

УДК 57.087

**Аппаратно-программный комплекс микроскопии медико-биологических препаратов
для задач диагностики и научных исследований**

Валюк Я.О.¹, Клименко Н.С.², Холмова М.А.³

*^{1,2,3} студенты, кафедра «Биомедицинские технические системы» МГТУ им. Н.Э. Баумана,
г. Москва, Россия*

*Научный руководитель: А.В. Самородов, к.т.н., доцент, доцент каф. «Биомедицинские
технические системы» МГТУ им. Н.Э. Баумана, г. Москва, Россия*

*Научный консультант: О.А. Артюхова, аспирант каф. «Биомедицинские технические
системы» МГТУ им. Н.Э. Баумана, г. Москва, Россия*

МГТУ им. Н.Э. Баумана

yana.valyuk@gmail.com

natasha.klmnk@gmail.com

Введение

Микроскопический анализ фиксированных на предметном стекле медико-биологических препаратов (МБП) имеет широкую область применения в задачах клинко-лабораторной диагностики и научных исследований [1]. В ходе микроскопического исследования МБП проводится морфологический, цветовой и структурный анализ микрообъектов в поле зрения микроскопа или на зарегистрированном изображении. В настоящее время большинство задач клинко-лабораторных и научных исследований решается посредством визуального анализа МБП врачом-лаборантом. Подобный анализ имеет существенные недостатки:

1) прямая зависимость его результатов от квалификации исполнителя, что приводит к существенным различиям в результатах анализа между разными лабораториями,

2) высокая трудоемкость анализа, что, в свою очередь, обуславливает сильную утомляемость исследователя и приводит к дополнительным ошибкам в результатах анализа,

<http://sntbul.bmstu.ru/doc/533193.html>

3) недостоверность результатов анализа вследствие невозможности исследования достаточного числа микрообъектов [2],

4) возможность оценки лишь небольшого числа самых простых морфологических параметров микрообъектов.

Кроме того, ряд исследований [1-4] показывает, что некоторым характеристикам структуры и формы микрообъектов, которые в ходе визуального анализа могут быть описаны лишь качественным образом, можно сопоставить количественные характеристики, получаемые с помощью методов автоматизированной морфометрии.

Приведенные сведения подчеркивают актуальность создания автоматизированных микроскопических систем анализа МБП.

1 Аппаратно-программный комплекс автоматизированного анализа медико-биологических препаратов

На кафедре «Биомедицинские технические системы» МГТУ им. Н. Э. Баумана был разработан аппаратно-программный комплекс (АПК) автоматизированного анализа МБП. Структурная схема данного АПК приведена на рис. 1.

