

На правах рукописи



Артюхова Ольга Александровна

БИОТЕХНИЧЕСКАЯ СИСТЕМА
АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ
КУЛЬТУР КЛЕТОК, ИНФИЦИРОВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ

05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Московском государственном техническом университете имени Н.Э. Баумана.

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент
Самородов Андрей Владимирович.

Официальные оппоненты: Ершов Юрий Алексеевич – доктор химических наук, профессор, МГТУ им. Н.Э. Баумана, кафедра медико-технических информационных технологий, профессор;

Сергеев Игорь Константинович – кандидат технических наук, доцент, Холдинг ОАО «НПК «Оптические системы и технологии», управление по развитию гражданского приборостроения, начальник управления.

Ведущая организация: ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений» Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии РФ.

Защита диссертации состоится «26» июня 2013 г. в 14:00 *
заседании диссертационного совета Д 212.141.14 при Мо
государственном техническом университете имени Н.Э. Ба
аудитории 319 Главного корпуса по адресу: 105005, г. Мос
Бауманская ул., д. 5, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГТУ им. Н.Э.
Автореферат разослан «25» мая 2013 г.



Ученый секретарь
диссертационного совета

Самородов
Андрей Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Хламидийная инфекция является актуальной медико-социальной проблемой современности (Якубович А.И., Корепанов А.Р., 2007; Тихонова Л.И., 1999; Кубанова А.А. и др., 2004). По данным ВОЗ, ежегодно во всем мире регистрируется более 100 млн. новых случаев заболевания. Достаточно часто заражение хламидиями и последующее развитие заболевания сопровождается минимальными клиническими проявлениями, больному не проводится специфическая терапия, что приводит к хронизации инфекционного процесса, бесплодию, синдрому Рейтера, инфицированию плода и другим осложнениям (Аковбян В.А., Прохоренков В.И., Соколовский Е.В., 2007; Якубович А.И., Корепанов А.Р., 2007; Кошкин С.В., 2008).

Успешная организация борьбы с хламидиозом возможна лишь при условии его своевременного выявления и правильного подбора антибиотиков. По сравнению с другими методами, используемыми в бактериологии, культуральный метод исследования на сегодняшний день является «золотым стандартом» диагностики хламидийной инфекции, референтным методом при оценке эффективности антибактериального лечения, а также единственным методом, позволяющим проводить анализ резистентности хламидий к антибиотикам при подборе терапии и разработке новых антибактериальных веществ (Риджуэй Г. Л., 2000; Шипицына Е.В. и др., 2004; Бочкарев Е.Г. и др., 2000).

Культуральный метод заключается в приготовлении и исследовании препаратов инфицированных хламидиями культур эукариотных клеток, которое в настоящее время проводится визуально с использованием флуоресцентного микроскопа. Визуальное исследование имеет ряд существенных недостатков, таких как негативное воздействие на зрение исследователя, высокая трудоемкость и длительное время анализа одного препарата, малый объем выборки визуально анализируемых клеток и, в конечном счете, низкая достоверность результатов анализа. Снижение трудоемкости и увеличение объема выборки анализируемых клеток возможно за счет автоматизации процессов сканирования препарата и обработки зарегистрированных изображений.

Основной задачей разработки систем, осуществляющих автоматическое сканирование препаратов под микроскопом, является выбор метода и алгоритма автофокусировки, основным элементом которой является расчет характеристики резкости изображений (Groen F.C.A, Young I.T., Lighthart G., 1985; Firestone L. et al., 1991; Liu X.Y., Wang W.H., Sun Y., 2007). В настоящее время систем сканирования рассматриваемых препаратов не существует, а опубликованные данные, обеспечивающие возможность выбора надежного метода и алгоритма оценки резкости флуоресцентно-микроскопических изображений рассматриваемых препаратов, отсутствуют.

Автоматизация обработки флуоресцентно-микроскопических изображений рассматриваемых препаратов предполагает решение задачи сегмента-

пии клеток и хламидийных включений. В настоящее время существуют различные методы сегментации цветных изображений: пороговые методы, методы кластеризации, наращивания областей, построения физических моделей формирования изображений и другие (Skarbek W., Koschan A., 1994; Wu Q., Merchant F.A., Castleman K.R., 2008), – однако методы, адаптированные для анализа флуоресцентно-микроскопических изображений хламидий в культуре клеток, ранее не разрабатывались.

Таким образом, разработка биотехнической системы (БТС) автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, позволяющей осуществлять автоматическое сканирование препарата и его автоматизированный количественный анализ, является актуальной задачей.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является разработка биотехнической системы автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- 1) анализ задач и особенностей исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями;
- 2) разработка метода автофокусировки флуоресцентного микроскопа, обеспечивающего возможность автоматического сканирования рассматриваемых препаратов;
- 3) разработка метода автоматической сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями;
- 4) разработка метода автоматизированного исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, по их флуоресцентно-микроскопическим изображениям;
- 5) апробация разработанных методов и макета аппаратно-программного комплекса автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями.

