

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

Пошук та стандартизація чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстрат-залежних клітинних систем *in vitro*

Приведен метод стандартизації чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстрат-залежних клітинних систем. Предложенний підхід пошуку та розділення зображень кліток дає достовірні результати.

The method of standardization of the numerical methods for evaluation of microscopic images of anchorage-dependent cell systems is presented. The proposed approach of finding and sharing the cells images gives the reliable results.

Подано метод стандартизації чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстрат-залежних клітинних систем. Запропонований підхід до пошуку та відокремлення зображень клітин дає достовірні результати

Вступ. Клітинні системи активно використовуються у біології, біотехнології, вірусології для вивчення проліферативних властивостей живих клітин *in vitro*, репродукції вірусів в них та оцінки біологічної активності потенційних лікарських засобів, в тому числі з противірусною дією. В той же час валідація оцінки результатів таких досліджень є трудомістким процесом, що обмежує одержання об'єктивних результатів. З цієї причини все більшої актуальності набувають розробки автоматизованих рішень для отримання кількісних об'єктивних результатів. Наприклад, таким кількісним методом аналізу є протоchna цитометрія, що використовується при дослідженні функціонального стану і сортування клітин в суспензії. В той же час такий підхід не є задовільним у роботі із субстрат-залежними клітинними системами, оскільки при його використанні втрачаються дані про морфологічні особливості та просторову організацію клітин при відокремленні їх від поверхні росту (субстрату), тому кількісний аналіз мікроскопічних зображень таких клітин є альтернативою для отримання цих характеристик. В даній статті запропоновано підхід, який дозволяє автоматизувати і дати об'єктивну оцінку найважливішим характеристикам субстрат-залежних клітин *in vitro* при аналізі зображень, отриманих у процесі мікроскопічних досліджень таких об'єктів.

Постановка задачі

Завдяки сучасним досягненням в галузі світлової і люмінесцентної мікроскопії, підсилен-

ню контрастування мікроскопічних об'єктів та візуалізації зображень з використанням цифрових камер, а також появі потужних комп'ютерів та програмного забезпечення, значно збільшились можливості дослідження зображень біологічних об'єктів. Багато алгоритмів було розроблено і адаптовано для автоматичного розпізнавання мікроскопічних зображень клітинних культур. Таке розпізнавання полягає у розділенні одержаного образу на сукупності регіонів з особливими властивостями. Після розділу зображення на фрагменти проводяться вимірювання для кожного фрагменту та прилеглих до нього регіонів, співвідношення між якими підлягають кількісній оцінці. Для успішної розробки алгоритму, який би розділяв зображення за регіонами, необхідні деякі попередні дані про зображення (шум, збільшення, зміст тощо) і об'єкти, що становлять інтерес (їх кількість, форма, розмір, орієнтація, розподіл рівнів сірого, колір, текстура тощо). Такі дані щодо кожного регіону дозволяють диференціювати окремі об'єкти на зображенні, але, на жаль, вони зазвичай рідко доступні в практичній роботі. Як наслідок, не існує загального алгоритму для отримання оптимального розпізнавання зображень [1]. Низка робіт описує алгоритми виявлення та ідентифікації як окремих, так і груп клітин: підходи на основі порогових гістограм, виявлення меж [2], мульти-спектральний аналіз [3, 4], морфологічну математику та скелетизацію [5, 6], класифіка-

Ключові слова: клітинна система, мікроскопія, метод Оцу, сегментація вододілом, інформаційно-комп'ютерні технології, автоматизація.

цію [7], параметричні активні контури [8–11] та ін. Запропонований в даній статті алгоритм дозволяє розпізнати клітини на зображенні за їхніми геометричними даними.

Мета роботи – пошук та стандартизація чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстрат-залежних клітинних систем *in vitro*.

Методи досліджень

Дослідження склалися з кількох етапів: приготування клітинних моношарів субстрат-залежних культур клітин, контрастування та мікроскопія культур клітин, одержання зображень, сегментації зображень для пошуку об'єктів (окремих клітин), що представляють інтерес, класифікації і обчислення результатів.

В процесі роботи використано субстрат-залежну культуру клітин аденокарциноми гортані людини *Hep-2*, одержану з колекції клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Клітинні моношари були вирощені у культуральних полістиролових планшетах, або матрасах [12]. Мікроскопічні дослідження проводили під інвертованим мікроскопом *PrimoVert* у світлому полі прохідного світла при диференційно-інтерференційному контрастуванні живих клітин або при дослідженні фіксованих клітин, пофарбованих за Романовським-Гімзою. Зображення клітинного моношару фотографували за допомогою цифрової кольорової камери *Digital Microscopy Camera AxioCam ERc5s* для обробки зображень за методом Нобуюкі Оцу [13], розробленим у 1979 р.

