

Национальная академия наук Беларуси
Объединенный институт проблем информатики

С.В. Абламейко, А.М. Недзьведь

**Обработка оптических изображений
клеточных структур в медицине**

Минск 2005

УДК 681.327.12.001.362

Абламейко С. В., Недзьведзь А. М. Обработка оптических изображений клеточных структур в медицине. – Мн.: ОИПИ НАН
Беларуси, 2005. – 156с. ISBN 985-6744-09-1

Рассматриваются вопросы, связанные с применением систем обработки изображений для исследования препаратов тканей различных органов в оптической микроскопии.

Приведены теория и практика построения прикладных систем обработки изображений ткани. Описаны теоретические основы и методы обработки изображений, которые необходимо применять при автоматизации исследований оптической микроскопии, а также технические средства, используемые в подобных системах.

Представлены прикладные системы анализа и обработки изображений оптической микроскопии, разработанные на основе предложенных методов выделения и анализа клеток, клеточных структур и других гистологических объектов.

Представляет интерес для студентов, аспирантов и специалистов, занимающихся вопросами обработки изображений, разработчиков программных продуктов, связанных с автоматизацией исследований оптической микроскопии, и медиков, работающих с системами обработки изображений.

Печатается по решению редакционной коллегии Объединенного института проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Бюро отделения физики, математики и информатики и редакционно-издательской комиссии Национальной академии наук Беларуси.

Ил. 100, табл.3, библиогр. 83 назв.

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор И.А. Швед
доктор технических наук, Б.А. Залесский

ISBN 985-6744-09-1

© С.В.Абламейко, А.М.Недзьведзь,
2005

О г л а в л е н и е

Введение	6
Глава 1. Обработка медицинских изображений	9
1.1. Актуальность проблемы	9
1.2. Типы изображений в медицине	11
1.3. Гистологические изображения	15
1.3.1. Характеристика гистологических изображений	15
1.3.2. Классификация гистологических изображений	20
1.4. Цитологические изображения	24
1.5. Анатомические изображения.....	25
1.6. Системы обработки медицинских изображений клеточных структур	29
Глава 2. Основные операции, используемые при обработке медицинских изображений	35
2.1. Основные определения	35
2.2. Сегментация изображений.....	39
2.2.1. Пороговая сегментация.....	40
2.2.2. Морфологическая сегментация	42
2.2.3. Наращивание областей	44
2.2.4. Новые направления в сегментации изображений.....	45
2.3. Выделение средних линий объектов изображений	47
2.3.1. Анализ алгоритмов выделения средних линий	47
2.3.2. Алгоритмы утоньшения полутоновых изображений... ..	50
2.4. Выделение границ объектов	55
Глава 3. Обработка полутоновых изображений клеточных структур	57
3.1. Представление гистологических объектов на изображении и порядок их обработки	57
3.2. Выделение сети сосудов и волокон посредством полутонового утоньшения.....	58
3.3. Идентификация сосудов и волокон на изображениях.....	63
3.4. Пороговая сегментация изображений клеточных структур....	66
3.5. Морфологическая сегментация изображений клеточных структур	68

3.6. Сегментация изображений клеточных структур посредством объединения областей	70
3.7. Выделение клетки среди бинарных объектов, полученных в результате сегментации	75
Глава 4. Сегментация цветных изображений клеток и клеточных структур	81
4.1. Особенности цветных изображений гистологических препаратов	81
4.2. Системы координат для представления цвета	84
4.3. Система координат для морфологических операций на цветных изображениях	86
4.4. Понятие связности для пикселей цветного изображения	91
4.5. Сегментация цветных медицинских изображений в пространстве HSB	93
4.5.1. Предварительная оценка изображений	93
4.5.2. Алгоритм сегментации	96
4.6. Морфологическая сегментация цветного изображения клетки	98
Глава 5. Вычисление характеристик объектов изображений	101
5.1. Типы характеристик и предварительная подготовка	101
5.2. Геометрические характеристики	103
5.3. Топологические характеристики	108
5.4. Объемные характеристики	113
5.5. Текстурные характеристики	114
5.6. Денситометрические и колориметрические характеристики	115
Глава 6. Задачи оптической микроскопии, решаемые с помощью систем анализа изображений	119
6.1. Исследование пирамидальных нейронов головного мозга разной степени поражения вирусом простого герпеса	119
6.2. Определение плотности радиальных и тангенциальных волокон мозговой ткани	121
6.3. Наблюдение обмена веществ в клетке с помощью радиоавтографии	122
6.4. Исследование оптических характеристик культуры нервных клеток	124

Глава 7. Система анализа цитологических изображений	
«Контур»	127
7.1. Общее назначение системы	127
7.2. Функциональные возможности системы	129
7.3. Диагностические возможности	133
Глава 8. Система анализа гистологических изображений	
«Биоскан»	137
8.1. Общее назначение	137
8.2. Функциональные возможности	138
8.3. Программное обеспечение.....	141
Заключение	148
Литература	150

Введение

Благодаря широкому использованию в медицине электронно-вычислительных комплексов значительно облегчается решение многих практических задач. Например, математические методы применяются при обработке и анализе медицинских изображений. Изображения анатомического и гистологического строения различных органов и тканей организма и их патологических изменений являются фундаментальными для медицинской науки. Диагностика заболеваний, лечение и управление терапевтическими процедурами опираются на данные, получаемые методами медицинской визуализации.

Современный уровень медицинской науки требует от специалистов не только владения определенными практическими навыками, но и знания основных общепатологических процессов, их номенклатуры и определений, причин, патогенеза и исходов, а также их значения для организма человека. Общепатологические процессы протекают на различных уровнях: организменном, органном, тканевом, клеточном, ультраструктурном, молекулярном. Два первых уровня соответствуют макроскопическим изменениям, видимым невооруженным глазом, и предполагают изменения внешнего вида пораженных органов. На тканевом и клеточном уровнях патологические процессы выявляются с помощью светового микроскопа.

Приготовление препаратов для микроскопических исследований – сложный процесс, который влечёт за собой ухудшение качества изображений гистологических препаратов. Для преодоления трудностей, связанных с искажением изображения, требуются высокий профессионализм исследователя и выполнение сложной рутинной работы по корректировке результатов. Применение вычислительной техники значительно упрощает решение этих задач, облегчая работу с медицинскими изображениями.

За последние пять лет количество автоматизированных систем обработки медицинских изображений сильно возросло, но число публикаций, особенно русскоязычных, по этой теме невелико.

Предлагаемая книга посвящена обработке медицинских изображений оптической микроскопии и состоит из нескольких глав.

В первой главе рассматриваются изображения оптической микроскопии, наиболее известные системы и технологии анализа и обработки изображений оптической микроскопии, предлагается классификация объектов на изображении.

Вторая глава посвящена методам и алгоритмам обработки и распознавания изображений. Даются основные определения и рассматриваются алгоритмы утоньшения и сегментации изображений, наиболее актуальные при выделении объектов на изображениях оптической микроскопии.

Третья глава посвящена сегментации гистологических объектов на полутоновых изображениях. Глава начинается с классификации гистологических объектов для определения наиболее эффективного метода сегментации. Затем рассматривается сегментация протяженных объектов (сосудов и волокон) и площадных (клеток и их структур) и приводится алгоритм определения клетки среди бинарных объектов, полученных в результате пороговой сегментации.

В четвертой главе описывается сегментация цветных медицинских изображений оптической микроскопии. Рассматриваются основные понятия, используемые при определении цвета. Выбирается система координат, наиболее удобная при описании цветового пространства и обработке изображений методами математической морфологии, и описываются особенности её использования в методах морфологической сегментации объектов оптической микроскопии.

Результатом процесса сегментации являются выделенные объекты, для которых обычно вычисляются характеристики. Пятая глава посвящена характеристикам объектов и способам их вычисления.

В шестой главе приводятся примеры задач, решаемых путем обработки гистологических и цитологических изображений.

В седьмой и восьмой главах описываются разработанные и практически используемые системы для обработки изображений оптической микроскопии. Система «Биоскан», разработанная коллективом лаборатории информационно-компьютерных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета (Г.М. Карапетян, А.М. Недзьведзь, Ю.Г. Ильич, А.В. Подопригора, Б.В. Налибоцкий), предназначена для комплексного исследования анатомических и гистологических изображений. Система «Контур», разработанная группой специалистов Объединенного института проблем информатики Национальной академии наук Беларуси (С.В. Абламейко, Н.И. Парамонова, О.А. Пацко, О.П. Чиж, Д.М. Лагуновский) и Белорусского государственного медицинского университета (В.А. Кириллов, Е.И. Стебеньева, С.В. Дубовский), предназначена для комплексного исследования цитологических изображений с целью постановки диагноза рака щитовидной железы.

Авторы накопили большой опыт в создании систем ввода, обработки и анализа изображений оптической микроскопии. За последние 10–15 лет совместно с нашими коллегами из лаборатории обработки и

распознавания изображений Объединенного института проблем информатики Национальной академии наук Беларуси и лаборатории информационно-компьютерных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета разработан ряд систем обработки медицинских изображений, которые успешно применяются во многих исследовательских учреждениях. За это время по данной тематике опубликовано много работ в научных журналах и трудах конференций. Полученные результаты легли в основу этой книги.

Кроме разработки конкретных систем наши коллеги принимали участие в написании некоторых разделов книги. Так, материалы главы 7 базируются на результатах и статьях, опубликованных совместно с Н.И. Парамоновой, О.А. Пацко, О.П. Чижом, Д.М. Лагуновским, В.А. Кирилловым, Е.И. Стебеньевой, материалы главы 6 – на результатах и статьях, опубликованных совместно с Г.М. Карапетяном, Ю.Г. Ильичом, А.В. Подопригорой. Раздел 4.5 написан А.М. Белоцерковским.

Авторы выражают огромную благодарность своим коллегам.

Отдельные результаты данной книги получены в рамках выполнения проектов МНТЦ В-517 и В-736.

Глава 1

Обработка медицинских изображений

1.1. Актуальность проблемы

Широкое использование математических методов является необходимым условием совершенствования качества научных исследований в биологии, фармакологии и медицине.

На тканевом и клеточном уровнях исследования патологических процессов обычно проводятся с помощью оптической микроскопии. Благодаря применению методов количественной морфологии в анатомо-клиническом исследовании некоторых классов заболеваний желудочно-кишечной, эндокринной, сердечно-сосудистой, кровеносной, костной и нервной систем можно определить оптические, геометрические и топологические характеристики как для отдельных объектов исследования, так и для всего изображения в целом, которые позволяют описать патологическую картину.

Приготовление препаратов для микроскопических исследований – сложный процесс, приводящий к частичному повреждению молекулярных и клеточных структур, что влечёт за собой ухудшение качества изображений гистологических препаратов. Существенная вариабельность и слабая контрастность биологических и медицинских изображений являются основными трудностями в задачах измерения и распознавания. Для их преодоления требуется профессиональная интуиция исследователя и выполнение сложной рутинной работы по корректировке результатов. Автоматизация процесса гистологических и цитологических исследований позволит существенно повысить производительность медицинского персонала, работающего с гистологическими препаратами.

Одним из приложений компьютерной обработки данных является цифровая обработка изображений. Теоретические исследования в этой области начались в 1960-е гг. и основывались на методах улучшения качества изображения и задачах дистанционного зондирования. С течением времени область применения обработки изображений значительно расширилась. Так, в качестве одного из развивающихся направлений выделился анализ медицинских изображений.

Техническое оборудование, применяемое для исследования изображений клеток и клеточных систем, легко перечислить. Это цитофо-

тометры, которые используют интерактивное выделение клеток, а также аппараты для анализа крови и кариотипирования, работающие с высококонтрастными изображениями. Основной причиной медленного развития средств автоматизации в гистологии являются высокая вариативность и слабая контрастность большинства гистологических структур.

Однако в последнее время быстрое развитие цифровой и аналоговой техники открывает новые возможности перед разработчиками. Например, увеличение быстродействия вычислительной техники позволяет использовать сложные, критичные ко времени алгоритмы, а благодаря появлению цветных телевизионных датчиков высокого разрешения можно получать и обрабатывать цветные изображения. Средства ввода изображений в компьютер с каждым днем все больше совершенствуются. Современные сканеры позволяют вводить полноцветные изображения с большой глубиной яркости (16 бит на пиксель). ССD-камеры также претерпели значительные изменения. Сегодня их отличительной особенностью является высокая чувствительность, что позволяет использовать эти камеры не только в световой, но и в флуоресцентной микроскопии. У современных образцов разрешение достигает 4 500 x 3 072 точек (площадь регистрируемой точки 9 x 9 мкм), а чувствительность – до 55 мкЛюкс. Динамический диапазон их также очень велик, что позволяет одновременно регистрировать как точки с высокими интенсивностями, так и с низкими. Кроме того, в последнее время активно внедряются цифровые камеры и микроскопы, которые позволяют вводить полноцветные изображения размером до 6 000 x 6 000 точек, в то время как аналоговые видеокамеры не позволяют формировать сигнал с разверткой более 760 строк. Для подключения аналоговой камеры к компьютеру применяется фреймграббер. Фреймграбберы различаются типом телевизионного сигнала, точностью, разрешением, пропускной способностью, встроенными средствами обработки изображений. Цифровые камеры имеют на выходе цифровой сигнал, предназначенный для компьютера.

Именно современные технические возможности позволяют значительно расширить круг исследований и открывают новые пути решения задач, касающихся анализа изображений. Использование средств автоматизации способствует повышению эффективности работы исследователя и получению более качественных и точных результатов измерения характеристик объектов медицинских изображений.

Медицинские изображения принято классифицировать по способу их получения и отрасли, к которой они относятся. Выделяют несколько видов медицинских изображений [8, 12, 25, 26], основными среди них являются анатомические (фотографии, рентгеновские снимки, изобра-

жения, полученные методами УЗИ, ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), модели компьютерного томографа) и гистологические [10, 78] (изображения оптической и электронной микроскопии).

Легкость получения и достаточно высокое качество анализа анатомических изображений обуславливают большое количество работ по этой тематике [8, 12, 79]. По гистологическим и цитологическим изображениям также достаточно много публикаций, однако большинство из них посвящено решению частных задач, в которых рассматриваются методы исследования пространственной организации клеточных структур, трехмерная реконструкция по снимкам биологических структур, обладающих определёнными видами симметрии [3, 13]; голографический синтез объемных медицинских и биологических объектов по их ракурсным снимкам, полученным в режиме вторичных электронов [25]; моделирование гипотетической молекулярной структуры объекта путём расчета плоского изображения и сопоставления с истинным изображением [9]; автоматическое исследование геометрических и оптических характеристик клеточных структур, наблюдаемых в оптический микроскоп [40, 41]; восстановление первичной структуры биополимеров по набору их фрагментов [9, 36] и др. Недостаточное развитие этой области связано с проблемами автоматического выделения гистологических объектов на изображениях.

1.2. Типы изображений в медицине

Согласно современным представлениям диагностика и последующее решение о выборе тактики лечения любого заболевания должны быть основаны на целом комплексе параметров, включая топографические и визуально-прогностические характеристики. Медицинские изображения, являясь источником этих параметров, обеспечивают информацию об анатомическом и функциональном состояниях организма. Технический прогресс постоянно расширяет рамки возможностей получения изображений, добавляя всё новые их типы, что, в свою очередь, приводит к расширению диагностических и лечебных возможностей. Как пример можно рассмотреть эволюцию в подходах к лечению опухоли ствола головного мозга. До 1980-х гг. этот вид патологии рассматривался как однородная в гистологическом плане группа новообразований и считался в целом неоперабельным. Лечение ограничивалось проведением лучевой терапии, в исключительных случаях – паллиативными операциями (декомпрессивной трепанацией задней черепной ямки, шунтированием ликворной системы и, крайне редко, опорожнением опухолевых кист). В последнем случае операции нередко заканчивались летально. В начале 1980-х гг., благодаря использованию компьютерной

томографии (КТ) и, в особенности, ЯМР-исследований, стало очевидным, что диагноз «опухоль ствола», или «объемное образование», столь же неконкретен и обширен, как, например, диагноз «опухоль головного мозга». Оказалось, что существует целый ряд заболеваний с преимущественным поражением стволовых структур мозга опухолевого и неопухолевого генеза, которые ранее, до появления компьютерной томографии, объединялись под общим названием «опухоль ствола». Как следствие открылись новые возможности проведения операций в структурах ствола мозга и появились первые сообщения об успешном удалении опухолей данной локализации.

Следует подчеркнуть, что нередко для получения полной и объективной картины заболевания используется не один, а целый комплекс визуально-диагностических методов. Например, при некоторых заболеваниях почки в единый диагностический процесс объединяются методы УЗИ, КТ и магнитно-резонансной томографии.

В медицинской практике по характеру получения и области использования различают три типа изображений:

- анатомические;
- гистологические (включая цитологические);
- физиологические.

Физиологические изображения имеют специфические методы получения и обработки, поэтому рассматриваться не будут.

В настоящее время существует достаточно много способов получения медицинских изображений:

Анатомические изображения можно получить посредством рентгенографии, компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии, УЗИ, микроскопии, термографии, эндоскопическими и оптическими методами. Для получения гистологических изображений используются термография, электронная и оптическая микроскопия.

Все изображения для вышеперечисленных способов сильно различаются по своим характеристикам и требуют специализированной обработки. Так как в рамках одной книги рассмотреть все типы изображений невозможно, остановимся на изображениях, получаемых методами оптической микроскопии, основную группу которых составляют гистологические изображения. В оптической микроскопии существует несколько методов изучения изображений: светлое поле, темное поле, фазовый контраст, интерференционные методы контрастирования, флуоресцентные методы.

На гистологических изображениях оптической микроскопии определить информативные объекты непросто. Это связано со слабоконтрастным изображением клеток и клеточных структур, сложностью организации ткани и её структуры, наличием в поле зрения различной

группы клеток и значительной неоднородностью ткани как фона (рис. 1.1).

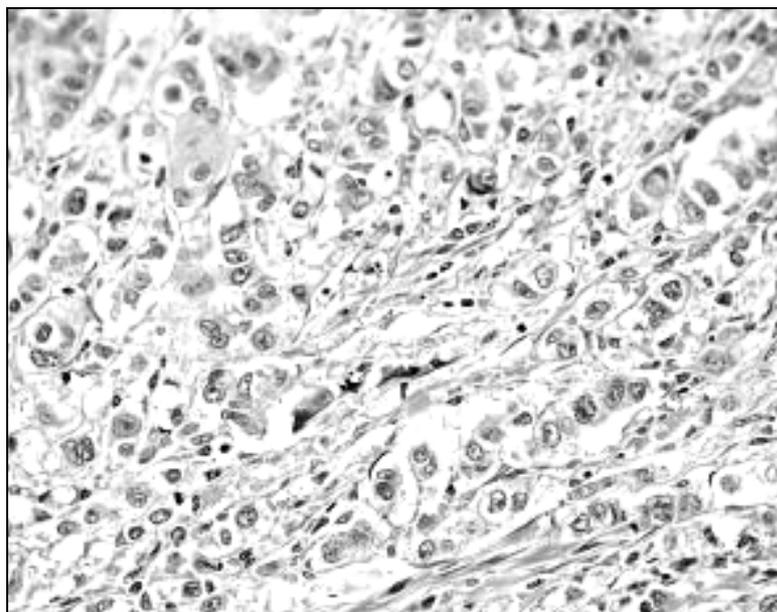


Рис. 1.1. Изображение оптической микроскопии

Изображение оптической микроскопии очень сильно зависит от качества приготовленного препарата и используемого оборудования. Поэтому изображения оптической микроскопии могут быть как полутоновыми, так и цветными (это определяется типом оборудования и поставленными задачами). Наличие большого числа разнотипных объектов на гистологических изображениях является серьезным недостатком при анализе этих изображений.

Как отдельный класс изображений, получаемых в оптической микроскопии, можно выделить цитологические изображения (рис. 1.2), которые являются частным случаем гистологических. Преимущественно это изображения мазков и проточной цитологии, состоящие из отдельно лежащих клеток.

На анатомическом изображении оптической микроскопии (рис. 1.3) представлены органы и их фрагменты, чаще всего это изображения зародышей, или эмбрионов. На уровне ткани характеристика таких изображений напоминает гистологическую, с той разницей, что орган или его фрагмент обычно геометрически локализованы.

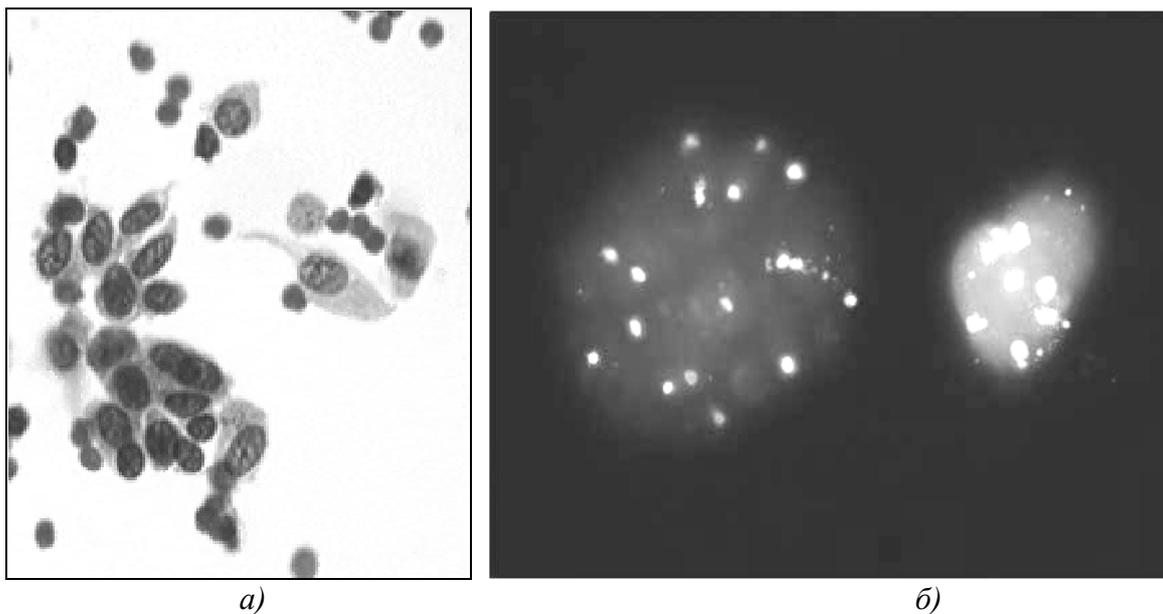


Рис. 1.2. Изображения цитологии: а) оптической микроскопии; б) флуоресцентного микроскопа

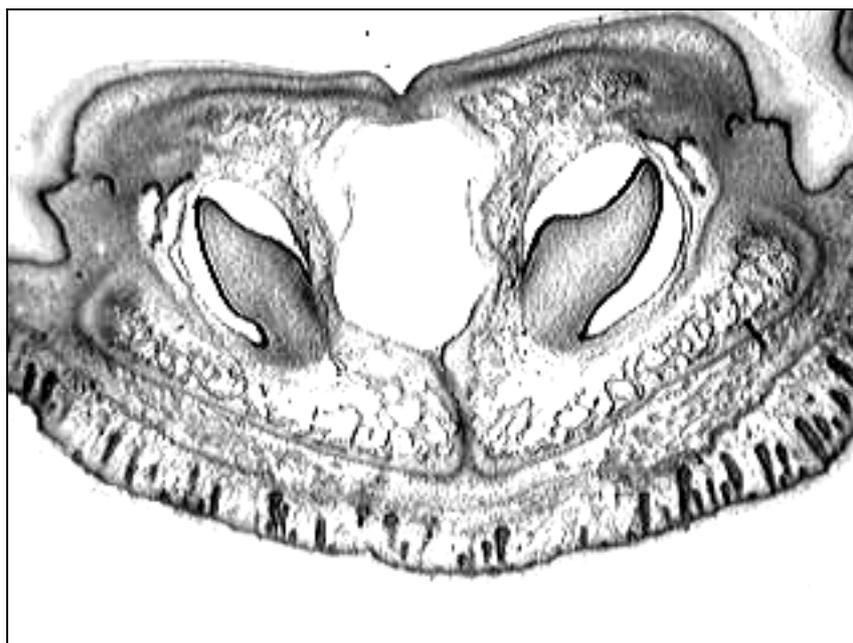


Рис. 1.3. Анатомическое изображение нижней челюсти зародыша свиньи

При обработке медицинских изображений оптической микроскопии наиболее важную роль играют характеристики зашумленности изображения, однородность фона, оптические и геометрические характеристики объектов и т. д. (табл. 1.1).