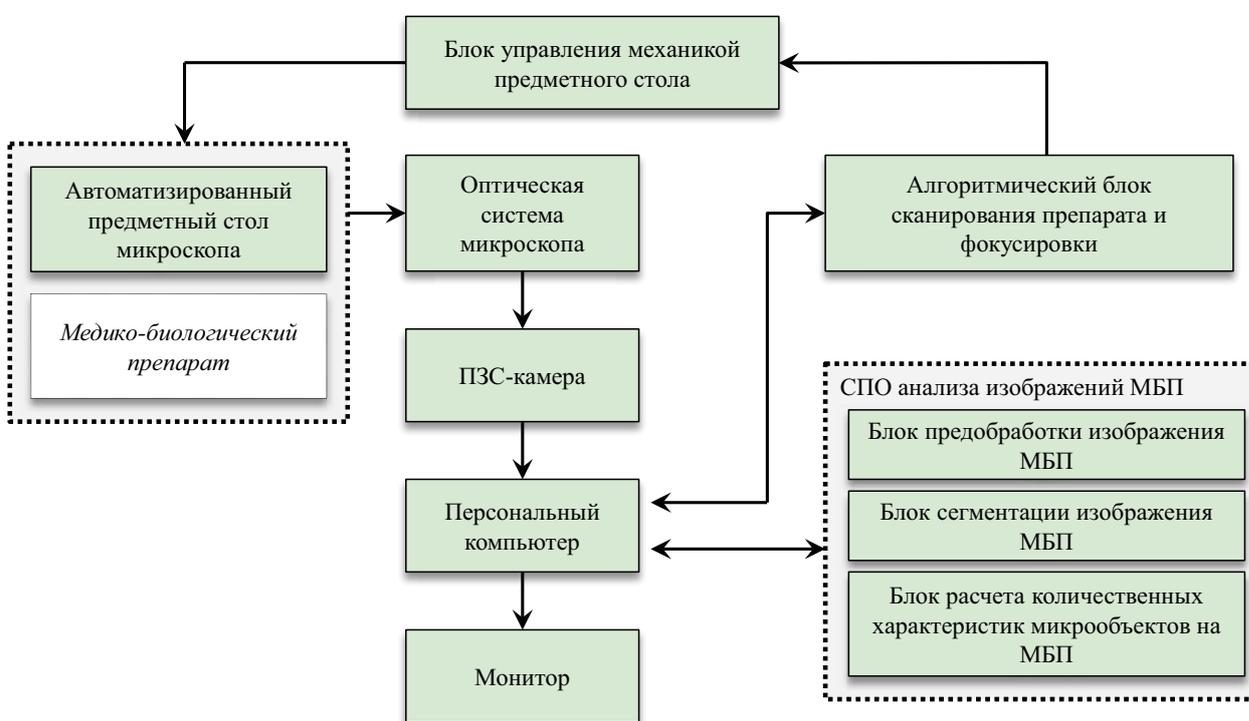


Рис. 1. Структурная схема АПК анализа МБП

Основными элементами АПК автоматизированного анализа МБП являются оптический микроскоп-тринокуляр с автоматизированным предметным столом, блоком

автофокусировки и цифровой камерой, а также специальное программное обеспечение (СПО) анализа регистрируемых изображений МБП. Описанные в данной работе модификации АПК, предназначенные для исследования различных типов МБП, отличаются используемыми алгоритмами анализа изображений.

В работе рассмотрены три модификации АПК автоматизированного анализа МБП, предназначенные для решения задач скрининговых исследований и дифференциальной диагностики в онкоцитологии, а также научных исследований в психиатрии.

2 Модификация АПК для скрининга заболеваний шейки матки

Рак шейки матки – тяжелое онкологическое заболевание, эффективность лечения которого напрямую зависит от того, на какой стадии оно было диагностировано. Этим объясняется необходимость массового проведения скрининговых исследований женщин для наиболее раннего выявления патологических изменений шейки матки. Цитологический метод, заключающийся в микроскопическом анализе фиксированных на предметном стекле и окрашенных клеток плоского эпителия, является одним из основных методов скрининга данного заболевания.

В ходе микроскопического анализа цитологического препарата оценивается сложный комплекс его характеристик, среди которых одной из основных является ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) [5]:

$$\text{ЯЦО} = \frac{S_{\text{ядра}}}{S_{\text{клетки}} - S_{\text{ядра}}},$$

где $S_{\text{ядра}}$ – площадь ядра клетки,

$S_{\text{клетки}}$ – площадь клетки.

Достоверное визуальное определение ЯЦО невозможно, поскольку оно предполагает определение площадей ядер и клеток, находящихся в препарате.

Задачей данной работы являлась автоматизация оценки ЯЦО, что подразумевает решение задачи сегментации микроскопических изображений цитологических препаратов шейки матки.

Алгоритмы автоматизированного анализа были разработаны и реализованы в среде MatLab. В работе использовались цитологические препараты клеток шейки матки пациенток различных возрастов, приготовленные в Московском научно-исследовательском онкологическом институте (МНИОИ) им. П.А. Герцена и окрашенные по методам Папаниколау и Романовского. Основными этапами обработки изображения (рис. 2) являются предобработка; сегментация клеток и ядер с помощью выбранного

метода и дальнейшая морфологическая обработка; расчёт ядерно-цитоплазматического отношения.