Методы исследования

Поставленные задачи решались на основе теории биотехнических систем, методов цифровой обработки и анализа изображений, методов распознавания образов и компьютерного зрения, методов статистического анализа экспериментальных данных.

Научная новизна

1. Разработан метод автоматической фокусировки флуоресцентного микроскопа, обеспечивающий возможность автоматического сканирования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, и заключающийся в расчете производных по фокусировочным кривым характеристик резкости

«Байесовская энтропия спектра» и «Сумма квадратов гауссовых производных», выборе характеристики с наибольшим значением производной при текущем положении предметного стола микроскопа и смещении предметного стола микроскопа по вертикали в соответствии с принятой стратегией поиска максимума.

2. Разработан метод автоматической сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов инфицированных культур клеток, заключающийся в применении быстрого алгоритма адаптивной бинаризации по методу Ниблэка к изображению клеток, построенному в канале V пространства HSV, и изображению хламидийных включений, построенному по модифицированному методу цветовой деконволюции.

3. Разработан метод автоматизированного исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, заключающийся в автоматическом сканировании препарата во флуоресцентном микроскопе, сегментации зарегистрированных изображений, определении числа хламидийных включений и вычислении их количественных характеристик: поверхностной плотности, среднего значения и среднеквадратичного отклонения значений площади хламидийных включений.

4. Разработана БТС автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, обеспечивающая вероятность обнаружения хламидийного включения не менее 99,6 % и вероятность ложного обнаружения – не более 0,3 %.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в создании и апробации метода автоматизированного исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, обеспечивающего вероятности обнаружения и ложного обнаружения хламидийных включений не менее 99,6 % и не более 0,3 % соответственно, а также возможность количественной оценки их морфологических характеристик.

Проведенные исследования и разработанный метод расчета характеристики резкости флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов инфицированных культур клеток обеспечивают возможность автоматизации флуоресцентно-микроскопических исследований данных препаратов.

Разработанный быстрый алгоритм адаптивной бинаризации по методу Ниблэка обеспечивает возможность практического применения данного метода в задачах сегментации полутоновых изображений независимо от размера области расчета локальных статистик изображения.

Результаты работы позволяют рекомендовать созданный макет аппаратно-программного комплекса автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, для применения в практике микробиологических лабораторий медицинских научных и лечебно-профилактических учреждений.

Положения, выносимые на защиту

1. Для оценки резкости флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, в процессе автоматической фокусировки микроскопа необходимо осуществить выбор одной из двух характеристик резкости: «Байесовская энтропия спектра» и «Сумма квадратов гауссовых производных» – по максимуму значения производной их фокусировочных кривых при текущем положении предметного стола микроскопа.

2. Для сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, необходимо применить к изображению клеток, построенному в канале V пространства HSV, и изображению хламидийных включений, построенному по модифицированному методу цветовой деконволюции, быстрый алгоритм адаптивной бинаризации по методу Ниблэка.

3. Разработанный метод автоматизированного исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, обеспечивает решение задач обнаружения хламидийных включений с вероятностями обнаружения не менее 99,6 % и ложного обнаружения – не более 0,3 %.

Апробация работы

Основные положения работы докладывались и обсуждались на научном семинаре факультета «Биомедицинская техника» МГТУ им. Н.Э. Баумана (г. Москва, 2013), X ННТК «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии ФРЭМЭ» 2012 (г. Владимир, 2012), 10-й Международной конференции «Распознавание образов и анализ изображений: новые информационные технологии» (г. Санкт-Петербург, 2010), V ВНИК «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2012), XIV НТК «Медико-технические технологии на страже здоровья» (Португалия, кур-т Алгарве, 2012), XII НТК «Медико-технические технологии на страже здоровья» (о. Кипр, 2010), Всероссийской научной школе по биомедицинской инженерии «БМИ-2010» (г. Санкт-Петербург, 2010).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 3 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и материалы 5 докладов на научных конференциях общим объемом 3,4 печатных листа.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и приложений. Текст диссертации изложен на 97 страницах. В приложение вошли результаты экспериментальных исследований. Список литературы включает 110 библиографических источников. Диссертация проиллюстрирована рисунками, таблицами, графиками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность, научная новизна и практическая значимость исследования, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен анализ задач и особенностей проведения исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями.

