

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ЦИФРОВОЙ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Меркулова Е.В., Трибрат А.А.

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

Герасимов И.Г.

НИИ медицинских проблем семьи Донецкого медицинского
университета им. М. Горького, г. Донецк

Abstract

Merculova E., Tribirat A., Gerasimov I. Cells functional state estimation using methods of digital image processing. The definition of functional state estimation is one of the major tasks of diagnostics. The entropy equivalent as efficient criteria for functional state estimation is analyzed.

Общая постановка проблемы. Функциональное состояние (ФС) клеток является важнейшей характеристикой клеточной популяции, поскольку определяет способность отдельно взятой клетки и всей культуры выполнять свойственную им физиологическую функцию. Оценка функционального состояния является необходимой как для решения ряда диагностических задач, так и при культивировании с целью последующего использования клеточных популяций в лечебных мероприятиях.

В настоящее время для оценки функционального состояния клеток наиболее часто используются подходы, которые основаны на цитохимических, биохимических и цитоэнзиматических методах. Такие методы позволяют визуально оценивать локализацию и полуколичественное содержание исследуемых веществ в клетках и предполагают обработку клеток специальными химическими препаратами для выявления специфической окраски различной степени интенсивности. К недостаткам таких методов можно отнести временные затраты и субъективность полученной оценки функционального состояния.

Использование современных компьютерных технологий для анализа изображений клеток позволяет повысить точность получаемой оценки и устранить субъективность при определении их функционального состояния.

Постановка задач исследования. В работе [1] описан способ оценки термодинамической энтропии биологических систем с помощью энтропийного эквивалента (ЭЭ). Для оценки изменения энтропии предложен энтропийный эквивалент, который рассчитывается по коэффициентам корреляции между параметрами состояния биосистемы (ЭЭ_r). Исследовались зависимости изменения ЭЭ_r от функционального состояния клеток. При этом число клеток, которое необходимо проанализировать для того, чтобы средние значения и относительная дисперсия ЭЭ_r оставались постоянными в пределах погрешности расчета, составляет не менее 50.

Энтропийный эквивалент может быть рассчитан по доверительным вероятностям коэффициентов корреляции между параметрами состояния культуры клеток [2]:

$$\text{ЭЭ}_p = \sum_{i=1}^n \left\{ \left[\frac{\sum_{j=1}^n (1 - p_{i,j})}{\sum_{i \neq j}^n (1 - p_{i,j})} \right]^2 + \sum_{i \neq j}^n (1 - p_{i,j})^2 \right\}; \quad (1)$$

где $p_{i,j}$ — доверительная вероятность коэффициента корреляции r между i -м и j -м ($i \neq j$) параметрами состояния;

n — количество параметров состояния.

$\Delta\mathcal{E}_p$ в меньшей степени, чем $\Delta\mathcal{E}_r$, зависит от числа наблюдений, что, вероятно, может позволить без потери качества уменьшить объем выборки, необходимый для оценки функционального состояния.

Предварительная оценка функционального состояния клеток выполнялась с использованием системы экспертных оценок, которая заключалась в следующем. Два квалифицированных эксперта, прошедших стажировку в НИИ биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Россия) и имеющих опыт работы 3–5 лет, независимо оценивали жизнеспособность фибробластов по таким характеристикам:

1) вакуолизация — отсутствие клеток с вакуолями (5 баллов), наличие единичных (4 балла) или множества (3 балла) вакуолизированных клеток;

2) адгезия — все клетки распластаны, т. е. имеют вытянутую удлиненную форму с длинными псевдоподиями (5 баллов), наличие плохо прикрепившихся клеток полуокруглой формы и/или клеток с короткими псевдоподиями (4 балла), большинство полуокруглых клеток и/или клеток с короткими псевдоподиями (3 балла);

3) качество монослоя — конфлуэнтный — формирование после пассирования на 3–4 день (5 баллов), субконфлуэнтный — формирование на 4–5 день (4 балла) или на 6–7 день (3 балла).