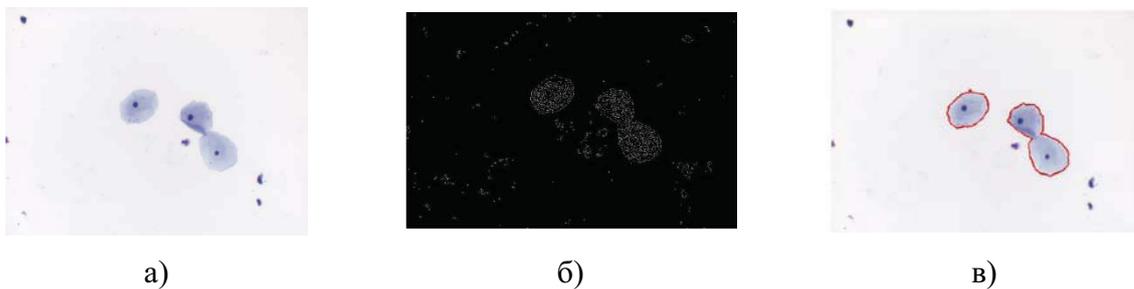


Рис. 2. Этапы сегментации изображения цитологического препарата: а) исходное изображение; б) результат бинаризации; в) итоговая сегментация.

На этапе предобработки изображения производится медианная фильтрация и/или фильтрация с помощью фильтра Гаусса и переход к полутоновому изображению, который осуществляется с помощью метода главных компонент, позволяющего получить наиболее контрастное изображение. Сегментация клеток и ядер выполняется на основе одного из методов, рассмотренных ниже. В ходе дальнейшей морфологической обработки полученных в результате сегментации бинарных изображений выполняется фильтрация элементов этих изображений по площадям, форме, а также проверяется принадлежность ядер области клеток. Далее осуществляется оценка среднего значения ядерно-цитоплазматического отношения для цитологического препарата.

В процессе экспериментальных исследований оценивалось качество сегментации, для чего площадь автоматически сегментированного объекта сравнивалась с площадью объекта, сегментированного вручную. Лучшие результаты сегментации клеток цитологических препаратов шейки матки (рис. 3) получаются при использовании:

- бинаризации по глобальному порогу (для изображения в координатах RGB), относительная погрешность сегментации составляет 5,3 %;
- детектора границ Канны, относительная погрешность сегментации составляет 7,1 %;
- кластеризации по методу k-means (используя 1 и 3 координаты цветового пространства YCbCr), относительная погрешность сегментации составляет 4,9 %.

Лучшие результаты сегментации ядер цитологических препаратов шейки матки получаются при использовании:

- бинаризации по глобальному порогу (для изображения в RGB);

– кластеризации по методу k-means (с использованием 1-ой и 3-ей координат цветового пространства Lab);

– кластеризации по методу k-means (с использованием 1-ой координаты цветового пространства HSV).

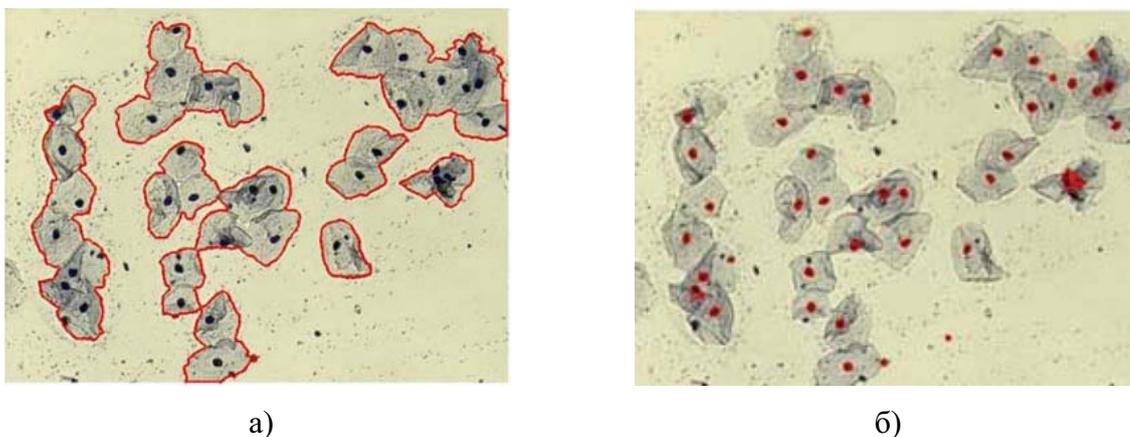


Рис. 3. Пример результаты сегментации микроскопического изображения цитологического препарата шейки матки: а) клеток; б) ядер

Таким образом, разработаны и реализованы алгоритмы анализа микроскопических изображений цитологических препаратов шейки матки, проведены экспериментальные исследования алгоритмов. К направлениям дальнейших исследований в этой области относятся разработка критериев качества цитологических препаратов шейки матки и алгоритма автоматизированного определения пригодности изображений цитологических препаратов для анализа.

