

УДК 621.391.837: 681.3

© В. В. Манойлов, Б. В. Бардин, И. В. Чубинский-Надеждин,
Е. К. Васильева, И. В. Заруцкий

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КЛЕТОК ДЛЯ ИХ РАСПОЗНАВАНИЯ НА ЦИФРОВЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЯХ

Рассмотрены алгоритмические методы оценки оптических параметров клеток для распознавания различных типов лейкоцитов по их микроскопическим изображениям, зарегистрированным в проходящем свете. Гранулоциты, моноциты и лимфоциты можно идентифицировать по относительной прозрачности и гранулярности (наличию выраженной внутренней структуры). Для иллюстрации применения методов идентификации клеток при цитофлуориметрии приведены результаты анализов суспензий лейкоцитов реальных образцов крови.

Кл. сл.: микроскопические изображения клеток, обработка цифровых изображений, преобразование Фурье, цитометрия по изображениям клеток, субпопуляции лейкоцитов

ВВЕДЕНИЕ

В проточных цитометрах распознавание клеток различных типов (различных субпопуляций) в клеточной суспензии производится, в частности, по параметрам светорассеяния лазерного излучения [1, 2]. Коэффициент прямого светорассеяния (на углы менее 10°) характеризует размер клетки, а коэффициент бокового светорассеяния (на углы вблизи 90°) связан с наличием развитой внутренней структуры клеток. Оба параметра определяются для каждой обнаруженной клетки индивидуально. Характер статистических распределений этих параметров позволяет различить, например, отдельные субпопуляции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в исследуемой суспензии лейкоцитов крови [2].

В цитофлуориметрах с принципом действия, основанным на регистрации и анализе микроскопических изображений клеточных суспензий [3, 4], для целей идентификации клеток различных типов целесообразно использовать их оптические характеристики, которые непосредственно связаны с построением микроскопических изображений в проходящем свете. Например, можно пытаться различать клетки по степени пропускания падающего на них света (по прозрачности), а также по наличию структуры изображений клеток, имеющих внутри себя явно выраженные фрагменты — гранулы (соответственно более темные элементы изображения), т. е. обладающих гранулярностью. Примером последних можно считать клетки крови, называемые гранулоцитами. Они представляют

собой субпопуляцию лейкоцитов, которые являются распространенным объектом цитофлуориметрических исследований для целей иммунодиагностики. Клетки других субпопуляций лейкоцитов — лимфоциты и моноциты — не обладают ярко выраженной структурой (рис. 1). Таким образом, параметр, характеризующий отсутствие или наличие гранул, а также степень гранулярности, по-видимому, может быть использован для различения типов лейкоцитов по их изображениям.

Целью настоящей работы являлось рассмотрение возможностей определения параметров прозрачности и гранулярности как полуколичественных характеристик, с помощью которых, как представляется, можно произвести идентификацию объектов (в нашем случае клеток крови) на их микроскопических изображениях. Параметры прозрачности и гранулярности клетки определяются внутри контура ее изображения. Построение контура, который можно аппроксимировать окружностью, является первым шагом анализа изображения [4]. Обсуждение технических характеристик изображений выходит за рамки данной статьи; в качестве основных условий здесь можно принять, что изображения клеток имеют типичный размер (диаметр) от 3 до 15 пикселей, а отношение сигнал / шум в пикселе составляет 30–60.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЗРАЧНОСТИ КЛЕТОК

В общем случае прозрачность является численной интегральной характеристикой объекта по отношению к фоновому уровню изображения.

