

Д.І. Кунашев, О.П. Трохименко, С.О. Соловійов, І.В. Дзюблик

Формування концепції автоматизованої обробки та аналізу цифрових зображень субстратзалежних клітинних систем

Разработана общая концепция автоматической обработки и анализа цифровых изображений в микроскопии с последующим созданием алгоритмов количественного анализа визуальных данных о живых субстратзависимых клеточных систем на примере перепрививаемой культуры клеток аденокарциномы гортани человека *HEP-2*.

Ключевые слова: клеточные системы, микроскопия, обработка и анализ цифровых изображений, автоматизация, контуры клеток, метод Оцу, сегментация водоразделом, информационно-компьютерные технологии.

Розроблено загальну концепцію автоматичної обробки та аналізу цифрових зображень в мікроскопії з подальшим створенням алгоритмів кількісного аналізу візуальних даних щодо живих субстратзалежних клітинних систем на прикладі перещеплювальної культури клітин аденокарциноми гортані людини *HEP-2*.

Ключові слова: клітинні системи, мікроскопія, обробка і аналіз цифрових зображень, автоматизація, контури клітин, метод Оцу, сегментація вододілом, інформаційно-комп'ютерні технології.

Вступ. У різних галузях біології, медицини, фізіології, фармакології, класичної вірусології, де широко використовуються клітинні системи, основним інструментом дослідника був і залишається мікроскоп, проте сьогодні в оцінці результатів мікроскопічних досліджень з використанням сучасних технологій все частіше застосовується автоматичний аналіз одержаних зображень з метою валідації та об'єктивної оцінки результатів. Для цього необхідним є одержання чітких цифрових зображень досліджуваного об'єкта, забезпечення надходження цифрових зображень із оптичної системи мікроскопа в комп'ютер, їх попередня обробка та подальший автоматичний аналіз із застосуванням інформаційно-комп'ютерних технологій. В ХХІ ст., коли технології візуалізації зображень у мікроскопічних дослідженнях значно поліпшені і автоматизовані, що дозволяє одержувати величезні масиви цифрових зображень, обробка і аналіз їх у ручному режимі стають неможливими [1–3]. Відповідно до цього формування концепції автоматичної обробки та аналізу цифрових зображень залишається актуальним у сучасній біології та медицині. Це дозволяє проводити об'єктивний моніторинг клітинного резерву у біологічних системах, зокрема:

проліферації, диференціюванні, трансформації і апоптозу клітин *in vitro*, репродукції вірусів у клітинних системах, патогенезу вірусних інфекцій на рівні клітин, дослідження різних аспектів фармакодинаміки противірусних препаратів тощо [3–4].

Постановка задачі

В попередніх дослідженнях авторами описано метод стандартизації чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстратзалежних клітинних систем *in vitro* [5]. Запропонований підхід до одержання і обробки цифрових зображень клітинних моношарів, який передбачає пошук і розділення зображень окремих клітин, дає позитивні результати. Проте загальна концепція автоматичної обробки та аналізу цифрових зображень залишається нерозробленою. Розв'язання цієї задачі дозволить по-перше, суттєво полегшити роботу та скоротити час досліджень, оскільки більшість механічних маніпуляцій щодо виділення контурів клітин та обрахунку їх основних параметрів, зокрема периметру, площі тощо, виконуватиметься в автоматичному режимі за допомогою відповідного програмного забезпечення, що дозволить суттєво збільшити масив оброблюваних даних та оперативно використовувати

одержані результати. По-друге, такий підхід поліпшить точність виділення контурів клітин на знімках, що покращить репрезентативність вибірки. По-третє, буде автоматизовано статистичний аналіз отриманих параметрів клітин у великих вибірках та порівняння великих чисельних масивів.

Мета роботи – розробка загальної концепції автоматизованої обробки та аналізу цифрових зображень субстратзалежних клітинних систем.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проведено з використанням субстратзалежної культури клітин аденокарциноми гортані людини (*HEP-2*), одержаної з колекції клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України. Клітинні моношари вирощували у культуральних полістиролових матрасах виробництва *Sarstedt* (США) з площею поверхні росту 25 см^2 і посівною концентрацією 10^6 кл/см² [6]. Клітини культивували впродовж 72 г. при 37°C з наступним мікроскопічним дослідженням через 48 і 72 г. від моменту інокуляції. Мікроскопічні дослідження нативних клітинних моношарів проводили під інвертованим мікроскопом *Primo-Vert* у світлому полі прохідного світла при диференційно-інтерференційному контрастуванні живих клітин. Зображення клітинного моношару візуалізували за допомогою цифрової кольорової камери *Digital Microscopy Camera AxioCam ERc5s* із застосуванням програмного забезпечення *Carl Zeiss*. Попередню обробку цифрових зображень проводили за методом Нобуюкі Оцу [7]. Статистичний аналіз описано у [8].

Дослідження, результати та їх обговорення

Для найкращого статистичного аналізу змін клітин моношару культури *HEP-2* при його формуванні впродовж 24–72 г. культивування було отримано максимально велику за обсягом кількість цифрових зображень клітин з метою виявлення змін, що відбувались у всій сукупності клітин моношару, а не лише в певних його точках. Це потребувало збору якомога більшої бази цифрових зображень клітин, одер-

жаних за однакових умов зйомки для всіх випадків. Кожне зображення було піддане обробці для виокремлення цифрових даних для нього, після чого всі дані було зібрано в єдину базу, проаналізовану статистичними методами [8]. Так, серія зі ста зображень, кожне з яких містило двісті клітин в середньому, мала записи про приблизно 20 тис. різних клітин, кожна з яких мала свій набір значень для заздалегідь визначених характеристик. Власне характеристики фактично визначались шляхом застосування математичних функцій до контурів клітин на зображенні [9]. Водночас отримання контурів клітин виконувалось методами обробки зображень, в тому числі морфологічними методами для перетворення оригінального зображення у карту контурів клітин [10].