Результати досліджень та їх обговорення

При мікроскопічному дослідженні та фотографуванні сформованого клітинного моношару культури клітин *Hep-2* одержано зображення множини клітин (рис. 1).

Для опису властивостей клітин у певному стані на окремому графічному зображенні потрібно виділити кожну клітину та визначити чисельні значення її параметра, після чого можна скласти загальну картину та розрахувати середні значення параметрів сукупності клітин на зображенні. Порівняння середніх значень

параметрів клітин на послідовно одержаних зображеннях можна використати для визначення змін характеристик культур клітин під дією певних чинників.

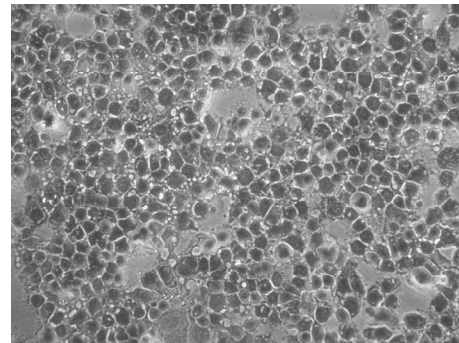


Рис. 1. Кольорове зображення множини клітин клітинної лінії (збільшення $\times 20$)

Виділення кожної клітини стає можливим у випадку правильної бінаризації зображення, що дозволить представити його як *множини білих об'єктів на чорному тлі*, де білі об'єкти – це безпосередньо заповнені контури клітин, які на бінаризованому варіанті зображення позначено білим кольором, а *чорне тло* – все інше, тобто саме тло та об'єкти, які не потрапили у вибірку. Все, що на чорному тлі, ігнорується та позначається на бінаризованому зображенні чорним кольором. Метод Нобуюкі Оцу дозволяє на основі аналізу гістограми зображення встановити поріг між класами об'єктів та тлом так, щоб вони були максимально *щільними*. Тобто задача зводиться до мінімізації внутрішньокласової дисперсії [12]. Після отримання такого бінарного зображення з розташованими на ньому однотонними об'єктами, можливо чітко відокремити кожен з них та обчислити його параметри (рис. 2).

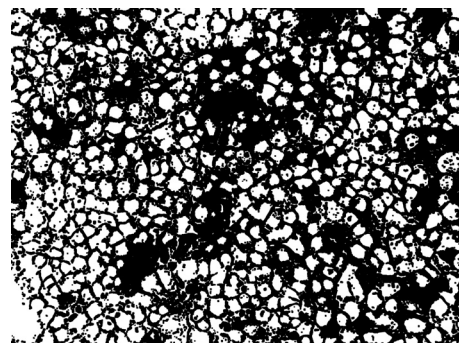


Рис. 2. Бінаризоване зображення множини клітин (збільшення $\times 20$)

У разі потреби запропонований метод дозволяє дослідити не тільки властивості самої клітини, але й проаналізувати її складові частини і використати бінаризоване зображення як маску для відокремлення самих клітин від всього, що їх оточує, з подальшою обробкою зображення окремої клітини та розбиттям його на дрібніші складові.

Аби привести зображення до чорно-білого, краще за все застосувати порогову (граничну) обробку. Для цього перш за все конвертують зображення з кольорового формату у формат градацій сірого (рис. 3), що дозволяє обробляти лише один канал зображення, після чого застосовується метод Оцу для його бінаризації [12]. Він є найбільш прийнятним, оскільки визначає поріг перетворення так, щоб відхилення в кількості пікселів, віднесених до певного класу (тло або об'єкт), було мінімальним (рис. 4).