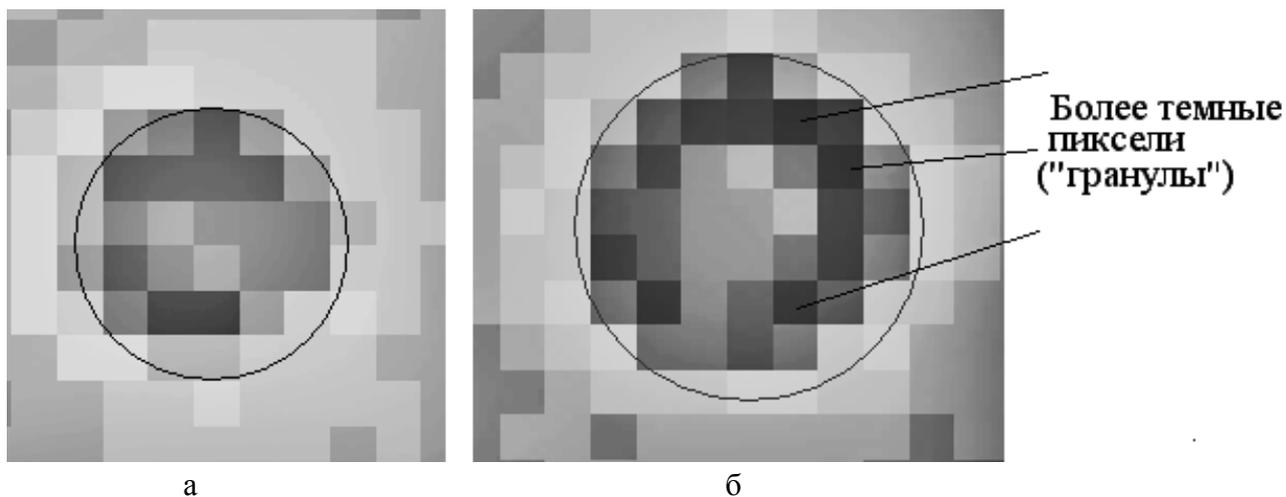


Рис. 1. Микроскопические изображения лейкоцитов. а — крупный лимфоцит, б — гранулоцит

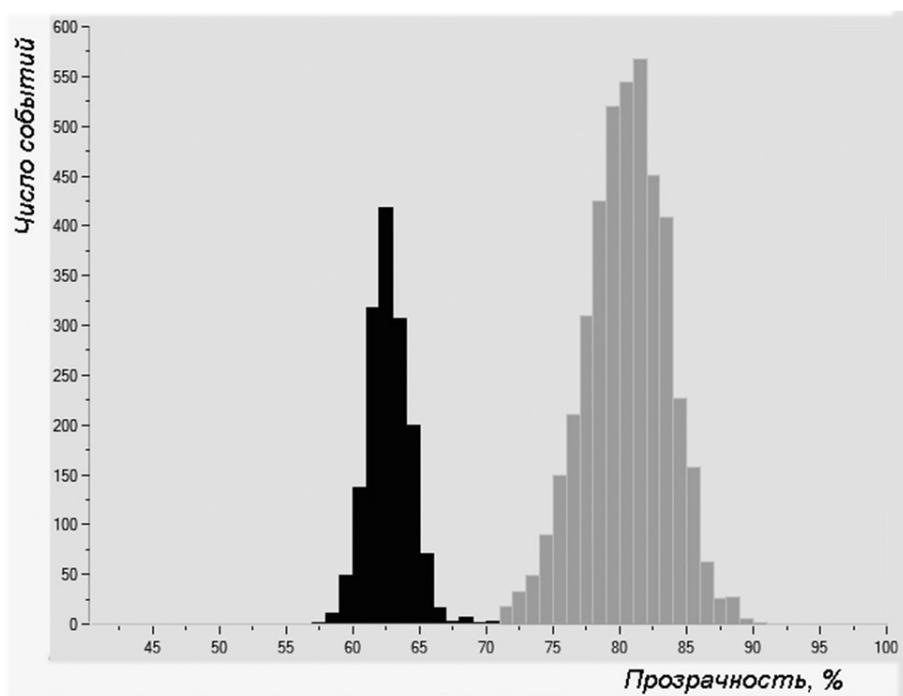


Рис. 2. Определение прозрачности микросфер диаметром 10–11 мкм (темное изображение) и 3.2 мкм (светлое изображение)

Если объектом является клетка, то прозрачность — это интегральная характеристика по отношению к буферному раствору. Вычисление прозрачности Tr в процентах для объектов в контуре известного диаметра может быть выполнено по формуле

$$Tr = \frac{S_{Ring}}{S_{Fon}k} 100, \quad (1)$$

где S_{Ring} — сумма значений яркости для всех

элементов (пикселей изображения) внутри контура объекта; S_{Fon} — среднее значение яркости пикселя вне контура объекта, но в непосредственной близости от него; k — количество элементов изображения (пикселей) внутри контура объекта.

Простая расчетная оценка показывает, что минимальное значение относительной ошибки определения прозрачности объектов может составлять менее 1 %, если отношение сигнал/шум в одном пикселе регистрируемых изображений превышает 50 и диаметр контура объекта более 3 пикселей.

При этом учитываются случайные составляющие величин S_{Rmg} и S_{Fon} , связанные только с шумами в пикселях. Значительного увеличения погрешностей можно ожидать из-за случайных ошибок определения контуров и размеров объектов, что особенно сказывается в случае более мелких объектов с меньшим числом элементов.