Основными этапами культурального исследования являются заражение культуры клеток (фибробластов) инфицирующей суспензией, содержащей элементарные тела *Chlamydia trachomatis*, инкубирование ее при температуре 37 °С, фиксация 96 % ацетоном, окрашивание препарата флуоресцентным красителем FITC и синькой Эванса и исследование препарата с использованием флуоресцентного микроскопа. На изображениях препаратов хламидийные включения выглядят ярко-зелеными на красновато-коричневом фоне окрашенных клеток (рис. 1), их размеры варьируют от 1 мкм до 8 мкм и более.

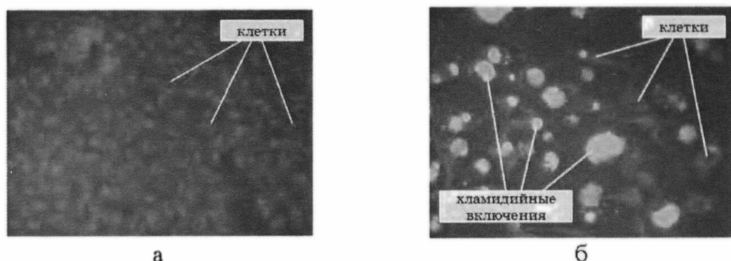


Рис. 1. Флуоресцентно-микроскопическое изображение препаратов культур клеток: а – чистой культуры клеток, б – культуры клеток, инфицированной хламидиями

Основными задачами, решаемыми по результатам культурального анализа, являются диагностика хламидийной инфекции и анализ действия антибактериальных веществ, включая подбор терапии. При решении задач диагностики производится констатация факта наличия либо отсутствия хламидийных включений в культуре клеток, при этом для постановки диагноза достаточно обнаружения одного включения в препарате (Гранитов В.М., 2002). При анализе действия антибактериальных веществ по серии препаратов оценивается степень инфицирования культуры клеток в каждом препарате. В качестве показателей степени инфицирования используется доля инфицированных клеток, определяемая визуально по нескольким полям зрения препарата, а также качественная оценка размеров хламидийных включений. Указанные показатели позволяют охарактеризовать эффективность антибактериального вещества в зависимости от дозы и сроков его введения (Шипицына Е.В. и др., 2004; Зигангирова Н.А. и др., 2012).

Культуральный метод предполагает просмотр и поиск хламидийных включений в каждой клетке культуры в препарате (около 10^5 клеток), что затруднительно при визуальном анализе. Это приводит к снижению чувствительности культурального метода и, в конечном счете, к возможности выявления хламидийной инфекции только при наличии большого числа включений (более 30-ти при просмотре каждой 10-й клетки для вероятности выявления инфекции 95 %).

Высокая трудоемкость и большое время анализа одного препарата, негативное воздействие на зрение проводящего исследование врача-лаборанта, отсутствие количественных измерений морфологических параметров хламидийных включений обуславливают необходимость автоматизации микроскопического анализа рассматриваемых препаратов.

Во второй главе сформулированы требования к биотехнической системе автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями (рис. 2). Показано, что ключевыми элементами разрабатываемой БТС являются алгоритмический блок автофокусировки и специальное программное обеспечение исследования изображений препарата, обеспечивающие выполнение функций автоматического сканирования препарата, автоматической сегментации зарегистрированных изображений и расчета количества хламидийных включений и их количественных морфологических характеристик.

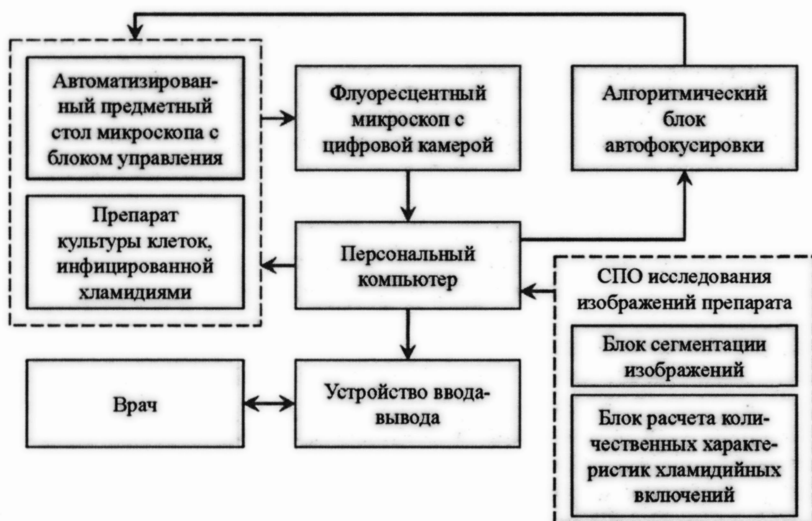


Рис. 2. Структурная схема биотехнической системы автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями. Основными требованиями к решению задачи диагностики хламидийной инфекции являются требования к вероятностям обнаружения $P_{обн. хл.}$ и