Особенности изображений оптической микроскопии

Изображения оптической микроскопии	Используемый тип изображения	Наличие больших шумов и артефактов	Нечеткие границы объектов	Геометрические искажения	Наличие различных типов объектов в поле зрения	Неоднородность фона
Гистологические	Полутоновое и цветное	Есть	Есть	Вероятны	Есть	Есть
Цитологические		Вероятны	Вероятны	Вероятны	Есть	Есть
Анатомические		Есть	Есть	Есть	Есть	Есть

1.3. Гистологические изображения

1.3.1. Характеристика гистологических изображений

Известно, что клетки представляют собой элементарные единицы, из которых построены живые организмы, и что организм состоит из различных тканей. Причина различий между тканями заключается в строгой специализации клеток этих тканей для выполнения определенных функций, необходимых организму.

Существует пять основных типов тканей [4, 26, 27, 28]: эпителиальная, соединительная, нервная, мышечная, системы тканей внутренних сред. Каждая из них имеет индивидуальную структуру и свои особые функции. Здесь достаточно указать, что клетки каждой ткани структурно специализированы для осуществления одной или нескольких функций.

Клетки эпителиальной ткани (рис. 1.4) обычно выполняют защитные и секреторные функции. Поэтому они располагаются слоями и плотно прилегают друг к другу.

Соединительная ткань (рис. 1.5, а) имеет множество функций, но главной её задачей является поддержание целостности других тканей и питание их через собственные кровеносные сосуды. Соседство с другими тканями делает изображение самой соединительной ткани достаточно переменчивым, причем в ней сложно выделить конкретные объекты. Очень часто изображение ткани определяется как фон с расположенными на нём гистологическими объектами (клетками, волокнами и сосудами).



Рис. 1.4. Гистологическое изображение фрагмента эпителиальной ткани (высокий призматический эпителий почки кролика)

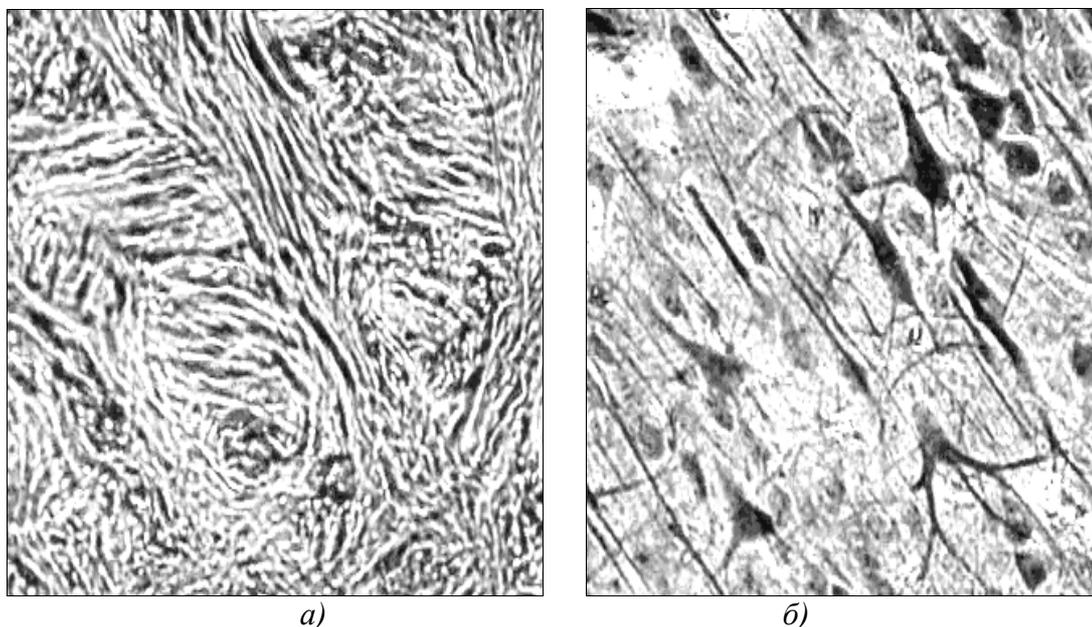


Рис. 1.5. Гистологические изображения: а) плотная соединительная ткань кожи пальца человека; б) фрагмент нервной ткани коры больших полушарий собаки

Нервная ткань (рис. 1.5, б) регулирует и координирует физиологические процессы отдельных тканей и систем организма, перерабатывает сигналы памяти, внутренней и внешней среды, обладает такими свойствами, как раздражимость и проводимость. Тонкие нервные волокна, отходящие от нервных клеток, тянутся от головного и спинного мозга ко всем органам и тканям, обеспечивая быструю связь между разными частями организма, образуя белое вещество и периферические нервы.

Мышечная ткань также имеет сложную структуру. Мышечные волокна собраны в пучки, которые, в свою очередь, являются составной частью более сложных объединений. Эта структура отражается на изображениях мышечной ткани (рис. 1.6).

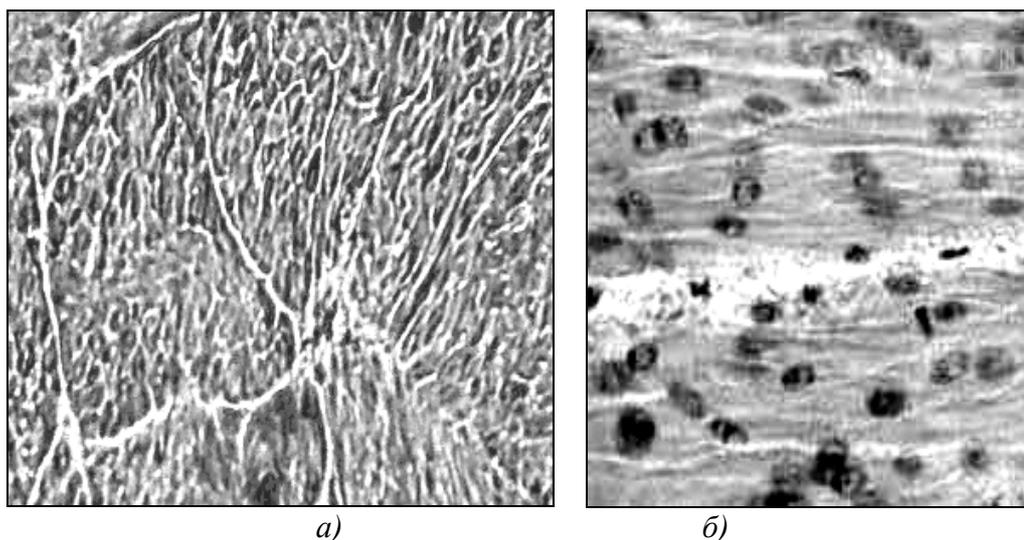


Рис. 1.6. Гистологические изображения фрагментов гладкой мышечной ткани:
а) поперечный срез; б) продольный срез

На основе структурных и геометрических характеристик можно выделить следующие типы гистологических тканей:

- четкой текстуры (ткани с плотно прилегающими друг к другу клетками с похожей геометрической структурой);
- сложной текстуры (ткани с плотно прилегающими друг к другу клетками с разной геометрической структурой);
- с отдельно лежащими клетками, ориентированными в пространстве по форме;
- с «произвольно» лежащими клетками (со сложно определяемой геометрической структурой и положением в пространстве);
- с продольно лежащими волокнами, сосудами или длинными клетками, относительно ориентированными в пространстве;
- с продольно лежащими волокнами, сосудами или длинными клетками без явной ориентации в пространстве.

Изображения живых клеток достаточно стабильны и удобны для анализа. Примерно в центре расположено ядро, которое часто по своему показателю преломления отличается от остальной клетки. На окрашенных препаратах видно, что ядро ограничено ядерной мембраной, или оболочкой. В ядре имеются одно или несколько округлых темноокрашенных телец, называемых ядрышками.

Ядро расположено в цитоплазме, занимающей внешнюю и обычно большую часть клетки. Каждый компонент цитоплазмы выполняет свои определенные функции, причем в разных клетках эти компоненты имеют различный вид в зависимости от этих функций. Следует указать, что при помощи светового микроскопа в цитоплазме обнаруживаются лишь некоторые из ее компонентов. Исследование же всех компонентов и

структуры цитоплазмы проводится с использованием электронного микроскопа. Цитоплазма содержит множество специализированных ультраструктур, называемых органеллами клетки, их наличие обуславливает оптическую неоднородность клетки.

Клетки различаются по своим размерам, существуют некоторые верхние и нижние границы размеров: в большинстве случаев диаметр клетки не выходит за пределы 0,01 – 0,1 мм [2, 28].

На основе структурных и геометрических характеристик можно выделить следующие типы клеток:

- определяемые как площадные объекты относительно правильной геометрической формы;
- как площадные объекты произвольной геометрической формы;
- как сильно вытянутые объекты.

По оптическим характеристикам и методу окрашивания клетки делятся на три класса:

- с окрашенным ядром;
- с неокрашенным ядром;
- без ядра.

При попытках интерпретировать то, что можно увидеть на гистологическом препарате, возникают два главных затруднения [28]. Во-первых, препарат – всего лишь один срез, а одного среза часто недостаточно, чтобы наблюдатель мог представить себе структуру, из которой он был получен. Ввиду трудности интерпретации отдельных срезов гистологам приходится тратить много времени и усилий на определение микроскопического строения разных частей тела. Оно обычно достигается путем реконструкции части организма из отдельных ее срезов, подобно тому, как можно восстановить целый объект, сложив вместе нарезанные ломтики. Для этого готовят срезы из всей изучаемой структуры. Каждому из таких последовательных (серийных) срезов дают соответствующий номер, окрашивают его, а затем делают его копию соответствующей толщины. Копии складывают вместе в должной последовательности и получают модель, в которой структуру изучаемых частей можно рассматривать невооруженным глазом. Такую модель можно даже разрезать в разных плоскостях, чтобы сделать возможным изучение внутренней структуры.

Второе затруднение, возникающее при интерпретации препаратов, состоит в умении распознавать на отдельных срезах различные структуры, общая форма которых на макроскопическом уровне известна.

В теле человека имеется много трубчатых структур разного типа и разных размеров. Трубчатую форму имеют кровеносные сосуды, встречающиеся в организме почти повсеместно [28], воздухоносные пути в

легких и протоки многочисленных желез, а также лимфатические сосуды. Главная трудность распознавания трубок обусловлена тем, что срез может пройти через них в продольном, косом или поперечном направлениях. Еще труднее бывает узнать срезы изогнутых трубок.

Во многих органах имеется большое число перегородок, или септ, делящих орган на множество более мелких частей. Хотя иногда такие части имеют одинаковые размеры, на срезах они могут выглядеть по-разному в зависимости от расположения плоскости среза.

На препаратах часто видны нервные волокна, через которые срезы также могут пройти в разных плоскостях. Эти волокна очень сходны с проводами, состоящими из многих отдельных изолированных проволок. Поэтому если представить себе провода, перерезанные под разными углами, легче будет интерпретировать картину нервных волокон, срезаемых в разных плоскостях.

Если наблюдатель видит на срезе ряды клеток, тянущихся поперек поля зрения, то он может принять их за один ряд. Однако все то, что видно на срезе, имеет ничтожную глубину, поэтому такой ряд на самом деле может быть срезом через толстый слой клеток [28]. Значит, прежде чем делать те или иные выводы, следует всегда пытаться представить, что могло бы находиться над или под плоскостью среза.

Одной из самых важных характеристик клеток и ядер является их величина [2]. На срезах толщиной около 7 мкм, полученных из клеток диаметром более 15 мкм, не обязательно видны ядра. Когда на срез попадает клеточное ядро, оно часто выглядит меньше, чем в действительности. Кроме того, размеры самой клетки на срезе могут казаться меньше, поскольку изображение зависит от того, какая часть клетки попала в плоскость среза. Поэтому клетки на срезе могут сильно различаться по величине, являясь на самом деле одинаковыми.

На многих изображениях, полученных с гистологических срезов, присутствуют различного рода помехи. Некоторые из них классифицируются как артефакты [2, 4, 26, 28].

Артефактом (от лат. *art* – искусство и *factum* – сделанный) называют то, что создано искусственно. В гистологии артефактами называют признаки или структуры, возникающие на препаратах случайно или вследствие плохой обработки. Искажения истинного вида ткани могут возникнуть на любом этапе изготовления препарата. Поскольку артефакты иногда встречаются на препаратах, изучаемых в лаборатории, полезно с самого начала научиться узнавать наиболее распространенные из них, чтобы в дальнейшем не принимать во внимание.

1.3.2. Классификация гистологических изображений

При анализе любое изображение делится на объекты и фон. Цель процесса сегментации – определить области, соответствующие объектам, а всю остающуюся часть изображения отнести к фону. Для того чтобы правильно выбрать методы сегментации, необходимо определить объекты как набор признаков и характеристик.

Выше рассматривались основные объекты, изучаемые гистологией, причем если один объект является составной частью другого, то это создает некоторые трудности в определении признаков гистологических объектов на изображении. Поэтому в гистологии объекты определяются в зависимости от задач, которые ставит перед собой исследователь. В основу классификации гистологических изображений в целях автоматического анализа и измерений удобнее всего положить топологические свойства гистологического изображения в целом. Это позволит определить порядок обработки изображения гистологического препарата с целью выделения всех объектов.

Одним из интересных свойств гистологических препаратов является то, что в зависимости от степени оптического увеличения их изображений одни объекты выделяются более явно, а другие теряют своё явное определение. Каждое значение оптического увеличения выделяет определённую группу топологических характеристик ткани и её составляющих. Поэтому наиболее удобно рассматривать гистологические объекты в зависимости от степени увеличения гистологических препаратов (рис. 1.7).

Общее изображение гистологических препаратов образуется различными фрагментами ткани, состоящими из групп однородных клеток или волокон (рис. 1.8). Эти фрагменты являются объектами, интересующими исследователей, и обычно имеют текстурный характер. Чаще всего для выделения фрагментов применяются методы роста областей.

Изображение ткани анализируется при небольших оптических увеличениях, которые дают возможность получить образ ткани, складывающийся из различных фрагментов. Поэтому, если рассматривать обработку последовательно в виде дерева (рис. 1.7), этот вид изображений можно отнести к первому уровню.

На втором уровне обработки располагаются изображения клеток, волокон и сосудов как исследуемые объекты, образующие фрагменты ткани. На этом уровне начинает играть свою роль соотношение полутонных характеристик фона и объектов. Чаще всего фон образуют пустоты, очень мелкие клетки, волокна, какие-либо частицы. Кроме того, фон обычно включает в себя различные помехи и шумы, возникающие при получении изображения. Поэтому изображение фона характеризуется

примерно одинаковым уровнем яркости пикселей, за исключением единичных выбросов, образованных шумами. Яркость пикселей изображения фона зависит от распределения плотности ткани, качества среза и освещения и наличия электронных помех.

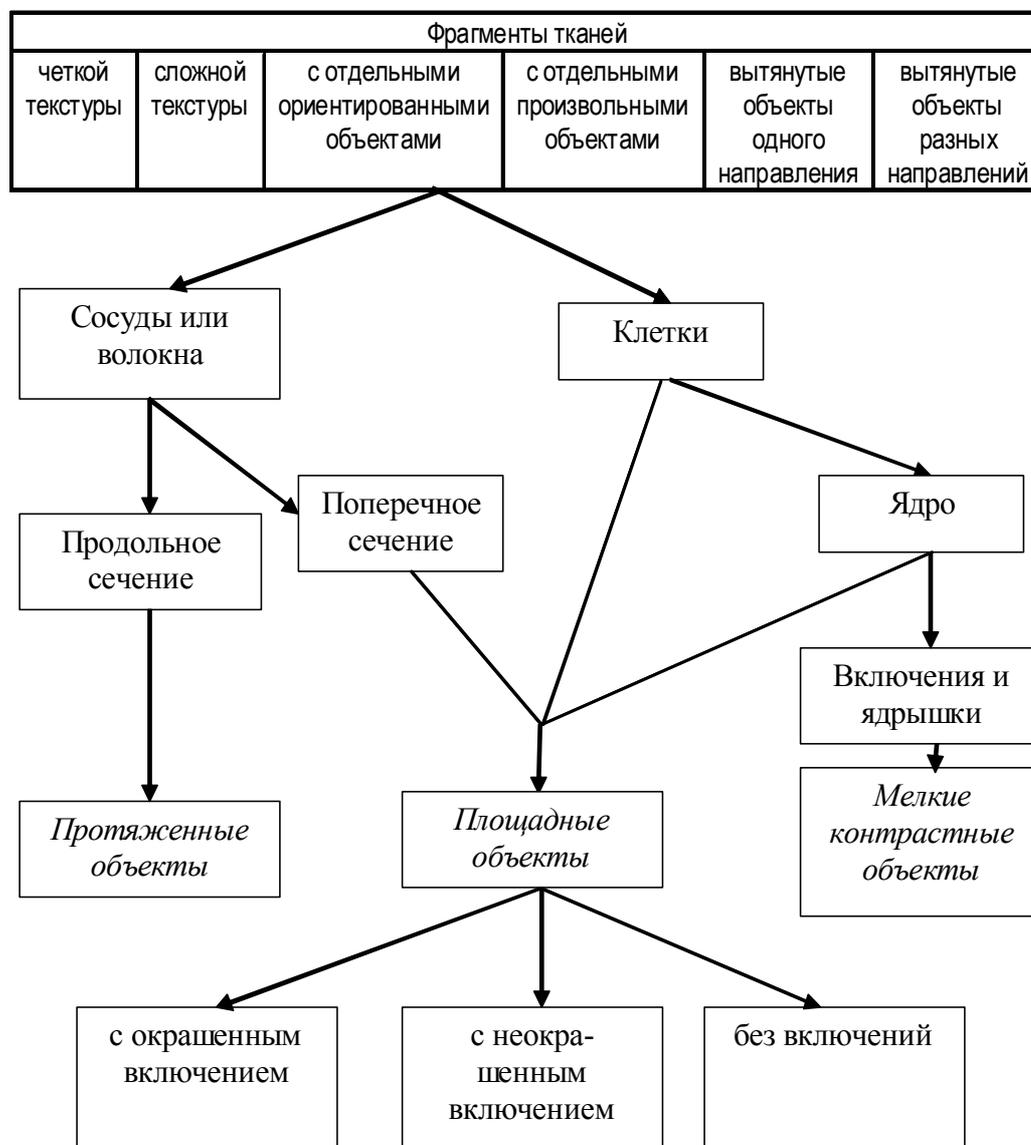


Рис. 1.7. Иерархия гистологических объектов

Существует два вида изображений сосудов и волокон для продольных срезов (рис. 1.9, а) и для поперечных срезов (рис. 1.9, б) гистологического препарата.

Изображение сосуда и волокна в поперечном срезе представляет собой кольцо, ограничивающее область с другими денситометрическими характеристиками. Плотность яркости пикселей внутренней части волокна всегда равномерна, а у сосудов иногда видны элементы содержимого вещества (крови). Дальнейшая классификация этих изображе-

ний такая же, как для клеток, но их изображение сегментируется по геометрическим параметрам, характеризующим форму. Их можно отнести к классу объектов, для геометрической характеристики которых нельзя пренебрегать шириной.

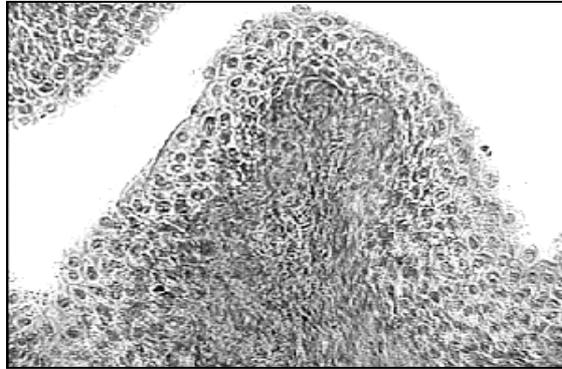


Рис. 1.8. Общее изображение ткани переходного эпителия мочевого пузыря кролика

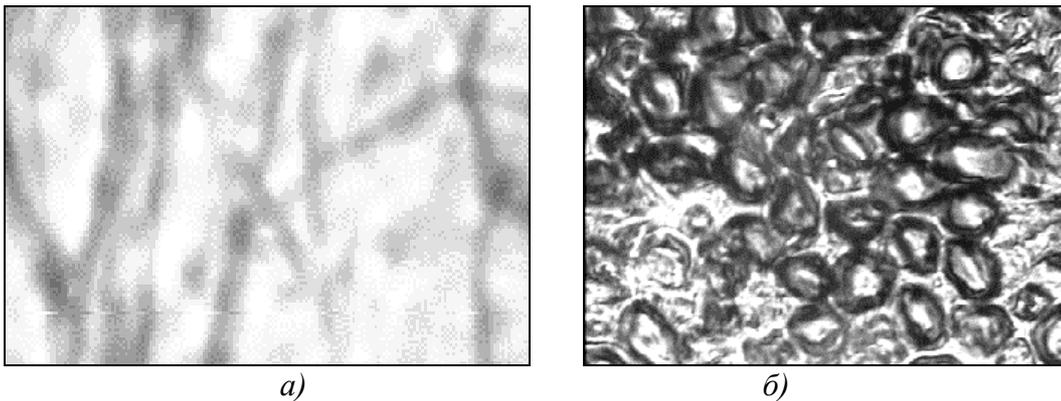


Рис. 1.9. Нервные волокна: а) продольный срез гистологического препарата; б) поперечный срез

Изображения сосудов и волокон в продольном срезе представляют собой длинные, протяженные, ветвящиеся объекты. Их определение – достаточно сложная задача, так как чаще всего эти объекты имеют на разных областях разную яркость, меняющуюся в зависимости от толщины пересечений и наложений друг на друга таких объектов. В данном случае протяженные объекты оптимально характеризует их средняя линия, или скелет.

Более сложным объектом является изображение клетки (рис. 1.10). Для геометрической характеристики клетки важным параметром служит её ширина, клетки также отличаются по геометрической форме. Кроме

того, при идентификации ткани большую роль играет положение клетки в ткани. Однако для клеток характерно множество геометрических форм, следовательно, классификация их по форме на начальном этапе не является оптимальной. Методы, которые выбираются для сегментации клетки в ткани, зависят от полутоновых характеристик изображений клетки, фона и их взаимосвязи. По этим характеристикам изображения клеток можно разделить на три группы:

1. Изображение отдельно лежащих клеток одного типа, причем для любого пикселя этих объектов значение яркости не может совпадать со значением любого пикселя, принадлежащего фону. В этом случае применяется пороговая сегментация.

2. Изображение отдельно лежащих клеток одного типа, при этом яркость пикселей фона меняется равномерно и не делает резких скачков. Применяется морфологическая сегментация.

3. Изображение клеток с яркостью пикселей фона, способных принимать любое значение, причём на изображении имеются другие объекты (клетки, волокна, шумы). Сегментация выполняется посредством объединения областей.

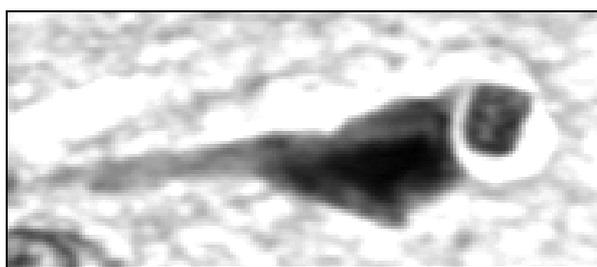


Рис. 1.10. Изображение клетки – пирамидального нейрона коры головного мозга

Разумеется, используя геометрические и топологические характеристики клеток, можно продолжить классификацию клетки с целью определения её типа: по форме, размерам, составу (наличию ядрышек или включений).

Для удобства классификации изображений клеток и волокон в продольном разрезе они рассматриваются как площадные объекты, а ядра и радиальная неоднородность внутри волокон определяются аналогично включениям.

Следующим типом в иерархии изображений будут изображения клеточных ядер, основной характеристикой которых является то, что ядра представляются вложенными в изображение клетки. Поэтому, учитывая соотношение изображений ядра и клетки, ядра можно разделить на три группы, такие же, как и для клеток.