На гистограмме рис. 2 показаны результаты экспериментального определения прозрачности объектов (микросфер) модельного образца по их микроскопическим изображениям. Видно, что микросферы диаметром около 10 мкм (около 7 пикселей) имеют среднюю прозрачность около $63 \pm 2\%$ (с.к.о.), микросферы диаметром 3.2 мкм — $81 \pm 4\%$. Относительная вариация значений средней прозрачности, оцененная по результатам серии экспериментов, составляла 1–3%. Рис. 2 иллюстрирует ожидаемый уровень возможностей данного метода различения объектов изображения по их прозрачности.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАНУЛЯРНОСТИ

Гранулярность объекта отражается на его микроскопическом изображении в проходящем свете наличием более темных элементов относительно средней яркости элементов внутри объекта. Отдельные более темные элементы изображения объекта могут быть классифицированы либо как отдельные "выбросы" в выборке данных случайной величины сигналов яркости пикселей внутри контура объекта, либо как импульсные высокочастотные помехи. Соответственно можно рассмотреть два подхода к полуколичественному описанию степени гранулярности, в данном случае в приложении к задаче различения клеток крови по их микроскопическим изображениям.

Для выявления "выбросов" в выборке данных случайных величин широко используются методы, основанные на принципе упорядоченного выбора. Среди них наибольшее количество выбросов наилучшим образом выявляет метод на базе минимизации квадрата медианного остатка, предложенный Русью [5]. При использовании упорядоченного выбора из обрабатываемых данных строится вариационный ряд и по количеству членов ниже заданного порога делается вывод о количестве гранул.

На базе принципа упорядоченного выбора значений яркостей пикселей внутри контура объекта выполняется также алгоритм двумерной медианной фильтрации. Из исходного изображения можно вычистить отфильтрованное изображение и по сумме разностей полученных отсчетов произвести оценку количества гранул.

При использовании принципа упорядоченного выбора параметр гранулярность Gr вычисляется

по следующей формуле:

$$Gr = \frac{S_{gr}}{Mn_f} K_m, \quad (2)$$

где Mn_f — среднее значение фона вокруг объекта; K_m — масштабный коэффициент; S_{gr} — сумма абсолютных величин отклонений яркостей пикселей изображения объекта от яркостей пикселей изображения, подвергнутого двумерной медианной фильтрации.

S_{gr} вычисляется по формуле (3):

$$S_{gr} = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (|S_{g3}(i, j) - L_c(i, j)|), \quad (3)$$

где i, j — номера строки и столбца в изображениях объекта; $S_{g3}(i, j)$ — яркость пикселя, соответствующего i -строке и j -столбцу изображения, подвергнутого двумерной медианной фильтрации; $L_c(i, j)$ — яркость пикселя, соответствующего i -строке и j -столбцу исходного изображения, например подобного одному из изображений, представленных на рис. 1.

Чем больше темных элементов относительно фона и относительно средней яркости элементов внутри объекта, тем больше сумма, вычисленная по формуле (3), и соответственно больше параметр гранулярности, который вычисляется по формуле (2).

Для выявления импульсных высокочастотных помех наиболее подходящими являются методы на базе спектрального анализа, когда обрабатываемые данные разделяют на высокочастотные и низкочастотные составляющие и по их отношению делается вывод о наличии определенного количества импульсных высокочастотных помех — гранул.

При использовании спектрального анализа параметр "гранулярность" вычисляется путем выполнения следующих операций.

1. Двумерный массив L значений яркостей пикселей, составляющих объект, превращается в одномерный массив путем выстраивания друг за другом горизонтальных профилей изображения. Во фрагменте изображения L количество пикселей по горизонтали и вертикали одинаково и равно количеству пикселей в объекте с максимальным радиусом, умноженному на 1.5.

2. Полученный одномерный массив подвергается одномерному дискретному преобразованию Фурье. Значения комплексной амплитуды $\dot{X}(n)$ на n -й пространственной частоте вычисляются по следующей формуле:

$$\dot{X}(n) = \sum_{k=0}^{N-1} x(k) \exp\left(-j \frac{2\pi nk}{N}\right), \quad (4)$$

где $x(0), \dots, x(k), \dots, x(N-1)$ — элементы исходного фрагмента изображения L ; N — количество элементов фрагмента изображения. Комплексная амплитуда $\dot{X}(i)$ содержит две части: действительную $a(i)$ и мнимую $b(i)$.