Обробка зображень. Морфологічні методи. Метод водорозділу. У попередніх дослідженнях [5] авторами виконано обробку зображення клітин фіксованого забарвленого моношару, де колір клітин та вільної від них поверхні росту значно різнилися між собою, що дозволяло розрізняти їх за допомогою стандартних методів відокремлення об'єктів на фото. Втім фіксація і забарвлення досліджуваного матеріалу не дозволяє спостерігати зростання клітин в динаміці, досліджувати цитопатичні зміни в них при інфікуванні вірусами, виявляти вплив хіміопрепаратів тощо. Отже необхідно було знайти способи виділення контурів живих клітин на зображенні. Одним із способів збільшення різниці між яскравістю клітин та вільної від них поверхні росту є встановлення високої яскравості підсвітлення нативного препарату під час вивчення під мікроскопом та відповідної зйомки.

Бінаризація зображення. Визначення адаптованого порогу бінаризації. У попередніх дослідженнях [11] виконано перетворення кольорового піксела у сірий, застосовуючи два основні методи: знаходження середнього значення трьох каналів за формулою

$$\text{Gray} = \frac{R + G + B}{3}$$

та використання стандартних коефіцієнтів за формулою

$$Gray = R \cdot 0,299 + G \cdot 0,587 + B \cdot 0,114.$$

У другій формулі використано коефіцієнти для кожного з каналів, властиві більшості алгоритмів переведення кольорового зображення в сіре. Втім, ці коефіцієнти підбрано з урахуванням того, що людське око краще за все сприймає зелений колір, а інші гірше. Проте цей метод виявився неприйнятним у випадку автоматичного аналізу кожного зображення як набору чисел, що виконується програмним способом. Тому обробка зображень нативних клітинних моношарів потребувала використання інших коефіцієнтів.

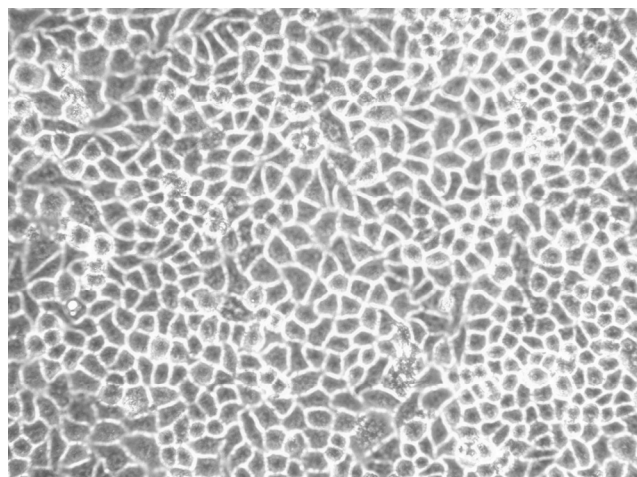


Рис. 1. Кольорове зображення клітин не забарвленого моношару з яскравим освітленням

Дослідження довільного кольорового зображення не забарвленого клітинного моношару під мікроскопом показало, що зелений канал скрізь був представлений майже однаковими значеннями, в той час як синій канал мав невелику різницю між максимальним та мінімальним значеннями, а для червоного каналу ця різниця визначалась на рівні декількох десятків з урахуванням множини значень для кожного каналу від нуля до 255 (рис. 1). Отже ефективна формула перетворення цього кольорового зображення у сіре мала вигляд

$$Gray = 0,6 \cdot R + 0,1 \cdot G + 0,3 \cdot B.$$

Ця формула справила найбільший вплив на кінцеві значення пікселів у сірому зображенні саме червоному каналу, що в результаті збільшило різницю між значеннями сірих пікселів для клітин та вільної від них поверхні росту, що значно покращило якість бінаризації (рис. 2).

Як базовий метод бінаризації використано метод Оцу [7]. У випадку забарвленого клітинного моношару він показав себе цілком спроможним надавати очікуваний результат [11].

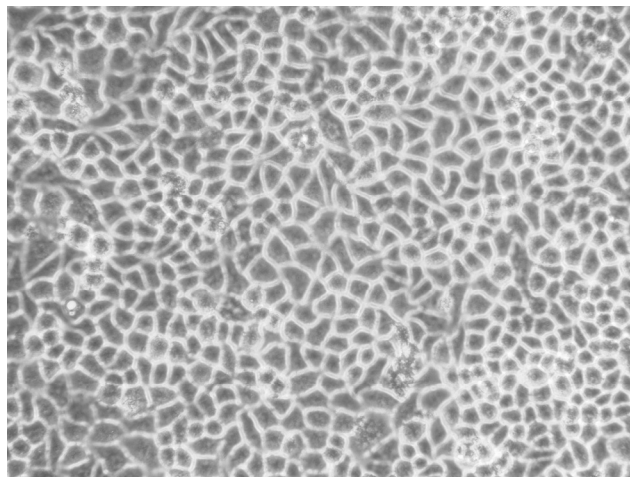


Рис. 2. Перетворення зображення не забарвленого клітинного моношару з кольорового у градієнти сірого

Втім, при аналізі нативних зображень цей метод виявився недостатньо ефективним через нерівномірний розподіл світла під час створення цифрового зображення, оскільки часто значення пікселів для клітин в одній його частині близьке до значень пікселів вільної від клітин поверхні росту в іншій частині зображення, що заважає дійсно якісному виокремленню контурів клітин по всьому зображенню. Для вирішення цієї проблеми апробовано метод визначення адаптивного порогу бінаризації, перевага якого полягала у визначенні порогу для кожного піксела окремо на основі не всього зображення, а лише множини сусідніх пікселів (у певному радіусі або у межах певного квадратного вікна). Втім, такий підхід мав свої вади. По-перше, його використання потребувало більше ресурсів для обрахунку, оскільки кожен з пікселів аналізувався не один раз, а в середньому кілька десятків разів. Інша суттєва його вада – те, що на практиці отримані зображення не давали цілісних контурів, а, натомість, формували дуже зашумлене зображення (рис. 3, 4). Втім, використання цього методу як допоміжного наразі вивчається детальніше. В перспективі він може бути використаний для покращення якості виділення контурів.