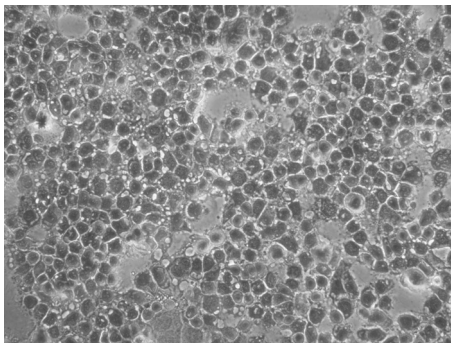


Рис. 3. Початкове зображення у градаціях сірого

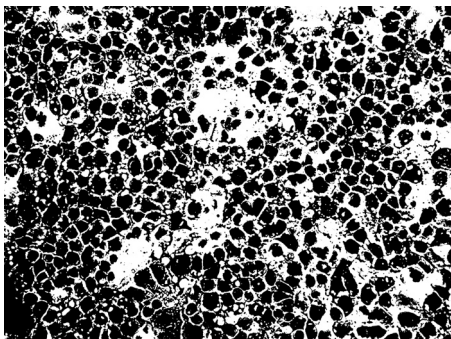


Рис. 4. Зображення, бінаризоване за методом Оцу

Основні вади отриманого зображення – наявність шумів та елементи, розташовані занадто близько та торкаються один одного. Після цього виділяються зображення клітини так, щоб кожна з них була окремою компонентою

зв'язності, яка в подальшому підлягає обробці. Для цього виконується дилатація поданого зображення, тобто в даному виразі оператор об'єднання можна вважати оператором, застосовуваним в граничних значеннях пікселів. Структурний елемент застосовується до всіх пікселів бінарного зображення. Щоразу, коли початок координат структурного елемента поєднується з одиничним бінарним пікселем, до всього структурного елемента застосовується перенесення і наступне логічне додавання (логічне АБО) з відповідними пікселями бінарного зображення. Результати логічного складання записуються у вихідне бінарне зображення, яке спочатку ініціалізується нульовими значеннями. Якщо зображення ще не є інвертованим, можна спочатку інвертувати його, а потім зробити ерозію, при операції якої структурний елемент проходить по всіх пікселях зображення. Якщо в деякій позиції кожен одиничний піксель структурного елемента збігається з одиничним пікселем бінарного зображення, то виконується логічне додавання центрального пікселя структурного елемента та відповідного пікселя вихідного зображення. В результаті застосування операції ерозії всі об'єкти, менші за структурний елемент, стираються; об'єкти, з'єднані тонкими лініями роз'єднуються і їх розміри зменшуються. Для визначення стандартного ядра об'єкта використовується матриця 3×3 , заповнена одиницями. Ерозія (дилатація) дозволяє розширити тло та звузити об'єкти на зображенні. Кількість ітерацій, з одного боку, впливає на більш якісне розділення об'єктів, але, з іншого, – зменшує власне площу виділених компонентів, що впливає на повноту інформації та подальшу якість обробки, тому кількість ітерацій має бути помірною. Інверсія зображення дозволяє досягти мети *білі об'єкти на чорному тлі* (рис. 5). Інвертоване зображення схоже на негатив фотографії. Тобто від білого кольору (255) віднімаємо яскравість поточного пікселя (від нуля до 255), і як результат отримується інвертоване зображення.

Слід враховувати, що в результаті такої обробки зберігатиметься похибка – деякі об'єкти можуть залишитись з'єднаними, частина тла буде розпізнана як об'єкт, нерівномірне освітлен-

ня впливатиме на визначення межі та підвищить похибку. Тому найкраще для обробки те мікроскопічне зображення, на якому є чіткий контраст між тлом та клітинами при рівномірному освітленні.

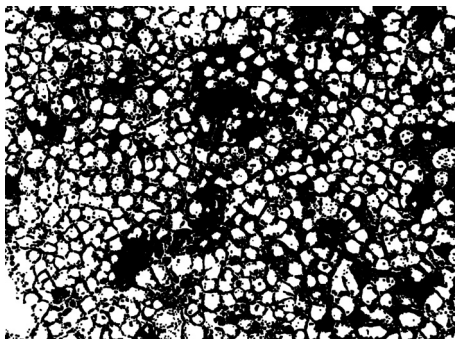


Рис. 5. Інвертоване зображення: білі об'єкти на чорному тлі

Наступним етапом обробки є відокремлення об'єктів, що дозволить обчислити їх характеристики. Для цього покроково використовується кластеризація модифікованим варіантом методу водорозділу.

К р о к 1. *Покращене розділення клітин за допомогою алгоритму водорозділу.* Замість пошуку оптимальної кількості ітерацій ерозії можливим є застосування алгоритму водорозділу для одержання однопіксельних граней поміж клітинами, розташованими занадто близько одна до одної.