3. Параметр гранулярность Gr_f вычисляется по следующей формуле:

$$Gr_f = \frac{1}{M} \sum_{i=k}^{N/2} [a(i)^2 + b(i)^2]. \quad (5)$$

Параметр k — номер пространственной частоты, с которой начинается суммирование по формуле (5); подбирается при настройке прибора по результатам оценки спектрального состава шума и дрейфа базовой линии; M — масштабирующий коэффициент.

Чем больше сумма, входящая в формулу (5), тем больше высокочастотных составляющих в спектре, тем больше темных элементов относительно фона и относительно средней яркости элементов внутри объекта, и тем больше параметр гранулярности, вычисляемый по формуле (5).

На рис. 3 и 4 представлены результаты одномерного дискретного преобразования Фурье массивов значений яркости пикселей изображений соответственно лимфоцита и гранулоцита. По горизонтальной оси на этих рисунках — значения

пространственных частот, а по вертикальной — суммы квадратов вещественной и мнимой частей для каждой из частот начиная с частоты с номером k . Величины амплитуд сигналов на одних и тех же частотах для объектов с меньшей гранулярностью (рис. 3) меньше, чем для объектов с большей гранулярностью (рис. 4).

Для принятия решения о выборе наиболее приемлемого метода для оценки гранулярности в обнаруженных объектах изображений было произведено сравнение двух рассмотренных методов: 1) анализа суммы разностей яркостей пикселей исходного и отфильтрованного с помощью двумерной медианной фильтрации изображений; 2) спектрального анализа изображения. Очевидно, что результаты применения методов в значительной степени зависят от качества регистрируемых микроскопических изображений клеток реального образца (в том числе от качества подготовки образца, правильности настройки прибора и др.). Сравнение методов производилось путем обработки реальных изображений лейкоцитов (число серий экспериментов более 20, общее число клеток — более 80 тысяч). Результаты сравнения показали, что оба метода практически равнозначны по достоверности выявления гранулярности в изучаемых объектах — количественных отличий не было выявлено. Однако они различаются по простоте реализации и быстрдействию алгоритмов. По критерию получения результата за наиболее короткий промежуток времени был выбран метод, соответствующий вычислениям по формуле (5),