Для данной культуры усредняли оценки, выставленные каждым из экспертов, после чего находили общую среднюю округленную до целых оценку культуры. Культуру, состояние которой оценили в 5 баллов, считали отличной, 4 балла — удовлетворительной, 3 балла — неудовлетворительной. Всего (дважды в течение времени культивирования) провели оценку жизнеспособности 12-ти культур пассируемых фибробластов, из которых 10 — прошли от 2-х до 25 пассажей с периодичностью пассирования 5–7 дней, и 2 культуры, для которых периодичность пассирования не соблюдали. Исследование проводили на следующий день после пассирования.

В качестве параметров состояния культуры клеток для расчета энтропийного эквивалента по доверительным вероятностям коэффициентов корреляции использовались характеристики изображений клеток. Такими характеристиками объектов на изображении являются компактность, моменты формы, дескрипторы Фурье формы.

Компактность объекта является безразмерной величиной, которая не зависит от размера и положения объекта. Компактность объекта определяется по формуле:

$$C = \frac{P^2}{S}; \quad (2)$$

где P — это периметр объекта; S — площадь объекта.

Компактность представляет меру сложности контура и его площади. Большое численное значение компактности характерно объектам, имеющим грубый контур с большим числом изгибов.

В [4] предложено использовать моменты границ областей — альтернативное определение моментов, которое используется для описания контура. По этому определению, контур объекта может быть представлен как упорядоченная последовательность евклидовых расстояний между геометрическим центром объекта и координатами его контура. Такие упорядоченные последовательности обеспечивают уникальное представление формы объекта.

Пусть координаты N точек контура оцифрованного объекта описываются упорядоченным множеством координат (x_i, y_i) , $i = 1, 2, \dots, N$. Евклидовы расстояния z_i , $i = 1, 2, \dots, N$, между геометрическим центром (x_c, y_c) контура и упорядоченным

множеством точек контура формируют однозначное одномерное представление контура. Тогда, p -тый момент определяется как:

$$m_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [z_i]^p, \quad (3)$$

а p -тый центральный момент определяется следующим образом:

$$M_p = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - m_1)^p. \quad (4)$$

На основе центральных моментов в [4] предложено использовать нормированные моменты для характеристики формы объекта:

$$F_m = \frac{\left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z(i) - \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z(i))^m \right]^{\frac{1}{m}}}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z(i)}; \quad (5)$$

где N — количество точек контура;

$z(i)$ — евклидовы расстояния между координатами геометрического центра контура и упорядоченной последовательностью координат точек контура;

m — порядок нормированного момента.

Нормированные моменты являются безразмерными величинами. Это позволяет использовать их непосредственное сравнение или комбинирование в виде разности моментов для описания формы объекта.

В качестве характеристик контура использовали нормированные моменты начальных порядков, например F_m 2-го порядка (F_2), из-за их низкой чувствительности к шуму [3]. Нормированные моменты безразмерны. Это позволяет использовать их непосредственное сравнение или комбинации.

Один из наиболее перспективных способов описания формы объекта основан на использовании дескрипторов Фурье. Пусть имеется N точек контура, ограничивающего некоторую область изображения. Эту область можно рассматривать как область, расположенную в комплексной плоскости, в которой ордината соответствует мнимой оси, а абсцисса — действительной оси. Тогда координаты (x, y) каждой точки анализируемого контура могут быть представлены как комплексные числа $(x + jy)$. Последовательность точек контура может быть записана как комплексная последовательность [3, 4]:

$$Z_i = x_i + jy_i. \quad i = 0, 1, 2, \dots, N - 1. \quad (6)$$

Дескрипторы Фурье определяются как:

$$A(n) = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} Z_i * \exp\left[-\frac{2\pi ni}{N}\right], \quad n = 0, 1, \dots, N - 1. \quad (7)$$

Для анализа контура объекта используются модули дескрипторов Фурье. Для их практического использования необходимо выполнить нормирование, то есть устранить зависимость от месторасположения и размера контура. Это достигается путем использования следующих свойств дескрипторов:

1. Изменение месторасположения контура достигается изменением дескриптора нулевого порядка $A(0)$.
2. Изменение масштаба контура достигается умножением каждого дескриптора Фурье на скалярную константу.