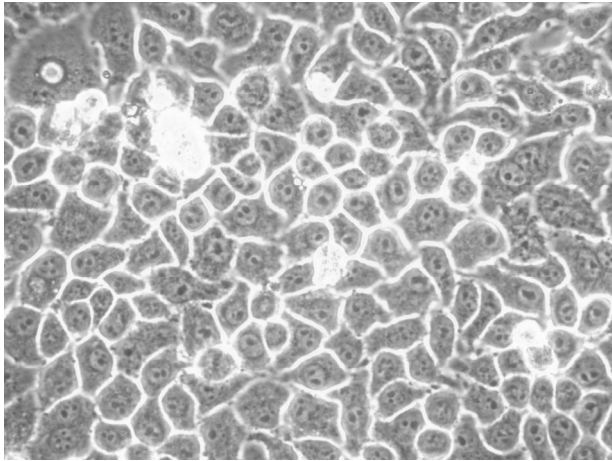


Рис. 3. Кольорове зображення до бінаризації

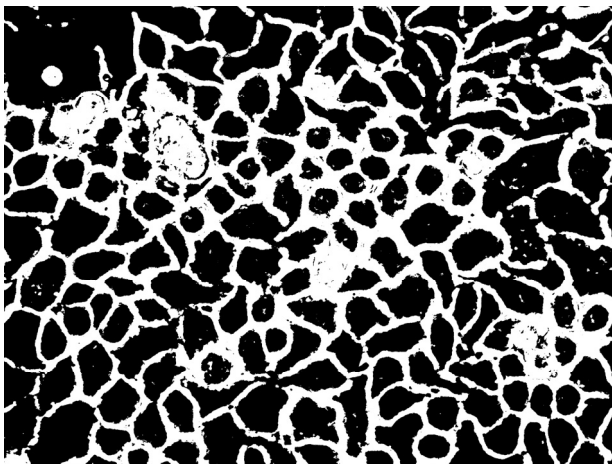


Рис. 4. Кольорове зображення після бінаризації

Видалення артефактів. Використання морфологічних методів. Метод водорозділу. Як видно з рис. 4, отримане бінаризоване зображення має дві суттєві вади. По-перше, всередині масивних областей певного кольору спостерігались невеликі частки іншого кольору. По-друге, деякі фігури, які мають репрезентувати окремі клітини, мали дрібні зв'язки, що перетворювали декілька клітин в єдину компоненту зв'язності, через що автоматичні методи аналізу об'єктів сприйматимуть декілька об'єктів як один. Тобто фактично стояло дві задачі: видалення шуму на зображенні та розділення «злипаних» клітин. Додатково можна зазначити, що чорним кольором позначались саме клітини, а білим – зовнішні області, в той час як в теорії пошуку об'єктів на зображенні білий колір репрезентує саме об'єкти, а чорний – фон. Це обумовлено тим, що під мік-

роскопом клітини є темнішими за вільну поверхню навколо них. Втім, ця проблема легко вирішується інвертуванням зображення. Щодо позбавлення шуму, то для цього використано ті самі методи, що й у попередніх дослідженнях – ерозія, дилатація, морфологічні відкриття та закриття [11].

Розділення «злипаних» клітин виконано у два етапи. На першому створювалась карта маркерів. Останні репрезентували внутрішні частини контурів клітин, які точно охоплювали саме площину клітин, причому кожен маркер відповідав одній клітині. Теоретично маркер не може репрезентувати дві та більше клітин, так само, як одну клітину не може репрезентувати більш ніж один маркер. Способом створення таких маркерів стала ерозія зображення за ядром певного розміру з метою видалення зайвих зв'язків між клітинами та областей, які помилково занесено до контурів клітин. В той же час за допомогою дилатації виокремлено область, яка належала саме фону зображення та не охоплювала клітини. Місця між маркерами та фоновою областю поступово заповнювались за методом водорозділу [10] так, що кожен контур, вирощений з маркеру, не перетинався з областю іншої клітини, бо цю область заповнював інший вирощений маркер.

Важливо, що часто зазначений метод виділення маркерів не давав ідеального результату та помилково розбивав одну клітину на дві або помилково об'єднував деякі сусідні клітини. Для максимізації якості виділення контурів найкращим варіантом стало впровадження можливості для користувача корегувати карту маркерів – видаляти зайві та додавати нові там, де вони не були додані автоматично. Досліди показали, що така можливість необхідна через занадто велике різноманіття можливих форм та розмірів клітин в межах однієї культури та, як результат, неможливості передбачення однозначного алгоритму для розділення клітин між собою.

Фінальна обробка. Видалення надлишкових об'єктів. В результаті обробки на зображеннях зазвичай залишаються дрібні надлишкові елементи, які не несуть корисної інформації. Відповідні контури можуть бути видалені. Також варто

видаляти усі контури, які стосуються меж зображення. Причина полягає в тому, що частіше за все такі контури фактично є «обрізними, обірваними» версіями контурів повноцінних клітин, оскільки така клітина частіше за все лише частково потрапляє в область зображення (рис. 5, 6). Видалення таких контурів дозволить уникнути значних похибок при подальшому автоматичному аналізі зображень.