3 Модификация АПК для анализа иммуноцитохимических препаратов молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) с начала 80-х годов стал наиболее частой патологией у женщин большинства стран мира и в настоящее время составляет около 19 % от всех злокачественных опухолей [6]. Определение гормонального статуса рака является важным этапом при планировании лечения. Для определения гормонального статуса РМЖ предложены методики определения в ткани опухоли рецепторов эстрогенов (РЭ), прогестерона (РП) и некоторых других гормонов. Присутствие РЭ и РП в первичной опухоли молочной железы свидетельствует о ее потенциальной чувствительности к гормональной терапии [7].

Одним из современных методов определения гормонального статуса рака является иммуноцитохимический (ИЦХ) анализ, в основе которого лежит иммунологическая

реакция антиген-антитело. В качестве антигенов при РМЖ выступают рецепторы эстрогенов и прогестерона, а антитела вводятся искусственно. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» может быть помечен с помощью специальных красителей и визуализирован. Для вынесения решения о гормональном статусе рака проводится микроскопическое исследование ИЦХ препарата, в ходе которого определяются диагностические баллы, характеризующие долю клеток с окрашенными ядрами и интенсивность их окрашивания [3]. По значению итогового суммарного балла делается вывод о гормональном статусе РМЖ. В работе использованы изображения ИЦХ препаратов, приготовленных в МНИОИ им. П.А. Герцена (рис. 4).

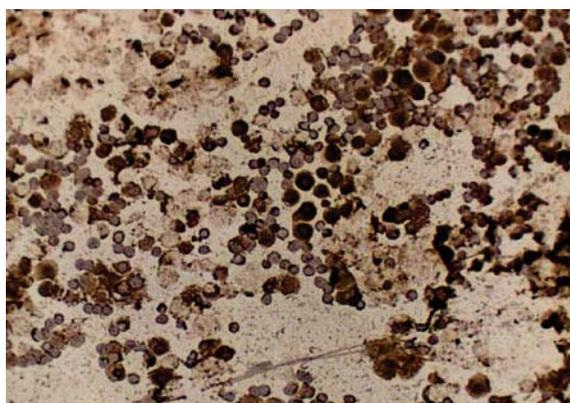


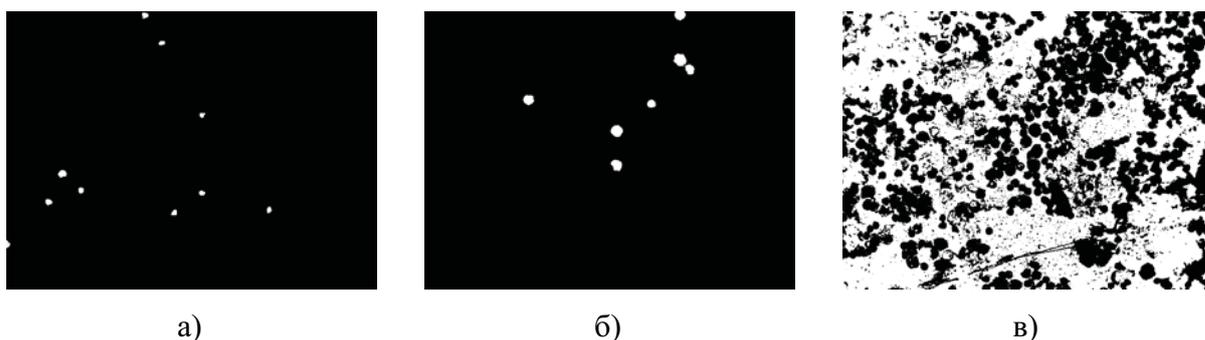
Рис. 4. Микроскопическое изображение ИЦХ препарата

Для определения диагностических баллов на изображении препарата необходимо выделить область клеток, имеющих рецепторы гормонов (они имеют коричневый оттенок и далее будут называться «окрашенные клетки»), и область клеток, не имеющих рецепторы – «неокрашенные клетки», то есть произвести сегментацию изображения. Сегментация изображения проводится на основе цветовой информации и осуществляется в два этапа. Целью первого этапа сегментации является нахождение бинарных масок, соответствующих наиболее характерным областям окрашенных клеток, неокрашенных клеток и фона. С использованием этих масок извлекается цветовая информация о каждой из указанных трех областей для второго, уточняющего, этапа сегментации.