ложного обнаружения $P_{\text{лож. обн. хл.}}$ хламидийного включения, которые не должны быть менее 95 % и более 5 % соответственно. Данные вероятности связаны с вероятностями отказа автофокусировки в процессе сканирования препарата $P_{\text{отказ АФ}}$ и вероятностями ошибок при сегментации зарегистрированных изображений следующими соотношениями:

$$P_{\text{обн. хл.}} = 1 - P_{\text{отказ АФ}} - (1 - P_{\text{отказ АФ}}) \cdot (1 - P_{\text{сегм. обн. хл.}}), \quad (1)$$

$$P_{\text{лож. обн. хл.}} = (1 - P_{\text{отказ АФ}}) \cdot P_{\text{сегм. лож. обн. хл.}} \quad (2)$$

где $P_{\text{сегм. обн. хл.}}$ и $P_{\text{сегм. лож. обн. хл.}}$ – вероятности обнаружения и ложного обнаружения хламидийного включения, обусловленные алгоритмом сегментации изображений.

На основе анализа научно-технической литературы и результатов собственных экспериментальных исследований в диссертации разработан метод автофокусировки, обеспечивающий автоматическое сканирование препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, во флуоресцентном микроскопе с управляемым с персонального компьютера автоматизированным предметным столом.

Автофокусировка микроскопической системы заключается в регистрации изображения, расчете характеристики резкости для этого изображения и смещении предметного стола микроскопа по вертикали в соответствии с принятой стратегией поиска максимума. В настоящее время разработано значительное число характеристик резкости для различных областей оптической микроскопии (Groen F., Young I.T., Ligthart G., 1985; Firestone L. et al., 1991; Baina J., Dublet J., 1995; Santos A. et al., 1997; Geusebroek J.M. et al., 2000; Bueno-Ibarrá M.A. et al., 2005; Kristan M. et al., 2006; Shen C.-H., Chen H.H., 2006; Liu X.Y., Wang W.H., Sun Y., 2007; Wu Q., Merchant F.A., Castleman K.R., 2008). Однако в научно-технической литературе отсутствуют сведения, позволяющие выбрать характеристику резкости для использования в разрабатываемой БТС.

В диссертационной работе был сформирован перечень из 23-х характеристик резкости микроскопических изображений, описанных в научно-технической литературе, из которых по результатам экспериментальных исследований было отобрано 14 характеристик, потенциально пригодных для решаемой задачи. В ходе экспериментальных исследований фокусировочные кривые для данных характеристик строились по 10 полям зрения различных исследуемых препаратов. Отобранные характеристики резкости были проанжированы по критериям качества, предложенным L. Firestone et al. (1991) (табл. 1).

Таблица 1.

Результат сравнения характеристик резкости

№ п/п	Характеристика резкости	Критерий качества				
		Точность	Локальные максимумы	Область значений	Шум	Ширина пика
1	Байесовская энтропия спектра	1,0	1,0	5,1	2,5	4,0
2	Сумма квадратов гауссовых производных	1,0	1,0	10,9	1,0	1,2
3	Градиент Тененбаума	1,0	1,0	12,4	1,5	1,0
4	Градиент Бреннера	1,0	1,0	12,7	2,0	1,0
5	Квадрат градиента	1,0	6,1	13,9	5,2	1,0
6	Абсолютный пороговый градиент	1,2	5,4	14,0	14,0	1,6
7	Контраст	1,4	1,3	3,9	2,4	3,5
8	Характеристика Файрстоуна	1,5	1,3	5,9	1,2	2,7
9	Корреляция, основанная на дисперсии	1,6	1,3	2,6	1,4	3,7
10	Дисперсия	1,7	1,3	2,5	1,4	3,7
11	Энергия переменной составляющей	1,7	1,3	2,5	1,4	3,7
12	Нормированная дисперсия	1,7	1,3	2,6	1,4	3,7
13	Характеристика Шена и Чена	1,7	1,3	2,6	1,4	3,7
14	Энтропия	14,0	14,0	1,0	13,2	14,0

Проведенные экспериментальные исследования позволили установить, что наилучшими из проанализированных характеристик резкости являются «Байесовская энтропия спектра» (БЭС) F_1 и «Сумма квадратов гауссовых производных» (СКТП) F_2 :

$$F_1 = 1 - \frac{\sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} |F_c(u, v)|^2}{\left(\sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} |F_c(u, v)| \right)^2}, \quad (3)$$

где $F_c(u, v)$ – дискретное косинусное преобразование изображения, (u, v) – координаты в пространственно-частотной области;

$$F_2 = \frac{1}{H \cdot W} \sum_{Height} \sum_{Width} [f(x, y) \otimes G_x(x, y, \sigma)]^2 + [f(x, y) \otimes G_y(x, y, \sigma)]^2, \quad (4)$$

где $f(x, y)$ – изображение,

$G_x(x, y, \sigma)$ и $G_y(x, y, \sigma)$ – производные Гауссова фильтра с СКО $\sigma = 1/\sqrt{3}$ (Geusebroek J.M. et al., 2000) в горизонтальном и вертикальном направлениях соответственно.