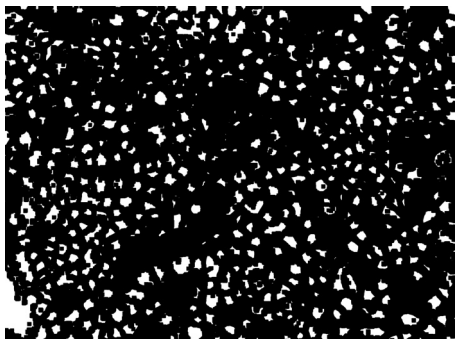


Рис. 6. Зображення після великої кількості послідовних ерозій

Для цього потрібно виділити три групи областей на зображенні: область, що точно є тлом, область, що буде розглянута як невизначена, та маркери об'єктів. Областю тла є чорне тло попередньо бінаризованого зображення. Для визначення маркерів проводять ерозію зображення зі значною кількістю ітерацій (10–15 ітерацій в залежності від зображення) з метою мак-

симального зменшення зображення кожної клітини або її частини, але не знищення його.

В кінцевому результаті одержують множину зв'язних компонентів, кожний з яких має стати окремим маркером з відповідним номером. Уся частина зображення, що не є тлом та не входить до маркерів, вважається не визначеною і буде заповнена водорозділом. Перевагою такого підходу є те, що декілька клітин, які дотикались між собою та утворювали дивну фігуру за допомогою ерозії, втрачають зв'язок, перетворюються у декілька дрібніших компонентів зв'язності, які надалі стануть окремими маркерами та у результаті виконання алгоритму будуть окремими розділеними об'єктами, що дозволить розглядати всі три клітини окремо.



Рис. 7. З'єднані між собою компоненти

Для кращого розділу об'єктів після водорозділу додатково виконується ерозія та одна ітерація.

Також задля уникнення надлишкової сегментації доцільно заповнити отвори в об'єктах. Це можна зробити шляхом морфологічної операції закриття на початку цього кроку, яка, втім, потребує додаткового підбору ядра потрібного розміру.

К р о к 2. *Обробка зв'язних компонент.* Отримане раніше зображення, за своєю суттю, є множиною компонентів зв'язності. Кожний з них можна представити як множину точок або замкнений контур. Це дозволяє надалі кожен об'єкт окремо розглядати як геометричну фігуру з відповідними властивостями. Основні властивості – це периметр та площа. Площа в свою чергу може бути вирахована як фактична площа об'єкта та як заповнена площа для об'єкта, який має отвори всередині. З основних властивостей об'єкта витікають подальші складені властивості:

- компактність – відношення квадрата периметра до площі;
- відношення площі фігури до площі описаного прямокутника;
- площа опуклої оболонки фігури;
- відношення площі фігури до площі її оболонки та ін.



Рис. 8. Компоненти, роз'єднані водорозділом

Під час обробки варто проводити мінімальну фільтрацію об'єктів. Так, наприклад, задля зменшення похибок доцільно ігнорувати об'єкти, які торкаються краю зображення, бо вони можуть бути обрізані, а тому зображення клітини або частина тла, яка потрапила до області об'єктів під час бінаризації, неповноцінне. Також є сенс ігнорувати занадто дрібні об'єкти (наприклад, 10 пікселів площі та менше), бо в більшості випадків вони виявляються шумом або дрібними частками, які потрапили на фото та не стосуються зображення клітин. В залежності від відомих загальних характеристик клітин можна фільтрувати об'єкти, характеристики яких занадто розбігаються з визначеними.

Висновки. Розглянуто стандартизацію чисельних методів оцінки мікроскопічних зображень субстрат-залежних клітинних систем на прикладі перещеплюваної культури клітин аденокарциноми гортані людини. Застосовані методи пошуку та відокремлення зображень клітин дають достовірні результати. Користуючись можливістю одночасно проводити обробку зображення великої кількості клітин, можна зменшити нечітке розпізнавання клітин, що зліпилися (конгломератів), які вимушено відкидаються, та не впливають на кінцевий результат. Запропонований метод може бути використаний і надалі у розробці алгоритмів автоматизованої оцінки якості та властивостей широкого спектра субстрат-

залежних культур клітин у фундаментальних наукових та клінічних дослідженнях.