Подобная классификационная схема объектов и структур на гистологических изображениях наиболее благоприятна не только для авто-

матического анализа ткани и её составляющих, но и для выбора методов выделения объектов на гистологических изображениях.

1.4. Цитологические изображения

Цитология – это наука, изучающая клетки. Задача цитолога – установить, как выглядит живая клетка и как она выполняет свои функции. Один из методов изучения клетки – микроскопирование. Современный световой микроскоп увеличивает объекты в 3 000 раз и позволяет видеть наиболее крупные органоиды клетки, наблюдать движение цитоплазмы, деление клетки.

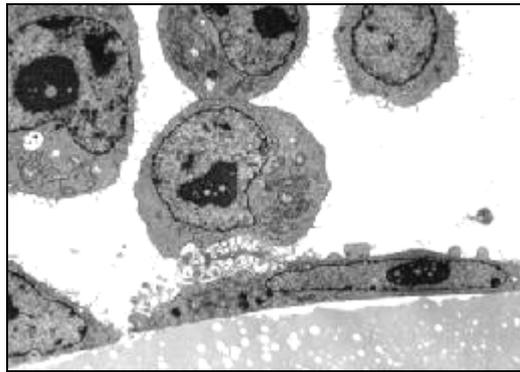


Рис. 1.11. Цитологическое изображение культивируемых клеток

Безусловно, в гистологическом препарате клетки являются одним из основных элементов, делающих ткань видимой. Но изображения клеток вне ткани принято считать цитологическими (рис. 1.11). Цитологические изображения получают на основе всевозможных мазков, включая смывочные методы; проточных цитометров, исключая клеточные конгломераты; колоний подсаженных или выращенных искусственно клеток. Данный класс изображений напоминает гистологические изображения клеточного уровня. Основным его отличием является фон, окружающий клетки. Если в гистологических изображениях фон состоит преимущественно из элементов ткани, то в цитологических он не обладает явными поглощающими свет свойствами. Его можно считать оптически однородным.

Главным объектом на цитологическом изображении является клетка, поэтому классификация объектов на этих изображениях совпадает со схемой гистологических изображений для отдельно лежащих клеток (рис. 1.12).



Рис. 1.12. Иерархическая классификация цитологических объектов

Клетка и ядро рассматриваются как площадные объекты, включения и ядрышки – как мелкие контрастные объекты. На схеме отсутствует важная составляющая клетки – цитоплазма. Она является составляющей клетки и определяется исключением из клетки ядра.

Следует отметить, что изображения клеток на цитологических препаратах бывают двух типов: с отдельно лежащими клетками и с клетками, объединенными в конгломераты. Во втором случае исследование клеток затрудняется из-за необходимости их разделения, а в случае наслаивания клеток друг на друга исследование затрудняется настолько, что во многих случаях не получается удовлетворительный результат.

Исследования клетки имеют большое значение для диагностики заболеваний, так как именно в клетках начинают развиваться патологические изменения, приводящие к возникновению болезни.

1.5. Анатомические изображения

Анатомия – это наука, изучающая строение тела, отдельных органов, ткани и их взаимоотношения в организме. С помощью оптической микроскопии в анатомии исследуются органы или их фрагменты маленьких размеров, а также ткани, из которых органы состоят. Если изображение ткани относится к гистологии, то изображения органов, види-

мые целиком или частично, принято считать анатомическими. Анатомические изображения отличаются от гистологических не только геометрическими свойствами. Речь идет и о внешних признаках, и о внутренних особенностях. Внутренние структуры более многочисленны, а их функции и взаимоотношения существеннее и разнообразнее. Первоначально термин «анатомия» употребляли только в отношении человеческого тела, но сейчас под ним понимают раздел морфологии, занимающийся изучением любых организмов на уровне органов и их систем.

Все организмы образуют естественные группы со сходными анатомическими признаками входящих в них особей. Крупные группы последовательно делятся на более мелкие, представители которых обладают все большим количеством общих черт. Давно известно, что организмы сходного анатомического строения близки и по своему эмбриональному развитию. Однако иногда даже существенно различающиеся виды, например черепахи и птицы, на ранних стадиях индивидуального развития почти неразличимы. Эмбриология и анатомия организмов настолько тесно коррелируют между собой, что таксономисты (специалисты в области классификации) при разработке схем распределения видов по отрядам и семействам в равной степени используют данные обеих этих наук. Такая корреляция неудивительна, поскольку анатомическое строение – конечный результат эмбрионального развития.

Анатомия изучает структуры, для понимания связей между которыми привлекаются физиологические данные. Так, у высших животных и человека различают десять физиологических систем, деятельность каждой из них зависит от одного или более органов. В первую очередь сравниваются внешние особенности, а именно кожа и ее образования. Объекты этого уровня однотонны, границы выражены явно, на изображениях, кроме тех, которые получены оптическими методами, слабо видны. Следующая система – скелет. Объекты этого уровня хорошо видны практически на всех изображениях. Третьей системой является мускулатура, которая обеспечивает движения скелета, для этого типа изображений оптимальны системы тепловидения. На четвертом месте стоит нервная система, поскольку именно она управляет работой мускулатуры. Три следующие системы – пищеварительная, сердечно-сосудистая и дыхательная. Все они размещены в полости тела и так тесно связаны между собой, что некоторые органы функционируют одновременно в двух из них или даже во всех трех. Выделительная и репродуктивная системы у позвоночных также используют некоторые общие структуры, они помещены на восьмое и девятое места. Затем рассматриваются железы внутренней секреции, образующие эндокринную систему. Другие железы, например кожные, изучаются по мере рассмотрения органов, в которых они находятся. Изображение органа в анатомиче-

ском препарате (рис. 1.13) может быть представлено как отдельно, так и внутри определенной структуры.

Для определения особенностей анатомических изображений сначала требуется их сегментация, но она усложнена из-за сложности и изменчивости анатомических форм. Кроме того, границы между анатомическими структурами часто неясны или даже отсутствуют из-за недостатка контраста между этими структурами или из-за несовершенного качества изображения, что может серьезно мешать точности определения характеристик объектов.

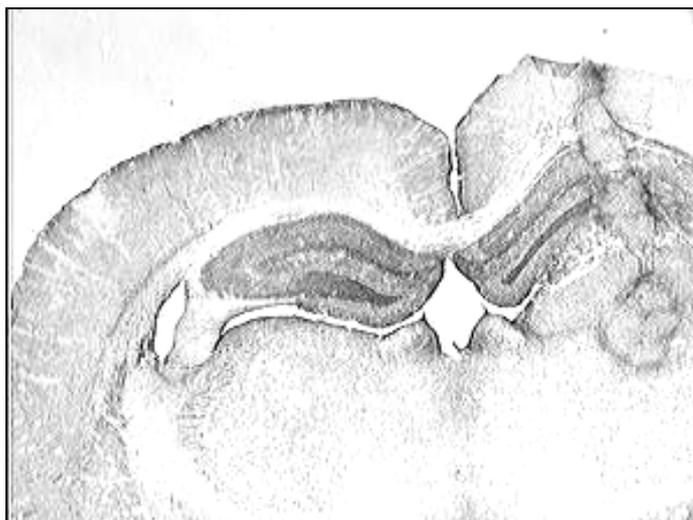


Рис. 1.13. Анатомическое изображение фрагмента мозга

Для облегчения процесса сегментации разработана классификационная схема получения образов объектов на анатомических изображениях (рис. 1.14). Суть схемы заключается в определении отдельного образа анатомического органа. На первом уровне выполняется классификация изображений в зависимости от способа их получения. Следует отметить, что выделяют два глобальных класса, в которых образ органа представляется как 3D-модель (рис. 1.15), и плоское двумерное изображение. 3D-модель выносится отдельным классом. В большинстве случаев она образована на определенном количестве плоских изображений.

Несмотря на то, что получение трехмерного образа в оптической микроскопии осложнено проблемой синхронизации плоскостей, на сегодняшний день существует ряд систем визуализации, способных в качестве конечного результата выдавать трехмерный образ. Кроме того, уже собраны архивы обработанных трехмерных моделей и многие модели создаются виртуально в учебных целях. Эти модели по умолчанию подразумевают качественное выделение образа органа и определение его характеристик.

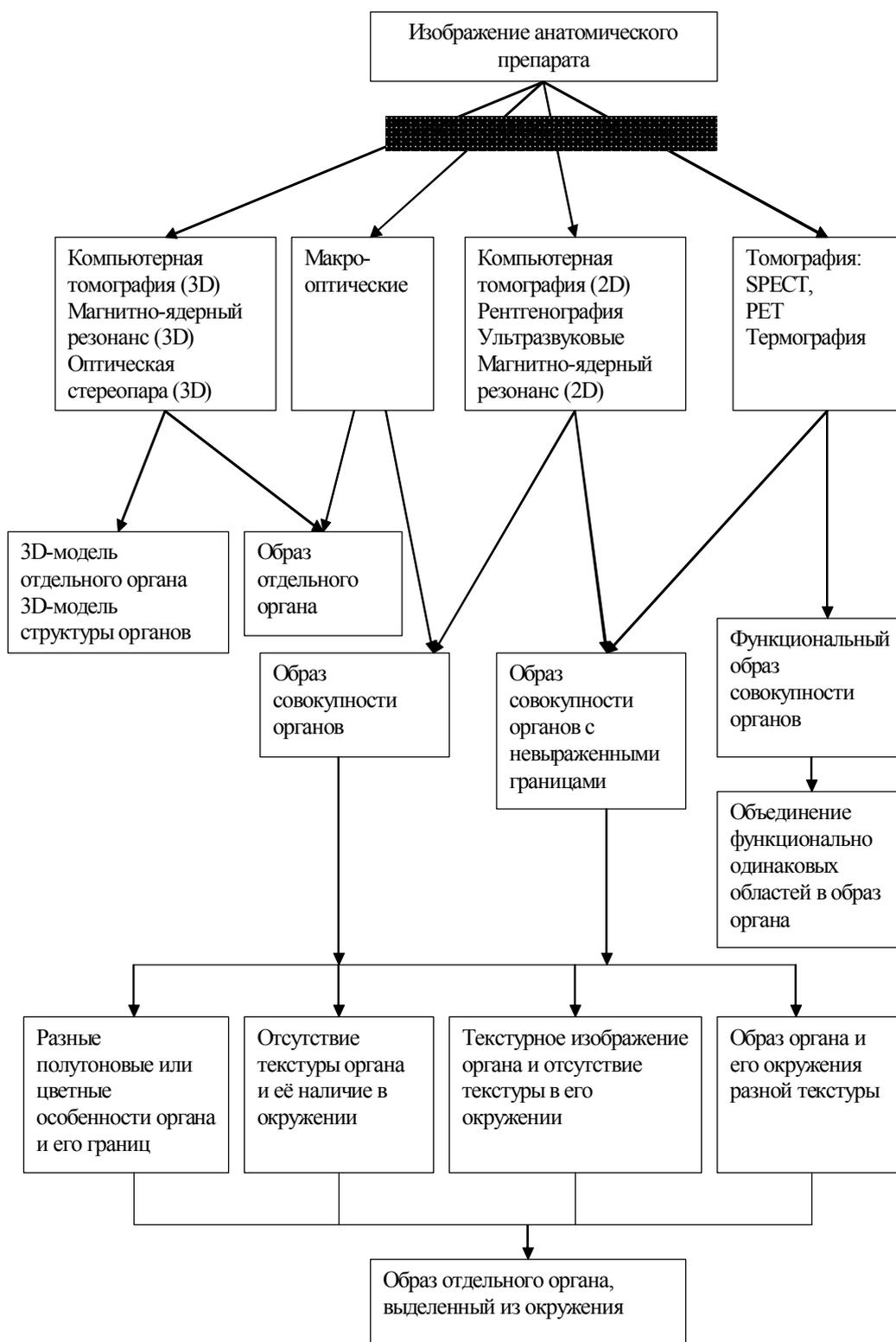


Рис. 1.14. Классификационная схема получения образов объектов на анатомических изображениях



Рис. 1.15. 3D-модель головного мозга человека

1.6. Системы обработки медицинских изображений клеточных структур

Первые анализаторы имели весьма ограниченные возможности, например измеряли только площадь и оптическую плотность объектов. В дальнейшем появились более сложные устройства, способные измерять большое количество параметров, некоторые из этих устройств снабжались специальными процессорами, ускоряющими обработку изображения.

В последнее время работы по созданию анализаторов изображений микрообъектов ведутся в двух направлениях. Первое направление – создание серийных специализированных устройств различных классов и возможностей. Специализация их состоит в том, что некоторые геометрические и денситометрические параметры объектов или их изображений определяются в самом устройстве. Большинство из этих устройств связаны с вычислительными машинами, которые позволяют решать практически любые задачи методами анализа изображений и проводить новые разработки. Специализированные анализаторы успешно применяются при анализе проб с лейкоцитами и эритроцитами [11], при определении размеров [13] и изменении ДНК в ядрах отдельно лежащих клеток [9]. Попытки применить специализированные анализаторы в более сложных задачах, например при анализе цитологических и гистологических препаратов, достаточно редки.

Второе направление – разработка универсальных компьютерных комплексов, в которых задача анализа изображений полностью возлагается на вычислительную машину. В этом случае появляется возможность анализировать такие характеристики изображений, как форма и текстура. Кроме того, эти комплексы обладают возможностями расши-

рения посредством специализированных функций, что позволяет обрабатывать неограниченное число объектов.

Автоматические системы анализа изображения были разработаны сравнительно недавно. Их работа основана на методах, которые относят к разделам технического зрения, а продолжающаяся миниатюризация информационной техники позволяет создавать малогабаритные матричные фотоприемники с достаточно высокой разрешающей способностью и специализированными процессами обработки видеоинформации [9]. В настоящий момент не все автоматические системы могут анализировать объекты с нечеткими границами, а так как большинство объектов являются размытыми, анализаторы изображения включают возможность контроля обработки со стороны пользователя, т. е. интерактивный режим работы. Несмотря на это, у автоматических систем есть много преимуществ. Во-первых, количественный учет и классификация признаков более объективны. Во-вторых, расчеты и измерения выполняются намного быстрее, чем вручную. В-третьих, работая длительное время, исследователь устает, поэтому начинает пропускать интересующие его структуры и допускать ошибки; это исключено при использовании автоматике.

В настоящее время различают три типа систем анализа и обработки изображений:

- общего назначения;
- общего назначения, дополненные специализированными возможностями;
- специализированные системы для решения частных задач.

Получение цифровых изображений оптической микроскопии обычно выполняется посредством специализированных систем, которые чаще всего имеют следующую структуру (рис. 1.16):

- персональный компьютер стандартной конфигурации;
- модуль электронного ввода телевизионного сигнала в компьютер, который обеспечивает преобразование видеосигнала в код с дискретностью более 24 двоичных разрядов с возможными масштабированием и фильтрацией изображения;
- световой микроскоп;
- датчик телевизионный;
- комплект системного программного обеспечения.

Изображение образуется посредством прохождения (отражения в случае темного поля) светового пучка через препарат. Телевизионная камера принимает образ, сформированный пучком, и передает его в качестве электронного сигнала на фреймграббер, который оцифровывает его и формирует изображение.

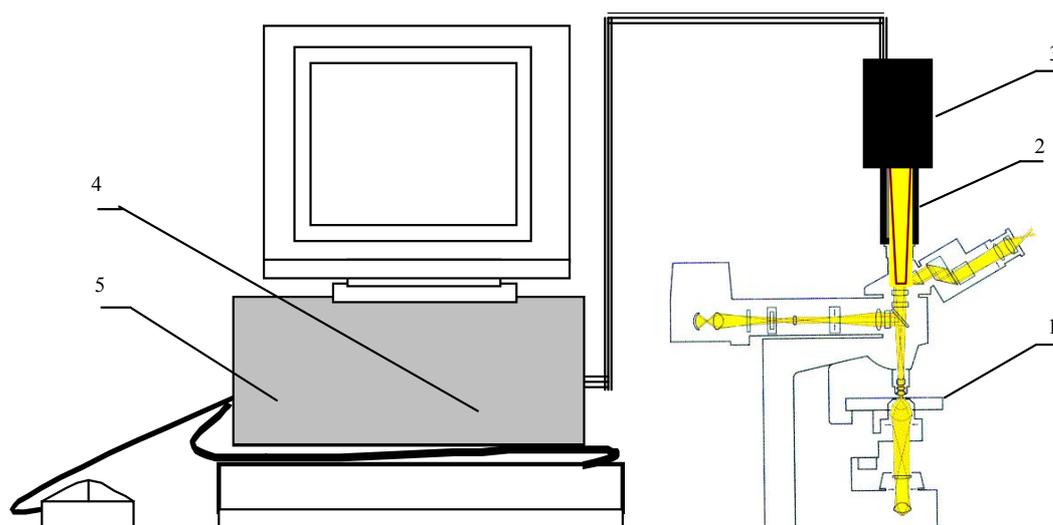


Рис. 1.16. Принципиальная схема работы системы анализа изображений:
1 – микроскоп; 2 – фотонасадка; 3 – ПЗС-камера; 4 – фреймграббер; 5 – компьютер

Качество изображения зависит от огромного числа факторов, возникающих на этапах:

- приготовления гистологического препарата (методов достаточно много, и каждый из них имеет свои особенности);
- формирования оптического образа (наличие пыли на пути оптического пучка, оптические искажения, возникающие в результате интерференции света и аберрации);
- удаления помех, возникающих из-за некачественного электронного оборудования (помехи в электросетях, потеря информации при оцифровке и т. д.).

Большинство систем общего назначения имеют необходимый набор функций для решения задач:

- редактирования изображений;
- интерактивного выделения объектов;
- автоматического выделения объектов;
- контрастирования изображений;
- сравнения изображений;
- измерения объектов на изображении и анализа их характеристик.

Для реализации набора этих функций используются следующие математические операции:

- линейная и нелинейная фильтрация;
- арифметико-логические операции;
- математическая морфология;

- пороговая сегментация;
- интерактивные измерения;
- автоматические измерения;
- статистический анализ.

Отдельные системы анализа изображений включают в себя Фурье-анализ и обработку в спектральной области. Наиболее известные системы этого типа – VIDAS, VIDEOPLAN (Kontron electronics), Quantinent 720, Quantinent 2000 (Leica). В последнее время наиболее известны и популярны следующие системы: Optimas (Macromedia Inc.), Diamorph (Диаморф, Россия, Москва), KS-500 (Kontron electronics), Halcon (MVTec). Между собой системы отличаются наборами методов пороговой сегментации, наличием сложных операций математической морфологии и наборами измеряемых параметров.

Несмотря на наличие базового набора операций, исследователи часто сталкиваются с рядом трудностей:

- иерархией объектов при определении характеристик (цитоплазма, ядро, ядрышко в гистологии);
- сложностями с сегментацией слабоконтрастных объектов со средним уровнем яркости, близким к фону;
- сегментацией группы объектов.

В последнее время благодаря развитию вычислительной техники и увеличению рынка систем анализа изображений стали появляться анализаторы, имеющие расширения для специализированной обработки изображений и объектов узких областей.

Одной из первых систем, специализирующихся на гистологических изображениях, является анализатор CIRES (Cell Image Retrieval and Evaluation System). Она базируется на PC - совместимых компьютерах и работает с клетками, основываясь на некоторых особенностях цитоплазмы, ядер и ядрышек.

Данная система применяется в таких областях, как клиническая онкология, измерение плоидного индекса, анализ группы клеток, определение гиперплоидных клеток и клеток в S-фазе. Она обеспечивает выполнение определенной последовательности функций для шаблонных приложений так же хорошо, как и выполнение через меню. Данные о пациенте и файловая система управления изображениями клеток допускают их взаимодействие с измеряемыми величинами, графическим представлением и результатами классификации. Интерпретация изображений, удаление артефактов и назначение классов осуществляются через новое приложение – галерею клеток изображений.

CIRES воспроизводит и сохраняет изображения клеток в реальных цветах, что является очень важным фактором для ретроспективных данных и интерпретации изображений.

Отличительной особенностью CIRES является ее способность выполнять измерения цитоплазмы, ядер и ядрышек в клетках с помощью цветовых каналов. Структурная клеточно-ядерная эволюция осуществляется посредством анализа границ, интерпретированных для различных клеточных компонентов.

Кроме того, в данной системе заложена возможность восстановления клеток. Индивидуальные клетки или клеточные субпопуляции могут быть отмечены в одном из представлений графических свойств. Соответствующие клетки могут быть изменены, переотмечены или выброшены из популяции.

Система CIRES является одной из лучших, и своей успешной работой она во многом обязана великолепной оптике микроскопов Zess. Эти микроскопы, обладающие высокой глубиной резкости, качественным освещением и цветопередачей, часто позволяют получать контрастное изображение гистологической ткани, но результаты работы со слабоконтрастными изображениями во многих случаях оставляют желать лучшего.

Система Histometrix (Kinetic Imaging Limited, <http://www.kineticimaging.com>) применяется для анализа характеристик ткани. Histometrix позволяет создавать протоколы анализа для исследователей-гистологов. Эта система основана на инструментах цифровой стереологии и аппарате двумерной обработки изображений.

Из систем анализа изображений, производимых в СНГ, следует отметить ВидеоТест (НПО «Иста-ВидеоТест» совместно с СИФ АО ЛОМО, <http://www.videotest.ru/>). В систему вошли программные пакеты VT-Морфо и VT-Карио. Первый включает в себя ручные и автоматические измерения на изображении и поиск по указанному комплексу параметров. Второй позволяет строить кариограммы в автоматическом и ручном режиме, а также корректировать их.

Как специализированную систему микроскопии можно отметить ImageScore (Системы для микроскопии и анализа, <http://www.microscop.ru/rus/software.html>).

Все эти системы базируются на оптических и электронных микроскопах, имеют стандартный набор функций и позволяют рассчитывать 25 морфологических параметров для каждой из выделенных областей.

Автоматизированных систем, ориентированных на изучение гистологических препаратов, немного, потому что самым сложным и самым ответственным шагом в анализе изображений является их сегментация. Специализированные анализаторы таких фирм, как Leica

(<http://www.microscopy-imaging.com/>) и Kontron Electronic (http://www.zeiss.ru/production/1/micro_prinadl_ks/index.htm), ориентированы на интерактивное выделение объектов, причем медицинские направления начинают больше доминировать в анализаторах общего направления, например в Image-Pro Plus (media Cybernetics, <http://www.mediacy.com/ippage.htm>) и в MICROM or PH (Centre de Morphologie Mathematique, <http://malte.ensmp.fr/Micromorph/mmorpha.htm>). Большинство анализаторов используют пороговую сегментацию полутонового изображения (UTHSCSA *ImageTool*, UTHSCSA; CUE 2/3/4, Olympus) или цветного по координатам HLS (ВидеоТест-Морфо 3.2, Иста-ВидеоТест; Visiolog5, Noesis Vision Inc.). Эти алгоритмы работают с гистограммой яркости, выбирая пороги по определённому критерию. Отдельные анализаторы ориентируются на предобработку, после которой используют контурную сегментацию (Optimas 6.1, Bothll. WA; Image-Pro Plus, media Cybernetics).

Специализация функций и методов в системах начинает играть все большую роль. Поэтому в последнее время появился новый цифровой микроскоп, объединяющий устройства для получения изображения и пакеты его обработки. Примерами таких устройств могут служить цифровые микроскопы Nikon (<http://www.microscopyu.com/articles/photomicrography/digital/index.html>), МЕКОС-Ц (<http://www.mecos.ru/product.htm>) и многие другие.

На современном рынке существует большое количество систем анализа изображений и цифровых микроскопов. Огромную роль в них играет качество оптики. Трудности обычно вызывает выбор средств съемки изображения и ввода его в компьютер. Эти средства должны обеспечить приемлемое качество изображения на экране монитора, которое в большинстве случаев будет хуже, чем в окулярах микроскопа. Стоимость и функциональность подобных систем также колеблются в широких пределах. Поэтому чаще всего эффективность работы на них определяется спецификой исследуемых объектов и изображений.

Глава 2

Основные операции, используемые при обработке медицинских изображений

2.1. Основные определения

Пусть $A = \{a_{ij} \mid i = \overline{1, m}, j = \overline{1, n}\}$ – растровое изображение, представляющее собой прямоугольную матрицу, a_{ij} – элемент изображения (пиксель).