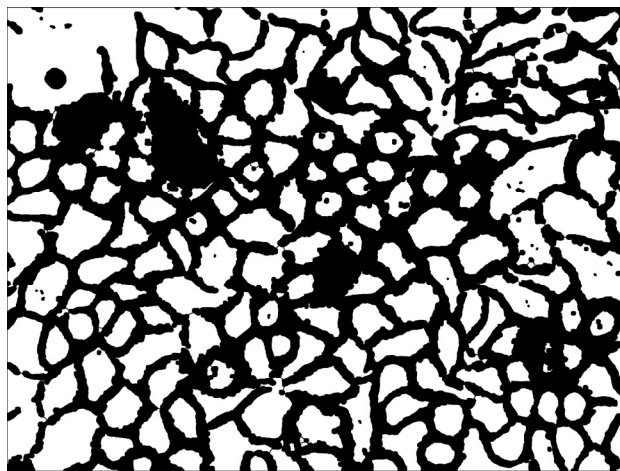


Рис. 5. Виділені об'єкти з наведених операцій за допомогою алгоритму

Застосування математичних методів для визначення характеристик отриманих контурів. Отримані контури далі розглядаються як геометричні фігури з відповідними математичними характеристиками. Найпростішими з них є площа та периметр. Якщо позначити фігуру контуру як C , тоді ці характеристики є функціями, які можна позначити як $p(C)$ для периметра та $a(C)$ для площі, що визначають розмір об'єктів. Також вони мають певні похідні характеристики [10], як, наприклад, компактність, яку можна визначити за формулою $\text{compactness}(C) = \frac{(p(C))^2}{a(C)}$ та яка в залежності

від значення дозволяє судити про опуклість або увігнутість фігури. Іншими характеристиками, які описують форму фігури, є площа опуклої оболонки $\text{convex}(C)$ та щільність, котра визначається за формулою

$$\text{solidity}(C) = \frac{a(C)}{\text{convex}(C)}$$

Також можна включати безліч додаткових характеристик на кшталт середньої, максимальної або мінімальної яскравості пікселя всередині фігури тощо. Перелік подібних характеристик є безмежним та дає можливості характеризувати зміни у розмірах, формі, яскравості та інших властивостях клітин під дією певних процесів. Отже, кожна виділена клітина може бути охарактеризована масивом чисельних значень відповідних математичних характеристик, множини яких підлягають детальному вивченню.

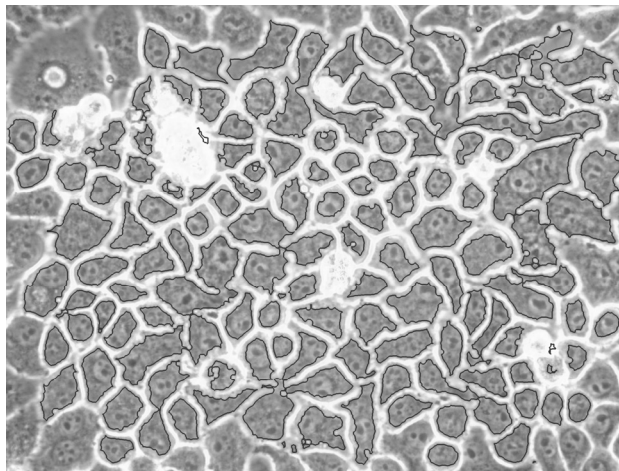


Рис. 6. Контури клітин. Надлишкові контури видалено

Створення бази даних параметрів клітин та їх статистичний аналіз

Порівняння параметрів клітин та різних культур для різних умов культивування. Для ефективного аналізу цифрових зображень клітин певної культури та її зміни під дією зовнішніх і внутрішніх чинників необхідно мати якомога більшу серію знімків, виконаних за однакових умов: посівної концентрації клітин при інокуляції, фазі росту клітинної культури, умов культивування, освітлення, однаковості процесів (в ідеалі – різні знімки єдиного досліджуваного матеріалу), налаштування апаратури тощо. Для кожного знімка формується база даних, де у відповідність до кожного з контурів ставиться певний масив значень характеристик контуру.

Наступний крок – узагальнення масивів чисельних значень характеристик усіх клітин усіх знімків однієї серії в єдину базу, яка від-

повідас певним умовам та процесам всередині певної культури в певний час. Ці характеристики можна вивчати за допомогою статистичних методів (знаходити середнє, максимальне, мінімальне, медіану, моду, відхилення тощо). Так, можна виводити узагальнені характеристики певної культури для певних умов.

Якщо виконувати аналогічний аналіз для тієї самої культури за інших умов (наприклад, з різницею у 24 г.), при інфікуванні тощо, то можна побачити зміну узагальнених характеристик. Так, наприклад, якщо за 24 г. збільшилась середня площа клітини, то можна припустити, що власне клітини збільшились у результаті дії вказаних процесів. Зміни узагальнених характеристик дозволять вивчати зміни біологічних характеристик клітин в цілому. Аналогічно порівняння можна проводити для клітин однієї культури, які перебувають під дією різних чинників або порівнювати різні культури, вивчати біологічні процеси з використанням субстратзалежних клітинних культур.

Висновки. Розроблено загальну концепцію автоматичної обробки та аналізу цифрових зображень в мікроскопії з наступним створенням алгоритмів кількісного аналізу візуальних даних щодо живих субстратзалежних клітинних систем на прикладі перещеплювальної культури клітин аденокарциноми гортані людини *HEP-2*. Її практичне застосування дозволить розробити програмне забезпечення для аналізу результатів мікроскопічних досліджень і виявлення змін біологічної системи під дією зовнішніх і внутрішніх чинників. Запропоновані рішення поліпшать точність автоматичного виділення контурів клітин на знімках з можливістю їх корекції в ручному режимі, дозволять автоматизувати статистичний аналіз отриманих параметрів клітин у великих вибірках та

порівняння великих чисельних масивів. Описаний інструмент є важливим кроком у застосуванні інформаційно-обчислювальних технологій у дослідженні біологічних систем та змін в них під впливом фізичних, хімічних і біологічних чинників.