1. Pal N.R., Pal S.K. A review on image segmentation techniques // *Pattern Recognition*. – 1993. – **26**, N 9. – P. 1277–1294.
2. Scene segmentation techniques for the analysis of routine bone marrow smears from acute lymphoblastic leukaemia patients / J.J. Brenner, T.F. Necheles, I.A. Bonacossa et al. // *J. Histochemistry and Cytochemistry*. – 1977. – **25**, N 7. – P. 601–613.
3. Aggarwal R.K., Bacus J.W. A multi-spectral approach for scene analysis of cervical cytology smears // *Ibid.* – P. 668–680.
4. Fernandez G., Kunt M., Zryd J. Multi-spectral based cell segmentation and analysis // *Proc. of the Workshop on Physics-based Modelling in Computer Vision*.-Cambridge, USA. – 1995. – P. 166–172.
5. 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.
6. Cloppet F., Oliva J., Stamon G. Angular Bisector Network, a Simplified Generalized Voronov Diagram: Application to Processing Complex Intersections in Biomedical Images // *IEEE Trans, on Patt. Anal. and Machine Intel.* – 2000. – **22**, N 1. – P. 120–128.
7. Fast Pixel Classification by SVM Using Vector Quantization, Tabu Search and Hybrid Color Space / G. Lebrun, C. Charrier, O. Lezoray et al. // *CAIP*. – 2005. – 3691. – P. 685–692.
8. Bamford P. Segmentation of cell images with an application to cervical cancer screening. – PhD thesis. – University of Queensland. – 1999.
9. Segmentation and Tracking of Migrating Cells in Videomicroscopy with Parametric Active Contours: a Tool for Cell-Based Drug Testing / C. Zimmer, E. Labruyere, V. Meas-Yedid et al. // *IEEE Trans. Med. Imaging*. – 2002. – **21**, N 10. – P. 1212–1221.
10. Segmentation and Tracking of Fluorescent Cells in Dynamic 3-D Microscopy with Coupled Active Surfaces / A. Dufour, V. Shinin, S. Tajbakhsh et al. // *IEEE Trans. on Image Processing*. – 2005. – **14**, N 9. – P. 1396–1410.
11. Xie X., Mirmehdi M. Level-set based geometric color snakes with region support // *Proc. of Int. Conf. on Image Processing*. – 2003. – N 2. – P. 153–156.
12. Основи клітинної технології у біології та медицині / О.П. Трохименко, Л.О. Антоненко, С.О. Соловйов та ін. – К.: НТУУ «КПІ» – 2011. – 48 с.
13. Otsu's method – https://en.wikipedia.org/wiki/Otsu%27s_method

Поступила 17.09.2014

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

E-mail: dimakunashev@gmail.com, solovyov@i.ua, lovyov@i.ua

© Д.И. Кунашев, С.А. Соловьев, Е.П. Трохименко, 2014

Поиск и стандартизация численных методов оценки микроскопических изображений субстрат-зависимых клеточных систем *in vitro*

Введение. Клеточные системы активно используются в биологии, биотехнологии, вирусологии для изучения пролиферативных свойств живых клеток *in vitro*, репродукции вирусов в них и оценки биологической активности потенциальных лекарственных средств, в том числе с противовирусным действием. В то же время валидация оценки результатов таких исследований – трудоемкий процесс, ограничивающий получение объективных результатов. По этой причине все большую актуальность приобретают разработки автоматизированных решений для получения количественных объективных результатов. Например, таким количественным методом анализа служит прочная цитометрия, используемая при исследовании функционального состояния и сортировки клеток в суспензии. В то же время такой подход неудовлетворителен при работе с субстрат-зависимыми клеточными системами, поскольку при его использовании теряются данные о морфологических особенностях и пространственной организации клеток при отделении их от поверхности роста (субстрата), поэтому количественный анализ микроскопических изображений таких клеток интересен как альтернатива для получения этих характеристик. В данной статье предложен подход, позволяющий автоматизировать и объективно оценить важнейшие характеристики клеток в субстрат-зависимых клеточных системах *in vitro* в анализе изображений, полученных при микроскопических исследованиях таких объектов.

Постановка задачи

Благодаря значительным современным достижениям в области световой и люминесцентной микроскопии, усилению контраста микроскопических объектов и визуализации изображений с использованием цифровых камер, а также появлению мощных компьютеров и программного обеспечения, значительно увеличились возможности исследования изображений биологических объектов. Многие алгоритмы были разработаны и адаптированы для автоматического распознавания микроскопических изображений клеточных культур. Такое распознавание состоит в разделении полученного образа на совокупности регионов с особыми свойствами. После разделения изображения на фрагменты проводятся измерения каждого фрагмента и прилегающих к нему регионов, соотношение между которыми подлежит количественной оценке. Для успешной разработки алгоритма, разделяющего изображения на значимые регионы, требуется наличие некоторых предварительных данных изображения. Ими могут быть: шум, увеличение, содержание, а также другие объекты, представляющие интерес для исследования – количество объектов, форма, размер, ориентация, цвет, текстура, распределение

