеток немного больше, чем у молодых культур. Такие особенности на данном увеличении микроскопа человеческим глазом заметить невозможно. Поэтому целесообразно исследовать текстуры монослоев фибробластов специальными методами, для их последующей классификации. При этом методы должны быть инвариантны к любому углу поворота (фибробласты наращивают монослой под произвольным углом наклона) и незначительному изменению масштаба (оператор наводит фокус на каждый монослой с определенной долей погрешности). В качестве таких методов в работе предложено использовать логарифмически-полярные вейвлет-сигнатуры.

Для анализа текстур фибробластов использовался процесс обработки, математическая модель которого построена на основе стандартного дискретного вейвлет-преобразования (использовались вейвлеты Добеши) [2]. Краткое описание модели приведено ниже.

Для устранения эффектов поворота и масштаба в изображении, исходное изображение конвертируется в лог-полярное. Полученное лог-полярное изображение получается сдвинутым по рядам, при этом яркостные значения пикселей остаются прежними, а меняются только координаты их расположения. Полярная форма $p(a,r)$ данного $N \times N$ изображения $f(x,y)$ вычисляется следующим образом:

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

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

Далее рассчитывается лог-полярное изображение для заданного $N \times N$ изображения, по формуле:

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

для $i=0, \dots, S-1$, и $j=0, \dots, R-1$.

Затем полученное лог-полярное изображение подвергается вейвлет преобразованию, с использованием пары квадратурных зеркальных фильтров (высокочастотного и низкочастотного). Фильтр $h(n)$ является низкочастотным (подавляющим высокие частоты), с конечной импульсной характеристикой, а фильтр $g(n)$ является высокочастотным (подавляющим низкие частоты), с конечной импульсной характеристикой и задается формулой:

$$g(n) = (-1)^n h(1-n). \quad (3)$$

Низкочастотный фильтр должен удовлетворять следующим условиям для ортонормального представления:

$$\sum_n h(n)h(n+2j) = 0, \quad (4)$$

для $j \neq 0$,

$$\sum_n h(n)^2 = 1, \quad (5)$$

$$\sum_n h(n)g(n+2j) = 0, \quad (6)$$

для всех j .

Использованные для вейвлет-анализа фильтры, с помощью формул (3,4,5,6) можно представить рядом коэффициентов [2].

Далее выполняется вейвлет-пакетное преобразование, которое отличается от стандартного двумерного вейвлет-преобразования расчетом избыточного количества наборов коэффициентов. Вначале необходимо вычислить максимально возможное количество уровней разложения p , для изображения $N \times N$:

$$p \leq \min(\log_2(N)), p \in \mathbb{N}. \quad (7)$$

Для каждого уровня, рассчитывается 4 периодических изображений без сдвига, по формулам для вычисления стандартного 2-мерного дискретного вейвлет-преобразования:

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

$$C_{8k+1,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n h(m)g(n)C_{k,(m+2i,n+2j)}^p, \quad (9)$$

$$C_{8k+2,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n g(m)h(n)C_{k,(m+2i,n+2j)}^p, \quad (10)$$

$$C_{8k+3,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n g(m)g(n)C_{k,(m+2i,n+2j)}^p, \quad (11)$$

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

$C_{0,(i,j)}^0 = x_{(i,j)}$ - яркостные характеристики изображения.

Для получения инвариантности ряда к сдвигу рассчитываются еще 4 периодических изображений, каждое со сдвигом на один ряд:

$$C_{8k+4,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n h(m)h(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p, \quad (12)$$

$$C_{8k+5,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n h(m)g(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p, \quad (13)$$

$$C_{8k+6,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n g(m)h(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p, \quad (14)$$

$$C_{8k+7,(i,j)}^{p+1} = \sum_m \sum_n g(m)g(n)C_{k,(m+2i+1,n+2j)}^p. \quad (15)$$