Если $a_{ij} \in \{0, 1, \dots, N-1\}$ и принимает N значений, то изображение называется *полутонным* и каждый пиксель может принимать N оттенков серого цвета (градаций яркости).

Если $a_{ij} \in \left\{ \begin{pmatrix} x_{ij}^1 \\ x_{ij}^2 \\ x_{ij}^3 \end{pmatrix} \right\}$, где $x_{ij}^k \in \{0, 1, \dots, N-1\}$, то изображение называется

цветным и каждый пиксель может иметь любое из N^3 возможных значений, характеризующих цвет, который определяется соответствующими ему координатами $(x_{ij}^1, x_{ij}^2, x_{ij}^3)$ в цветовом пространстве.

Отображаемые объекты изображения можно разделить на три типа: текстурные, локально-информационные и смешанные. В классе текстурных изображений информационная содержательность заключена в тех или иных макропараметрах, характеризующих изображение или значительную его часть в целом. Для статистического описания текстурных изображений естественно использовать классические методы и статистические модели теории случайных полей. Локально информационные изображения характеризуются присутствием цельных объектов, имеющих конкретные геометрические характеристики. В смешанных изображениях содержатся объекты, имеющие признаки обоих типов.

Пусть B и W – два множества: объект и фон. Каждый пиксель изображения имеет восемь соседей, которые нумеруются в соответствии со схемой, изображенной на рис. 2.1.

Множество всех соседей элемента a_{ij} (кроме собственно a_{ij}) называется 8-соседями a_{ij} и обычно обозначается как $S_8(a_{ij})$. Соседи с четными номерами – прямые соседи a_{ij} , или 4-соседи, обозначаемые как $S_4(a_{ij})$;

соседи с нечетными номерами – это не прямые соседи a_{ij} , которые обозначаются как $S_D(a_{ij})$. В общем случае под понятием соседства понимается объединение восьми соседей. Множество $S_8(a_{ij})$ называется 8-окрестностью a_{ij} , а множество $S_4(a_{ij})$ – 4-окрестностью a_{ij} . Топология на цифровой плоскости определяется с помощью отношения соседства [1].

p_3	p_2	p_1
p_4	a_{ij}	p_0
p_5	p_6	p_7

Рис. 2.1. 8-окрестность пикселя a_{ij}

Одним из важных определений на бинарном изображении является расстояние. В работе будет использоваться определение, приведенное в работе [1]. *Расстояние* между двумя пикселями x и y – это длина кратчайшего пути, соединяющего x и y на соответствующем графе. Расстояние может быть определено путем выбора подходящего отношения соседства и подходящего определения длины пути.

Известно, что евклидово расстояние определяется формулой

$$D(a_{i_1j_1}, a_{i_2j_2}) = \sqrt{(i_1 - i_2)^2 + (j_1 - j_2)^2}.$$

Основной проблемой в использовании евклидова расстояния для обработки изображений является то, что оно представляется нецелыми числами, поэтому применяются многочисленные аппроксимации евклидова расстояния, среди которых наиболее простыми и часто встречаемыми являются следующие:

$$D_{city} = |i_2 - i_1| + |j_2 - j_1| \text{ – городское расстояние (city block);}$$

$$D_{chess} = \max(|i_2 - i_1|, |j_2 - j_1|) \text{ – шахматное расстояние (chessboard).}$$

Метрика [1] на множестве X – это функция $D: X \times X \rightarrow R^+$, которая обладает следующими свойствами:

– положительна: $D(x,y) > 0$ для всех $x \neq y$, $D(x,y) = 0$ тогда и только тогда, когда $x = y$;

– симметрична: $D(x,y) = D(y,x)$ для любых x и y ;

– для неё выполняется правило треугольника для любых x , y и z :
 $D(x,z) \leq D(x,y) + D(y,z)$.

Соответственно простейшими метриками считаются городская (рис. 2.2, *а*) и шахматная (рис. 2.2, *б*). Результаты, получаемые при использовании городской и шахматной метрик, сильно отличаются от результата, полученного при использовании евклидовой метрики. Поэтому существуют промежуточные варианты метрик, самая популярная из них – Чамферная (рис. 2.2, *в*, *г*).

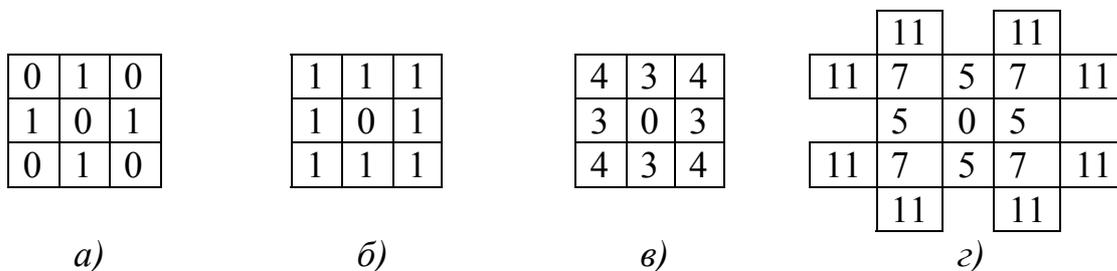


Рис. 2.2. Примеры определений векторов в маске для различных метрик: *а*) городской; *б*) шахматной; *в*) Чамфера (3, 4); *г*) Чамфера (5, 7, 11)

Два пикселя (*B* или *W*) называются соседями [1], если расстояние между ними не превышает ненулевое число в выбранной метрике. Два пикселя (*B* или *W*) называются соседями или *связными*, если между ними можно проложить путь, состоящий из соседних пикселей. *Связная компонента* изображения – это связное множество пикселей в соответствии с выбранным типом метрики. В зависимости от выбранного типа метрики существует три типа линий: 8-связный (рис. 2.3, *а*), 4-связный (рис. 2.3, *б*), а также смешанный тип связности (рис. 2.3, *в*).

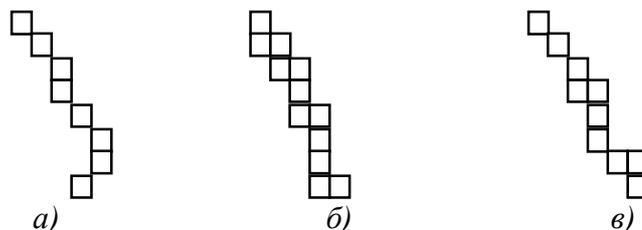


Рис. 2.3. Вид линии в зависимости от типа связности

Для сохранения связности объекта и фона используются противоположные типы связности. Обычно 8-связность используется для *B*, а 4-связность – для *W* или наоборот.

Как и для бинарного изображения, для полутонового основными являются понятия объекта и фона, однако процесс определения этих понятий более сложен, чем для бинарного изображения. Рассмотрим пример объекта на полутоновом изображении (рис. 2.4, *а*). Объект, как правило, отличается от фона значением яркости [1]. На рисунке I – область фона, III – область объекта. В силу того что изображение полутоновое,

граница II между объектом и фоном является размытой. Граница на полутоновом изображении – это область, ограничивающая объект. Если рассматривать изображение как двумерную функцию, то I и III – области постоянных значений, а II – область изменения значения яркости, т. е. она соответствует перепаду яркости – области, в которой производная отлична от нуля (рис. 2.4, б). Наиболее распространенной задачей в обработке полутоновых изображений является выделение границ – областей на изображении, соответствующих области II. Результат представляется в виде бинарного изображения, на котором областям I и III соответствует белый цвет, а области II – черный. Линии черного цвета на бинарных изображениях, соответствующие границам объекта на полутоновых изображениях, называются контурными линиями, или контурами. Соответствие между перепадом яркости, границей и контуром показано на рис. 2.4, г.

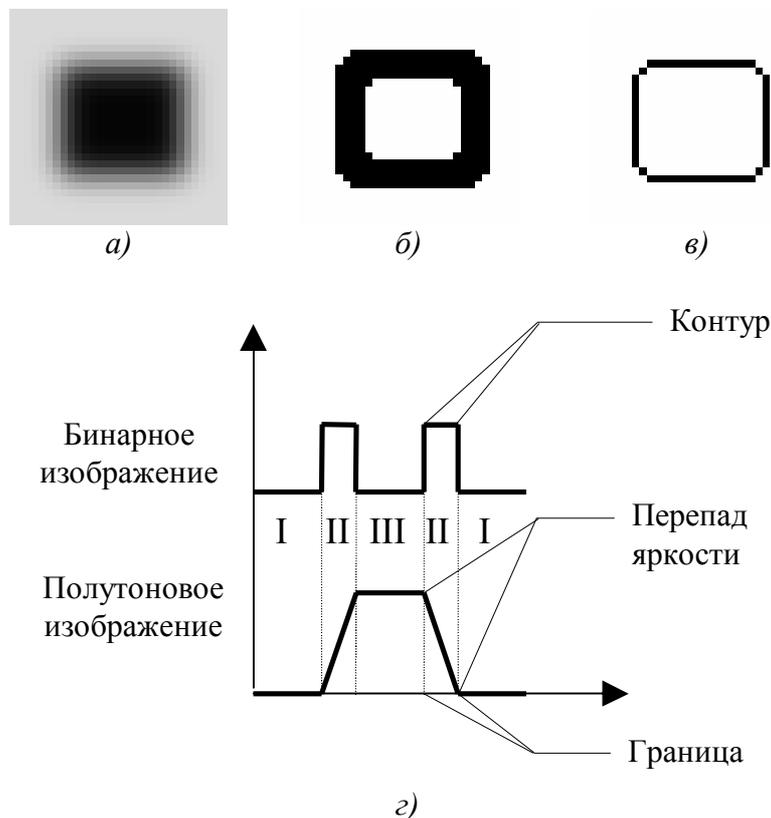


Рис. 2.4. Выделение перепадов яркости на полутоновом изображении

Контурная линия – это линия, ограничивающая объект, а так как объекты отличаются от фона своей яркостью, то можно считать, что линия контура должна проходить в местах наибольшего перепада яркости на изображении (рис. 2.4, в).

Средняя линия объекта (скелет) – это линия единичной ширины в поперечном сечении, проходящая через точки, равноудаленные от края

объекта (рис. 2.5). Она обычно проходит через пиксели локальных максимумов. Локальные максимумы определяются как точки, равноудаленные от края объекта.

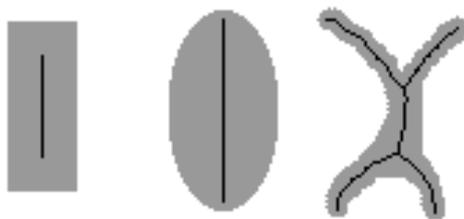


Рис. 2.5. Примеры средней линии разных объектов

Основными операциями, используемыми при обработке изображений клеточных структур, являются сегментация изображений с целью выделения объектов, определение средних линий объектов и выделение границ (контуров) объектов изображений. Рассмотрим эти операции более подробно.

2.2. Сегментация изображений

Сегментация предназначена для выделения на изображениях областей с определёнными свойствами. Такие области обычно соответствуют объектам или их частям, которые определяют исследователи. Результатом сегментации является бинарное или иерархическое (мультифазное) изображение, в котором каждый уровень (фаза) изображения соответствует конкретному классу выделенных объектов.

Сегментация является сложным моментом в обработке и анализе медицинских изображений биологической ткани, так как необходимо выделять области, соответствующие различным объектам или структурам на гистологических препаратах: клеткам, органоидам, артефактам и т. д. Это связано с высокой вариабельностью их характеристик, слабой контрастностью обрабатываемых изображений и сложной геометрической организацией объектов.

По математическому аппарату, используемому для реализации методов сегментации, они делятся на три вида:

- пороговая сегментация [22];
- морфологическая сегментация [68];
- объединение (наращивание) областей [21].

Разумеется, во многих случаях для получения более эффективного результата можно последовательно использовать разные методы сегментации. Например, для выделения границ используется операция морфологического градиента, после которой для фрагментов, соответ-

вующих небольшим перепадам яркости, проводится пороговая сегментация. Рассмотрим данные методы сегментации более подробно.

2.2.1. Пороговая сегментация

Пороговая сегментация является одним из самых простых и быстрых методов сегментации. Основная проблема пороговой сегментации заключается в определении порога, определяющего разбиение функции яркости на два или более уровня яркости. Рациональный выбор порога позволяет свести шумы и помехи, возникающие в реальных условиях, к минимуму. Порог может быть постоянным и адаптивным (изменяющимся в пространстве и времени) [21].

В первом случае он устанавливается заранее в виде некоторого определенного значения, не зависящего от свойств анализируемого изображения, и является постоянным по всему изображению [21]. Во втором случае порог формируется в результате некоторой обработки исходного изображения и задается только для фрагмента изображения [22]. Порог, постоянный по всему изображению, обычно определяют из гистограммы уровней яркости изображения. Это удобно, если объект и шум имеют разную интенсивность. Для получения бинарного изображения возможно применение нескольких порогов [21, 29]. В общем случае выражение для сегментации изображения по двум порогам можно записать в следующем виде:

– для общих порогов

$$B(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{при } T_1 < S(x, y) < T_2; \\ 0 & \text{во всех остальных случаях;} \end{cases}$$

– для локальных порогов

$$B(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{при } S_1(x, y) < S(x, y) < S_2(x, y); \\ 0 & \text{во всех остальных случаях,} \end{cases}$$

где T_1 и T_2 , $S_1(x, y)$ и $S_2(x, y)$ – общие и локальные пороговые значения; $B(x, y)$ – значение пикселя результирующего изображения; $S(x, y)$ – пиксель исходного изображения.

В случае использования более двух порогов для отображения результата одного бинарного изображения сегментация выполняется по формуле

$$B(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{при } S_1(x, y) < S(x, y) < S_2(x, y); \\ 2 & \text{при } S_2(x, y) < S(x, y) < S_3(x, y); \\ \dots & \dots \\ n & \text{при } S_n(x, y) < S(x, y) < S_{n+1}(x, y); \\ 0 & \text{во всех остальных случаях.} \end{cases}$$

В этом случае для отображения результата используется иерархическое изображение [3].

Пороговые значения могут интерактивно задаваться пользователем и автоматически определяться с помощью анализа гистограммы полутоновой величины, некоторых статистических методов или посредством задания определенных параметров.

Примером использования полуавтоматических методов является выбор значений порогов по среднему значению яркости и стандартному отклонению [22]:

$$S = \begin{cases} 1 & \text{при } (k_1\mu - k_2\sigma) < S(x, y) \leq (k_1\mu + k_2\sigma); \\ 0 & \text{в остальных случаях,} \end{cases}$$

где μ – среднее значение; σ – дисперсия; k_1, k_2 – корректирующие коэффициенты.

Наиболее популярным полуавтоматическим методом является определение порогов по процентному соотношению, где пользователь задает процент площади, занимаемой объектами. Процент соответствует границе этой площади.

Существует достаточно автоматических методов сегментации, которые зависят от конкретных задач сегментации. Один чрезвычайно простой способ нахождения подходящего порога состоит в том, чтобы сначала определить каждый из пиков гистограммы (локальные максимумы), а затем найти долину (минимум) между ними. Этот метод носит название ватершета, или выделения долин, и позволяет определять несколько порогов без специальной модификации алгоритма сегментации.

Очень распространены методы перебора порогов, при которых определяется оптимальный по определенным условиям. Самый распространенный среди них – метод Отсу [22]. Цель этого метода состоит в том, чтобы выбрать порог, который минимизирует отношение объединенной дисперсии к дисперсии между классами, определяемыми разбиением гистограммы на пороги.

Общая дисперсия определяется как

$$\sigma_{\text{Within}}^2(T) = n_b(T) \cdot \sigma_B^2(T) + n_o(T) \cdot \sigma_o^2(T),$$

Где $n_b(T) = \sum_{i=0}^{T-1} p(i)$, $n_o(T) = \sum_{i=T}^{N-1} p(i)$ – количество элементов в классах;

$\sigma_B^2(T)$, $\sigma_o^2(T)$ – дисперсия внутри классов; T – порог.

Дисперсия между классами определяется как

$$\sigma_{\text{Between}}^2(T) = n_b(T) \cdot n_o(T) \cdot [\mu_b(T) - \mu_o(T)]^2,$$

где μ – среднее значение в классе.

В связи с тем что перебор порогов производится через единицу, расчет количества элементов в классе и среднего значения можно оптимизировать:

$$\begin{aligned} n_b(T+1) &= n_b(T) + n_T; \\ n_o(T+1) &= n_o(T) - n_T; \\ \mu_b(T+1) &= \frac{\mu_b(T) \cdot n_b(T) + n_T \cdot T}{n_b(T+1)}; \\ \mu_o(T+1) &= \frac{\mu_o(T) \cdot n_o(T) - n_T \cdot T}{n_o(T+1)}. \end{aligned}$$

Существует еще целый класс методов автоматического определения порогов, носящих название мультиспектральных. В его основе лежит разбиение гистограммы на ряд распределений с заранее определенной формой. Наиболее популярно разложение гистограммы по гауссовым распределениям. Порог определяется в точках пересечения этих распределений.

2.2.2. Морфологическая сегментация

В основе морфологической сегментации лежат методы математической морфологии. Морфологическая сегментация применяется к объектам, которые характеризуются пространственными особенностями, такими как размеры, форма, контраст, связность.

Математическая морфология является математическим аппаратом, оперирующим геометрическими образами. Основные понятия приведены в работах [77, 21, 35]. Операции бинарной и мультифазной математической морфологии рассматривают объект на изображении как мно-

жество. Поэтому в основе этого аппарата лежат следующие основные операции с множествами:

- трансляция: $X_t = \{x | x-t \in X\}$;
- дополнение: $X^c = \{x | x \notin X\}$;
- пересечение: $X \cap Y = \{x | x \in X \text{ and } x \in Y\}$;
- объединение: $X \cup Y = \{x | x \in X \text{ or } x \in Y\}$;
- отражение: $!X = \{x | -x \in X\}$;
- различие: $X \setminus Y = \{X \cap Y^c\}$;
- масштабирование: $a \cdot X = \{a \cdot x | x \in X\}$.

Чаще всего в качестве множеств используется само изображение и его структурирующий элемент (СЭ). На основании этого выделяют две операции, являющиеся базовыми для большинства остальных:

– дилатацию: $A \oplus B = \bigcup_{b \in B} A_b$;

– эрозию: $A \ominus B = \bigcap_{b \in B} A_b = (A^c \oplus B)^c$, если B симметричный элемент,

и $A \ominus B = (A^c \oplus \check{B})^c$, если $\check{B} = \{-b, b \in B\}$.

Эти две операции могут применяться в различных комбинациях для получения новых операций [65, 67], например операции отмыкания $A \circ B = (A \ominus B) \oplus B$ и операции замыкания $A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B$.

Первоначально математическая морфология использовалась для бинарных изображений, затем с введением понятия проекции [35, 77]

$$U(f) = \{(x, y) : x \in D(f)\},$$

где f – функция $f(x, y)$, $D(f)$ – объем, ограниченный функцией, понятия эрозии и дилатации были переопределены для полутоновых изображений:

$$U(A \ominus B) = U(A) \ominus U(B);$$

$$U(A \oplus B) = U(A) \oplus U(B).$$

Исторически сложилось так, что на практике в полутоновой морфологии чаще используется двухмерный СЭ в двухмерной плоскости изображений. Обработка изображения с его помощью влияет только на геометрические свойства объектов. Поэтому работа с объектами похожа на обработку бинарного изображения, при которой эрозия и дилатация определяются как

$$A \ominus B = \min(A(x) : x \in B);$$

$$A \oplus B = \max(A(x):x \in B),$$

где *min* и *max* – функции минимума и максимума.

Для цветных изображений базовые методы математической морфологии используются так же, как для полутоновых, только для каждой характеристики цвета в отдельности [46] или по одной искусственной оси, объединяющей свойства всех остальных.

Другие методы, которые можно отнести к математической морфологии, основаны на определении связности. Основные из них – утоньшение, удаление отдельных ветвей, заполнение пустот, идентификация.

Полезной операцией является заполнение пустот в объектах. Она выполняется исключительно для бинарных и мультифазных изображений и часто используется для коррекции дефектов объектов.

Интересной операцией математической морфологии является HitOrMiss – обобщенная двойная морфологическая операция, которая используется для поиска специфических объектов или элементов на изображении:

$$HMT(A, B_1, B_2) = (A \ominus B_1) \cap (A^C \ominus B_2),$$

где A – исходное изображение; A^C – инвертированное изображение; B_1, B_2 – структурирующие элементы.

Данная операция может использоваться для определения таких важных топологических элементов, как окончания ветвей, точки седла, узлы ветвей и т. д.

Основное назначение аппарата математической морфологии – сегментация объекта по форме или выделение геометрических свойств, которые будут использоваться для последующей сегментации объектов. Эффективность этого метода подтверждает то, что в большинстве работ по сегментации присутствуют элементы математической морфологии [59, 64, 68, 81].

2.2.3. Нарращивание областей

Метод наращивания областей состоит в том, что соседние элементы изображения, характеристики которых удовлетворяют какому-либо условию, группируются вместе и образуют область [21]. Условия группировки зависят от задач сегментации. В самом простом случае группируют элементы по яркости, но этот способ сильно уступает по скорости выполнения сегментации остальным. Для наращивания областей часто используются функции энергии [81], функции Байеса [83], вейвлет и свойства фракталов, а также аппарат нейронных сетей.

Наращивание областей может происходить по-разному. Наиболее простой способ – поточечное наращивание [21, 72]. Начальный пиксель определяется как область, и если он удовлетворяет необходимым условиям, к нему присоединяется соседняя область. Другой способ основан на моделях, подобных активному контуру [67], и модели «Змей» [81]. Здесь рассчитываются сглаживающие и растягивающие силы, действующие на контур области.

Объединение областей можно выполнить с учетом самых разных условий в зависимости от задач сегментации, например таких, как сравнение средних значений полутоновых величин в областях [21], распределение вероятности [67], фрактальной размерности, текстурных примитивов, энтропии, энергии [81].

Изначально метод наращивания областей заключался в том, что на изображении каким-либо образом определялись начальные области или точки, которые являются начальными «атомами» для роста. «Засевание атомами» – не оптимальный метод, так как редкое «засевание» приводит к потере важных областей, а частое замедляет процесс и может привести к появлению шумов. Большинство современных методов роста областей являются дополнением к методам морфологической сегментации, в частности к ватершеду. С их помощью проверяются граничные пиксели по каким-то заранее установленным условиям, и, если условие удовлетворяется, пиксель присоединяется к первоначальной области. Процесс повторяется до тех пор, пока для областей не останется ни одной граничной точки, удовлетворяющей поставленным условиям. После того как изображение заполнено, выполняется одна из двух операций – разделение или объединение областей [21, 81].

Разделение является сложной операцией, предназначенной для того, чтобы компенсировать неудовлетворительное определение начальных областей на изображении, от которых началось наращивание. В разных алгоритмах это делается по-разному, но чаще всего либо разбиением на простые геометрические фигуры, либо введением дополнительных начальных областей («атомов») [81].

2.2.4. Новые направления в сегментации изображений

Кроме указанных выше способов сегментации существует много других. Абсолютное большинство из них базируется на анализе и выделении областей. Области на изображении имеют множество характеристик, в частности текстуру, внутреннюю структуру, геометрическую форму и ориентацию в пространстве. Все эти признаки используются для сегментации.

Одним из интересных направлений сегментации является фрактальный анализ. В основе работ [39, 49] лежит описание текстур, кото-

рые могут быть смоделированы фракталами. Кроме того, в работах обсуждаются параметры фракталов, способствующие сегментации. Возможности такого подхода до конца не изучены и могут в дальнейшем развиваться.

Перспективным направлением является использование возможностей вейвлет-преобразования для сегментации изображения. В работах [51, 64] детально обсуждаются теория вейвлета и его приложения. Предлагаемые для сегментации схемы применяются через функцию локальной энергии двух размерностей вейвлет-преобразования. Их можно разделить на четыре основные стадии:

- свертка изображения вейвлет-преобразованием, в результате которого имеем множество вейвлет-деталей изображения;
- определение множества локальной энергии изображений и удаление фаз в зависимости от деталей изображения;
- слияние пространства масштабов, которое включает кластеризацию масштабов и определение ориентации слияния;
- кластеризация текстурных особенностей и фона.