1. *Biological imaging software tools* / K.W. Eliceiri, M.R. Berthold, I.G. Goldberg et al. // *Nature Method.* – 2012. – **9(7)**. – P. 697–710.
2. *Peng H.* Bioimage informatics: a new area of engineering biology // *Bioinformatics.* – 2008. – **24(17)**. – P. 1827–1836.
3. *Angulo J., Flandrin G.* Automated detection of working area of peripheral blood smears using mathematical morphology // *Analytical Cellular Pathology.* – 2003. – **25**, N 1. – P. 37–49.
4. *HollandFrei* Cancer Medicine. National Center for Biotechnology Inform. (U.S.) American Cancer Society / B.C. Decker Publisher. – 2000. – 350 p.
5. *Dimmock N., Easton A., Leppard K.* Introduction to Modern Virology // Blackwell Publ. – 2007. – 400 p.
6. *Дзюблик І.В., Трохименко О.П., Соловйов С.О.* Культура клітин у медичній вірусології: Навч.-метод. посібник. – Вінниця: Меркьюрі-Поділля, 2015. – 144 с.
7. *Метод* Оцу – https://en.wikipedia.org/wiki/Otsu%27s_method
8. *Крамер Г.* Математические методы статистики. – М.: Мир, 1975.
9. *Python OpenCV* – Find black areas in a binary image. – <http://stackoverflow.com/questions/9056646/python-opencv-find-black-areas-in-a-binary-image>
10. *Gonzalez Rafael C., Richard E. Woods* Digital Image Processing // Prentice Hall. – 2002. – P. 519–560; P. 590–626.
11. *Кунашев Д.І., Соловйов С.О., Трохименко О.П.* Пошук та стандартизація чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстрат-залежних клітинних систем *in vitro* // *УСиМ.* – 2014. – № 6. – С. 80–88.

Поступила 09.04.2015

Тел. для справок: +38 044 205-4988 (Київ)

E-mail: dimakunashev@gmail.com

© Д.И. Кунашев, Е.П. Трохименко, С.А. Соловьев, И.В. Дзюблик, 2016

Д.И. Кунашев, Е.П. Трохименко, С.А. Соловьев, И.В. Дзюблик

Формирование концепции автоматизированной обработки и анализа цифровых изображений субстратзависимых клеточных систем

Введение. В разных областях биологии, медицины, физиологии, фармакологии и классической вирусологии, где широко используются клеточные системы, основным инструментом исследователя был и остается мик-

роскоп, однако сегодня в оценке результатов микроскопических исследований с использованием современных технологий все чаще применяется автоматический анализ графических изображений с целью валидации и

объективизации оценки результатов. С этой целью необходимо получение четких цифровых изображений исследуемого объекта, обеспечение поступления цифровых изображений из оптической системы микроскопа в компьютер, их предварительная обработка и дальнейший автоматический анализ с применением информационно-компьютерных технологий. В XXI в., когда технологии визуализации изображений в микроскопии значительно улучшены и автоматизированы, что позволяет получать огромные массивы цифровых изображений, обработка и анализ их в ручном режиме становятся невозможными [1–3]. В соответствии с этим, формирование концепции автоматической обработки и анализа цифровых изображений остается актуальным в современной биологии и медицине. Это позволит проводить объективный мониторинг клеточного резерва в биологических системах: пролиферации, дифференцировке, трансформации и апоптоза клеток *in vitro*, репродукции вирусов в клеточных системах, патогенеза вирусных инфекций на уровне клеток, исследования различных аспектов фармакодинамики противовирусных препаратов и др. [3, 4].

Постановка задачи

В предыдущих исследованиях описан метод стандартизации числовых методов оценки микроскопических изображений субстратзависимых клеточных систем *in vitro* [5]. Предложенный подход к получению и обработке цифровых изображений клеточных монослоев, состоящий из поиска и разделения изображений отдельных клеток, дает положительные результаты. Однако общая концепция автоматической обработки и анализа цифровых изображений остаются не разработанными. Решение этой задачи позволит, во-первых, существенно облегчить работу и сократить время исследований благодаря тому, что большинство механических манипуляций по выделению контуров клеток и расчета их основных параметров, в частности периметра, площади и другого будут выполняться в автоматическом режиме с применением соответствующего программного обеспечения. Это позволит существенно увеличить массив обрабатываемых данных и оперативно использовать полученные результаты. Во-вторых, такой подход повысит точность выделения контуров клеток на снимках, улучшит репрезентативность выборки. В-третьих, будет автоматизирован статистический анализ полученных параметров клеток в больших выборках и сравнения больших многочисленных массивов.

Цель работы – создание общей концепции автоматизированной обработки и анализа цифровых изображений субстратзависимых клеточных систем.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены с использованием субстратзависимой культуры клеток аденокарциномы горлани человека *HEP-2*, полученной из коллекции клеточных культур Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН

Украины. Клеточные монослои выращивали в культуральных полистироловых матрасах производства *Sarstedt* (США) с площадью поверхности роста 25 см² и посевной концентрацией 10⁶ кл/см² [6]. Клетки культивировали в течение 72 ч. при 37°C с последующим микроскопированием через 48 и 72 ч. от момента инокуляции. Микроскопические исследования не окрашенных клеточных монослоев проводили под инвертированным микроскопом *PrimoVert* в светлом поле проходящего света при дифференциально-интерференционном контрастировании живых клеток. Изображение клеточного монослоя визуализировали с помощью цифровой цветной камеры *Digital Microscopy Camera Axio Cam ERc5s* с применением программного обеспечения *Carl Zeiss*. Предварительная обработка цифровых изображений проведена по методу Нобуоки Оцу [7]. Статистический анализ проведен по описанию в [8].