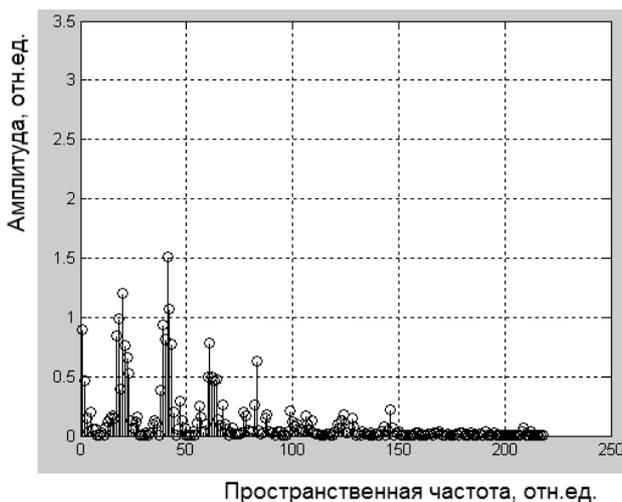


Рис. 3. Спектр Фурье изображения лимфоцита, представленного на рис. 1, а

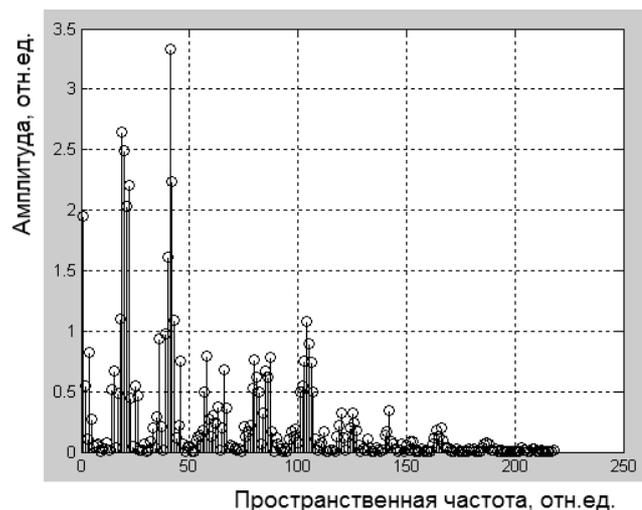


Рис. 4. Спектр Фурье изображения гранулоцита, представленного на рис. 1, б

поскольку этот алгоритм работает примерно на 30 % быстрее по сравнению с методом, соответствующим формуле (2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Процесс цитометрического анализа заключается в получении для каждой отдельной клетки набора нескольких параметров, в рассматриваемом в данной статье случае это — размер, прозрачность и гранулярность. Способы и результаты определения размеров объектов по их изображениям описаны в работе [4]. Обычно представление совокупности цитометрических данных, т. е. распределений параметров всех клеток при многопараметрическом анализе, производится как в виде обычных гистограмм (одномерные распределения в координатах "параметр—число реализаций", аналогично рис. 2), так и в виде точечных двумерных графиков (скаттерграмм) совместных распределений двух параметров клетки [2]. Каждая точка скаттерграммы соответствует одной обнаруженной клетке с параметрами, соответствующими координатам данной точки. Сгущение точек показывает область распределения соответствующих типов объектов (субпопуляций клеток).

Для иллюстрации возможности применения методов различения клеток, которые рассмотрены в данной работе, выполнялись анализы суспензий лейкоцитов реальных образцов крови. Идентификация различных типов лейкоцитов проводилась на основе предварительно полученных экспериментальных данных анализа специально подготовленных образцов, например содержавших только заранее выделенные в процессе пробоподготовки лимфоциты, а также анализа смесей (суспензий) лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, меченных флуоресцентными красителями с высокой специфичностью к соответствующим типам лейкоцитов. При этом сопоставление распределений размеров и оптических параметров (прозрачности или гранулярности) клеток с одновременно регистрируемым распределением флуоресценции клеток позволяло отнести соответствующие распределения оптических параметров к тем или иным субпопуляциям лейкоцитов.

На рис. 5 представлена скаттерграмма совместного распределения прозрачности и размеров лейкоцитов крови, построенная по результатам анализа реального образца. Всего обработано 198 предварительно зарегистрированных микроскопических изображений полей зрения, содержащих более 11 тысяч клеток. Это заняло около 35 с, включая затраты времени на обнаружение клеток на изображениях, определение их размеров и прозрачности. Видно, что разные субпопуляции лейкоцитов локализованы на скаттерграмме доста-

точно хорошо для их надежного различения и выделения.

При обработке цитометрических данных графическое выделение областей распределения численных значений параметров клеток субпопуляций лейкоцитов, показанное на рис. 5 и 6 (т. н. "гейтинг"), производится средствами специального программного обеспечения непосредственно на скаттерграмме. Этот прием сортировки и разделения массива многопараметрических данных позволяет извлечь интересующие группы данных для расчета статистических параметров распределений каждой из субпопуляций клеток и для анализа выделенных ансамблей данных по другим регистрируемым параметрам клеток, например по

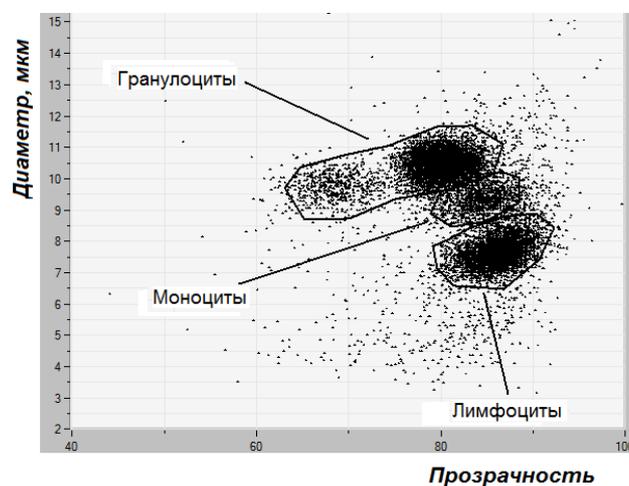


Рис. 5. Скаттерграмма "Прозрачность—Диаметр" для пробы 3-19

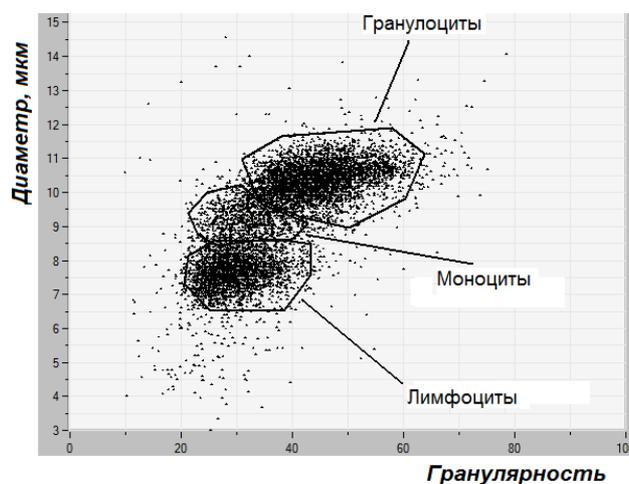


Рис. 6. Скаттерграмма "Гранулярность—Диаметр" для пробы 45-14

гранулярности и флуоресценции в нескольких спектральных диапазонах.

