

## МЕТОДЫ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА КРИОМИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Аврунин О., Сун Х\*, Глассмахер Б\*.

Харьковский национальный университет радиоэлектроники  
61166, Харьков, пр. Ленина, 14, каф. БМЭ, тел. (057)702-13-64

E-mail: [gavrun@mail.ru](mailto:gavrun@mail.ru); факс (057)702-11-13

\*Институт мультифазных процессов университета им. Лейбница, Ганновер, Германия

Designing of algorithm and the special software for automatically analysis of cryomicroscopical probes. Stages of digital image processing of cryomicroscopical probes of endothelial cells are described. The main of these stages are: preprocessing of digital images of cryomicroscopical probes for noise reductions; gradient contour segmentation and filing area of cells, logical filtration for reduce artifacts from probe coloration and ice crystals, marking of founded images of microobjects and computation square and volume of the cells. Designing methods for monitoring of cells volume valuations before, in - and after frizzling process are proposed and discussed. Perspectives for methods and software for automatically analysis of several kinds of cells in frizzling process are discussed.

**Введение.** Высокая вариабельность большинства биологических структур является одной из главных причин сравнительно низкой степени автоматизации программных продуктов для анализа биомедицинских изображений. Поэтому совершенствование существующих и разработка новых методов и подходов для анализа (и в первую очередь - для сегментации) биомедицинских изображений должны быть основаны на изучении специфики визуализации исследуемых объектов. В настоящее время базовые подходы к сегментации изображений достаточно хорошо освещены в литературе [1-5]. При этом можно определить пять основных классов методов сегментации объектов: пороговые, наращивания областей, выделения границ, корреляционные и текстурные. Последние два находят лишь ограниченное применение при анализе изображений биологических объектов, ввиду высокой индивидуальной изменчивости их геометрических и оптических свойств, а так же характеристик окружающих структур. Основной задачей при этом является разработка методов, алгоритмов и программного обеспечения для автоматизированного анализа изображений микропрепаратов и динамики изменения объемов клеток в процессе замораживания.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на препаратах эндотелия животных с помощью цифровой криомикроскопической установки, состоящей из стереоскопического микроскопа Zeiss PrimoStar с тринокулярной насадкой, позволяющей подключать цифровую окулярную видеокамеру, снимки с которой (DataSet) с частотой 2 кадра в секунду передавались через USB-интерфейс в ПЭВМ для дальнейшей обработки и анализа. Препарат размещался на предметном столике микроскопа в специальной криоприставке, к которой с помощью термоизолированных криошлангов подавался жидкий азот согласно протоколу замораживания.

**Суть работы.** Анализ изображений микропрепаратов можно разбить на три этапа: предварительной обработки изображений, сегментации микрообъектов и описания их геометрических свойств в процессе замораживания. Рассмотрим подробно данные этапы.

На этапе предварительной обработки изображений выполняется гистограммная коррекция и медианная фильтрация изображений, направленные на расширение тонового диапазона, коррекцию неравномерности освещения и устранение локальных помех.

На этапе сегментации изображений выполняется грубая и точная сегментации микрообъектов. Результатом грубой сегментации является построение бинарной характеристической функции изображения, разграничивающей области объектов и фона. При этом априорными данными для сегментации при этом являются: допущения, что изображение является суммой представлений всех областей объектов, на изображении

(включая фон как объект), и области объектов, находящиеся на изображении, не перекрываются.

Учитывая, что при криомикроскопии большинство клеточных структур, являющиеся объектами сегментации, существенно не отличаются по интенсивности и цветовым характеристикам от фона, но имеют ярко выраженные контуры, целесообразным является проведение сегментации путем выделения границ. Данный метод позволяет с помощью операций пространственного дифференцирования выделять контурные характеристики объектов и основан на вычислении градиентных характеристик изображения. На заключительном этапе выполняется однородная заливка обнаруженных объектов на изображениях.

На стадии разметки изображения на отдельные объекты выполняется построение сканирование бинарной характеристической функции скользящим окном и проверкой смежности элементов обнаруженных объектов. Процедура выполняется рекурсивно до полной разметки изображения.

Далее выполняется устранение ложных объектов и артефактов с помощью логической фильтрации. Параметры логической фильтрации определяются эмпирически, исходя из характеристик искомым объектов. Первым этапом является устранение малых по площади объектов, являющихся частями клеток и кристаллов, а так же слившихся клеток и их ансамблей, неподдающихся анализу вследствие нарушения допущений при сегментации и занимающих большие площади. Учитывая, что рассматриваемые клетки являются объектами с почти идеальной круглой формой, поэтому для вытянутых объектов, близких к ним по площади, применяется фильтрация по значению коэффициента площади. При этом выполняется нахождение диаметра каждого объекта и соответствующее нахождение площади аналитически, а так же путем численного подсчета принадлежащих ему элементов. Затем, по значению коэффициента отношения площадей определяется степень вытянутости формы каждого обрабатываемого объекта. Таким образом, устраняются артефакты от кристаллов льда и «слипшиеся», наложившиеся друг на друга клетки. Большой объем вычислений вычислений при этом связан с необходимостью обрабатывать большое количество изображений и проследивать расположение каждого объекта в наборе данных. На практике, только до 20% из всех обнаруженных микрообъектов могут быть пригодны для обработки на всех изображениях набора данных.

**Выводы.** В результате работы предложены методы и программное обеспечение для автоматизированной обработки криомикроскопических препаратов и определения объема клеток при криоконсервировании. Реализованы методы, позволяющие устранять артефакты от кристаллов льда при замораживании криомикропрепаратов. Однако это приводит к уменьшению количества наблюдаемых объектов, поэтому необходимо разрабатывать методы замораживания с минимальным количеством артефактов от кристаллов льда. Перспективой работы является разработка программного обеспечения для мониторинга изменения объема клеток при криоконсервировании в автоматическом режиме с возможностью экспресс-анализа и контроля статуса процесса замораживания.

**Список литературы.** 1. Путьтин Е.П., Аверин С.И. Обработка изображений в робототехнике. М.: Машиностроение, 1990.- 330 с. 2. Павлидис Т. Алгоритмы машинной графики и обработки изображений. - М.: Радио и связь, 1986.- 400 с. 3. Gonzales R., Woods R. Digital image processing . Prentice Hall, 2002.-P.1070. 4. Nixon M., Aguado A. Feature extraction and image processing. Newnes, 2002.-350 p. 5. Acharya T., RayA.K. Image processing: principles and applications. J. Wiley & Sons, 2005.- 428 p.