уровней серого и пр. Такие данные по каждому региону позволяют дифференцировать отдельные объекты на картинке, но, к сожалению, они обычно редко доступны. Как следствие, не существует общего алгоритма для получения оптимального распознавания изображений [1]. В ряде работ описаны алгоритмы обнаружения и идентификации как отдельных, так и групп клеток: подходы на основе пороговых гистограмм, выявление границ [2], мульти-спектральный анализ [3, 4], морфологическая математика и скелетизации [5, 6], классификация [7], параметрические активные контуры [8–11] и др. Предложенный в статье алгоритм позволяет распознать клетки в изображении на основе их геометрических данных.

Цель работы – поиск и стандартизация численных методов оценки микроскопических изображений субстрат-зависимых клеточных систем *in vitro*.

Методы исследования

Исследования состояли из нескольких этапов: приготовления клеточных монослоев субстрат-зависимых культур, контрастирования и микроскопии культур клеток, получения изображений, сегментации изображений для поиска объектов (отдельных клеток), представляющих интерес, классификации и вычисления результатов.

Использована субстрат-зависимая культура клеток аденокарциномы гортани человека *Hep-2*, полученная из коллекции клеточных культур Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. Клеточные монослои получены в культуральных полистироловых планшетах, или матрасах [12]. Микроскопические исследования проведены под инвертированным микроскопом *PrimoVert* в светлом поле проникающего света при дифференциально-интерференционном контрастировании живых клеток или при исследовании фиксированных клеток, окрашенных по Романовскому–Гимзе. Изображения клеточного монослоя фотографировали с помощью цифровой цветной камеры *Digital Microscopy Camera AxioCam ERc5s*, для обработки изображений использован метод Нобуюки Оцу [13].

Результаты исследований и их обсуждение

При микроскопическом исследовании и фотографировании сформированного клеточного монослоя культуры клеток *Hep-2* получено изображение множества клеток (рис. 1).

Для описания свойств клеток в определенном состоянии на отдельном графическом изображении нужно выделить каждую клетку и определить численные значения ее параметра, после чего можно составить общую картину и вычислить средние значения параметров совокупности клеток на изображении. Сравнение средних

значений параметров клеток на последовательно полученных изображениях можно использовать для определения изменений характеристик культур клеток под действием определенных факторов.

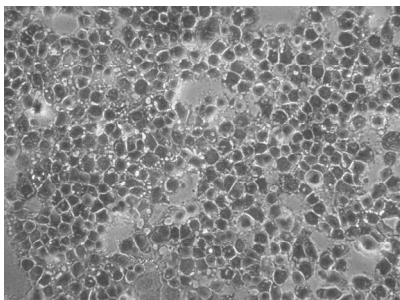


Рис. 1. Цветное изображение множества клеток клеточной линии (увеличение $\times 20$)

В свою очередь, выделение каждой клетки становится возможным в случае правильной бинаризации изображения, что позволит представить его как *множество белых объектов на черном фоне*, где *белые объекты* – это непосредственно заполненные контуры клеток, которые на бинаризованном варианте изображения обозначены белым цветом, а *черный фон* – все остальное, т.е. именно фон и объекты, не попавшие в выборку. Все, что на черном фоне, игнорируется и сказывается на бинаризованном изображении черным цветом. Метод Нобуюки Оцу позволяет на основе анализа гистограммы изображения установить порог между классами объектов и фоном так, чтобы они были максимально *плотными*, т.е. задача сводится к минимизации внутриклассовой дисперсии [12]. После получения такого бинарного изображения с расположенными на нем однотонными объектами, можно четко отделить каждый из этих объектов и вычислить его параметры (рис. 2).

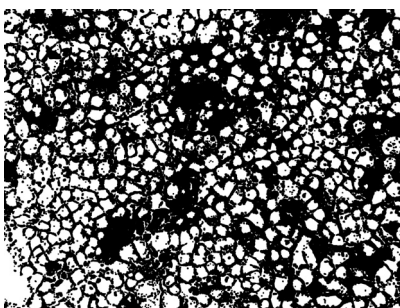


Рис. 2. Бинаризованное изображение множества (увеличение $\times 20$)

В случае необходимости предложенный метод позволяет исследовать не только свойства самой клетки, но и проанализировать ее составляющие части, становится возможным использовать бинаризованное изображение как маску для отделения самих клеток от всего, что их окружает, с последующей обработкой изображения отдельной клетки и разбивкой его на более мелкие составляющие.

