

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ СЕГМЕНТАЦИИ ОБЪЕКТОВ БИМЕДИЦИНСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Е. В. Лисица

ВВЕДЕНИЕ

Для обработки люминесцентных изображений биологических объектов разработано множество специальных и универсальных алгоритмов, среди которых можно выделить пороговые, градиентные, водораздельные методы и методы, в основе которых лежит вычислительная геометрия [1]. Основная проблема разработки методов анализа изображений связана с необходимостью всестороннего тестирования алгоритмов на широком наборе эталонных экспериментальных данных, которые в большинстве случаев технологически трудно получить. Данная задача может быть успешно решена с использованием метода имитационного моделирования [2]. Цели данной – 1) реализация алгоритмов обработки изображений для сегментации ядер клеток, 2) разработка имитационной модели люминесцентных изображений на основе параметров полученных из экспериментов по регистрации биомаркеров цитокератина (СК) в цитоплазме и рецептора эстрогенов (ER) в ядрах клеток.

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

Биологический образец – опухоль рака груди. В цитоплазме раковых клеток протекают реакции с участием цитокератин 8 (СК8), который маркируется красителем Alexa Fluor 488 ($\lambda_{\text{поглощения}} = 493$ нм, $\lambda_{\text{испускания}} = 518$ нм [3]). В ядрах раковых клеток находится протеин рецептор эстрогенов ER [4], для маркировки которого используется краситель Cy5 ($\lambda_{\text{поглощения}} = 654$ нм, $\lambda_{\text{испускания}} = 673$ нм [5,6]), Для маркировки ядер используется краситель DAPI ($\lambda_{\text{поглощения}} = 358$ нм, $\lambda_{\text{испускания}} = 461$ нм [7]).

Изображения получены при помощи конфокального микроскопа компании Delta Vision Restoration, с использованием камеры Photometrix CH350L (500 kHz, 24-bit, 2048×2048 пикселей), диапазон возможных значений интенсивности от 0 до 255. В системе установлен микроскоп Nikon TE-2000, встроенный в Delta Vision System. Оптические срезы тканей получены последовательным фотографированием с шагом 0.5 мкм вдоль оси z. с Параметрами объектива – Nikon, Plan Fluor, NA 1.4 линзами. Флуоресценция регистрировалась стандартом Delta Vision для DAPI, FITC,

TexasRed. Размер изображения составляет 2048 пикселей на 2048 пикселей в каждом из трех каналов, разрешающая способность: 5 пикселей на 1 мкм. На рис. 1а приведен пример изображения системы.

На этапе предварительной обработки проводилась нормировка гистограммы интенсивностей пикселей в зависимости от времени облучения образца.

ИМИТАЦИОННАЯ МОДЕЛЬ

Разработка имитационных алгоритмов проводилась на основе модельных представлений о регистрации трехканальных экспериментальных изображений, где синий цвет используется для окраски ядер клеток (аналогично красителю DAPI), красный цвет – для ядер раковых клеток (биомаркер ER) и зелёный цвет – для цитоплазмы раковых клеток (биомаркер СК). Экспериментальные изображения представляют собой наборы кластеров клеток. Использовались следующие распределения плотностей вероятностей: 1) кластеров клеток, 2) площадей клеток, 3) пиксельной интенсивности люминесценции в пределах ядра. Допускается наложение изображений индивидуальных клеток. Входными параметрами для моделирования установлены: отношение сигнал к шуму SNR (*signal-to-noise ratio*), относительный радиус наложения клеток в кластере $parametr$, относительная площадь, занимаемая кластерами клеток к площади изображения k , относительная площадь занимаемая ядром от площади клетки s , частота встречаемости клеток без протеина ER *probability*. Подробное описание построения имитационной модели приведено в работе [8].