Таким образом, для нормирования дескрипторов необходимо приравнять $A(0)$ к нулю (чтобы достигнуть независимости от месторасположения), и разделить каждый коэффициент на величину A_{max} чтобы нормировать размер контура.

Нормированные дескрипторы Фурье определяются как

$$NFD(n) = \begin{cases} 0; & n = 0 \\ \frac{A(n)}{A_{max}}; & n \neq 0 \end{cases} \quad (8)$$

Нормированные величины дескрипторов Фурье можно использовать для классификации различных типов фигур. В качестве интегральной оценки дескрипторов предлагается использовать следующее выражение:

$$FF = \sum_{n=0}^N NFD(n). \quad (9)$$

Характеристики изображений клеток рассчитывались с помощью специализированной программы для IBM PC, написанной в среде Borland C Builder 6. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью MS Excel.

Эффективность использования энтропийного эквивалента зависит от выбора параметров, которые используются для расчета ЭЭ. Наиболее приемлемыми являются три или четыре параметра, которые не имеют сильной корреляционной связи друг с другом [1]. Предварительный анализ показал, что в данном случае расчет ЭЭ целесообразно проводить с использованием трех параметров: S, F₂, FF.

Решение задач и результаты исследований. Расчет значений ЭЭ_p проводили для 4 культур фибробластов с различным функциональным состоянием клеток. Функциональное состояние фибробластов одной культуры оценено на 3, другой — на 4, и двух культур — на 5 баллов. На рис. 1 представлены графики зависимости ЭЭ_p от количества клеток в выборке.

Как видно из рис. 1, использование ЭЭ_p позволяет оценить функциональное состояние клеток при числе наблюдений 15–25, что примерно вдвое меньше, чем необходимо при использовании ЭЭ_r [1]. Кроме того, значения ЭЭ_p для культур, оцененных на 5 баллов, существенно меньше, чем для двух других, и в свою очередь величины ЭЭ_p больше в случае культуры, оцененной на 3 балла по сравнению с таковой, оцененной на 4 балла.

Полученные результаты качественно согласуются с результатами оценки функционального состояния клеток при использовании ЭЭ_r. Таким образом, использование ЭЭ_p позволяет уменьшить объем проводимых исследований, необходимых для оценки ФС клеток, без ухудшения её качества.

Проведенные исследования и полученные результаты могут быть использованы для построения автоматической системы обработки изображений клеток с целью определения их функционального состояния.

Выводы. Выполненный анализ энтропийного эквивалента, который рассчитывается по доверительным вероятностям коэффициентов корреляции между параметрами состояния биосистемы, в качестве критерия оценки функционального состояния клеток показал, что его использование вместо энтропийного эквивалента, который рассчитывается по коэффициентам корреляции между параметрами состояния биосистемы, позволяет уменьшить необходимый для расчета объем выборки. Таким образом, энтропийный эквивалент, который рассчитывается по доверительным вероятностям коэффициентов корреляции между параметрами состояния биосистемы, является эффективным критерием оценки функционального состояния клеток.