С развитием теории графов и генетических алгоритмов эти методы стали активно использоваться для распознавания образов, а в последнее время – для сегментации изображений. Основная идея заключается в том, что организуется база данных из признаков и образов, в которой соблюдается иерархия их развития. При сегментации она используется для выделения областей [48, 60].

При более сложных методах сегментации используются нейронные сети [55, 57]. Эта техника сейчас успешно применяется для анализа изображений, которые получаются от различных сенсоров. В анализаторах изображений она является мощным средством выделения объектов.

Сеть представляет собой нециклический граф [52, 57], в вершине которого лежат признаки и образы, характеризующие изображения, в корнях дерева находятся решения о сегментации. Узлы в сети называются нейронами и имеют распределительные функции. Каждый из них характеризуется входными (причинными) и выходными (диагностическими) каналами, причём каждый канал имеет свой вес и порог. Нейрон принимает решение на основе весовой функции, являющейся комбинацией предыдущих параметров. Для определения областей изображение чаще всего разбивается на множество небольших окошек, по которым проводится ряд статистических измерений, выявляющих определённые отличия для типов текстур внутри вычисляемого окошка [48, 57]. Затем с помощью нейронной сети эти окошки классифицируются и в случае необходимости разбиваются или объединяются, образуя сегментированный образ.

Нейронные сети для сегментации областей позволяют использовать различную информацию. Кроме того, в работу сети можно заложить возможность обучения, т. е. пополнить базу данных, необходимую для сегментации, или изменить условия для отдельных нейронов [57]. Поэтому использование сети для сегментации изображений, особенно текстурных, является достаточно перспективным направлением.

2.3. Выделение средних линий объектов изображений

2.3.1. Анализ алгоритмов выделения средних линий

Выделение средних линий (утонышение) базируется на эрозии, которая сжимает объект до тех пор, пока не останется линия единичной ширины, хранящая топологическую информацию об объекте [7, 21].

Результат утонышения часто называется скелетом. Общие требования для результатов утонышения полутонового изображения были сформулированы в работах [21, 30, 47, 63] в следующем виде:

- скелет должен сохранять топологию объекта;
- если объект связный, то результат тоже должен быть связным, т. е. утонышение не должно менять топологию объекта;
- скелет должен проходить через центральные пиксели объекта, в полутоновых изображениях это пиксели с наибольшей величиной яркости;
- скелет должен быть инвариантен относительно вращения, по крайней мере при повороте на углы, кратные $\pi/2$;
- скелет должен быть толщиной в один пиксель.

Алгоритмы утонышения можно классифицировать по методике проверки окрестности: алгоритмы, основанные на использовании принципов математической морфологии [30, 82], дистанционных преобразований [32, 71, 73], на основе преобразования HitorMiss, градиентных методов для точного определения границ. В последнее время появились работы, использующие Гауссову фильтрацию и методы активного контура как элементы утонышения.

Большинство алгоритмов утонышения являются итерационными, т. е. последовательно удаляют или уменьшают значения пикселей на границе объекта до тех пор, пока не останется только скелет. Итерационные алгоритмы делятся на четырехпроходные, двухпроходные и однопроходные. Итерация четырехпроходного алгоритма последовательно обрабатывает пиксели каждой из четырех сторон (севера, юга, запада, востока). Первая подытерация двухпроходного алгоритма анализирует и удаляет северо-западные угловые точки на юго-восточной границе, другая – юго-восточные угловые точки на северо-западной границе.

В однопроходных алгоритмах обрабатываются все граничные точки за одну подытерацию.

Рассмотрим, например, четырехпроходной алгоритм Дависа-Плюмера (рис. 2.6, б). В основе алгоритма лежат построчный анализ и обработка пикселей изображения [7], где на каждом шаге утоньшения краевые для своего уровня пиксели, не являющиеся элементами дуги и не влияющие на связность объекта, уменьшаются до уровня фона.

Обработка осуществляется за четыре прохода, а именно для верхнего, нижнего, правого и левого краев. Значения пикселей меняются в соответствии со следующими условиями, каждое из которых выполняется в отдельной итерации:

1. $X = \text{not } p_2 \text{ and } p_6$ (пиксель является граничной точкой) and X (пиксель принадлежит объекту) and ($\text{not } p_1 \text{ and } p_4 \text{ or } \text{not } p_3 \text{ and } p_0 \text{ or } p_0 \text{ and } p_4$) (пиксель не является элементом дуги и точкой конца).

2. $X = \text{not } p_6 \text{ and } p_2 \text{ and } X$ and ($\text{not } p_5 \text{ and } p_0 \text{ or } \text{not } p_7 \text{ and } p_4 \text{ or } p_4 \text{ and } p_0$).

3. $X = \text{not } p_4 \text{ and } p_0 \text{ and } X$ and ($\text{not } p_3 \text{ and } p_6 \text{ or } \text{not } p_5 \text{ and } p_2 \text{ or } p_2 \text{ and } p_6$).

4. $X = \text{not } p_0 \text{ and } p_4 \text{ and } X$ and ($\text{not } p_7 \text{ and } p_2 \text{ or } \text{not } p_1 \text{ and } p_6 \text{ or } p_6 \text{ and } p_2$).

Номера пикселей здесь соответствуют рис. 2.1.

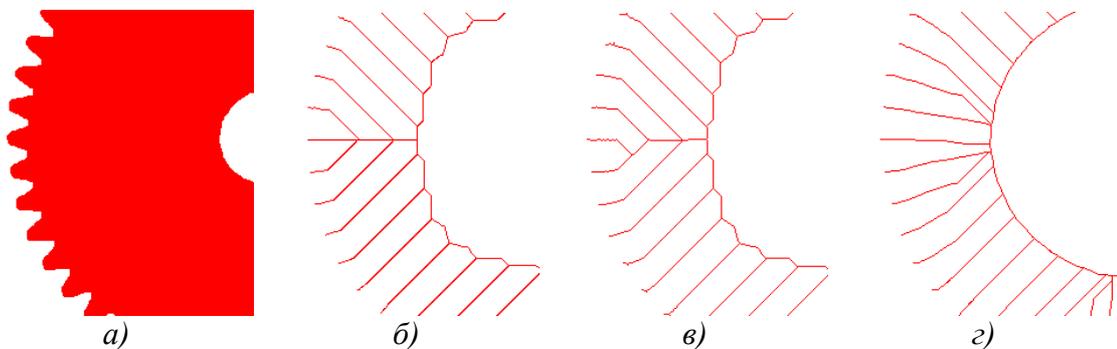


Рис. 2.6. Примеры утоньшения: а) исходное бинарное изображение; б) утоньшение четырехитерационным алгоритмом Дависа-Плюмера; в) двухитерационным алгоритмом Занга-Суена; г) на основе дистанционного преобразования на Евклидовой метрике

Примером двухпроходного алгоритма является алгоритм Занга-Суена (рис. 2.6, в). Изменение пикселя на значение фона в этом алгоритме происходит при выполнении следующих условий:

– $2 \leq \sum p_i \leq 6$ (пиксель не является точкой конца и является граничной точкой);

– $\Sigma(p_i \text{ and } p_{i+1})=1$ (пиксель не связывает две отдельные области объекта);

– *not* $((p_0 \text{ and } p_2 \text{ and } p_4) \text{ or } (p_0 \text{ and } p_4 \text{ and } p_6))$ для первой итерации;
not $((p_0 \text{ and } p_2 \text{ and } p_4) \text{ or } (p_0 \text{ and } p_4 \text{ and } p_6))$ для второй итерации (необходимость сохранения связности при удалении пикселя).

Алгоритмы данного типа считаются самыми быстрыми среди итерационных, но результаты их работы отличаются от четырехпроходных.

Алгоритмы, выполняемые на основе дистанционных преобразований (рис. 2.6, *г*), строят скелет, определенным образом соединяя локальные максимумы [73]. Линии соединения проходят через точки седла по направлению максимального градиента. Эта операция выполняется за один проход, не считая построения дистанционной карты и поиска на ней локальных максимумов.

По типу операций алгоритмы утоньшения разделяются на последовательные и параллельные. В последовательном алгоритме пиксели проверяются в фиксированной последовательности в каждой итерации, и удаление конкретного пикселя зависит от всех операций, выполненных до сих пор, т. е. от результата предыдущей итерации и от значения пикселей, уже обработанных текущей итерацией. В параллельных алгоритмах существует зависимость только от предыдущей итерации.

Удаление отдельных ветвей [7, 30, 31] используется для борьбы с шумами и артефактами на изображении. Эта операция обычно полностью или частично удаляет линии единичной толщины, не замкнутые в контур. Чаще всего она используется после утоньшения для решения частных задач.

Известно много алгоритмов утоньшения для бинарных изображений [31, 50, 58, 63]. Однако в задачах обработки медицинских изображений необходимо полутоновое представление исходных данных, что создает дополнительную сложность для задач анализа изображений. В большинстве случаев объекты таких изображений не имеют четких границ и зашумлены. Эти факторы приводят к определенным трудностям при создании алгоритмов полутонового утоньшения.

В работах [30, 68] задачи полутонового утоньшения разделяются на два типа:

1) утоньшение только конкретных объектов или областей исходного изображения;

2) обработка всего исходного изображения как области для утоньшения.

В связи с тем что большинство задач принадлежит ко второму типу и алгоритмы, разработанные для этого типа, с успехом применяются и для первого типа, в дальнейшем будем рассматривать только задачи второго типа.

Абсолютное большинство алгоритмов полутонового утоньшения является обобщением бинарных методов. Алгоритмы, использующие дистанционное преобразование, анализируют образования из множества областей, имеющих приблизительно одинаковую яркость. В этом случае скелет объектов изображения представляется рядом центров. Другим способом адаптации алгоритмов утоньшения к полутоновым изображениям является использование и анализ карты расстояний полутонового изображения.

Для адаптации итерационных алгоритмов вместо бинарных значений пикселей [58, 62] рассматриваются их полутоновая яркость и яркости окружения пикселей. Если в условии проверки пикселя на удаление для бинарного изображения стоит бинарное значение p , символизирующее принадлежность пикселя к объекту, то для полутонового изображения делается замена на неравенство $p \geq X$ и соответственно там, где в бинарном варианте проверяется значение p на равенство нулю (т. е. отрицание p - *not p*), делается замена на неравенство $p < X$.

2.3.2. Алгоритмы утоньшения полутоновых изображений

Для данного алгоритма будем рассматривать полутоновое изображение как набор слоев (по подобию топологической модели), где каждый слой можно обрабатывать как бинарное изображение определенного уровня. Следует отметить, что при обработке одного слоя необходимо рассматривать и слой, лежащий выше него. И если по очереди проводить бинарную обработку каждого слоя начиная с верхнего уровня, то результат обработки последнего уровня будет соответствовать результату обработки всего полутонового изображения.

В основе алгоритма лежит построчный анализ и обработка пикселей изображения. На каждом шаге утоньшения краевые для своего уровня пиксели, не являющиеся элементами дуги и не влияющие на связность объекта, уменьшаются до уровня фона.

Выделим две основные операции при утоньшении: анализ пикселя и его окрестности и изменение пикселя на новое значение. Рассмотрим данные операции более подробно.

Анализ пикселя перед обработкой осуществляется за четыре прохода, а именно для верхнего, нижнего, правого и левого краев. За каждый проход значение пикселя изменяется в соответствии со следующими условиям:

$P = \text{not } p_2 \text{ and } p_6 \text{ and } P \text{ and } (\text{not } p_1 \text{ and } p_4 \text{ or } \text{not } p_3 \text{ and } p_0 \text{ or } p_0 \text{ and } p_4);$
 $P = \text{not } p_6 \text{ and } p_2 \text{ and } P \text{ and } (\text{not } p_5 \text{ and } p_0 \text{ or } \text{not } p_7 \text{ and } p_4 \text{ or } p_4 \text{ and } p_0);$
 $P = \text{not } p_4 \text{ and } p_0 \text{ and } P \text{ and } (\text{not } p_3 \text{ and } p_6 \text{ or } \text{not } p_5 \text{ and } p_2 \text{ or } p_2 \text{ and } p_6);$
 $P = \text{not } p_0 \text{ and } p_4 \text{ and } P \text{ and } (\text{not } p_7 \text{ and } p_2 \text{ or } \text{not } p_1 \text{ and } p_6 \text{ or } p_6 \text{ and } p_2),$

где P – центральный пиксель; p_x – его окружение для $x=0,1,\dots,7$.

В полутоновом случае требуется произвести замену значений бинарных пикселей на неравенства, характеризующие яркость изменяемого пикселя. Таким образом, если для пикселя ($p_x, x=0,\dots,7$) из его 8-окружения на бинарном изображении проверяется значение на условие равенства единице, то на полутоновом изображении ему будет соответствовать проверка полутоновой величины соседнего пикселя на превышение значения p . Таким образом, если в условии проверки для бинарного изображения стоит значение p_x , то для полутонового изображения делается замена на неравенство $p_x \geq P$, и соответственно там, где в бинарном варианте проверяется значение p_x на равенство нулю (т. е. отрицание p_x - *not* p_x), в полутоновом случае делается замена на неравенство $p_x < P$.

Подобная замена происходит в большинстве алгоритмов полутонового утоньшения [30, 82]. Если для упрощения выражений вынести проверку существования x как отдельное условие, то условия проверки для соответствующих направлений будут следующими:

если $p_2 < P$ and $p_6 \geq P$ and ($p_1 < P$ and $p_4 \geq P$ or $p_3 < P$ and $p_0 \geq P$ or $p_0 \geq P$ and $p_4 \geq P$), то пиксель изменяется;

если $p_6 < P$ and $p_2 \geq P$ and ($p_5 < P$ and $p_0 \geq P$ or $p_7 < P$ and $p_4 \geq P$ or $p_4 \geq P$ and $p_0 \geq P$), то пиксель изменяется;

если $p_4 < P$ and $p_0 \geq P$ and ($p_3 < P$ and $p_6 \geq P$ or $p_5 < P$ and $p_2 \geq P$ or $p_2 \geq P$ and $p_6 \geq P$), то пиксель изменяется;

если $p_0 < P$ and $p_4 \geq P$ and ($p_7 < P$ and $p_2 \geq P$ or $p_1 < P$ and $p_6 \geq P$ or $p_6 \geq P$ and $p_2 \geq P$), то пиксель изменяется.

Далее встает довольно сложная задача изменения пикселя, удовлетворяющего вышеуказанным условиям. Большинство существующих алгоритмов присваивает пикселю либо значение фона [30, 47], либо значение минимального соседа из его 8-окрестности [33, 62, 63], причем в некоторых работах объект рассматривается как набор бинарных плоскостей и обработка идет от уровня фона к максимальному уровню. Эти условия прекрасно работают для задач, в которых обрабатывается отдельный объект на равномерном фоне, но они не пригодны для утоньшения полутонового изображения целиком. Были разработаны три способа изменения анализируемого пикселя: последовательная обработка полутоновых слоёв, одновременная обработка полутоновых слоёв, одновременная обработка с максимизацией значения пикселя.

Наиболее простым действием для изменения анализируемого пикселя является уменьшение его полутоновой величины на единицу. Существует два способа решения этой задачи: последовательная и одновременная обработка полутоновых слоев.

Последовательная обработка полутоновых слоёв является самым точным способом и заключается в последовательном утоньшении каждого полутонового уровня. Обработка проводится от максимального уровня к минимальному, причем при утоньшении определенного уровня все нижележащие уровни рассматриваются как фон, а уже обработанные уровни, полутоновая величина которых лежит выше величины обрабатываемого слоя, принимаются за готовую часть скелета, тем самым изменяя вектор скорости утоньшения в свою сторону. В этом случае уменьшение значения пикселя на единицу позволяет учитывать его при обработке следующего слоя. Подобный алгоритм приводит к довольно качественному результату (рис. 2.7, 2.8), но не отличается быстродействием:

```
FOR I=maxlevel TO 1 STEP -1  
  K=(Level I AND Levels More Than I)  
  THINNING(K)  
NEXT
```

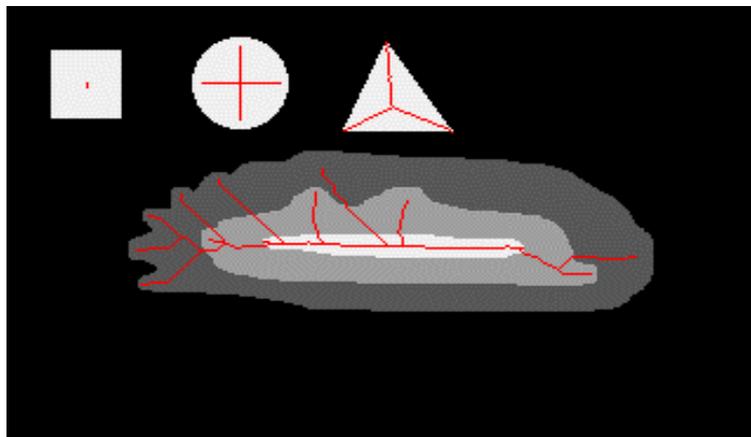


Рис. 2.7. Результат обработки тестового изображения посредством последовательного утоньшения полутоновых слоёв

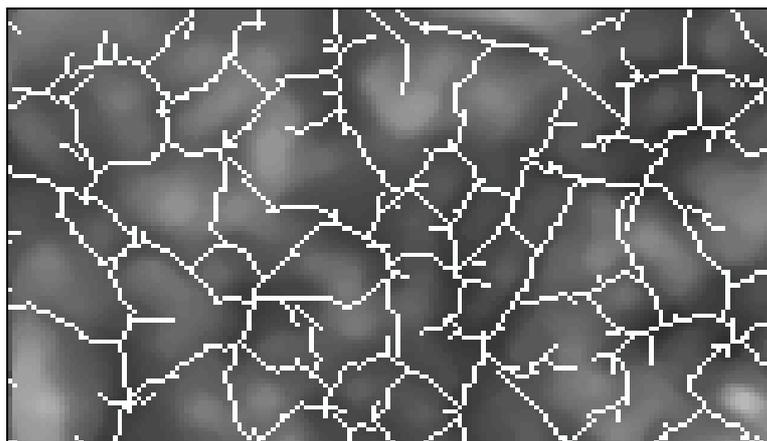


Рис. 2.8. Результат обработки изображения волокон посредством последовательного утоньшения полутоновых краёв

Одновременная обработка полутоновых слоёв заключается в уменьшении изменяемых пикселей на единицу за одну итерацию. В этом случае происходит удаление поверхностного слоя пикселей, принадлежащих склонам топологической поверхности изображения:

IF (*pixel* удовлетворяет условиям утоньшения) THEN $pixel = pixel - 1$.

Повторение подобных операций приводит к тому, что промежуточные плато уменьшаются до тех пор, пока не исчезнут или не станут элементами скелета (рис. 2.9).

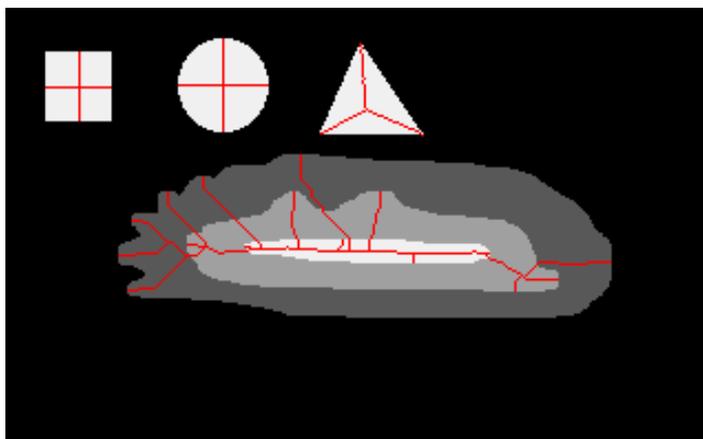


Рис. 2.9. Результат утоньшения всех слоёв одновременно с уменьшением обрабатываемого пикселя на единицу

Видно, что результирующие скелеты обоих вариантов сильно отличаются и скелет, представленный на рис. 2.9, является не совсем верным. Такой эффект возникает из-за того, что диагональные краевые пиксели обрабатываются несколькими проходами в цикле. Помечая об-

работанные пиксели на дополнительном изображении – маске, удастся избежать повторной обработки пикселей в цикле. Данная операция позволяет добиться такого же результата, как на рис 2.7.

В сложных полутоновых изображениях существуют отличия между результатами, полученными посредством применения этих способов (рис. 2.10). Они проявляются в образовании неявных небольших ветвей, что связано с разной скоростью утоньшения слоёв.

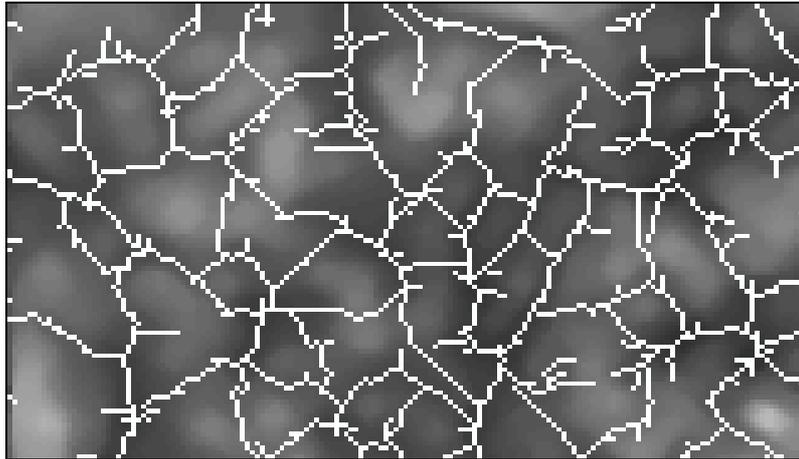


Рис. 2.10. Результат утоньшения всех слоев одновременно с уменьшением обрабатываемого пикселя на единицу

Одновременная обработка с максимизацией значения пикселя начинает работать еще быстрее, если значению изменяемого пикселя присваивать значение максимального соседа из его окружения, полутоновая величина которого не превышает величину изменяемого пикселя:

$$\text{IF}(X \text{ удовлетворяет условиям утоньшения}) \\ \text{THEN } X = \text{MAX}(p_i, p_i < X, i=1,2,\dots,8),$$

где X – значение изменяемого пикселя; p_i – множество, состоящее из 8-соседей X .

Подобная модернизация не приводит к сильным отличиям результата утоньшения на простых изображениях (см. рис. 2.7), но в сложных изображениях в зависимости от уменьшения пикселя направление вектора скорости утоньшения может сильно измениться и внести серьезные погрешности в результат (рис. 2.11).

Результатом подобных преобразований является полутоновой скелет объекта, пригодный для анализа образов, но не очень удобный для автоматических измерений, которые часто приходится выполнять на бинарных изображениях. С этой целью предлагается бинаризовать полученное изображение.

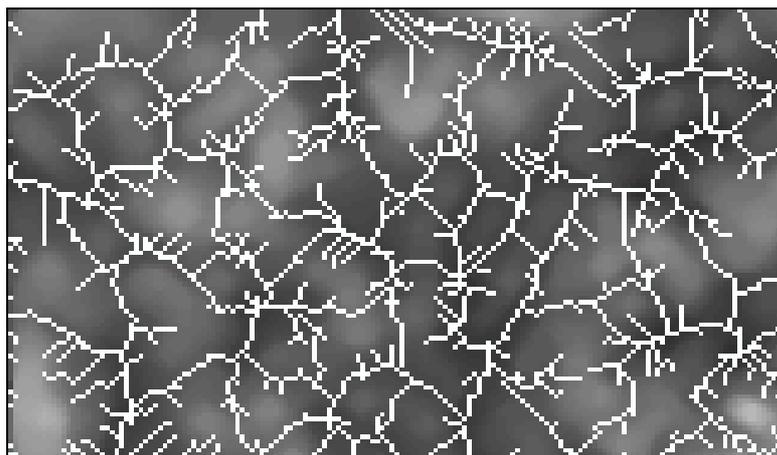


Рис. 2.11. Результат обработки тестового изображения посредством последовательного утоньшения полутоновых краёв с изменением анализируемого пикселя на значение максимального соседа из минимального окружения

Бинаризация проводится за один проход изображения. Если у обрабатываемого пикселя хотя бы один из четырех соседей (p_0, p_2, p_4, p_6) меньше его или все диагональные соседи (p_1, p_3, p_5, p_7) меньше его, то значение пикселя приравнивается к 1, в противном случае – к 0:

IF ($X > p_0$ or $X > p_4$ or $X > p_2$ or $X > p_6$) or ($X > p_1$ and $X > p_3$ and $X > p_5$ and $X > p_7$) THEN $X=1$ ELSE $X=0$.