Результаты и обсуждение

Для лучшего статистического анализа изменений клеток в монослое культуры *HEP-2* при его формировании в течение 24–72 ч. культивирования было получено максимально большое количество цифровых изображений клеток с целью выявления изменений, происходивших во всей совокупности клеток монослоя, а не только в определенных его точках. Это потребовало сбора как можно большей базы цифровых изображений клеток, полученных при одинаковых условиях съемки для всех случаев. Каждое изображение обрабатывали для выделения цифровых данных для него, после чего все данные были собраны в единую базу, проанализированную статистическими методами [8]. Так, серия из 100 изображений, каждое из которых содержало 200 клеток, в среднем имело записи о примерно 20 тыс. различных клеток, каждая из которых характеризовалась набором значений для заранее определенных характеристик. Собственно характеристики фактически определялись посредством математических функций к контурам клеток на картинке [9]. В то же время получение контуров клеток выполнялось методами обработки изображений, в том числе морфологическими методами для преобразования исходного изображения в карту контуров клеток [10].

Обработка изображений. Морфологические методы. Метод водораздела. В предыдущих исследованиях [6] выполнена обработка изображения клеток фиксированного окрашенного монослоя, где цвет собственно клеток и свободной от них поверхности роста значительно отличались между собой, что позволяло легко различать их посредством стандартных методов отделения объектов на фото. Но фиксация и окраска исследуемого материала не позволяет наблюдать за ростом клеток в динамике, исследовать цитопатические изменения в них при инфицировании вирусами, изучать различные аспекты фармакодинамики химиопрепаратов. Таким образом, необходимо было найти способы выделения контуров живых клеток на картинке. Одним из способов

увеличения различий изображений клеток и свободной от них поверхности роста было установление высокой яркости подсветки нативного препарата при изучении под микроскопом и соответствующей съемке

Бинаризации изображения. Определение адаптивного порога бинаризации. В предыдущих исследованиях [11] выполнены преобразования цветного пиксела в серый с применением двух основных методов: нахождения среднего значения трех каналов по формуле

$$Gray = \frac{R + G + B}{3}$$

и использования стандартных коэффициентов по формуле

$$Gray = R \cdot 0,299 + G \cdot 0,587 + B \cdot 0,114.$$

Во второй формуле использованы коэффициенты для каждого из каналов, свойственные большинству алгоритмов перевода цветного изображения в серое. Коэффициенты подбирались с учетом того, что человеческий глаз лучше всего воспринимает зеленый цвет и хуже другие. Однако этот метод оказался неприемлемым в случае автоматического анализа отдельных изображений как набора чисел, выполняемого программным способом. Поэтому обработка изображений нативных клеточных монослоев нуждалась в использовании других коэффициентов.

Исследование произвольного цветного изображения не окрашенного клеточного монослоя под микроскопом показало, что зеленый канал везде был представлен почти одинаковыми значениями, в то время как синий канал имел небольшую разницу между максимальным и минимальным значениями, а для красного канала эта разница определялась на уровне нескольких десятков с учетом множества значений для каждого канала от нуля до 255 (рис. 1). Так, эффективная формула преобразования этого цветного изображения в серое имела вид

$$Gray = 0,6 \cdot R + 0,1 \cdot G + 0,3 \cdot B.$$

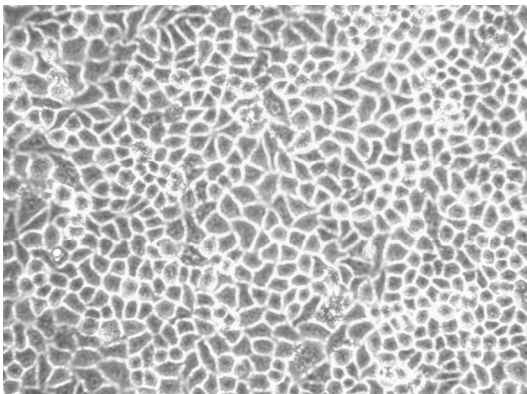


Рис. 1. Цветное изображение клетки не окрашенного монослоя с ярким освещением

Эта формула оказала наибольшее влияние на конечные значения пикселей в сером изображении именно красному каналу, что в результате увеличило разницу между значениями серых точек для клеток и свободной

от них поверхности роста, значительно улучшило качество бинаризации (рис. 2).

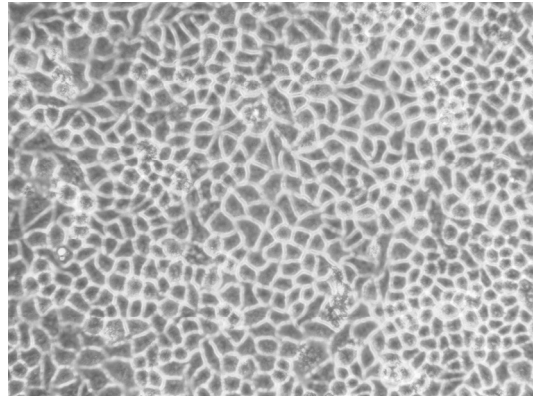


Рис. 2. Преобразование изображения не окрашенного клеточного монослоя из цветного в градиенты серого

Как базовый метод бинаризации был использован метод Оцу [7]. В случае окрашенного клеточного монослоя он показал ожидаемые результаты [11]. Однако при анализе нативных изображений этот метод оказался недостаточно эффективным из-за неравномерного распределения света при создании цифрового изображения, поскольку часто значения пикселей для клеток в одной его части близко к значениям пикселей свободной от клеток поверхности роста в другой части изображения, что препятствует действительно качественному выделению контуров клеток по всему изображению. Для решения этой проблемы был апробирован метод определения адаптивного порога бинаризации. Его преимущество заключалось в определении порога для каждого пиксела на основе не всего изображения, а только множества соседних пикселей (в определенном радиусе или в рамках определенного квадратного окна). Впрочем, такой подход имел свои недостатки. Во-первых, его использование требовало больше ресурсов для расчета, поскольку каждый из пикселей анализировался в среднем несколько десятков раз. Другим существенным его недостатком было то, что на практике полученные изображения не давали целостных контуров, а формировали очень зашумленное изображение (рис. 3, 4). Пока возможности этого метода как

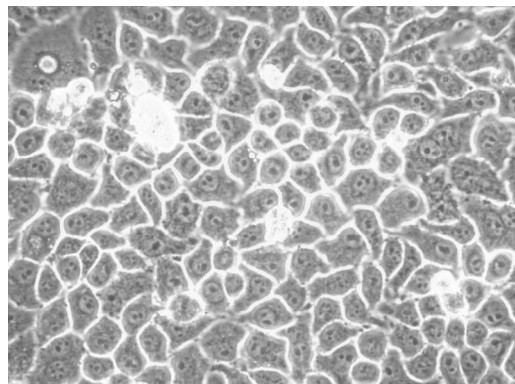


Рис. 3. Цветное изображение в бинаризации

вспомогательного детально изучаются. В перспективе он может быть использован для улучшения качества выделенных контуров.