В целях повышения эффективности классификации текстур с использованием вейвлет-преобразования выбираются определенные изображения для декомпозиции в дальнейшем. Выбор наилучшего базиса представления получается эффективным рекурсивным процессом отбора, который определяет лучшую декомпозицию изображения, основываясь на локальной минимизации функции цены информации. Базис представления для изображения вычисляется по формуле:

$$A_k^p = \begin{cases} C_k^p, \text{ если } M(C_k^p) \leq \frac{1}{2} \sum_{i=0}^7 M(A_{8k+i}^{p+1}) \\ \bigoplus_{i=0}^7 A_{8k+i}^{p+1} \end{cases}. \quad (16)$$

Функцией цены информации выбрана энтропия :

$$M(\{y_i\}) = - \sum_{i,y_i \neq 0} y_i^2 \ln y_i^2, \quad (17)$$

где $y_i = A_{8k+i}^{p+1}$.

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 в качестве энергии сигнатуры выбрана величина нормированного среднего значения:

$$e = \frac{1}{N^2} \sum_{k=1}^N |C_k|. \quad (18)$$

Для решения задачи текстурной классификации изображений монослоя фибробластов выбраны классификатор Махаланобиса и метод сравнения Евклидовых расстояний [5].

Описанная модель была реализована в виде прикладного программного обеспечения, выполненного на языке Borland Delphi 5.0, под операционную систему Windows. На рисунке 3 приведена экранная форма программного обеспечения.

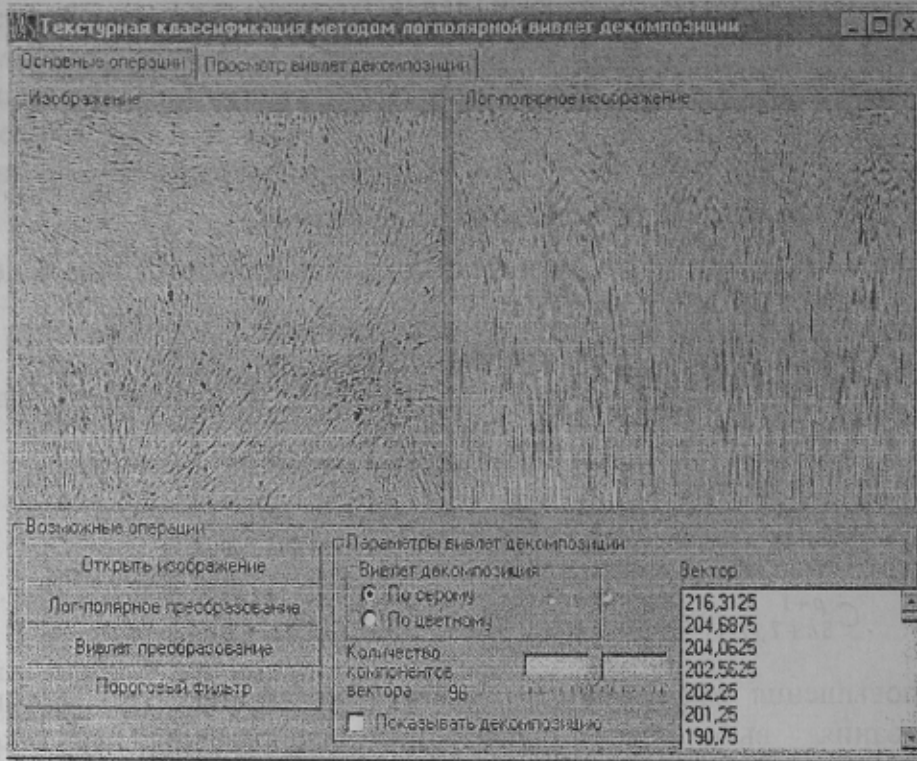


Рисунок 3 - Экранная форма программного обеспечения.

Тестирование модели определения жизнеспособности клеток проведено на 2-х типах изображений, размером 512x512. Первое изображение было черным, второе белым. В результате обработки черной картинке был получен единственный вектор нулевого значения, что и следовало ожидать, согласно вышеописанной модели. При вейвлет-декомпозиции белого изображения были получены вейвлет-сигнатуры, первые 5 из которых приведены в табл.1 .

Таблица1 - Первые значения вектора сигнатур, полученного вейвлет-декомпозицией белого изображения.