Предложенные алгоритмы, использующие изменения первого и второго типа, позволяют качественно выполнять скелетизацию полутонового изображения. Для алгоритма, использующего изменение третьего типа, получаются качественные скелеты для контрастных полутоновых изображений с небольшим количеством уровней, причем это приводит к значительному выигрышу в скорости по сравнению с остальными алгоритмами. В сложных слабоконтрастных изображениях этот алгоритм не только теряет свое преимущество, но и приводит часто к неправильному результату.

2.4. Выделение границ объектов

Сегментация, основанная на выделении границ, представлена большой группой методов, основанных на информации о границе объектов изображения. Это один из старейших подходов к сегментации изображений. В его основе лежат выделение границ объектов и составление их описания. Границы определяются посредством специальных операторов, наиболее известными из которых являются операторы Прэвитта, Собеля, Робетса, Лапласа, Канни и т. д. Границы, полученные с

помощью этих операторов, не являются конечным результатом сегментации, так как из них необходимо выделить граничные линии единичной ширины. При этом возникает множество проблем, связанных с появлением ложных границ.

Ложные границы можно удалить посредством усредняющей фильтрации или контрастирования. Цель фильтрации – улучшить изображения, содержащие шум, без удаления полезных деталей. Действие фильтрации иногда приводит к удалению некоторых объектов согласно какому-либо критерию размеров или особенностям контраста. В качестве улучшающих фильтров также используются линейные усредняющие фильтры, нелинейные распределительные фильтры, основанные на равенстве гармонических вершин, морфологические фильтры.

Для выделения границ также могут использоваться операции морфологического градиента или hat-top преобразования [35], благодаря которым получается изображение изменения яркостей пикселей. После этого в зависимости от решаемых задач выполняется утоньшение границ или операция ватершета [34, 35, 44].

Любое полутоновое изображение можно рассматривать как топологическую поверхность. Если от локальных минимумов начать заполнять впадины, предотвращая слияние заполнения, то получим линии водораздела, отделяющие области друг от друга. Области, которые заполняются первыми, сохраняются как локальные минимумы. Края, являющиеся линиями единичной толщины, скрываются под водой. Пиксели, скрывающиеся последними, сохраняются как линии водораздела. Если применить преобразование ватершета к градиенту изображения, области, ограниченные линиями водораздела, должны теоретически соответствовать однородным полутоновым областям.

Существует несколько алгоритмов ватершета: последовательные и параллельные. Среди последовательных наиболее известны алгоритмы Винсента-Сойла, компонентов графа, алгоритмы, выполняющиеся на основе вычисления топологического расстояния (простой очереди), и т. д. К параллельным относятся алгоритмы, использующие одновременный рост областей от локальных минимумов. Метод применяется как для бинарных, так и для полутоновых изображений.

Вместе с другими методами ватершет является мощным средством сегментации полутонового изображения.

Глава 3

Обработка полутоновых изображений клеточных структур

3.1. Представление гистологических объектов на изображении и порядок их обработки

Гистологические изображения характеризуются слабой контрастностью, затрудняющей выделение на них объектов. Повышение достоверности результатов сегментации гистологических объектов достигается благодаря определению специфических свойств отдельных объектов, что носит крайне индивидуальный характер и не может применяться для анализа гистологических изображений в целом.

Существует два основных направления решения данной задачи. Первое основывается на специфической обработке отдельных классов объектов, обуславливающей использование узкоспециализированных средств, второе – на определении общих свойств объектов, выделении крупных общих классов. Это направление дает менее качественный результат, но позволяет определять большие классы объектов. Оно является более перспективным, так как способствует расширению круга решаемых задач.

Для выбора метода сегментации необходимо провести классификацию гистологических объектов по их геометрическим и оптическим свойствам. На гистологических изображениях можно выделить четыре основных класса объектов:

- фрагменты ткани (текстурные объекты);
- сосуды и волокна в продольном сечении (протяженные объекты);
- клетки, ядра, сосуды и волокна в поперечном сечении (выпуклые объекты);
- клеточные включения и ядрышки (мелкие контрастные объекты).

Два последних класса в зависимости от окружающего фона делятся на подклассы. Сегментация должна определяться и для подклассов в соответствии со следующими основными методами:

- утоньшение протяженных объектов;

- пороговая сегментация;
- метематическая морфология;
- наращивание областей.

Отдельно следует отметить классификацию объектов посредством геометрических и топологических характеристик (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Методы сегментации гистологических объектов

Вид объектов	Характеристика объектов	Методы сегментации в зависимости от фона	
		равномерный	неравномерный
Площадные	Одельно лежащие одного типа	Пороговая сегментация	Методы математической морфологии
	Сопровождаемые объектами другого типа	То же	Методы наращивания областей
Протяженные	Длинные	– // –	Морфологическая сегментация, основанная на утоньшении
Мелкие контрастные	Маленького размера	– // –	Пороговая сегментация

3.2. Выделение сети сосудов и волокон посредством полутонного утоньшения

Сосуды и волокна в биологических тканях являются геометрически сложными объектами и отличаются непостоянной яркостью на изображении, что крайне затрудняет интерактивное измерение их геометрических и оптических характеристик. Именно поэтому автоматическая сегментация приобретает особое значение при решении подобных задач.

Изображение сосудов и волокон в продольном срезе редко отличается высокой контрастностью и однородностью, поэтому методы пороговой сегментации почти никогда не дают удовлетворительного результата.

Если рассматривать негатив изображения как топографическую местность, состоящую из хребтов и ущелий, то изображение средней линии, или скелета, сосудов или волокон будет соответствовать хребтам. Так как профиль яркости (график полутонной величины от геометрического смещения вдоль линии) поперечного сечения этих объектов по форме близок к Гауссовому распределению, то пиксель скелета находится в самой высокой точке яркости профиля. Хребты, принадлежащие фону изображения и шумам, чаще всего характеризуются невы-

сокой полутоновой величиной и удаляются после предварительной обработки пространственным низкочастотным или усредняющим медианным фильтром [15, 71].

Учитывая топографические особенности изображений данного типа, для выделения объектов можно применять методы математической морфологии. Хребты чаще всего определяются посредством полутонового утоньшения изображения.

В связи с особенностями восприятия человек слабо различает границы на ярком или слишком тёмном изображении (такие фрагменты встречаются при наличии клеток). Для компьютера эта особенность не критична, поэтому объекты выделяются более точно, чем при интерактивной сегментации, и результатом подобной обработки является качественное бинарное изображение сети сосудов и волокон.

В связи с тем что полученные скелеты являются хребтами изображений, для волокон или сосудов они соответствуют сети исследуемых объектов. Этот способ сегментации предназначен для определения сети сосудов или волокон при наличии однородного фона.

Большинство изображений гистологических препаратов при больших оптических увеличениях фона имеет текстурный характер. Это вносит множество помех в результат полутонового утоньшения. Поэтому для сегментации в подобных условиях необходимы существенные дополнения.

Для того чтобы выделить крупные нервные волокна головного мозга (рис. 3.1, *a*), недостаточно провести простое утоньшение, как это делалось для тонких сосудов или волокон (рис. 3.1, *б*), так как волокна имеют реальную толщину, которой нельзя пренебрегать.

При утоньшении полутонового изображения существует вероятность возникновения линий, не принадлежащих волокну. Основная причина их появления заключается в утоньшении хребтов, характеризующих неровности поверхности волокна и фона, возможные наложения различных элементов фона и волокна друг на друга. Это приводит к тому, что скелет оказывается в областях, не принадлежащих изображению волокон. Для определения таких областей необходимо выделить их границы. Поэтому проводится операция морфологического градиента (рис. 3.2, *a*)

$$I = (I \oplus M) - (I \ominus M),$$

где I – исходное изображение; M – структурный элемент морфологической обработки; \oplus – морфологическая операция дилатации; \ominus – морфологическая операция эрозии.

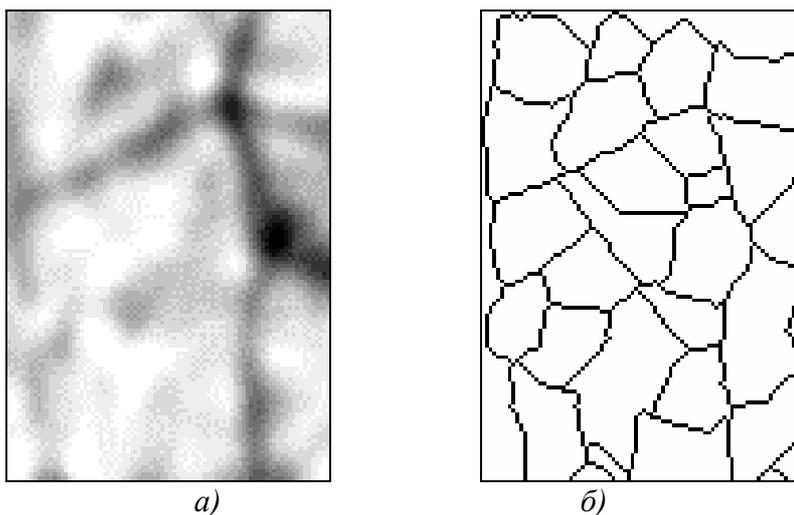


Рис. 3.1. Изображения нервных волокон головного мозга: *а)* полутоновое изображение; *б)* после обработки методом полутонового утоньшения

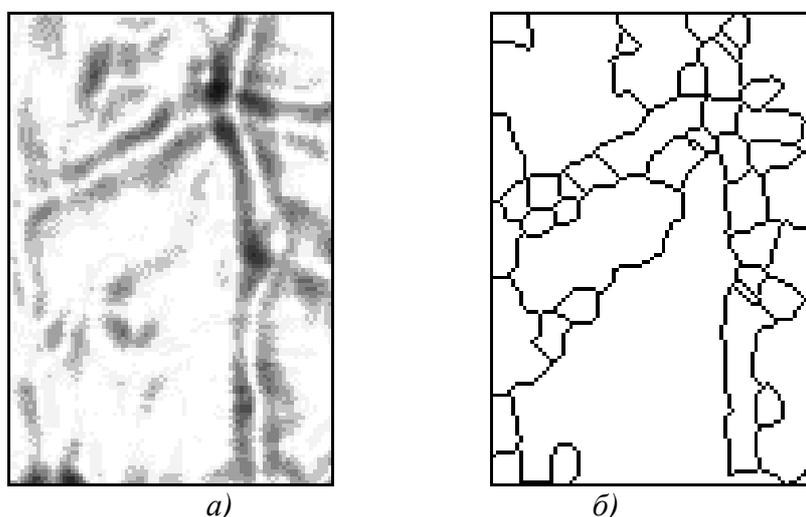


Рис. 3.2. Изображения волокон после обработки методами: *а)* градиентной морфологической фильтрации; *б)* утоньшения после градиентной фильтрации

Затем проводится операция полутонового утоньшения градиентного изображения волокна с удалением хвостов (рис. 3.2, *б*). В результате получается ряд областей, из которых отдельные принадлежат волокнам. Как указывалось выше, профиль яркости для перпендикулярного сечения волокна напоминает Гауссово распределение и имеет только один максимум. Поэтому в области, соответствующей волокну, будет присутствовать один и только один объект, принадлежащий средней линии, или скелету волокна. Область не удаляется, если для неё выполняются условия

$$\begin{cases} Bl < B < Bh; \\ S = 1, \end{cases}$$

где Bl и Bh – минимально и максимально возможная ширина волокна; B – среднее значение ширины волокна в области; S – число объектов, соответствующих средней линии.

Для того чтобы получить указанные выше характеристики, области измеряются как бинарные объекты. После этого для каждой области бинарной операции пересечения с изображением средних линий образуется комбинированное изображение и определяется количество 8-связных объектов, принадлежащих скелету исходного изображения. Затем удаляются оставшиеся области.

После удаления остаются области, соответствующие крупным волокнам (рис. 3.3, б). Для дальнейших операций достаточно объединить области. Таким образом получается бинарное изображение крупных сосудов (рис. 3.3, а).

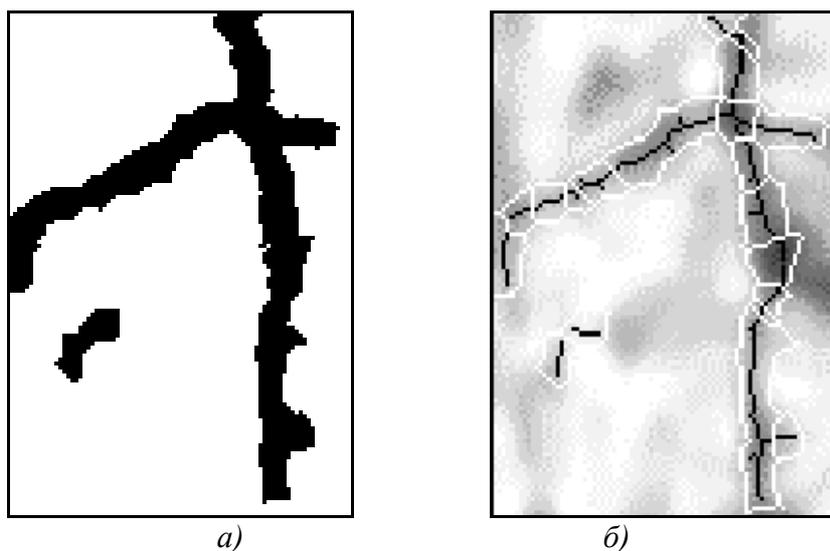


Рис. 3.3. Результат сегментации крупных волокон: а) бинарное изображение; б) наложение результата на полутоновое изображение, где волокно ограничено светлой линией, темной линией отмечен скелет волокна

Одной из основных особенностей полного алгоритма сегментации крупных волокон является то, что он состоит из двух ветвей. Это позволяет увеличить скорость при обработке изображения в многозадачном режиме (рис. 3.4).

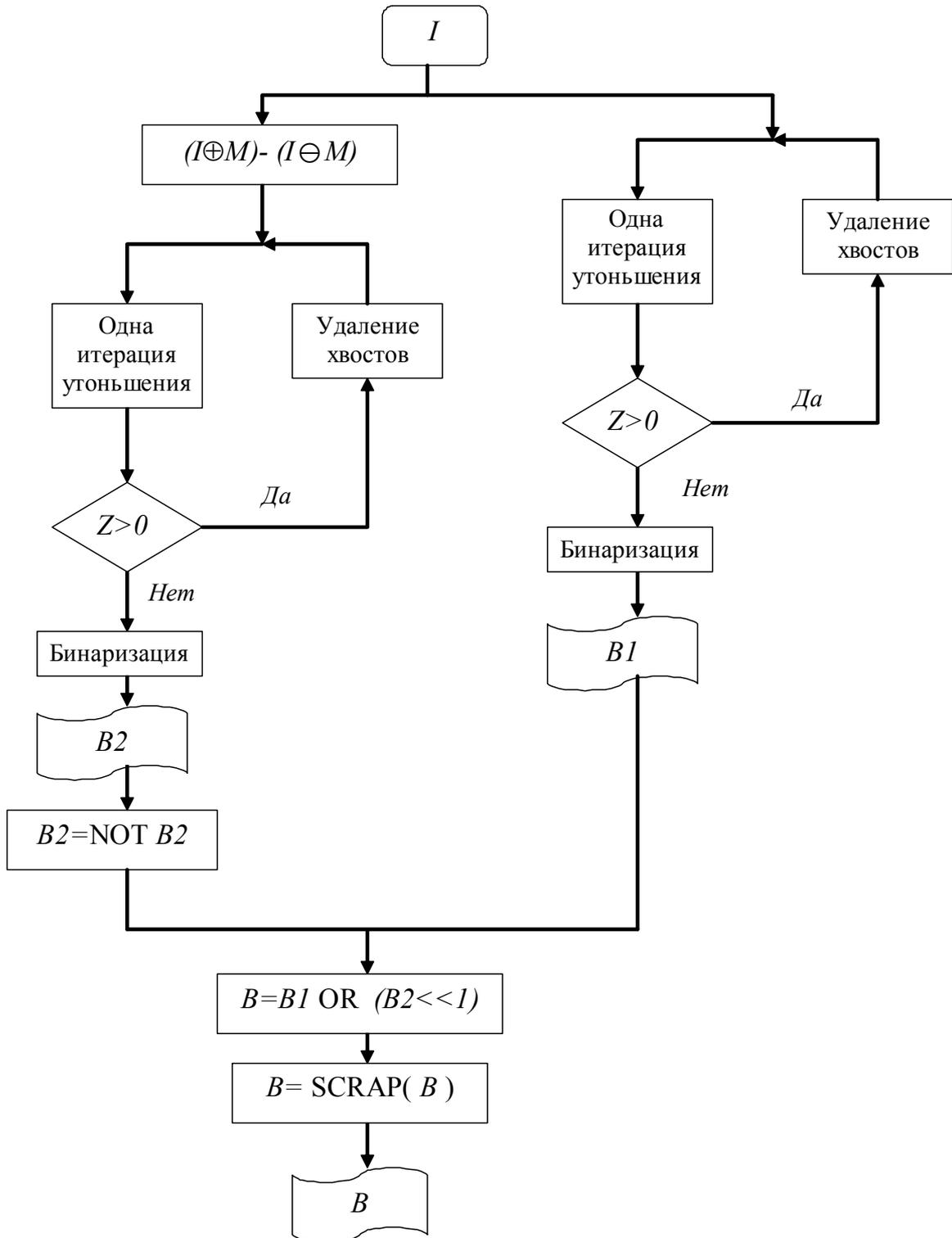


Рис. 3.4. Блок-схема алгоритма сегментации крупных волокон: I – исходное изображение; $B1$ – бинарное изображение скелета; $B2$ – бинарное изображение анализируемых областей; B – результирующее изображение; Z – число пикселей, удалённых во время итерации утоньшения; SCRAP – функция классификации и удаления областей по параметру ширины и количеству объектов скелета изображения

3.3. Идентификация сосудов и волокон на изображениях

Основная функция сосудов и волокон – направленное распространение. Нервные волокна являются проводниками электрического импульса, по сосудам течёт кровь или лимфа.

Одной из важных задач при исследовании волокон или сосудов является идентификация их ветвей, которая основывается на методе итеративного отслеживания. Он заключается в определении пути по границе объекта и его средней линии, соответствующей скелету [54, 76, 78]. Основные проблемы, возникающие при применении этого метода, – пересечение сосудов или волокон и их ветвление. Подобные проблемы решаются с помощью определения направления объекта.

В связи с тем что и сосуды, и волокна по своей природе являются проводниками, они обладают следующими свойствами [78]:

- не меняют резко направление и ширину;
- профиль сечения волокон и сосудов на большинстве препаратов моделируется Гауссовым распределением. На отдельных препаратах сосуды характеризуются двойным симметричным Гауссовым распределением.

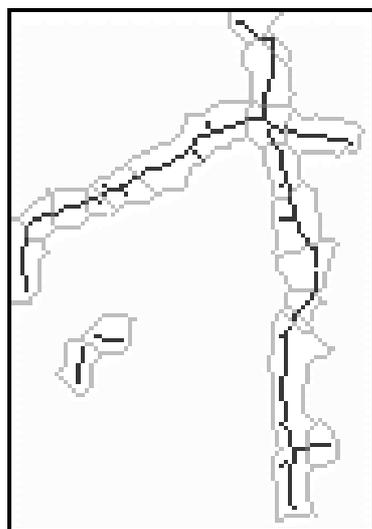


Рис. 3.5. Результат сегментации крупных волокон

Отслеживание волокна идет по скелету с помощью областей, полученных при утоньшении границ волокон (рис. 3.5). Одновременно вычисляется число пересечений скелета с границей области. Если это число меньше трёх, то данная точка не соответствует пересечению (рис. 3.6, а) или разветвлению (рис. 3.6, б). Область, для которой выполняется это условие, назовём областью продолжения (рис. 3.6, в).

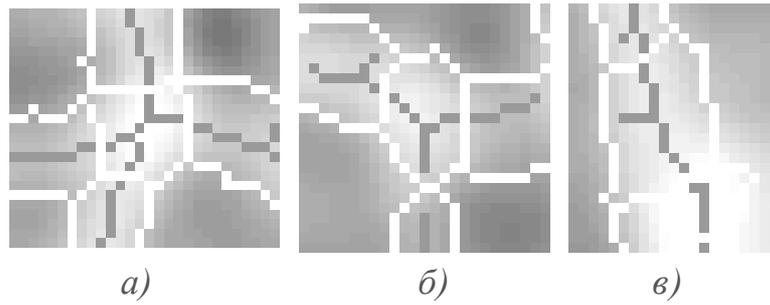


Рис. 3.6. Примеры анализируемых областей (S – число пересечений скелета с границей области): *а)* пересечения ($S=4$); *б)* разветвления ($S=3$); *в)* продолжения ($S=2$)

Чтобы в дальнейшем классифицировать область продолжения, необходимо сравнить характеристики её соседей, имеющих пересечения скелета и границ (рис. 3.7, *а*), для которых вычисляется угол между отрезком от центра масс области до точки пересечения границы и скелета к горизонтальной оси (угол, образованный отрезком DE к горизонтальной оси на рис. 3.7, *в*). В дальнейшем будем называть его углом продолжения. Затем рассматривается возможность сохранения построения скелета в данном направлении. Для этого пользователю необходимо задать угол возможного поворота волокна на единицу длины и измерить угол между прямыми от текущей точки к остальным точкам пересечения скелета в области (например, углы, образуемые отрезками DA , DB , DC к горизонтальной оси на рис. 3.7, *б*). Угол возможного поворота (например, углы EDA , EDB , EDC на рис. 3.7 *б*) не должен превышать угол, заданный пользователем. Для упрощения расчетов можно работать не с углами, а с косинусами и синусами, а угол, задаваемый пользователем, перед обработкой перевести в косинус.

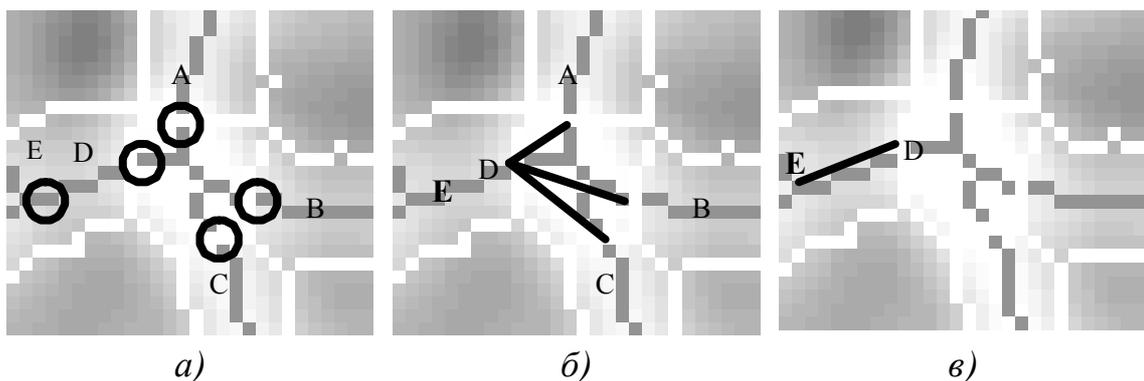


Рис. 3.7. Иллюстрация основных понятий, используемых при трассировке сосудов или волокон (A , B , C , D – граничные точки пересечения, E – точка центра масс): *а)* точки пересечения скелета с границей области; *б)* отрезки, соответствующие основным направлениям скелета в области из точки D ; *в)* отрезок из точки D до точки центра масс соседней области

Косинус угла поворота, удовлетворяющего пересечению, будет задаваться формулой

$$\cos \varphi = \cos(L \cdot u),$$

где φ – угол возможного поворота волокна в области; L – длина отрезка между точками в области; u – угол поворота, задаваемый пользователем.