Алгоритм автоматического нахождения бинарных масок заключается в пороговой обработке полутонового изображения – цветовой координаты светлота (L) пространства Lab, в которой изображение имеет самую широкую гистограмму. Пороговое значение для выделения фона определяется автоматически как локальный минимум гистограммы, при этом к области фона относятся пиксели с яркостью, превышающей данный порог. Для нахождения порога, разделяющего области окрашенных и неокрашенных клеток,

диапазон значений яркости изображения от минимального значения яркости до значения, соответствующего определенному выше локальному минимуму гистограммы, делится в отношении 4:3, при этом большая яркость соответствует неокрашенным, а меньшая – окрашенным клеткам.

После пороговой бинаризации проводится морфологическая обработка полученных изображений для удаления мелких объектов и сглаживания границ полученных областей. На рис. 5 приведены результаты автоматического нахождения масок для трех групп объектов: окрашенных клеток, неокрашенных клеток и фона.



а) маска неокрашенных клеток, б) маска окрашенных клеток, в) маска фона

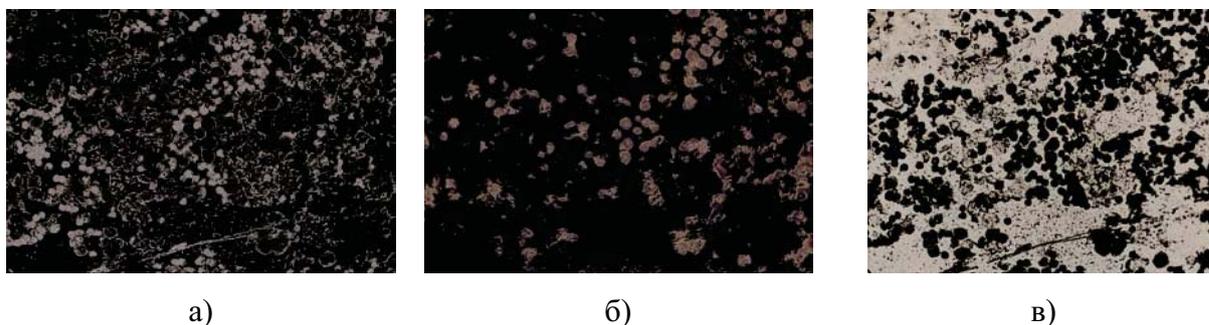
Рис. 5. Результаты автоматического нахождения бинарных масок характерных областей изображения

На втором этапе решается задача сегментации изображений на основе полученных на первом этапе данных. По полученным маскам трех областей ($j = \{1, 2, 3\}$) рассчитываются средние значения яркости (m_{ij}) в цветовых координатах «оттенок» (S) и «сила тона» (V) в цветовом пространстве HSV и «светлота» (Y) в цветовом пространстве NTSC ($i = \{S, V, Y\}$). Для этих координат в ходе предварительных исследований были получены максимальные различия в интенсивности между окрашенными и неокрашенными клетками.