Удаление артефактов. Использование морфологических методов. Метод водораздела. Как видно из рис. 4, полученное бинаризованное изображение имеет два существенных недостатка. Во-первых, внутри массивных областей определенного цвета наблюдались небольшие области другого цвета. Во-вторых, некоторые фигуры, которые должны представлять отдельные клетки, имели мелкие связи, превращая изображения нескольких клеток в единую компоненту связности, из-за чего автоматические методы анализа объектов учитывали несколько объектов как один, т.е. фактически стояло две задачи: удаление шума на изображении и разделение «слипшихся» клеток. Можно также отметить, что черным цветом обозначались именно клетки, а белым – внешние области, в то время как в теории поиска объектов на изображениях белый цвет представляет именно объекты, а черный – фон. Это обусловлено тем, что на снимках под микроскопом клетки темнее свободной поверхности вокруг них. Впрочем, эта проблема легко решалась инвертированием изображения. Для удаления шума использовались те же методы, что и в предыдущих исследованиях – эрозия, дилатация, морфологические открытия и закрытия [11].



Рис. 4. Цветное изображение после бинаризации

Разделение «слипшихся» клеток выполнялось в два этапа. На первом создавалась карта маркеров, представлявших внутренние части контуров клеток, охватывавших именно плоскость клеток, причем каждый маркер соответствовал одной клетке. Теоретически маркер не может представлять две и больше клеток, в то время как одну клетку не может представлять более чем один маркер. Способом создания таких маркеров стала эрозия изображения с ядром определенного размера с целью удаления лишней связи между клетками и областей, ошибочно занесенных в контуры клеток. В то же время с помощью дилатации выделялась область, принадлежавшая фону изображения, но не охватывавшая клетки. Места между маркерами и фоновой областью постепенно заполнялись по методу водораздела [10] так, что каждый контур, выра-

женный из маркера, не пересекался с областью другой клетки, поскольку эту область заполнял другой выращенный маркер.

Часто описанный метод выделения маркеров не давал идеального результата и ошибочно разбивал одну клетку на две или объединял некоторые соседние клетки. Для максимизации качества выделения контуров лучшим вариантом стало внедрение возможности для пользователя корректировать карту маркеров – удалять лишние и добавлять новые там, где они не были добавлены автоматически. Опыт показал, что такая возможность необходима вследствие слишком большого разнообразия возможных форм и размеров клеток в рамках одной культуры и, как результат, невозможности предсказания однозначного алгоритма для разделения клеток между собой.

Финальная обработка. Удаление избыточных объектов. В результате обработки на изображениях обычно остаются мелкие избыточные элементы, которые не несут полезной информации. Соответствующие контуры могут быть удалены. Также стоит удалить все контуры, которые касаются границ изображения, так как чаще всего такие контуры фактически являются «обрезанными, оборванными» версиями контуров полноценных клеток, поскольку такая клетка лишь частично попадает в область изображения (рис. 5, 6). Удаление таких контуров позволит избежать значительных погрешностей при дальнейшем автоматическом анализе изображений.

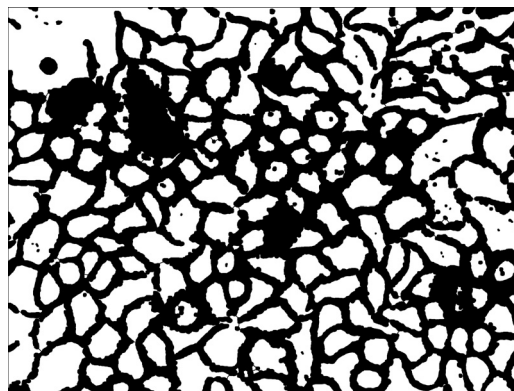


Рис. 5. Выделенные объекты с помощью алгоритма из приведенных операций

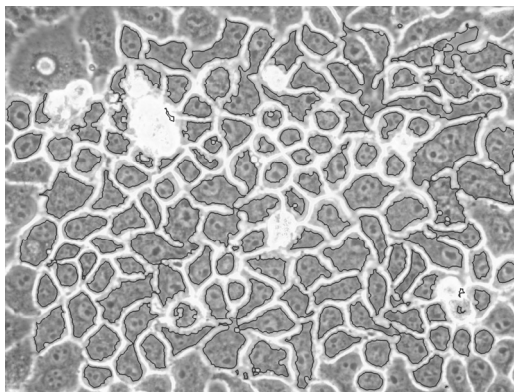


Рис. 6. Контуры клеток. Избыточные контуры удалены

Применение математических методов для определения характеристик полученных контуров. Полученные контуры далее рассматриваются как геометрические фигуры с соответствующими математическими характеристиками. Простейшие из них – площадь и периметр. Если обозначить фигуру контура как C , то эти характеристики – функции можно обозначить как $p(C)$ для периметра и $a(C)$ для площади определяют размер объектов. Также они имеют определенные производные характеристики [10], как, например, компактность, которую можно определить по формуле

$$\text{compactness}(C) = \frac{(p(C))^2}{a(C)}$$

и которая в зависимости от значения позволяет судить о выпуклости или вогнутости фигуры. Другими характеристиками, описывающими форму фигуры, есть площадь выпуклой оболочки $\text{convex}(C)$ и плотность, определяемая по формуле

$$\text{solidity}(C) = \frac{a(C)}{\text{convex}(C)}.$$

Также можно описывать множество дополнительных характеристик, таких как средняя, максимальная и минимальная яркость пиксела внутри фигуры и др. Перечень подобных характеристик безграничен и позволяет характеризовать изменения в размерах, форме, яркости и других свойствах клеток под действием определенных процессов. Так, каждая выделенная клетка может быть охарактеризована массивом численных значений соответствующих математических характеристик, множеством которых подлежат детальному изучению.