Результаты экспериментальных исследований показали, что ни одна из указанных характеристик резкости не может быть использована самостоятельно в разрабатываемой системе, так как применение БЭС осложнено из-за зашумленности и широкого пика фокусирующей кривой, а СКГП – из-за малой области значений (меньше, чем возможные изменения толщины исследуемых препаратов).

В диссертационной работе для оценки резкости флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов инфицированных культур клеток предложено использовать комбинированную характеристику резкости, вычисляемую как БЭС или СКГП в зависимости от того, значение производной какой из них при текущем положении предметного стола микроскопа больше. Примеры фокусирующих кривых, построенных для комбинированной характеристики резкости, приведены на рисунке 3 (по оси абсцисс отложено отклонение вдоль оптической оси от наиболее резкого изображения, по оси ординат – нормированное значение характеристики резкости).

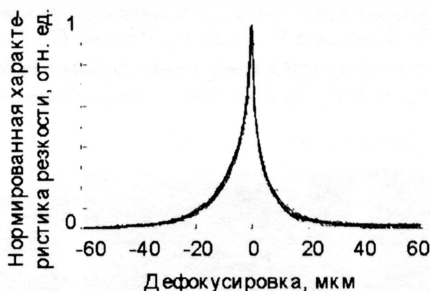


Рис. 3. Фокусирующие кривые для предложенной комбинированной характеристики резкости

Таким образом, алгоритм автофокусировки вблизи резкого изображения использует СКГП, а на удалении – БЭС:

$$k = \begin{cases} 1, & \text{если } \left| \frac{F_1(z + \Delta z) - F_1(z)}{\Delta z} \right| \geq \left| \frac{F_2(z + \Delta z) - F_2(z)}{\Delta z} \right|, \\ 2, & \text{в остальных случаях,} \end{cases} \quad (5)$$

$$z_{\text{нов}} = z + \text{sign} \left(\frac{F_k(z + \Delta z) - F_k(z)}{\Delta z} \right) \cdot \text{step}_z,$$

где z и $z_{\text{нов}}$ – координаты текущего и нового положений предметного стола микроскопа по вертикали соответственно;

Δz – значение шага микроскопа по вертикали, используемое при нахождении производной фокусировочной кривой в точке z ;

$step_z$ – расстояние между текущим и новым положениями предметного стола микроскопа по вертикали, определяемое используемой стратегией поиска максимума.

Экспериментальные исследования макета аппаратно-программного комплекса показали, что предложенная комбинированная характеристика резкости превосходит все рассмотренные ранее характеристики по указанным выше критериям качества фокусировочных кривых и обеспечивает вероятность отказа автофокусировки не более $P_{\text{отказ АФ}} = 0,3\%$, что не нарушает требований к вероятности обнаружения хламидийных включений (1).

Третья глава диссертации посвящена разработке метода автоматической сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями. Сегментация данных изображений состоит из двух этапов: сегментации клеток и сегментации хламидийных включений. В результате анализа распределения цветовых координат хламидийных включений, клеток и фона было установлено, что для разделения областей клеток и фона необходимо использовать цветовой канал V пространства HSV (Гонсалес Р., Вудс Р., Эддинс С., 2006). Для изображения в данном канале выполняется адаптивная пороговая бинаризация по методу Ниблэка. Результат сегментации клеток на изображении препарата приведен на рисунке 4.

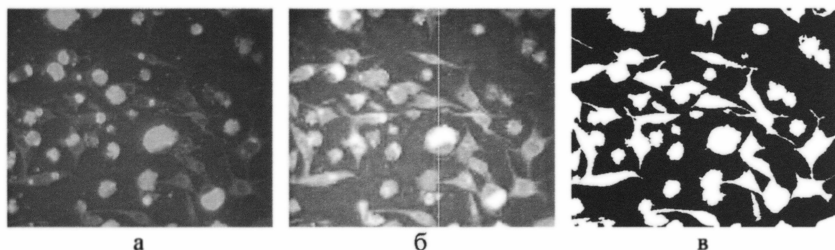


Рис. 4. Этапы сегментации клеток на флуоресцентно-микроскопическом изображении препарата: а – исходное цветное изображение, б – изображение в цветовом канале V пространства HSV, в – результат сегментации клеток по методу Ниблэка

Использование известных методов сегментации цветных изображений не позволяет решить задачу сегментации хламидийных включений вследствие значительной вариабельности интенсивности и цветности хламидийных включений и клеток. В диссертационной работе предложен модифицированный метод цветовой деконволюции, основанный на модели

формирования флуоресцентно-микроскопического изображения. Оригинальный метод цветовой деконволюции был предложен А.С. Ruifrok, D.A. Johnston (2001) для сегментации препаратов, полученных методом обычной световой микроскопии.