В экспериментальных результатах, показанных на рис. 5, субпопуляция гранулоцитов характеризуется средней прозрачностью 78 ± 4 % (с.к.о.) и размером клеток 10.4 ± 0.4 мкм, субпопуляция моноцитов — 84 ± 2 % и размером 9.3 ± 0.4 мкм, субпопуляция лимфоцитов — 86 ± 2 % и размером 7.7 ± 0.4 мкм. Приведенные значения параметров статистических распределений, а также абсолютные и относительные содержания клеток в выделенных субпопуляциях вычисляются автоматически программой "гейтинга".

На рис. 6 показана скаттерограмма совместного распределения гранулярности и размеров лейкоцитов в том же образце крови, но в другом эксперименте. За время около 37 с обработано 180 изображений полей зрения, содержащих более 8 тысяч клеток. Обработка включала обнаружение клеток на заранее зарегистрированных изображениях, определение их размеров и гранулярности. Получены следующие результаты: субпопуляция гранулоцитов характеризуется гранулярностью 45 ± 6 отн. ед. и размером клеток 10.3 ± 0.4 мкм, субпопуляция моноцитов — 32 ± 4 отн. ед. и размером 9.2 ± 0.4 мкм, субпопуляция лимфоцитов — 30 ± 5 и размером 7.7 ± 0.4 мкм.

Алгоритм определения гранулярности более сложен по сравнению с определением прозрачности. Экспериментальные оценки при анализах одних и тех же массивов изображений как по гранулярности, так и по прозрачности показали, что время определения гранулярности в два-три раза превышает время определения прозрачности. Однако это не сказывается существенным образом на полном времени анализа в связи с более значительными затратами времени на осуществление других операций общего алгоритма анализа.

Полученные экспериментальные данные позволяют, по нашему мнению, сделать вывод о возможности адекватного различения и идентификации субпопуляций лейкоцитов (или других клеток и микрообъектов, обладающих соответствующими свойствами) с использованием рассмотренных методов обработки цифровых микроскопических изображений, подобно тому как различаются и выделяются клетки по коэффициентам светорассеяния в проточной цитометрии [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shapiro H.M. The evolution of cytometers // *Cytometry*. Part A. 2004. V. 58A. P. 13–20.
2. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение / Под ред. С.В. Хайдукова и А.В. Зурочки. Челябинск, 2008. 195 с.
3. Бардин Б.В., Чубинский-Надеждин И.В. Обнаружение локальных объектов на цифровых микроскопических изображениях // *Научное приборостроение*. 2009. Т. 19, № 4. С. 96–102.
4. Бардин Б.В., Манойлов В.В., Чубинский-Надеждин И.В., Васильева Е.К., Заруцкий И.В. Определение размеров локальных объектов изображений для их идентификации // *Научное приборостроение*. 2010. Т. 20, № 3. С. 88–94.
5. Rousseeuw P.J. Least median of squares regression // *J. Am. Stat. Association*. 1984. V. 79. P. 871–880.

*Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург*

Контакты: Чубинский-Надеждин Игорь Вадимович,
IChub@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 24.06.2011.

THE USE OF OPTICAL PARAMETERS OF CELLS FOR THEIR RECOGNITION ON DIGITAL MICROSCOPIC IMAGES

V. V. Manoylov, B. V. Bardin, I. V. Chubinsky-Nadezhdin,
E. K. Vasilyeva, I. V. Zarutsky

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg

A algorithmic methods for estimating optical cell parameters for recognition of different types of leucocytes by their microscopic images captured in transmitted light are described. Granulocytes, monocytes and lymphocytes can be identified by relative transparency and granularity (presence of expressed internal structure). To illustrate the application of cell identification methods in cytometry the results of leukocyte analysis of real blood samples are shown.

Keywords: cell microscopic image, digital image processing, Fourier transform, image cytometry, leucocytes subpopulations