Затем для каждого пикселя анализируемого изображения, имеющего цветовые координаты z_i , вычисляются три евклидовых расстояния – меры близости пикселя к окрашенным клеткам (ε_1), неокрашенным клеткам (ε_2) и фону (ε_3):

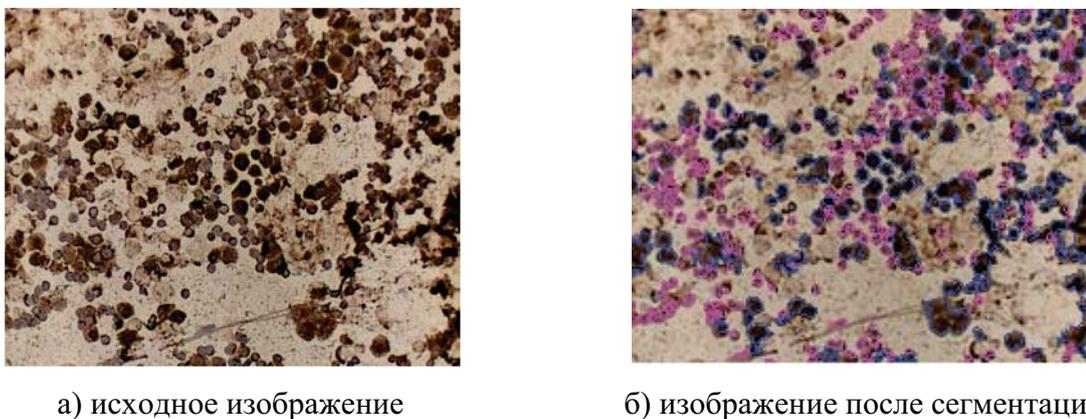
$$\varepsilon_j = \left[(z_S - m_{Sj})^2 + (z_V - m_{Vj})^2 + (z_Y - m_{Yj})^2 \right]^{\frac{1}{2}}.$$

Пиксель относится к той области, для которой вычисленное расстояние минимально. Результаты классификации пикселей изображения на области окрашенных клеток, неокрашенных клеток и фона приведены на рис. 6.



а) область неокрашенных клеток, б) область окрашенных клеток, в) область фона
Рис. 6. Результаты классификации пикселей микроскопического изображения ИЦХ препарата на области

Далее проводится постобработка изображений неокрашенных и окрашенных клеток с целью удаления сегментированных областей, размер и форма которых явно отличаются от соответствующих параметров клеток. Результат итоговой сегментации клеток на изображении ИЦХ препарата приведен на рис. 7.



а) исходное изображение б) изображение после сегментации
Рис. 7. Результат итоговой сегментации изображения на области окрашенных и неокрашенных клеток

Полученные результаты сегментации используются для расчета диагностических баллов ИЦХ препарата, характеризующих долю клеток с окрашенными ядрами и интенсивность их окрашивания; значение суммы данных баллов позволяет судить о гормональном статусе РМЖ [3].

4 Модификация АПК для анализа гистологических препаратов коры головного мозга человека в задачах психиатрии

Важнейшими функциями нервной системы в организме человека является управление деятельностью целостного организма и координирование процессов, протекающих в организме в зависимости от состояния внешней и внутренней среды [8]. Высшие функции нервной системы, т.е. анализ и синтез всех раздражений, поступающих из внутренней и внешней среды, и выработка ответных реакций, регулирующих любые виды деятельности организма, осуществляются различными структурами коры головного мозга человека. В последние годы получила распространение концепция модульного устройства коры головного мозга, согласно которой структурно-функциональной единицей коры является вертикальная цилиндрическая миниколонка диаметром 250–300 мкм. Многочисленные исследования гистологических препаратов коры головного мозга человека показали, что структура миниколонок существенно изменяется с возрастом, а также при наличии различных психических заболеваний [4].

Анализ изменений, происходящих в коре головного мозга при развитии психических заболеваний, возможен на основе количественных морфометрических исследований микроскопических изображений гистологических препаратов коры головного мозга человека с определением особенностей взаимного расположения клеток коры головного мозга [4]. В работе использованы изображения гистологических препаратов коры головного мозга человека, предоставленные Научным центром психического здоровья РАМН (рис. 8). Изображения содержат пирамидные нейроны (крупные треугольные клетки), а также олигодендроциты (более тёмные округлые клетки), выполняющие важную роль в миелинизации нервных волокон. В представленной модификации АПК автоматизированного анализа МБП реализованы автоматическая сегментация изображений данных препаратов и расчет количественных характеристик взаимного расположения пирамидных нейронов и олигодендроцитов.