Основываясь на этом, можно определить условия пересечения областей:

$$\begin{cases} \text{если } (\cos(\alpha) > \cos(\beta - L \cdot u)) \text{ or } (\cos(\alpha) < \cos(\beta + L \cdot u)), \text{ области пересекаются;} \\ \text{иначе } \text{ области не пересекаются,} \end{cases}$$

где α – угол продолжения исходной соседней области (на рис. 3.7, *в* для точки D это угол между отрезком DE и горизонтальной осью); β – угол продолжения проверяемой соседней области (на рис. 3.7, *б* это углы, образуемые отрезками DA, DB, DC к горизонтальной оси).

После небольшого преобразования получаем следующие условия, в которых используются операции с тригонометрическими функциями:

$$\begin{cases} \text{если } (\cos(\alpha) > (\sin(L \cdot u) \cos(\beta) - \cos(L \cdot u) \sin(\beta)) \\ \text{or } (\cos(\alpha) < (\sin(L \cdot u) \cos(\beta) - \cos(L \cdot u) \sin(\beta))), \text{ области пересекаются;} \\ \text{иначе } \text{ области не пересекаются.} \end{cases}$$

Если области пересекаются, то они не принадлежат ветвям текущего волокна. В противном случае отслеживание продолжается по одной из областей. Для остальных областей их координаты заносятся в стек, откуда восстанавливаются после окончания отслеживания текущей ветви. Результатом этой обработки является изображение отдельного волокна с его ветвями (рис. 3.8).

Основным преимуществом данного метода является то, что изображение обрабатывается по областям и нет необходимости определять вектор направления по скелету и границам объекта, как в [54, 76, 78]. Возможность смещения ветви скелета при утоньшении на несколько пикселей в зависимости от направления освещения может внести существенную погрешность в классификацию на точки разветвления и пересечения. В нашем алгоритме качество повышается по мере того, как обрабатываются области и направление волокна вычисляется более точно.

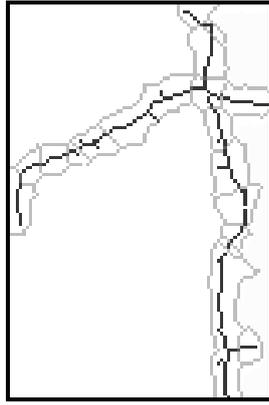


Рис. 3.8. Области, оставшиеся после трассировки волокон

3.4. Пороговая сегментация изображений клеточных структур

В связи с тем, что одним из самых важных гистологических объектов является клетка, особенности сегментации будут рассматриваться на её примере. Основная характеристика изображения клетки – это замкнутые границы, соответствующие клеточной мембране. Несмотря на то, что основной характеристикой большинства клеток является их выпуклая форма, она не всегда служит определяющим фактором, так как в случаях митоза и при некоторых видах патологии это условие нарушается. Кроме того, содержание клетки в зависимости от способа окраски гистологического препарата на изображении отражается по-разному. Чаще всего оно имеет профиль яркости, напоминающий Гауссово распределение. Иногда на изображении чётко видны элементы, соответствующие клетке и ядру. В случае неокрашенных ядер клетка характеризуется полым изображением.

При наличии качественного контрастного изображения клетки (рис. 3.9, а) самым эффективным способом обработки является пороговая сегментация.

При получении многих изображений с помощью светового микроскопа задать постоянный порог можно только для изображений с высоким контрастом. В связи с тем что качественные изображения гистологического препарата отображают клетки на определённом фоне, более эффективно задавать порог яркости с помощью анализа гистограммы (рис. 3.10). Одной из причин наличия у гистограммы статистических асимметрии и эксцесса является неоднородность совокупности. Это означает, что в одну совокупность значений яркости на изображении сведены пиксели двух и более нормальных совокупностей (например, для фона и объектов), каждая из которых характеризуется своим набором параметров и границами.

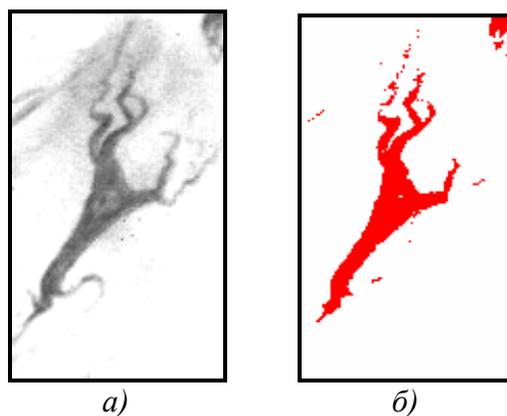


Рис. 3.9. Изображения мультиполярной нервной клетки переднего рога спинного мозга: *а)* полутоновое; *б)* бинарное, полученное после пороговой сегментации, основанной на анализе гистограммы полутоновой величины

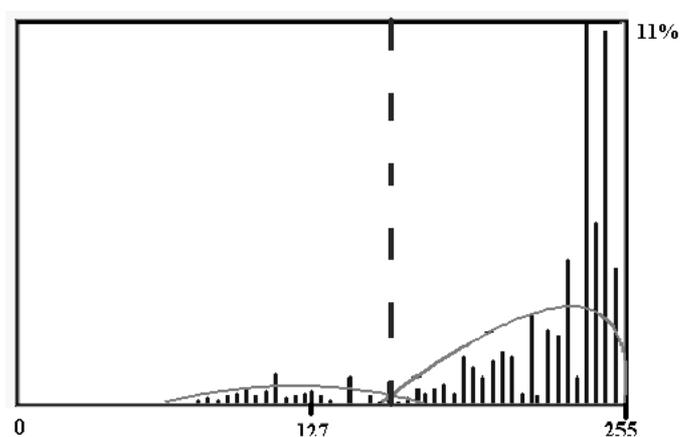


Рис. 3.10. Гистограмма полутонового уровня для изображения нервной клетки, для которой порог обозначен прерывистой линией

Так, если строить распределение по весу пикселей для групп каких-либо объектов на качественном контрастном изображении, получится нормальное распределение. Если разница между средними значениями двух совокупностей значений яркости для фона и для объектов больше, чем стандартное значение для каждой из них, то кривая распределения будет двухвершинной и пороговое значение определяется в минимуме между этими вершинами. При небольшом расхождении средних значений распределение имеет одну тупую вершину, и с выбором порога возникают сложности. В ряде случаев можно вычислить параметры составляющих совокупностей для фона и для объектов. На основе разложения на два Гауссова распределения выбирается бинарный порог (см. рис. 3.9, *б)*).

3.5. Морфологическая сегментация изображений клеточных структур

В случае когда фон неравномерен, пороговая сегментация неэффективна. Учитывая то, что основной характеристикой клетки является клеточная мембрана, очерчивающая её границы, эффективнее обрабатывать не изображение клетки, а её контур.

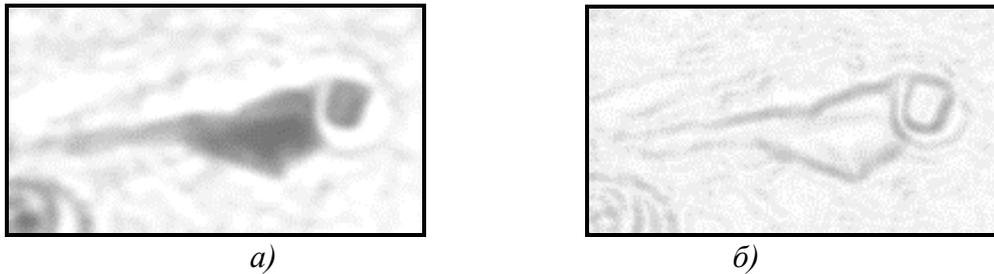


Рис. 3.11. Изображения нейрона коры головного мозга: *а)* полутоновое; *б)* полученное после выполнения операции морфологического градиента

На рис. 3.11, *а* показано полутоновое изображение нейрона головного мозга с нечеткими границами и непостоянным фоном. Наша задача – найти контур клетки, который лучше всего соответствовал бы её мембране. В связи с тем что профиль яркости такой клетки часто представляет собой несимметричную фигуру, для обработки необходимо использовать контур клетки. Это можно сделать с помощью морфологического градиента [68], являющегося разностью результатов после проведения операций эрозии и дилатации за одну итерацию (рис. 3.11, *б*):

$$G=I\oplus B-I\ominus B.$$

Очевидно, что оптимальный контур должен проходить по самому резкому перепаду яркости в мембране, который соответствует хребтам на изображении, полученном с помощью морфологического градиента. Поэтому для выделения контура используется операция полутонового утоньшения. После её применения остаётся достаточно много ложных ветвей и внутренних контуров.

Для устранения этого недостатка необходимо проводить предобработку исходного изображения. Для сглаживания точечных шумов обычно применяется усредняющая фильтрация. Искажения формы исправляются морфологическими операциями. Например, в связи с тем что клетка всегда имеет выпуклую форму, операция замыкания позволяет сгладить контур, и это приводит к заметному улучшению результата:

$$I \bullet B=(I \oplus B) \ominus B.$$

Контур у слабоконтрастных изображений может иметь разрывы, поэтому для устранения этого недостатка после проведения морфологического градиента и перед выполнением операции утоньшения нужно провести дилатацию на изображении градиента с количеством итераций, равным предполагаемому расстоянию разрыва.

FOR j=0 TO (длина разрыва) STEP 1
I= I \oplus B
NEXT j

Выполнение всех рекомендаций позволит получать контуры без разрывов.

Теперь, когда есть уверенность в том, что полученные контуры – замкнутые, проводится полутонное утоньшение. Для удаления ложных контуров необходимо после каждой итерации проводить полное удаление хвостов (отрезков, ограниченных узловыми и концевыми точками). В результате остаются только замкнутые контуры, где внешний контур соответствует границе клетки (рис. 3.12, а). Для того чтобы удалить внутренние контуры, после бинаризации проводится операция заливания контуров.

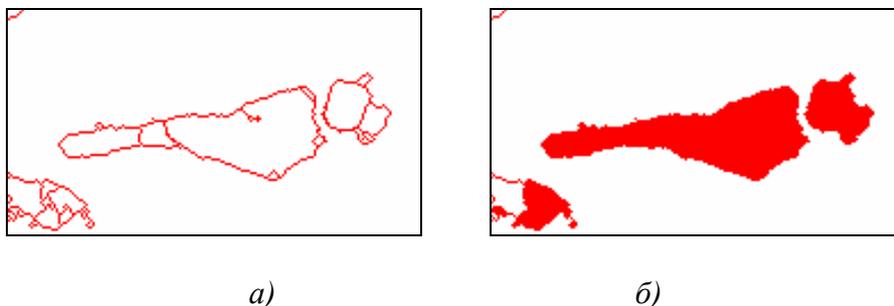


Рис. 3.12. Изображения нейрона: а) выделенные границы нейрона и других гистологических объектов после операции утоньшения; б) результат заливания границ для изображения нейрона

Существует достаточно много алгоритмов заливания, но самый простой из них – алгоритм переопределения фона, находящегося снаружи замкнутых контуров, служебным значением. Наружные края фона соответствуют краю изображения в целом. Он заполняется отдельным сервисным цветом, начиная с крайней точки изображения, после чего эта часть изображения интерпретируется как отдельный объект. Затем всем точкам с исходным значением фона присваиваются значения окружающих их объектов. В результате заполняются пустоты внутри объектов. Внешний фон восстанавливается из объекта, характеризующегося

служебным значением. В результате всех этих операций получается бинарное изображение клетки и других объектов (рис. 3.12, б).

Для удаления объектов, не являющихся клетками, проводится вычисление их геометрических или денситометрических характеристик. Объекты, не попадающие в заданные промежутки характеристик, удаляются (рис. 3.13).

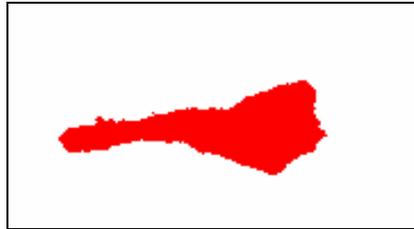


Рис. 3.13. Бинарное изображение нейрона, полученное в результате сравнения площадей объектов

Описанный алгоритм (рис. 3.14) является общей схемой применения морфологических методов для выделения клетки. При решении подобных задач вместо утоньшения могут использоваться методы ватершета и детекторы границ, но в целом последовательность действий в алгоритме сохраняется.

3.6. Сегментация изображений клеточных структур посредством объединения областей

Часто структура ткани является фоном и не позволяет выделить клетку, так как её элементы имеют яркость и уровни перепадов яркости, совпадающие с яркостью фона (рис. 3.15). Это не дает возможность выделить внешний контур клетки или сегментировать его по выбранным порогам.

В данном случае можно применить метод под названием «рост областей». В большинстве работ он начинается с операции определения случайным образом маленьких областей [18] размером в несколько пикселей, которые по ходу работы алгоритма растут и образуют информационные области. Для изображений с плавно меняющейся яркостью это не очень эффективно, так как результат выделения зависит от типа изображения и количества пикселей при инициализации.

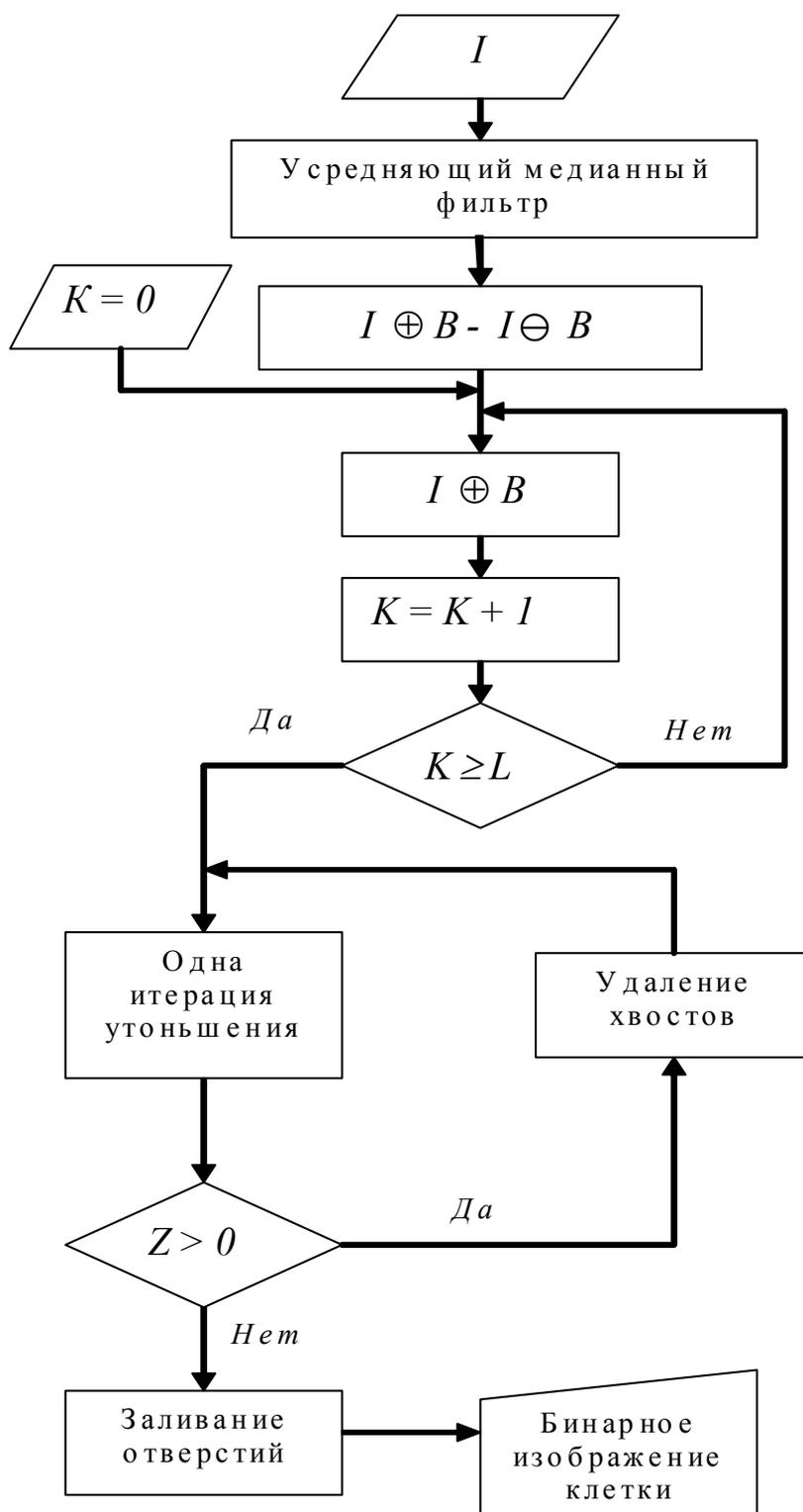


Рис. 3.14. Блок-схема алгоритма морфологической сегментации клетки:
 I – полутоновое изображение клетки; B – девятиточечный структурный элемент;
 L – расстояние, соответствующее половине размера предполагаемого разрыва;
 Z – число пикселей, удалённых во время итерации утоньшения

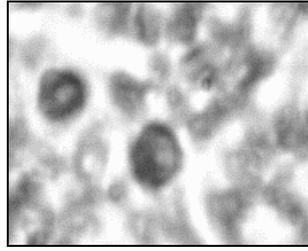


Рис. 3.15. Фрагмент изображения гистологического препарата

Если использовать вместо исходных пикселей бинарные области, полученные в результате последовательного выполнения следующих операций: морфологический градиент (рис. 3.16, *а*) → полутоновое утоньшение → бинаризация → инверсия (рис. 3.16, *б*), то можно уменьшить время обработки.

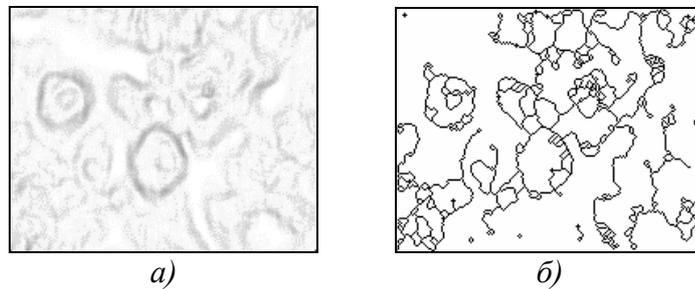


Рис. 3.16. Фрагмент гистологического препарата: *а*) результат выполнения операции морфологического градиента; *б*) результат утоньшения

В результате получается бинарное изображение, состоящее из плотно прилегающих областей. Эти области разделены линиями толщиной в один пиксель, что позволяет ограничиваться только объединением областей и игнорировать их рост. Объединение производится на основе вычисления характеристик областей. Для этой операции необходимо иметь исходное полутоновое изображение и организовать стек, характеризующий области.

Вычисление характеристик выполняется с помощью процесса идентификации – определения и классификации объектов на исходном бинарном изображении. Бинарное изображение имеет две градации яркости, которые отображают объекты и фон. Допустим, что фон отображается пикселями со значениями, равными 0, а объекты – со значениями, равными 1. В ходе идентификации каждый объект должен получить свой индивидуальный цвет. Идентификация выполняется посредством сканирования изображения. Как только встречается пиксель, равный 1, координаты его 8-соседей, которые тоже равны 1, заносятся в стек. Затем продолжается сканирование текущей линии по пикселям и окрашивание их в цвет обрабатываемого объекта. Одновременно происходит

накопление промежуточных параметров, необходимых в последующих измерениях. Как только встречается пиксель фона, из стека берётся следующий пиксель объекта и сканируется горизонтальная линия пикселей, равных 1, элементом которой он является. Координаты бинарных 8-соседей крайних пикселей также заносятся в стек. Эти операции выполняются до тех пор, пока стек не окажется пустым. В результате получается объект, выделенный индивидуальным цветом, по которому, используя соответствие пикселей на мультифазном и полутоновом изображениях, вычисляются следующие характеристики областей:

$$\begin{aligned} \text{среднее значение} & - M = \frac{1}{\text{число пикселей}} \cdot \sum_{\text{объект}} \text{значение пикселя}; \\ \text{дисперсия} & - \sigma = \frac{1}{\text{число пикселей}} \cdot \sum_{\text{объект}} \text{значение пикселя}^2 - M^2. \end{aligned}$$

Будем считать область, которая идентифицируется, первой родительской. Её идентификация проводится дважды. Во второй раз при идентификации определяются соседние области. После этого их характеристики сравниваются с родительской областью по следующим условиям:

- разница дисперсии для полутоновой величины не должна превышать заданного значения, определяющего отличия клетки от ткани;
- среднее значение яркости каждой области не должно выходить за пределы, ограниченные дисперсией другой области.

При выполнении этих условий области объединяются путем их переопределения, в результате чего идентифицируемая область окрашивается цветом родительской области, а также путем морфологической операции замыкания, выполненной для родительской области на общем мультифазном изображении. Граничные разделяющие линии между областями удаляются. Затем вычисляются характеристики новой объединённой области:

$$\begin{cases} M_{12} = \frac{A_1 \cdot M_1 + A_2 \cdot M_2}{A_1 \cdot A_2}; \\ \sigma_{12} = \frac{1}{A_1 + A_2} \left(A_1 \cdot \sigma_1^2 + \frac{A_1 \cdot A_2 \cdot (M_1 - M_2)^2}{A_1 + A_2} + A_2 \cdot \sigma_2^2 \right), \end{cases}$$

где M_1, M_2 – средние значения полутоновых величин для родительской и соседней областей; σ_1, σ_2 – дисперсии полутоновых величин для роди-

тельской и соседней областей; A_1 , A_2 – площади родительской и соседней области; M_{12} – среднее значение полутоновой величины для объединённых областей; σ_{12} – дисперсия полутоновой величины для объединённых областей.

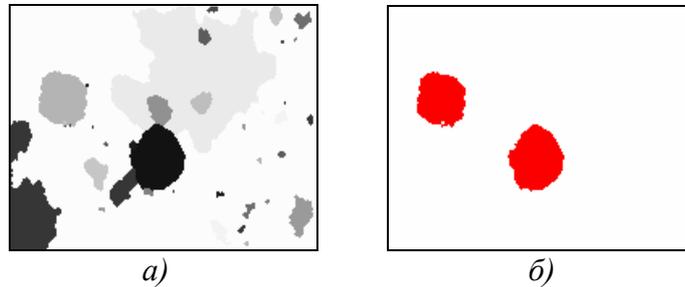


Рис. 3.17. Фрагмент изображения гистологического препарата: а) результат объединения областей с пороговым значением дисперсии полутоновой величины 2,8; б) бинарные изображения клеток, выделенные при сравнении площадей

При выполнении всех условий область заново анализируется посредством сканирования для поиска соседних необработанных областей. Если все области обработаны, одна из соседних областей анализируется как родительская.

В результате получается ряд областей, соответствующих различным участкам изображения (рис. 3.17, а). Для определения принадлежности области вычисляются её геометрические характеристики, по которым проводится классификация области как клетки, ткани или другого гистологического объекта. Области, не соответствующие клетке, удаляются, а оставшиеся заливаются соответствующим цветом. В результате получается бинарное изображение клеток (рис. 3.17, б). Этот алгоритм сегментации клетки представлен в виде блок-схемы на рис. 3.18.

Описанный алгоритм имеет ряд преимуществ. Результат сегментации стабилен и зависит только от порога дисперсии, так как объединяются конкретные области, не зависящие от особенностей засевания изображений. Он быстрее классических алгоритмов роста областей, так как основан только на объединении областей и не содержит фрагментов засевания областей и их роста. Отдельные области, выделяемые благодаря утоньшению полутонового градиента изображения, принадлежат клеткам или их фрагментам, что значительно улучшает качество определения клетки. Поэтому этот алгоритм можно признать достаточно эффективным для сегментации клеток.

3.7. Выделение клетки среди бинарных объектов, полученных в результате сегментации

Для выделения клетки необходимо предварительно определить пороговые значения следующих её параметров: площади, диаметра, ядерно-цитоплазматического отношения. Обязательными для клетки являются наличие ядра, ядрышек, а также возможность существования клеточных включений.

Для определения этих характеристик во время идентификации проводятся следующие вычисления.

Площадь определяется как сумма всех пикселей объекта за исключением граничных. Для геометрических вычислений различают три типа граничных пикселей, делающих определённый вклад в значение площади:

- вертикальный, если есть сосед по вертикали, при этом вклад соответствует масштабному значению пикселя;
- горизонтальный, если имеется сосед по горизонтали, при этом вклад соответствует масштабному значению пикселя;
- диагональный, если имеется сосед по диагонали, при этом вклад составляет половину от масштабного значения пикселя.