Для тестирования алгоритмов строились синтетические изображения двух типов: в первом случае ядра содержали только красную компоненту, во втором случае ядра содержали только синюю компоненту. В обоих случаях использовались следующие параметры моделирования: отсутствует пересечение клеток $parametr = 1$, относительная площадь клеток от изображения $k = 0.42$, площадь ядра от площади клетки составляет $s = 0.8$. Пример смоделированного изображения представлен на рис. 1б.

АЛГОРИТМЫ СЕГМЕНТАЦИИ ЯДЕР

Для сегментации ядер использовались пороговый алгоритм с вычислением порога по методу Оцу, пороговый алгоритм с вычислением порога методом суммирования нормальных распределений и градиентный алгоритм. Схемы сегментации ядер приведены на рис. 2.

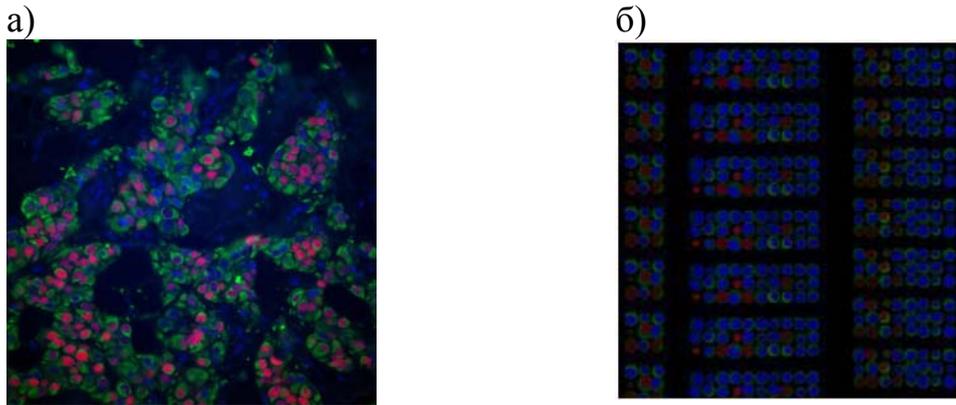


Рис. 1. Примеры изображений

a – экспериментальное изображение раковых клеток, *б* – синтетическое изображение псевдо-клеток полученное в результате имитационного моделирования

Для построения полутонового изображения использовалась сумма красной и синей компонент цветного изображения.