Создание базы данных параметров клеток и их статистический анализ

Сравнение параметров клеток для различных условий культивирования и разных культур. Для эффективного анализа цифровых изображений клеток определенной культуры и их изменения под действием внешних и внутренних факторов необходимо иметь большую серию снимков, выполненных при одинаковых условиях: посевной концентрации клеток при инокуляции, фазе роста клеточной культуры, условия культивирования, освещения, единообразии процессов (в идеале – различные снимки единого исследуемого материала), настройке аппаратуры и пр. Для каждого снимка формируется

база данных, где каждому контуру соответствует определенный массив значений характеристик контура.

Следующий шаг – обобщение массивов численных значений характеристик всех клеток всех снимков одной серии в единую базу, соответствующую определенным условиям и процессам внутри определенной культуры в определенное время. Эти характеристики можно изучать статистическими методами (находить среднее, максимальное, минимальное, медиану, моду, отклонения и пр.). Таким образом, можно выводить обобщенные характеристики определенной культуры для определенных условий.

Если выполнять аналогичный анализ для той же культуры в других условиях (например, с разницей в 24 ч.), при инфицировании и других условиях, то можно увидеть смену обобщенных характеристик. Так, например, если за 24 ч. увеличилась средняя площадь клетки, то можно предположить, что собственно клетки увеличились в результате действия указанных процессов. Изменения обобщенных характеристик позволяют изучить изменения биологических характеристик клеток в целом. Аналогично сравнения можно проводить для клеток одной культуры, пребывающих под действием различных факторов, или сравнивать разные культуры и изучать биологические процессы с использованием субстратзависимых клеточных культур.

Заключение. Практическое применение разработанной общей концепции автоматической обработки и анализа цифровых изображений в микроскопии с последующим созданием алгоритмов количественного анализа визуальных данных о живых субстратзависимых клеточных системах на примере перепрививаемой культуры клеток аденокарциномы гортани человека *HEP-2* позволит разработать программное обеспечение для анализа результатов микроскопических исследований и выявления изменений биологической системы под действием внешних и внутренних факторов. Предлагаемые решения улучшат точность автоматического выделения контуров клеток на снимках с возможностью их коррекции в ручном режиме, позволят автоматизировать статистический анализ полученных параметров клеток в больших выборках и сравнение больших многочисленных массивов. Описанный инструмент – существенный шаг в применении информационно-вычислительных технологий при исследовании биологических систем и изменений в них под влиянием физических, химических и биологических факторов.

UDC 611-018.1-086-092.4:612.014.46:578.858

D.I. Kunashev, S.O. Soloviov, O.P. Trokhimenko, I.V. Dzyublyk

Forming the concept of automated handling and analyzing of digital images of anchorage-dependent cell systems

Keywords: cell systems, microscopy, processing and analysis of digital images, the automation of cell circuits, the method of Otsu segmentation watershed, information and computer technology.

Background. Cell systems are widely used in various fields of biology and medicine, physiology, pharmacology, classical virology etc. Microscope remains the main instrument of the researcher. But today automated analysis of digital images for evaluating

the results of microscopic studies is used more and more often. Because of this, obtaining the accurate images, providing transfer of images from the optical system of microscope to the computer and further automated analysis with the extensive use of computer technologies are necessary.

Statement of the problem. Our previous studies described a method of standardizing numerical methods for evaluation of microscopic images of anchorage-dependent cell systems in vitro. The proposed approach of obtaining and processing images of cell monolayers gives the promising results. However, the general concept of automatic processing and analysis of digital images remains undeveloped. Solving this problem first of all will significantly facilitate the work and reduce the research time due to the fact that most of mechanical steps on edge detection and calculating main geometric shape parameters will become automated providing significant increase of the array of data being processed. In addition this approach will improve the accuracy of edge detection thus providing representativeness of the sample. So the aim of the work is to develop a common concept of automated processing and analyzing digital images of anchorage-dependent cell systems.

Research methodology. Research is conducted using inoculated cell cultures of adenocarcinoma of human larynx HEP-2 obtained from the collection of cell cultures of the RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv. The cell monolayers are grown in culture polystyrene mattress with growth surface area of 425 cm² and crop concentration of 10⁶ cells/cm². The cells were cultured for 72 hours at 37° C followed by microscopic examination after 48 and 72 hours from the time of inoculation. Microscopic study of native cell monolayers were carried out under an inverted microscope PrimoVert in transmitted bright field illumination. Image of the cell monolayer visualized using digital color cameras Digital Microscopy Camera AxioCam ERc5s with using Carl Zeiss software. Preprocessing of digital images was performed using Otsu's method.

Conclusions. The overall concept of automatic processing and analyzing of digital images in microscopy followed by the creation of algorithms for quantitative analysis of visual data on living anchorage-dependent cell systems is presented. The proposed solutions will improve the accuracy of automatic edge detection in the cells images with the possibility of correction in manual mode. They also will automate statistical analysis of the cells parameters in large samples.



Внимание !

**Оформление подписки для желающих
опубликовать статьи в нашем журнале обязательно.**

В розничную продажу журнал не поступает.

Подписной индекс 71008