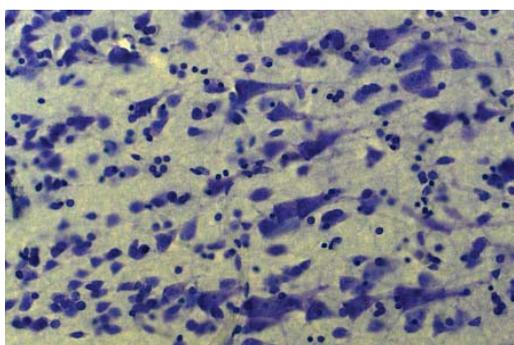
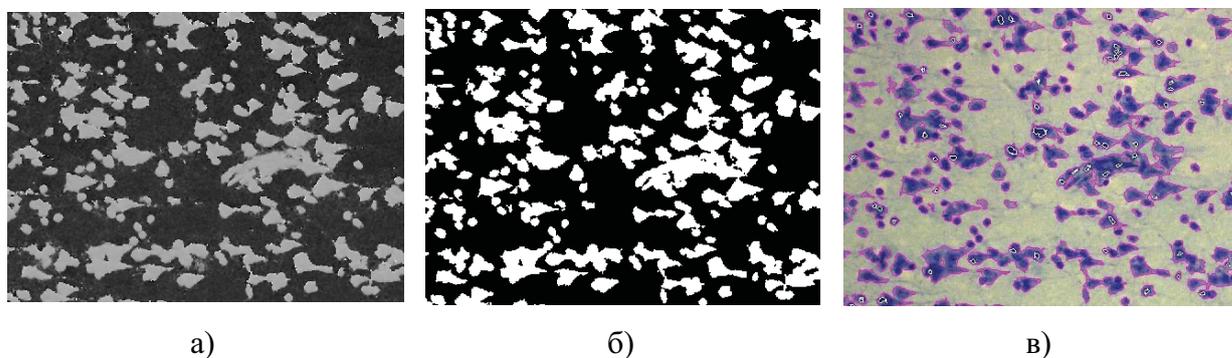


Рис. 8. Микроскопическое изображение гистологического препарата коры головного мозга человека

Разработанный алгоритм сегментации рассматриваемых изображений включает этапы перехода к полутоновому изображению, его пороговой бинаризации с последующей морфологической обработкой для выделения областей клеток и фона, классификации элементов областей клеток на пирамидные нейроны и олигодендроциты с использованием кластеризации по методу k-средних.

В ходе проведенных исследований было принято решение использовать цветовой канал Н пространства HSV для перехода к полутоновому изображению (рис. 9 а). В результате бинаризации этого изображения по автоматически вычисляемому порогу и последующей морфологической обработки находится маска клеток на изображении препарата (рис. 9 б).

Выделенная область клеток в дальнейшем разделяется на два класса: пирамидные нейроны и олигодендроциты – с использованием кластеризации по методу k-средних [9]. При этом используется информация об интенсивности пикселей, принадлежащих клеткам, в цветовых каналах R и G пространства RGB, в цветовом канале S пространства HSV, цветовом канале S канала HSI и цветовом канале L пространства Lab. На рисунке 3 в представлен пример результата сегментации изображения гистологического препарата коры головного мозга человека.

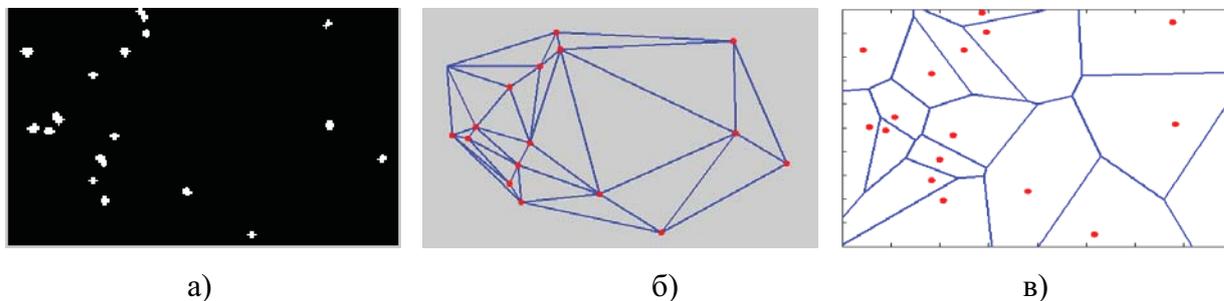


а) полутоновое изображение, б) маска клеток, в) результат сегментации пирамидных нейронов и олигодендроцитов

Рис. 9. Этапы и результат сегментации изображения

Для характеристики особенностей расположения клеток в исследуемом препарате предложено вычислять глобальные и локальные характеристики. В качестве глобальных характеристик используются: количество клеток, их плотность, минимальное, максимальное и среднее расстояния между клетками разных типов, среднеквадратическое отклонение и коэффициент вариации расстояний между соседними клетками разных типов.