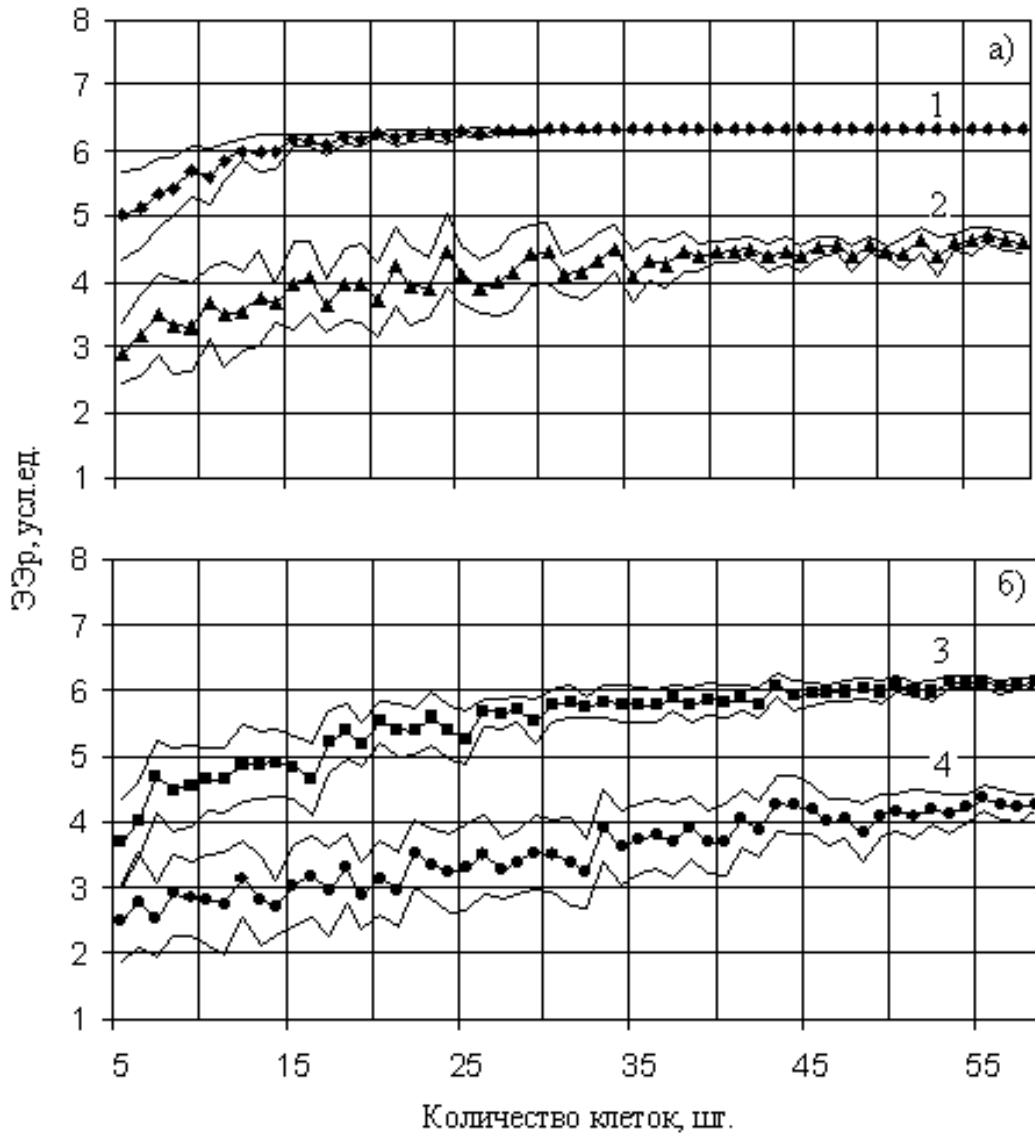


Рисунок 1 — Зависимость значения ЭЭ_p от количества проанализированных клеток в культурах, оцененных на 3 (а, 1), 4 (б, 3) и 5 (а, 2 и б, 4) баллов. Сплошной линией показаны границы доверительного интервала $\alpha=0,001$

Литература

1. Попандопуло А. Г., Меркулова Е. В., Разенкова И. А., Слипченко И. О., Герасимов И. Г. Оценка жизнеспособности фетальных фибробластов человека *in vitro* с помощью положений неравновесной термодинамики // Вестн. неотложной и восстановительной мед. — 2004. — Т. 5, N 2. — С. 305–307.
2. Спорыхин В.Я., Адамова Е.В., Герасимов И.Г. Выбор критерия определения жизнеспособности клеток для автоматизированной системы диагностики // Наукові праці Донецького державного технічного університету. Випуск 20. — Донецьк: ДонНТУ, 2000 — С. 224–230.
3. Shen L., Rangayan R., Desautels L. Application of shape analysis to mamographic classifications // IEEE Trans. On medic. imag. — 1994. — Vol 13, №2, — p. 263–276.
4. Прэтт У. Цифровая обработка изображений: Пер. с англ. — М: Мир, 1982. — Кн.2 — 480 с.