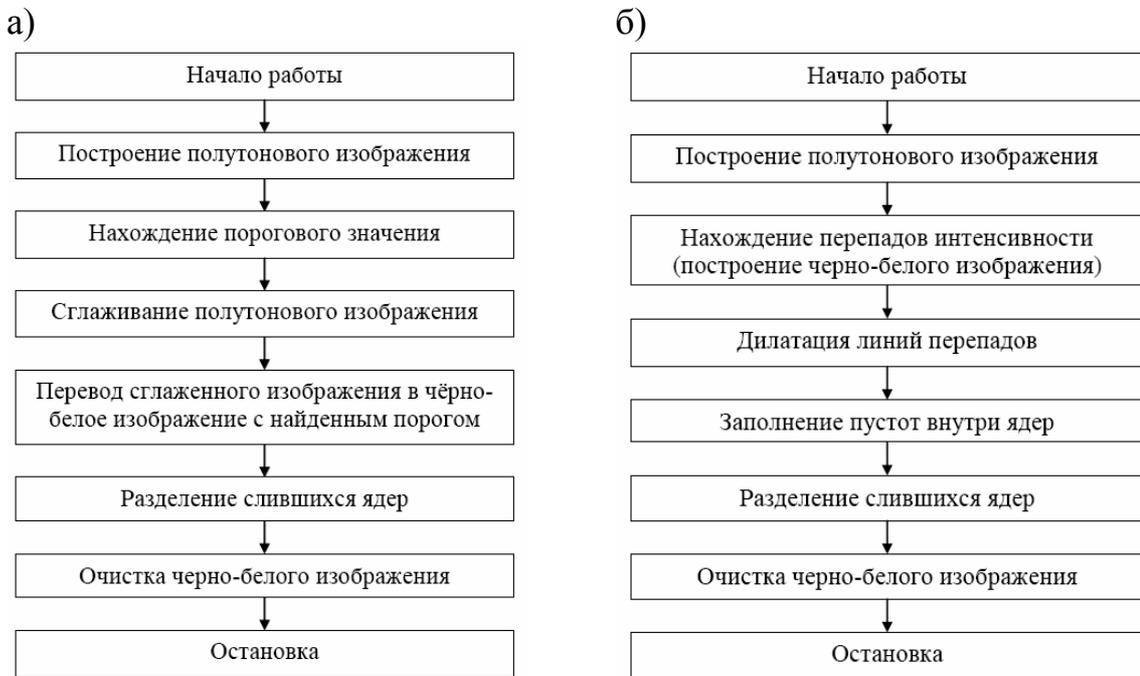


Рис. 2. Алгоритмы сегментации

a – пороговая сегментация, *б* – градиентная сегментация

В первом алгоритме для нахождения порога использовался метод Оцу (Otsu) [1]. Второй пороговый алгоритм использовал метод суммирования нормальных распределений для нахождения порога [9]. Отличительной особенностью метода суммирования нормальных распределений является необходимость оценивания относительной площади занятой искомыми объектами от площади всего изображения. Для построения данной оценки

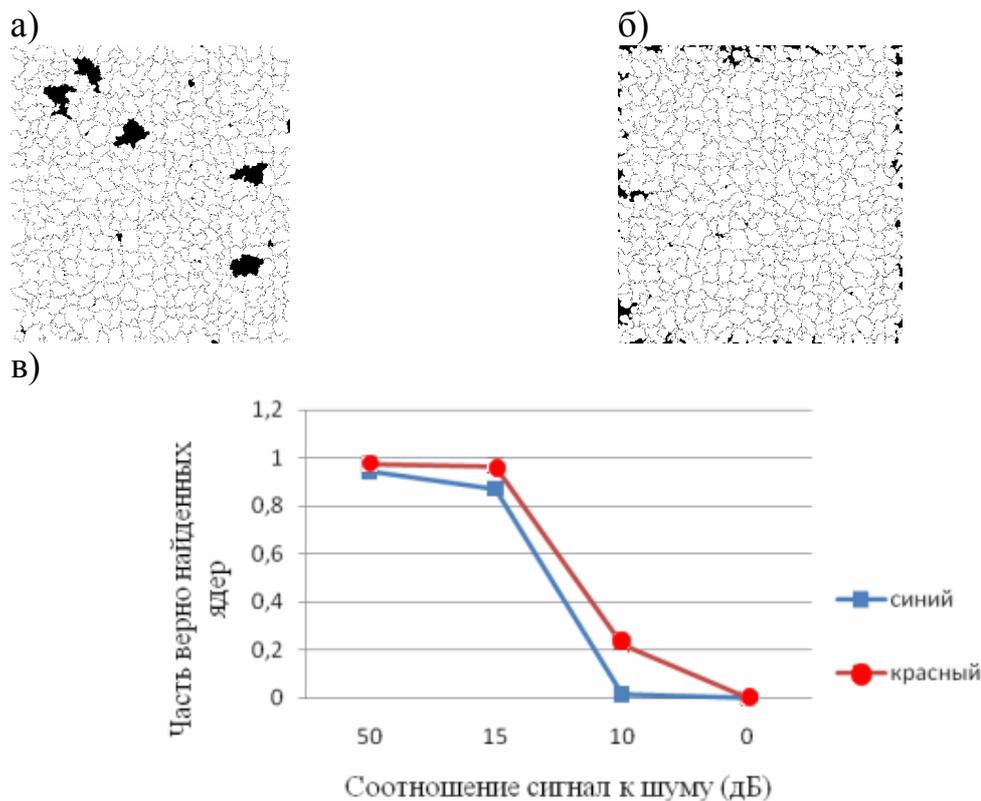


Рис.3. Результаты сегментации

a – сегментация пороговым методом Оцу, *б* – сегментация градиентным методом, *в* – устойчивость к шуму порогового метода на основе суммировании нормальных распределений

на полутоновом изображении находились локальные максимумы, по их количеству оценивалась площадь занимаемая ядрами. Сглаживание изображения позволяет сделать границ ядер более гладкими. Градиентный метод предполагает, что границы могут быть рассмотрены в виде областей, в которых наблюдается максимальный перепад интенсивности сигнала [10]. Для нахождения линий перепадов использовался детектор Канни [1]. Дилатация позволяет уширить линии границ и сгладить границы ядер [1].