Модель формирования флуоресцентно-микроскопического изображения в матричном виде:

$$I(x, y) = A \cdot C(x, y), \quad (6)$$

$$\text{где } I(x, y) = \begin{bmatrix} I^R(x, y) \\ I^G(x, y) \\ I^B(x, y) \end{bmatrix}, \quad A = \begin{bmatrix} \alpha_1^R & \alpha_2^R \\ \alpha_1^G & \alpha_2^G \\ \alpha_1^B & \alpha_2^B \end{bmatrix}, \quad C(x, y) = \begin{bmatrix} c_1(x, y) \\ c_2(x, y) \end{bmatrix},$$

$I^R(x, y)$, $I^G(x, y)$, $I^B(x, y)$ – значения интенсивности изображения в точке (x, y) в цветовых каналах R, G и B соответственно,

$\alpha_i^R, \alpha_i^G, \alpha_i^B$ – коэффициенты пропорциональности, характеризующие вклад в суммарную интенсивность флуоресценции i -го красителя в каналах R, G и B соответственно и определяемые экспериментально,

$c_1(x, y)$, $c_2(x, y)$ – пространственные распределения концентрации красителей.

Решение уравнения (6) методом наименьших квадратов обеспечивает нахождение профилей концентраций флуоресцирующих красителей:

$$C(x, y) = (A^T \cdot A)^{-1} \cdot A^T \cdot I(x, y). \quad (7)$$

Результат цветовой деконволюции исходного изображения, характеризующий профиль концентрации красителя FITC, приведен на рисунке 5б. В дальнейшем это изображение также подвергалось локальной адаптивной бинаризации по методу Ниблэка. Результат приведен на рисунке 5в.

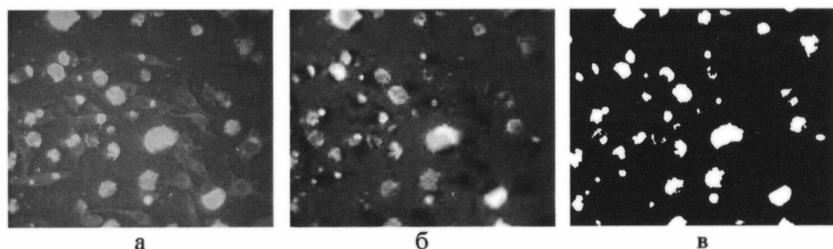


Рис. 5. Этапы сегментации хламидийных включений на флуоресцентно-микроскопическом изображении препарата: а – исходное цветное изображение; б – результат цветовой деконволюции, характеризующий профиль концентрации красителя FITC; в – результат сегментации хламидийных включений по методу Ниблэка

На рисунке 6 приведены примеры результатов автоматической сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями. Поскольку исследуемые клетки – фибробласты – на препарате зачастую расположены вплотную друг к другу (рис. 6б), а их форма и размер могут существенно изменяться в зависимости от их физиологической активности, сегментация изображения на области отдельных клеток невозможна. Между тем, хламидийные включения располагаются изолированно или с небольшим наложением, обеспечивающим возможность автоматического выделения границ отдельных включений. Таким образом, результатом сегментации изображений исследуемых препаратов является совокупность областей изображения, на которых присутствуют группы соприкасающихся клеток либо единичные клетки, и совокупность отдельных хламидийных включений на изображении поля зрения препарата.

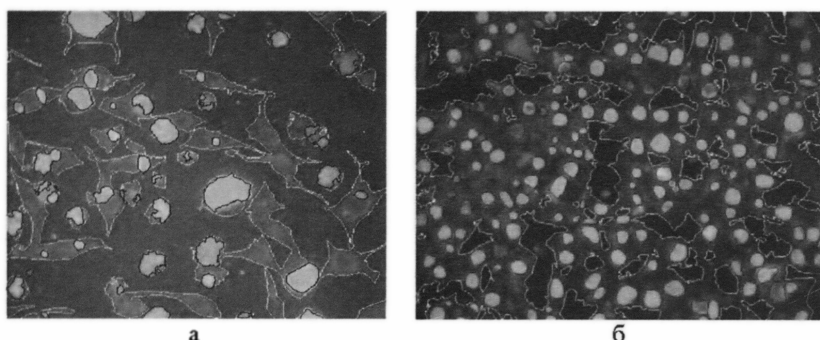


Рис. 6. Примеры результатов автоматической сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями: а – результат сегментации изображения, приведенного на рисунке 1б, б – результат сегментации изображения препарата с плотно расположенными клетками