Чтобы привести изображение к черно-белому, целесообразно применить пороговую (предельную) обработку. Для этого прежде всего конвертируют изображение из цветного формата в формат градаций серого (рис. 3), что позволяет обрабатывать не три, а только один канал изображения, после чего применяется метод Оцу для его бинаризации [12]. Метод наиболее приемлем, поскольку определяет порог преобразования так, чтобы отклонения в количестве пикселей, отнесенных к определенному классу (фона или объект), было минимальным (рис. 4).

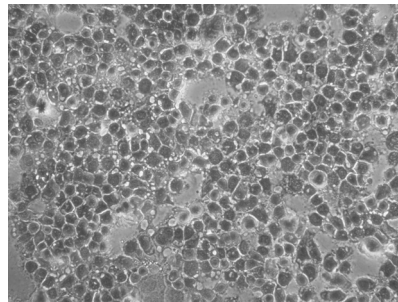


Рис. 3. Исходное изображение в градациях серого

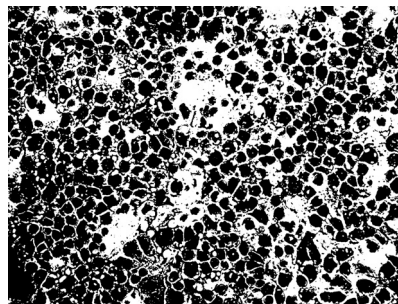


Рис. 4. Изображение бинаризованное методом Оцу

Основные недостатки полученного изображения – шумы и элементы, соприкасающиеся и расположенные слишком близко. Затем выделяются изображения клетки так, чтобы каждая из них была отдельной компонентой связи, в дальнейшем подлежащая обработке. Для этого выполняется дилатация представленного изображения, т.е. в данном выражении оператор объединения можно считать оператором, применяемым в предельных значениях пикселей. Структурный элемент применяется ко всем пикселям бинарного изображения. Каждый раз, когда начало координат структурного элемента сочтается с единичным бинарным пикселем, ко всему структурному элементу применяется перенос и последующее логическое сложение (логическое ИЛИ) с соответствующими пикселями бинарного изображения. Результаты логического сложения записываются в исходное бинарное изображение, которое сначала инициализируется нулевыми значениями. Если изображение не инвертировано вначале, то можно сначала инвертировать изображение, а затем провести эрозию, при выполнении операций которой структурный элемент проходит по всем пикселям изображения. Если в некоторой позиции каж-

дый единичный пиксель структурного элемента совпадает с единичным пикселем бинарного изображения, то выполняется логическое сложение центрального пикселя структурного элемента с соответствующим пикселем выходного изображения. В результате применения операции эрозии все объекты, меньше структурного элемента, стираются; объекты, соединенные тонкими линиями становятся разъединенными, и размеры всех объектов уменьшаются. Для определения стандартного ядра объекта используется матрица 3×3 , заполненная единицами. Эрозия (дилатация) позволяет расширить фон и сузить объекты на изображении. Количество итераций, с одной стороны, влияет на более качественное разделение объектов, но, с другой, – уменьшает непосредственно площадь выделенных компонентов, влияет на полноту информации и дальнейшее качество обработки, поэтому количество итераций должно быть умеренным. Инверсия изображения позволяет достичь цели «белые объекты на черном фоне» (рис. 5). Инвертированное изображение похоже на негатив фотографии, т.е. от белого цвета (255) вычитаем яркость текущего пикселя (от нуля до 255), и в результате получается инвертированное изображение.

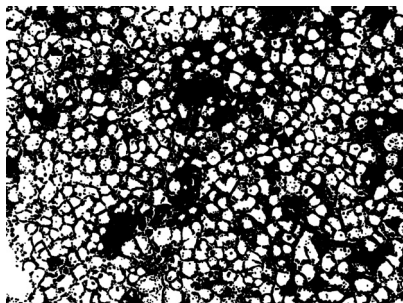


Рис. 5. Инвертированное изображение: белые объекты на черном фоне

Следует учитывать, что после такой обработки сохраняется погрешность – некоторые объекты могут остаться соединенными, часть фона будет распознана как объект, неравномерное освещение влияет на определение границы и повышает погрешность. Поэтому лучше для обработки то микроскопическое изображение, на котором есть четкий контраст между фоном и клетками при равномерном освещении.