Для разделения слившихся ядер использовался метод водораздела на основе интенсивности [1]. Для очистки изображения с маски ядер удалялись объекты радиус которых меньше заданного радиуса ядер.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3. показаны результаты сегментации пороговым алгоритмом на основе метода Оцу и градиентным алгоритмом. Оба метода демонстрируют неудовлетворительное качество сегментации при соотношении сигнал к шуму $SNR = 40$ дБ. Однако данные алгоритмы могут использо-

ваться для оценки числа ядер. Для улучшения сегментации ядер предложен алгоритм с пороговой сегментацией на основе метода суммирования нормальных распределений. Результаты устойчивости алгоритма к шуму показаны на рис. 3в.

При соотношении сигнал к шуму $SNR > 15$ дБ количество верно найденных ядер составляет около 90% в красном и синем каналах изображения. Однако, при уменьшении SNR до 10 дБ происходит резкое ухудшение качества сегментации.

Литература

1. Гонсалес Р., Вудс Р., Эддинс С. Обработка изображений в среде MATLAB. М.: Техносфера. 2006.
2. E. Novikov, E. Barillot. An algorithm for automatic evaluation of the spot quality in two-color DNA microarray experiments// BMC Bioinformatics. 2005. Volume 6. pp. 293.
3. Obermajer N. at all. Cytokeratin 8 ectoplasmic domain binds urokinase-type plasminogen activator to breast tumor cells and modulates their adhesion, growth and invasiveness// Molecular Cancer. 2009. Volume 8. pp 88-98.
4. Szeszel M. K. at all. Quantifying Estrogen and Progesterone Receptors Expression in breast cancer by digital imaging. Journal of Histochemistry and Cytochemistry// 2005. Volume 53. pp. 753-762.
5. Nled M. at all. Fluorescent dye-labeled highly cross-adsorbed secondary antibodies// Pierce Protein Research Products. 2009. Volume 13. pp. 6-8.
6. Desai S. at all. New fluorescent dyes for protein labeling and immunoassay procedures// Pierce Protein Research Products. 2009. Volume 12. pp. 6-16.
7. Barcellona M. L. and Gratto E. Fluorescence Anisotropy of DNA/DAPI Complex: Torsional Dynamics and Geometry of the Complex// Biophysical Journal. 1996. Volume 70. pp. 2341-2351.
8. Лисица Е. В., Яцков Н. Н., Лутковский В. М. Разработка моделей биомедицинских изображений// «Первый шаг в науку – 2010». Тез. докл. Междунар. форум студенческой молодёжи. Мн., 2010. С.516.
9. Bishop C. M. Pattern recognition and Machine Learning/ Springer. 2006.
10. Абламейко С.В., Лагуновский Д.М. Обработка изображений: технология, методы, применение. Мн.: Амалфея. 2000.

ЦИФРОВАЯ ОБРАБОТКА ИЗОБРАЖЕНИЙ НАНОЧАСТИЦ

Д. П. Лопатин, С. В. Кулаженко, Н. Н. Кольчевский

Анализ нанообъектов на сегодняшний день является актуальной задачей не только для научных исследований, но и для промышленного применения наноструктур. Наиболее достоверным методом исследования геометрических параметров наноструктур является электронная микроскопия, позволяющая наблюдать нанообъекты при увеличении в более чем тысячу раз. В качестве регистрирующего элемента применяется циф-