Предлагаемый в данной работе алгоритм сегментации клеток и хламидийных включений предполагает использование локальной адаптивной бинаризации. Согласно обзору O.D. Trier, T. Taxt (1995) и результатам собственных исследований, наиболее пригодным для решения задачи бинаризации данных изображений является метод Ниблэка, который заключается в расчете локального порога бинаризации $T(x, y)$ по локальным среднему значению $m(x, y)$ и стандартному отклонению $s(x, y)$ значений интенсивности изображения:

$$T(x, y) = m(x, y) + k \cdot s(x, y), \quad (8)$$

где k – коэффициент, значение которого определяется экспериментально (при сегментации клеток $k = -1$; при сегментации хламидийных включений $k = 2$).

Экспериментально было показано, что для вычисления локальных статистик по изображению с шагом дискретизации 0,14 мкм/пикс. для сегментации клеток и хламидийных включений необходимо использовать квадратные сканирующие окна размером 700 и 500 пикс. соответственно, что примерно соответствует утроенному среднему размеру данных объектов. При прямом вычислении указанных локальных статистик время бинаризации изображения размером 3072*2304 пикс. составляет несколько суток, что неприемлемо для практического использования данного метода.

В работе Р. Viola, М. J. Jones (2004) предложен быстрый алгоритм расчета локального среднего значения $\bar{f}(x_0, y_0)$ интенсивности изображения $f(x, y)$ по его интегральному изображению. По аналогии с данным методом в диссертации разработан быстрый алгоритм адаптивной бинаризации по методу Ниблэка, основанный на быстром алгоритме расчета локального среднего, а также на предложенном быстром алгоритме вычисления локального стандартного отклонения $S(x_0, y_0)$ значений интенсивности изображения с использованием введенного интегрального квадрата изображения $I_2(x_0, y_0)$:

$$S^2(x_0, y_0) \cdot (N - 1) = I_2(x_0 + \Delta x, y_0 + \Delta y) + I_2(x_0 - \Delta x - 1, y_0 - \Delta y - 1) - I_2(x_0 - \Delta x - 1, y_0 + \Delta y) - I_2(x_0 + \Delta x, y_0 - \Delta y - 1) - \frac{1}{N} \cdot [\bar{f}(x_0, y_0) \cdot N]^2, \quad (9)$$

где $N = (2 \cdot \Delta x + 1) \cdot (2 \cdot \Delta y + 1)$ – число элементов рассматриваемой области,

$$I_2(x_0, y_0) = \sum_{x=1}^{x_0} \sum_{y=1}^{y_0} [f(x, y)]^2. \quad (10)$$

Разработанный алгоритм обеспечил существенное снижение вычислительной сложности алгоритма локальной адаптивной бинаризации по методу Ниблэка и сокращение времени бинаризации до 9,5 секунд.

Четвертая глава диссертации посвящена разработке и апробации метода автоматизированного исследования препаратов инфицированных культур клеток по их флуоресцентно-микроскопическим изображениям (данный раздел работы был проведен совместно с лабораторией хламидиозов ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, зав. лабораторией – д.б.н., проф., Н.А. Зигангирова).

Решение диагностической задачи – установление факта инфицирования клеток по наличию в них хламидийных включений – достигается в результате автоматического сканирования всего препарата и сегментации регистрируемых изображений. В ходе проведенных исследований по изображениям

препаратов культур клеток, содержащих 5590 хламидийных включений, было определено, что обусловленные ошибками сегментации вероятность обнаружения хламидийных включений составила $P_{обн. хл.}^{сегм.} = 99,9 \%$, а вероятность ложного обнаружения – $P_{обн. хл.}^{сегм.} = 0,3 \%$. С учетом вероятности отказа автофокусировки, вероятность обнаружения хламидийных включений составила 99,6 %, вероятность ложного обнаружения – 0,3 %, что удовлетворяет сформулированным выше требованиям.

В задачах оценки эффективности действия антибактериальных веществ необходимо производить расчет количественных характеристик хламидийных включений. В диссертационной работе в качестве таких характеристик предложено использовать поверхностную плотность хламидийных включений в препарате, рассчитываемую как отношение числа присутствующих в препарате хламидийных включений к общей площади клеток в препарате, а также среднее значение и среднеквадратичное отклонение значений площади хламидийных включений.