Локальные характеристики особенностей расположения клеток в исследуемом препарате вычисляются на основе результатов триангуляции Делоне [10] и диаграмм Вороного [11]. Примеры результатов триангуляции Делоне и построения диаграммы Вороного приведены на рис. 10.



а) маска олигодендроцитов; б) результат триангуляции Делоне для данной маски олигодендроцитов; в) диаграмма Вороного для данной маски олигодендроцитов

Рис. 10. Пример результата триангуляции Делоне и построения диаграммы Вороного

В качестве локальных характеристик особенностей расположения клеток использованы коэффициенты вариации площадей треугольников Делоне и многоугольников Вороного для масок пирамидных нейронов и олигодендроцитов. Проведенные предварительные исследования показали статистическую значимость различий предложенных глобальных и локальных характеристик в группах больных шизофренией и контрольной группе.

Результаты и выводы

В результате проведенных работ созданы три модификации АПК для микроскопии МБП. Модификация АПК для скрининга онкологических заболеваний шейки матки позволяет проводить автоматизированный микроскопический анализ клеток плоского эпителия шейки матки и осуществлять расчет ядро-цитоплазматического отношения, являющегося одним из основных критериев принятия решения о наличии патологических изменений шейки матки. Модификация АПК для анализа ИЦХ препаратов молочной железы позволяет по результатам автоматического анализа цветовых особенностей микроскопических изображений определять гормональный статус РМЖ, являющийся существенным фактором при планировании лечения. Модификация АПК для анализа гистологических препаратов коры головного мозга человека предназначена для количественного анализа взаимного расположения клеток коры головного мозга человека

и проведения научных исследований изменений в структуре коры головного мозга, обусловленных различными психическими заболеваниями.

Созданные АПК позволяют производить автоматический анализ морфологических, цветоярких и структурных особенностей МБП, что способствует снижению трудоемкости микроскопических исследований, повышению достоверности их результатов, а также позволяет ввести количественные критерии в диагностический процесс и научные исследования.

Список литературы

1. Медовый В.С., Парпара А.А., Пятницкий А.М., Соколинский Б.З., Демьянов В.Л. Обзор методик автоматизированной микроскопии биоматериалов. Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 7. – С.15-20.
2. Самородов А.В. Автоматизация морфологического анализа медико-биологических препаратов //Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – №9. – С.11-17.
3. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. //Modern Pathology. – 1998. – Vol.11, No.2. – P.155-168.
4. Краснощекова Е.И. Модульная организация нервных центров. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2007. – 130 с.
5. Куликов Б.П., Варенов В.М. Курс онкологии. – Рязань, 2002. – 75 с.
6. Думанский Ю.В., Борота А.В., Семикоз Н.Г., Трухин Д.В. Опухоли молочной железы. Учебное пособие. – Донецк, 2008. – 87 с.
7. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Биологические маркеры рака молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации. //Маммология. – 2005. – № 1. – С.65-70.
8. Гайворонский И.В., Ничипорук Г.И., Гайворонский А.И., Виноградов С.В. Основы медицинских знаний. – СПб.: Изд-во «Элби-СПБ», 2002. – 293 с.
9. Гонсалес Р., Вудс Р., Эдинс С. Цифровая обработка изображений в среде MATLAB. – М.: Техносфера, 2006. – 616 с.
10. Скворцов А.В. – Обзор алгоритмов построения триангуляции Делоне //Вычислительные методы и программирование. – 2002. – Том 3, №1. – С.18-43.
11. Препарата Ф., Шеймос М. Вычислительная геометрия: Введение. – М.: Мир, 1989. – 295 с.