№ п/п	Значение сигнатуры	Происхождение сигнатуры
1	255	Сигнатура исходной картинке C_0^0
2	254,138259	Разложение первого уровня исходного изображения (лог-полярного) по с.трокам фильтром $g(n)$ и столбцам фильтром $g(n)$ C_0^1
3	253,424972	Разложение первого уровня исходного изображения, после сдвига на 1 строку, по строкам фильтром $g(n)$ и столбцам фильтром $g(n)$ C_4^1
4	252,056884	Разложение второго уровня изображения C_0^1 по строкам фильтром $g(n)$ и столбцам фильтром $g(n)$ C_8^2
5	251,579528	Разложение второго уровня изображения C_4^1 по строкам фильтром $g(n)$ и столбцам фильтром $g(n)$ C_{40}^1

Всего программа рассчитала 2025 сигнатур, и ее остановка осуществилась после

разложения этого изображения по всем 8 уровням, соблюдая условие декомпозиции (16).

Разработанная модель позволяет анализировать как цветные изображения, так и изображения в градациях серого. При обработке изображения в градациях серого в формулах (8)-(15) $C_{0,(i,j)}^0$ - задается яркостными характеристиками пикселей серого изображения. При обработке цветного изображения производится вейвлет-преобразование отдельно по каждой составляющей цвета (красной, зеленой, синей), т.е. $C_{0,(i,j)}^0$ - задается вначале значением интенсивности красной составляющей цвета, затем зеленой и далее синей. Т.о. получается 3 периодических изображения (декомпозиции), которые в дальнейшем собираются в одно цветное. Полученное цветное изображение конвертируется в градации серого и по этому серому изображению считается сигнатура.

Экспериментально выявлено, что время, затрачиваемое на обработку цветного изображения размером 512x512, составляет около 20 минут, а на обработку этого же изображения в градациях серого – порядка 4-5 минут. Проведено исследование точности классификации, достигаемой при обработке цветного и серого изображений. В серии экспериментов участвовали 9 культур фибробластов, каждая из культур была представлена набором снимков из 5 -7 изображений монослоя. Три культуры были оценены экспертами как отличные и 6 - как негодные. Энергия считалась по формуле (18), как средняя энергия, функцией меры информации была выбрана энтропия, рассчитываемая по формуле(17). Полученные результаты представлены на рис. 4.

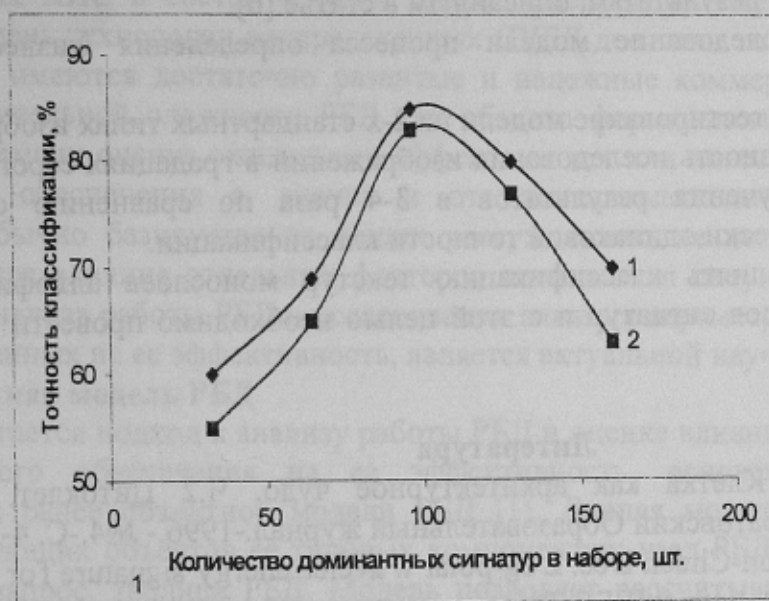


Рисунок 4 - Зависимость точности классификации от количества доминантных сигнатур в наборе, 1-при обработке цветного изображения, 2- при обработке изображения в градациях серого.