Следующий этап обработки – отделение объектов, позволяющее вычислить их характеристики. Для этого пошагово используется кластеризация модифицированным вариантом метода водораздела.

Шаг 1. Улучшенное разделение клеток с помощью алгоритма водораздела. Вместо поиска оптимального количества итераций эрозии возможно применение алгоритма водораздела для получения однопиксельных граней между клетками, расположенными слишком близко друг к другу.

Для этого нужно выделить три группы областей на картинке: область, которая точно есть фоном, область,

которая будет рассмотрена как неопределенная, и маркеры объектов. Как область фона это черный фон с предварительно бинаризованного изображения. Для определения маркеров проводят эрозию изображения со значительным количеством итераций (10–15 итераций в зависимости от изображения) с целью максимального уменьшения изображения каждой клетки или ее части, но не уничтожение его.

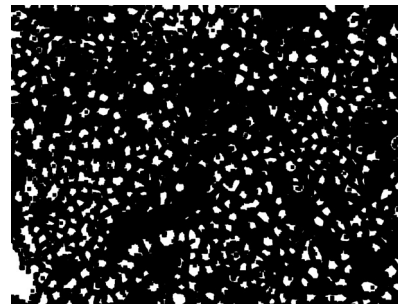


Рис. 6. Изображение после большого количества последовательных эрозий

В конечном результате получают множество связанных компонентов, каждый из которых должен стать отдельным маркером с соответствующим номером. Вся часть изображения, которая не есть фоном и не входит в маркеры, считается определенной и будет заполнена водоразделом. Преимущество такого подхода – то, что несколько клеток, которые соприкасались и образовывали удивительную фигуру, в результате эрозии теряют свою связь, превращаются в несколько более мелкие компоненты связности, которые в дальнейшем станут отдельными маркерами и после выполнения алгоритма будут отдельными разделенными объектами, что позволит рассматривать все три клетки отдельно.



Рис. 7. Соединенные между собой компоненты

Для лучшего раздела объектов после водораздела дополнительно выполняют эрозию и одну итерацию.

Также во избежание избыточной сегментации целесообразно заполнить отверстия в объектах. Это достигается путем морфологической операции закрытия в начале этого шага, которая, впрочем, нуждается в дополнительном подборе ядра нужного размера.

Шаг 2. Обработка связанных компонент. Полученное изображение, по сути, есть множество компонентов связности. Каждый из них можно представить как множество точек или замкнутый контур. Это позволяет в

дальнейшем каждый объект рассматривать как геометрическую фигуру с соответствующими свойствами. Основные свойства – это периметр и площадь. Собственно площадь в свою очередь может быть рассчитана как фактическая площадь и как заполненная площадь для объекта с отверстиями внутри. Из основных свойств объекта в дальнейшем вытекают следующие составленные свойства:

- компактность – отношение квадрата периметра к площади;
- отношение площади фигуры к площади описанного прямоугольника;
- площадь выпуклой оболочки фигуры;
- отношение площади фигуры к площади ее оболочки и пр.



Рис. 8. Компоненты, разделенные водоразделом

При обработке следует проводить минимальную фильтрацию объектов. Так, например, для уменьшения

погрешностей целесообразно игнорировать объекты, которые касаются края изображения, так как они могут быть обрезаны, а потому изображения клеток неполноценные, или часть фона, попавшая в область объектов при бинаризации. Целесообразно игнорировать слишком мелкие объекты (например, 10 пикселей площади и меньше), поскольку в большинстве случаев они оказываются шумом или мелкими частицами, попавшими на фото, и не касаются изображения клеток. В зависимости от известных общих характеристик клеток можно фильтровать объекты, характеристики которых слишком различаются с определенными.

Заключение. Рассмотрена стандартизация численных методов оценки микроскопических изображений субстрат-зависимых клеток систем на примере перевиваемой культуры клеток аденокарциномы гортани человека. Используемые методы нахождения и отделения изображений клеток дают достоверные результаты. Пользуясь возможностью одновременно проводить обработку изображения большого количества клеток, можно уменьшить нечеткое распознавание слипшихся клеток (конгломератов), которые вынужденно отбрасываются и не влияют на конечный результат. Метод может быть использован в дальнейшем при разработке алгоритмов автоматизированной оценки качества и свойств широкого спектра субстрат-зависимых клеточных культур в фундаментальных научных и клинических исследованиях.

Внимание !

Оформление подписки для желающих опубликовать статьи в нашем журнале обязательно.

В розничную продажу журнал не поступает.

Подписной индекс 71008