В ходе экспериментальных исследований было установлено наличие статистически значимой корреляции ($r=0,85$; $\alpha=0,05$) между результатами визуального подсчета доли инфицированных клеток и автоматического расчета поверхностной плотности хламидийных включений в клетках по 35 изображениям анализируемых препаратов. В результате исследования точности определения площадей хламидийных включений, используемых для расчета их среднего значения и среднеквадратичного отклонения, было установлено, что относительная погрешность определения площади не превышает 3 %.

Таким образом, разработанный метод автоматизированного исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, обеспечивает возможность достоверного определения количественных характеристик хламидийных включений.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. В результате анализа литературных данных показана необходимость повышения достоверности и автоматизации флуоресцентно-микроскопического исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями. Выделены основные задачи автоматизированного исследования данных препаратов: автоматическое сканирование препарата под микроскопом, сегментация полученных изображений, расчет количественных характеристик хламидийных включений.

2. В результате проведенных теоретических и экспериментальных исследований установлено, что представленные в современной научнотехнической литературе характеристики резкости не могут быть использованы для решения задачи автофокусировки в ходе сканирования рассматриваемых препаратов. Показано, что для оценки резкости рассматриваемых изображений необходимо использовать комбинацию двух характеристик:

«Байесовская энтропия спектра» и «Сумма квадратов гауссовых производных».

3. Разработан метод сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями. В основе данного метода лежит расчет профиля концентрации красителя FITC по модифицированному в диссертационной работе методу цветовой деконволюции с последующей адаптивной бинаризацией по методу Ниблэка.

4. Введено понятие интегрального квадрата изображения и предложен быстрый алгоритм расчета адаптивного порога в методе адаптивной бинаризации Ниблэка, обеспечивающий возможность практического использования данного метода.

5. Разработан метод автоматизированного исследования препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, заключающийся в автоматическом сканировании препарата во флуоресцентном микроскопе, автоматической сегментации зарегистрированных изображений и определении числа хламидийных включений, вычислении их количественных характеристик: поверхностной плотности, среднего значения и среднеквадратичного отклонения значений площади хламидийных включений.

6. Разработана БТС автоматизированных исследований препаратов культур клеток, инфицированных хламидиями, обеспечивающая вероятность обнаружения хламидийного включения не менее 99,6 % и вероятность ложного обнаружения – не более 0,3 %.

7. В ходе экспериментальных исследований показана статистическая достоверность рассчитываемых количественных характеристик хламидийных включений. Данные характеристики могут быть использованы в дальнейшем в задачах оценки эффективности антибактериальных веществ.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Артюхова О.А., Самородов А.В. Разработка алгоритма автоматической сегментации флуоресцентно-микроскопических изображений препаратов клеточных культур для задач микробиологии // Наука и образование: электронное научно-техническое издание. Эл № ФС 77-48211. ISSN 1994-0408. 2013. № 6. URL: <http://technomag.edu.ru/doc/574140.html> (дата обращения: 15.04.2013).

2. Артюхова О.А., Самородов А.В. Сравнительное исследование характеристик резкости микроскопических изображений медико-биологических препаратов // Медицинская техника. 2011. № 1. С. 15-22.

3. Artyukhova O.A., Samorodov A.V. Investigation of image sharpness characteristics in the field of automated microscopy of cytological preparations // Pattern Recognition and Image Analysis. 2011. Vol. 21. No. 2. P. 171-175.

4. Артюхова О.А. Автоматизированный анализ флуоресцентных изображений микробиологических препаратов // X МНТК «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии ФРЭМЭ'2012»: Материалы. Владимир, 2012. Книга 2. С. 111-113.

5. Artyukhova O.A., Samorodov A.V. Investigation of image sharpness characteristics in the field of automated microscopy of cytological preparations // Proceedings of the 10th International Conference «Pattern Recognition and Image Analysis: New Information Technologies» PRIA-10-2010. St. Petersburg, 2010. V 2. P. 141-144.

6. Артюхова О.А., Самородов А.В. Алгоритм сегментации флюоресцентных микроскопических изображений хламидий в культуре клеток // Медико-технические технологии на страже здоровья: Сб. трудов XIV НТК, кур-т Алгарве (Португалия), 21-28 сентября 2012 г. М.: НИИ РЛ МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2012. С. 66-68.

7. Артюхова О.А., Самородов А.В. Исследование характеристик резкости изображений медико-биологических препаратов для задач автоматизированной микроскопии // Медико-технические технологии на страже здоровья: Сб. трудов XII НТК, Кипр, 25 сентября-2 октября 2010 г. М.: НИИ РЛ МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2010. С. 137-140.

8. Разработка алгоритма автоматизированного анализа изображений хламидий в культуре клеток /О.А. Артюхова [и др.] // Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы V ВНПК. М., 2012. С.10-11.