Из рис.4 видно, что точность классификации, полученная по цветным изображениям, зависит от количества доминантных сигнатур в наборе и ее максимальное значение достигается при количестве сигнатур равном 96. Характер изменения кривых приблизительно одинаковый и не зависит от цветности изображения. Точность классификации, получаемая по цветным изображениям клеток отличается всего на 2-5%, а время обработки цветных снимков почти в 4 раза больше. Поэтому в дальнейшем рассматривались изображения клеток в градациях серого.

В работе [6] эффективность классификации текстур клеток проверялась путем проведения серии экспериментов. Использовались изображения 9 культур фибробластов, из которых только 2 оценены экспертами как отличные, 2 – как удовлетворительные, а

остальные - как неудовлетворительные. Каждая культура была представлена набором снимком из 5-10 изображений. Подобранные тип энергетической сигнатуры (среднее значение) и количество сигнатур в векторе (96), позволили получить точность классификации 98%.

В данной работе поставлены эксперименты на значительно большем количестве пригодных для применения культур. Используя тот же эталон, что и в работе [6], было исследовано 11 культур (представленных 60 снимками), которые оценены экспертами как отличные и хорошие. Точность классификации составила около 75 %. Исследована причина уменьшения точности классификации. Анализ полученных после вейвлет-преобразования векторов сигнатур показал, что максимальные значения векторов, для различных культур, имеют разные максимальные значения. Выделено 2 подкласса снимков отлично оцененных культур. Первый подкласс – изображения, характеризующиеся максимальным значением сигнатур в диапазоне 233-231, второй подкласс – характеризуются максимальным значением сигнатур в диапазоне 219-217. Внутри каждого подкласса были выбраны 5 эталонных снимков, по которым произвелась классификация снимков внутри каждого подкласса с количеством сигнатур – 32, 64 и 94. В первом подклассе (представленном 20 снимками) эффективность классификации по 96 и 64 сигнатурам была одинаковая – 91 %, а по 32 сигнатурам – всего 66%. Во втором подклассе (представленном 32 снимками) максимальная эффективность получилась по 32 сигнатурам – 92%, по 64 – 82%, по 96 – 86%. Анализ полученных результатов показал, что точность классификации возросла на 15-20% и значительно приблизилась к результатам, описанным в статье [6].

Таким образом, исследование модели процесса определения жизнеспособности клеток показало:

Проведено успешное тестирование модели на 2-х стандартных типах изображений.

Показана целесообразность исследования изображений в градациях серого цвета, что увеличивает скорость получения результатов в 3-4 раза по сравнению с цветными изображениями при практически одинаковой точности классификации.

Целесообразно выполнять классификацию текстур монослоев аллофибробластов, используя подклассы векторов сигнатур и с этой целью необходимо провести дальнейшие исследования.

Литература

1. Васильев Ю.М. Клетка как архитектурное чудо. Ч.2 Цитоклет, способный чувствовать и помнить.// Саратовский Образовательный журнал.-1996.- №4.-С. 4-10.
2. Chi-Man Pun, Moon-Chuen Lee. Log-polar wavelet energy signature for rotation and scale invariant texture classification. // IEEE Trans. on pattern analysis and machine intelligence. - Vol.25, no.5.-2003.-P.590-602.
3. Дремин И.М., Иванов О.В., Нечитайло В.А. Вейвлеты и их использование.// Успехи физических наук.-Т.171, №5.-2001.-С.465- 501.
4. Попандопуло А.Г., Игнатов Д.Ю., Слипченко И.О., Васильев Р.Г., Меркулова Е.В., Герасимов И.Г. Влияние факторов культивирования на жизнеспособность фетальных фибробластов человека *in vitro*. // Вестник неотложной и восстановительной медицины, -Т.4, №2. -2003.-с. 323-325.
5. Manian V., Castro M., Vasquez R. Texture-based algorithm for color image classification // Proc. SPIE Vol. 4041.-2000.-P.25-33.
1. Меркулова Е В. Создание модели процесса определения жизнеспособности культивируемых фибробластов для автоматизированной системы. // Вестник ХГТУ.-№1(19).-2004.-С.250-256.