Использование масштабного значения пикселя необходимо для получения результата в реальных единицах измерения.

Диаметр определяется по формуле

$$D = \sqrt{\frac{4 \cdot AREA}{\pi}},$$

где $AREA$ – площадь объекта.

Каждый вид клеток имеет свои пределы для площади и диаметра, поэтому эти характеристики используются только для определения класса клеток. На основании пределов величин площади и диаметра удаляется большинство объектов, не соответствующих интересующим нас клеткам. Поэтому такую операцию эффективно выполнять первой.

Для получения топологических характеристик клетку (рис. 3.19, а) удобно представить в виде иерархии бинарных изображений (рис. 3.21), где в корне графа лежит бинарное изображение клетки (рис. 3.19, б), на следующем уровне находится изображение ядра (рис. 3.20, а), в ветвях графа лежат ядрышки и различные клеточные включения (рис. 3.21).

Идея иерархии областей легко реализуется в вычислительной технике с помощью бит (табл. 3.2).

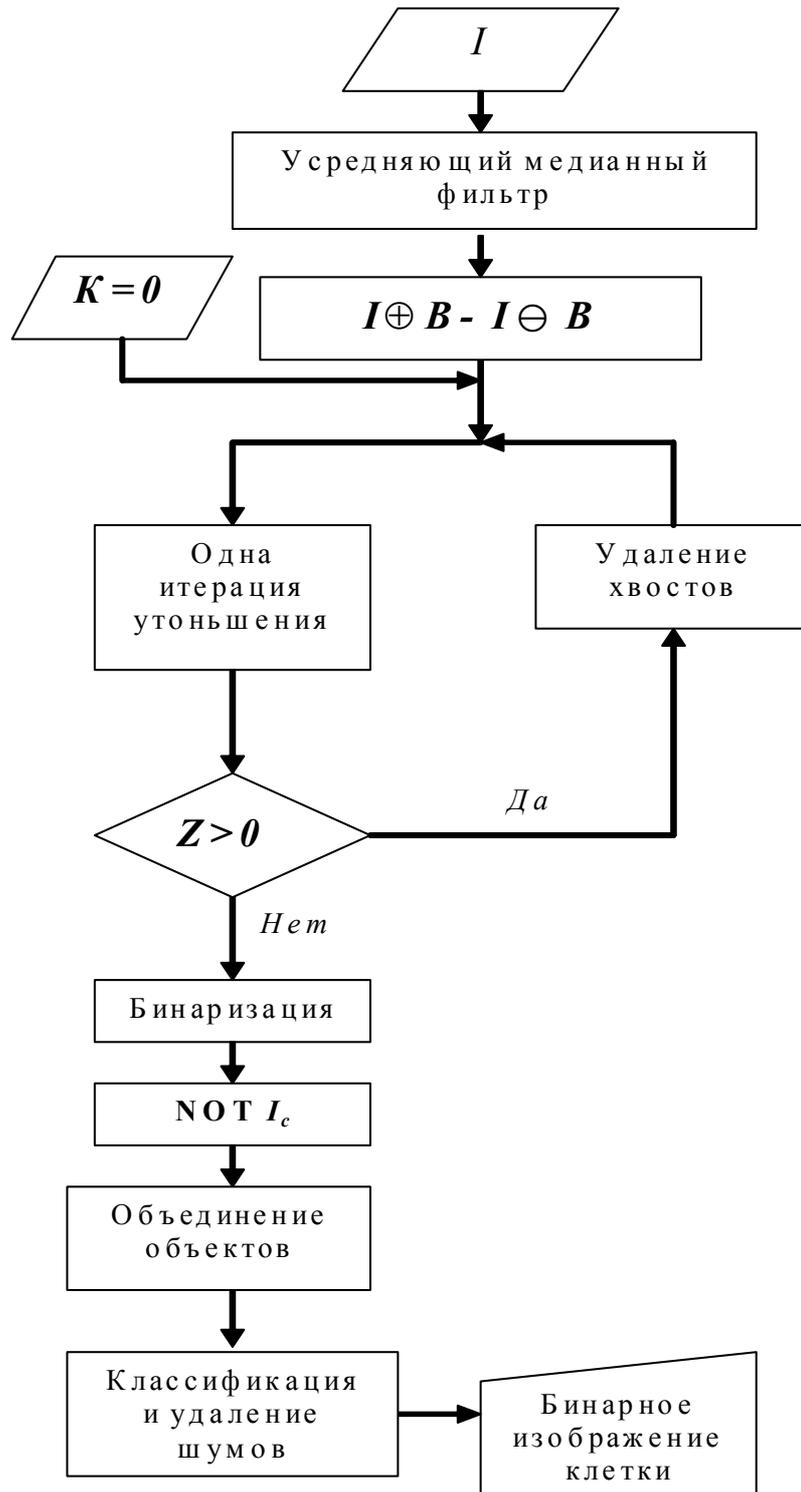


Рис. 3.18. Блок-схема алгоритма сегментации клетки методом объединения областей: I – полутоновое изображение клетки; B – девятиточечный структурный элемент; L – расстояние, соответствующее половине размера предполагаемого разрыва; Z – число пикселей, удалённых во время итерации утоньшения; I_c – скелет изображения

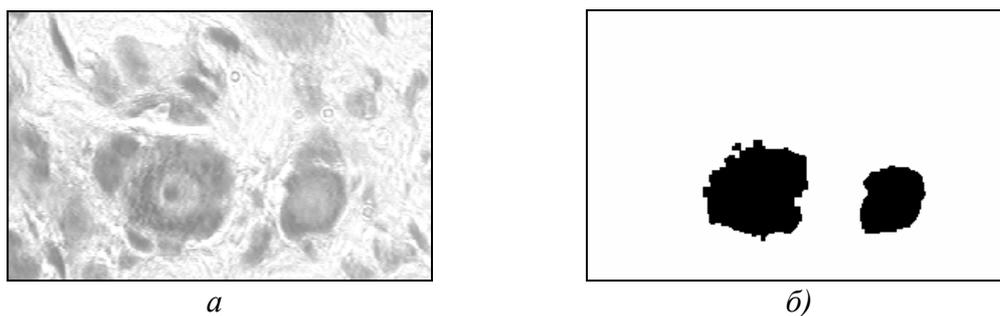


Рис. 3.19. Изображения клеток нейронов симпатических ганглиев: а) исходное полутоновое; б) бинарное после сегментации

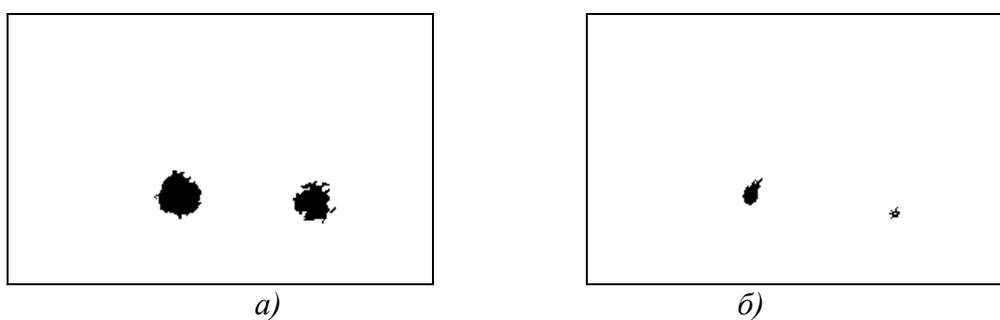


Рис. 3.20. Бинарные изображения: а) ядра клеток нейронов симпатических ганглиев; б) ядрышки клеток нейронов симпатических ганглиев

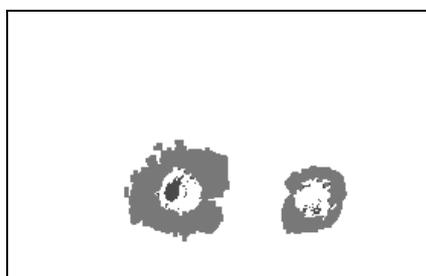


Рис. 3.21. Иерархическое изображение клеток нейронов симпатических ганглиев

Таблица 3.2

Значения пикселей для разных элементов в структуре клеток

Объект	Операция	Отдельное значение	Значения после объединения
Клетка	$1 \ll 0$	1	1
Ядро	$1 \ll 1$	2	3
Ядрышки и включения	$1 \ll 2$	4	7

Для анализа разных клеточных органелл эту таблицу можно продолжить. В вычислительной технике для представления пикселя чаще всего используется байт, состоящий из 8 бит. Можно выделять до восьми уровней иерархии. Преимущество описанного метода заключается в том, что по одному мультифазному изображению можно делать выводы для всех уровней классификации и в результате получать полную информацию о клетке.

Таким образом, если в клетке располагается ядро, то значение пикселя будет соответствовать 3. Если в ядре находится ядрышко, то пиксель будет равен 7. В случае наличия включения, которое не лежит в ядре, значение пикселя – 5. При подобной организации изображения можно легко оперировать различными клеточными составляющими и анализировать их.

Оптимальное условие для пикселя P идеальной клетки:

$$(P \text{ and } 1) \text{ or } (P \text{ and } 3) \text{ or } (P \text{ and } 7).$$

Это означает, что в идеальной клетке располагается ядро, а в ядре – ядрышки.

Блок-схема алгоритма, позволяющего получить такое изображение, показана на рис. 3.22. Прежде всего для разделения слившихся объектов выполняется операция отмыкания. Алгоритм состоит из двух ветвей. Первая применяется для выделения клеток с неокрашенным ядром, другая – для окрашенного ядра. В них последовательно создаются бинарные изображения клеток (см. рис. 3.19, б), ядер, ядрышек и включений (см. рис. 3.20). Получение каждого изображения сопровождается операциями заполнения дыр в объектах и контроля по площади и диаметру.

Особый случай – наличие в клетке органелл или каких-либо клеточных включений. Если объект с уровнем, соответствующим второму биту, не удовлетворяет по своим геометрическим характеристикам ядру, то значение пикселя P следует изменить на величину $(P \text{ or } 1 \text{ and } P) \gg 1) \text{ and } 1$. В случае, когда пиксель равен 7, его нужно уменьшить до 1, так как он принадлежит только клетке. Пиксели, имеющие значение 2, 4, 6, определенно являются шумами, поэтому уничтожаются. Когда характеристики областей собраны, среди них можно легко определить объекты, соответствующие клеткам.

Наличие в клетке ядра и ядрышек – топологическая характеристика, которая великолепно характеризуется числом Эйлера: $E_8 = C_8 - H_4$, где C_8 обозначает число 8-связных особенностей объекта, H_4 – число 4-связных дыр или объектов, вложенных в основной объект.

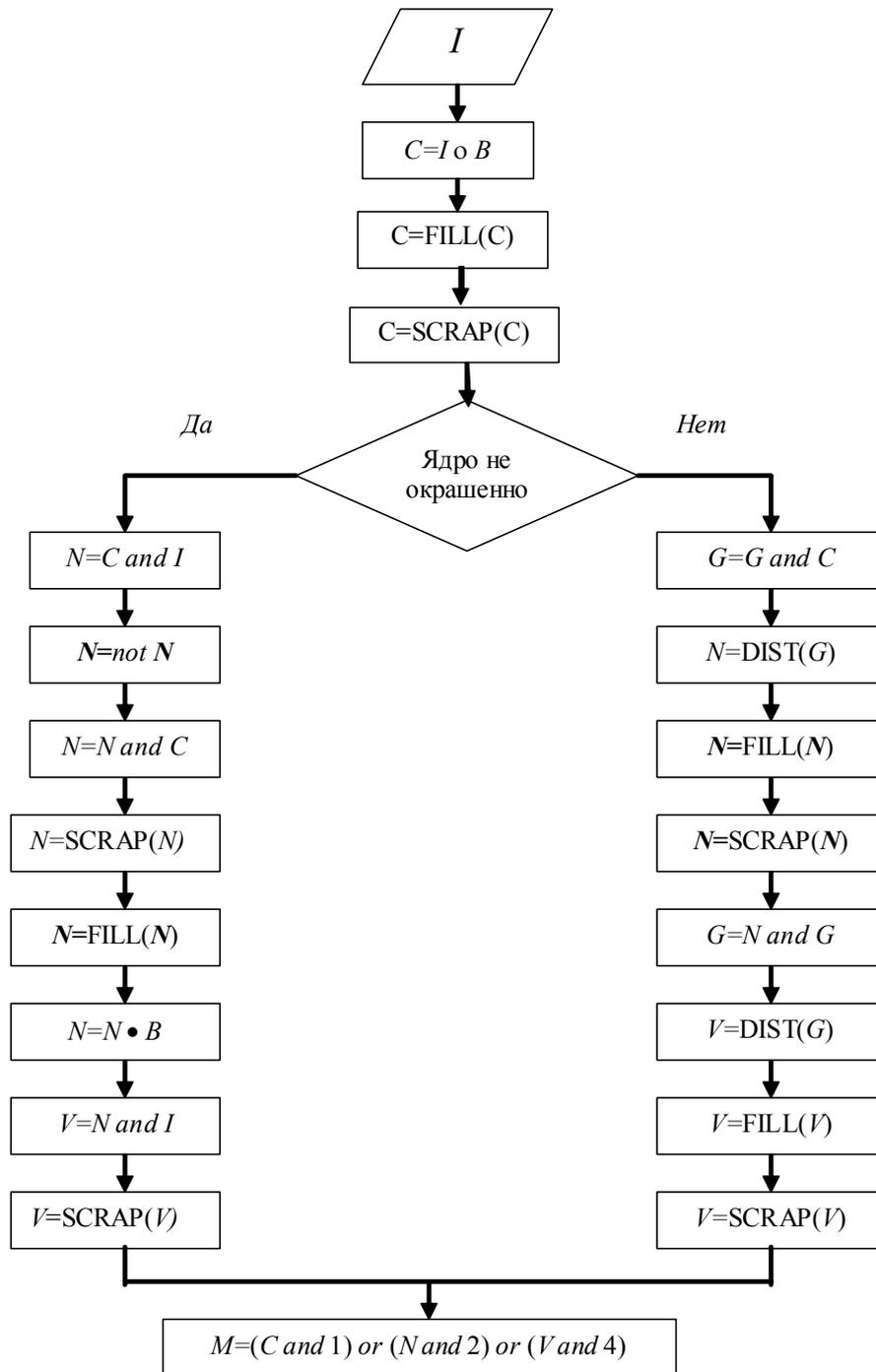


Рис. 3.22. Блок-схема алгоритма построения иерархического изображения клеток из бинарного: I – бинарное изображение; G – полутоновое изображение; C – бинарное изображение клетки; N – бинарное изображение ядра; V – бинарное изображение ядрышек или включений; B – морфологический структурный элемент. $SCRAP(X)$ – функция удаления объектов по размерам площади и диаметру на изображении X ; $FILL(X)$ – функция заполнения отверстий в объектах на изображении X ; $DIST(G)$ – адаптивная пороговая сегментация изображения G

Для нормальных клеток по отношению к ядру $E_g=1$, по отношению к ядрышкам и включениям число Эйлера меняется в зависимости от вида клетки.

Глава 4

Сегментация цветных изображений клеток и клеточных структур

4.1. Особенности цветных изображений гистологических препаратов

Для гистологических препаратов при анализе составляющих компонентов ткани важную роль играет цвет. Окрашивание препарата позволяет выделить те или иные клеточные структуры, причем стандартное преобразование цветного изображения (рис. 4.1) в полутоновое (рис. 4.2) приводит к потере некоторых объектов разной окраски, но одинакового уровня яркости.

В основе большинства методов сегментации гистологических объектов лежит аппарат математической морфологии, который хорошо разработан для полутоновых и бинарных изображений [32, 35, 46]. Этот аппарат работает со значениями пикселей для бинарных и полутоновых изображений. Цвет определяется возможностями человеческого зрения, и для того чтобы обсуждать количественные характеристики цвета, необходимо выбрать описывающую его модель.

Определение цвета частично обусловлено физическими процессами и частично связано с функциями глаза (с деятельностью мозга). Человеческий глаз состоит примерно из 7 млн колбочек и 120 млн палочек. Функция палочек заключается в обеспечении «ночного зрения» – светочувствительности, функция колбочек – в обеспечении «дневного зрения» – восприятия цвета, формы и деталей предмета. В колбочках заложены три типа воспринимающих элементов, каждый из которых воспринимает световое излучение только определенной длины волн. Яркость является классической полутоновой физической величиной, но цвет полутоновой величиной назвать сложно, несмотря на то, что классически он представляется радугой спектра в диапазоне волн примерно от 380 нм (синий цвет) до 770 нм (красный цвет).

Важный шаг в описании цвета был сделан Ньютоном – он впервые предложил цветовой график, получивший название цветового круга Ньютона, для систематизации многообразных цветов и для определения по смешиваемым цветам цвета их смеси.

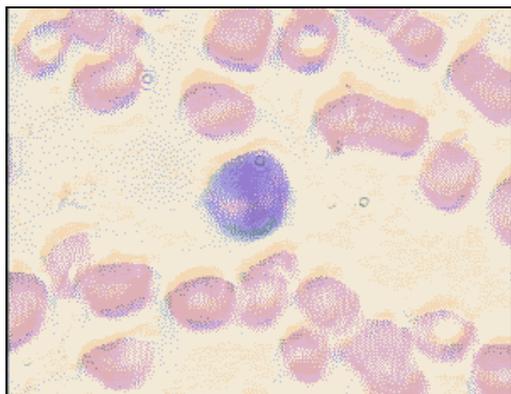


Рис. 4.1. Цветное изображение клеток крови

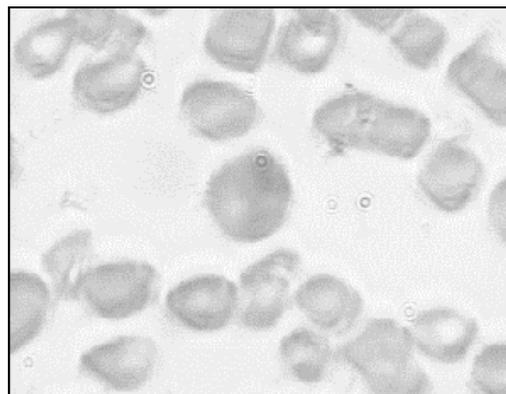


Рис. 4.2. Полутоновое изображение клеток крови

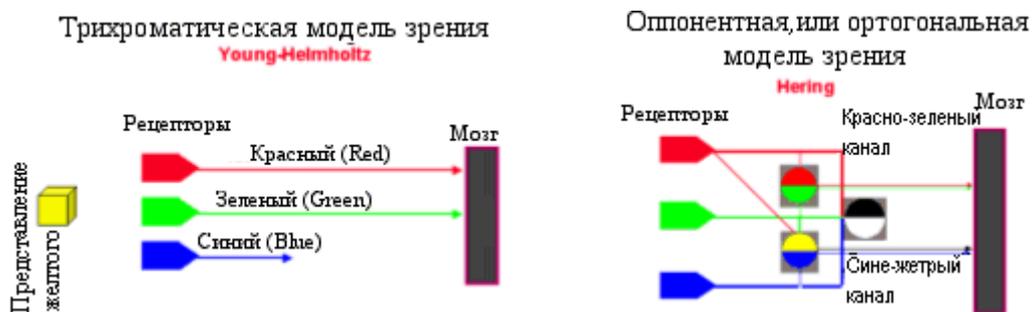


Рис. 4.3. Трихроматическая и ортогональная модели зрения

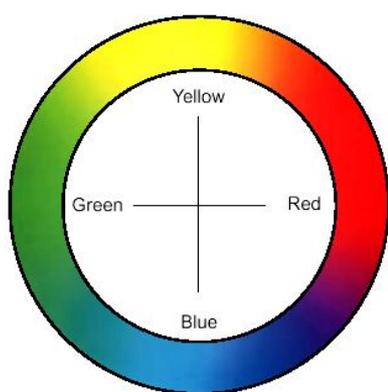


Рис. 4.4. Круг одинаковой цветности

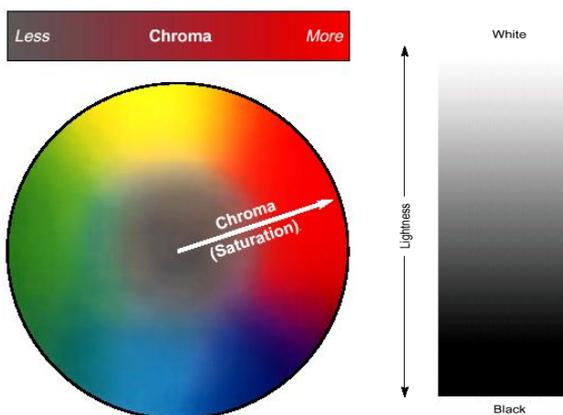


Рис. 4.5. Характеристики цвета – насыщенность и яркость

В основу графического сложения цветов Ньютон положил правило нахождения центра тяжести. Это правило широко используется и сейчас для цветовых расчетов на цветовых диаграммах и для количественной характеристики цветов. Гельмгольц и Максвелл, занимаясь смешиванием цветов, построили основы трехцветной теории зрения. Раштон, проводя опыты со всеми типами дальтонизма, определил соответствие колбочек глаза одному из трех основных цветов: красному, зеленому и синему. Остальные цвета и оттенки получаются смешением этих трех. Трехцветная модель человеческого зрения, аксиомы уравнивания цветов противоречат законам сложения волн и теореме Котельникова. Этот факт вносит психологические особенности в описание цвета и не позволяет цвет считать полутоновой величиной, несмотря на его явные полутоновые свойства в спектре видимого излучения.

Наиболее полное определение цвета было дано Грассманом, который вложил в него три понятия [21, 29]:

1. Трехмерность природы цвета. Глаз реагирует на три различные цветовые составляющие, например красный, зеленый и синий цвета; цветовой тон (доминирующую длину волны); насыщенность (чистота) и яркость (светлость).

2. Четыре цвета всегда линейно зависимы, т. е. $cC=rR+gG+bB$, где c, r, g, b . Для смеси двух цветов $(cC)_1$ и $(cC)_2$ имеет место равенство $(cC)_1+(cC)_2=(rR)_1+(rR)_2+(gG)_1+(gG)_2+(bB)_1+(bB)_2$.

3. Цветовое пространство непрерывно. Если в смеси трех цветов один непрерывно изменяется, а другие остаются постоянными, то цвет смеси будет меняться непрерывно.

Следует отметить, что существует две модели зрения: трихроматическая и ортогональная (оппонентная) (рис. 4.3) [21, 29].

Трихроматическая модель полностью соответствует принципам, указанным выше. Ортогональная модель основывается на существовании четырех основных цветов, составленных в ортогональные пары: красный – зеленый, синий – желтый, причем желтый получается с помощью смешения красного и зеленого. Этот факт не исключает, а дополняет трихроматическую модель и объясняет особенность восприятия желтого цвета человеком. Желтый цвет не воспринимается как смешанный цвет, однако между синим и зеленым, красным и синим все цвета воспринимаются как смешанные.

Ортогональная модель дополняется яркостной осью «белое-черное» и вводится для приближения к физиологическим свойствам глаза.

Подводя итог, можно сказать, что цвет в человеческом восприятии – это непрерывная замкнутая величина без начала и конца. Несмотря на трехцветную природу человеческого зрения (красный, зеленый,

синий), выделяют четыре цветовых тона (красный, желтый, зеленый, синий). Эта неоднозначность в определении цвета привела к существованию нескольких типов систем описания цвета в техническом зрении.

4.2. Системы координат для представления цвета

Определение модели цвета – непростая задача. В мире существует два устойчивых направления в моделировании цвета [21]: зависимое от физических устройств (определение цвета на одном устройстве не совпадает с другим) и независимое от внешних устройств (модель корректирует ввод цветного изображения на устройство и вывод из него). В связи с тем что второй вид моделей сложно использовать одновременно на разных устройствах, на практике применяется первый.

При абстрактном определении цвета рассматривают три специфических параметра: яркость, цветность и насыщенность [15, 21, 43]. Яркость – это энергетическое содержание света. Чаще всего именно этот параметр играет важную роль при различных полутонных операциях. Цветность – это длина волны излучения с максимально присутствующей интенсивностью. Это именно то восприятие, которое человек видит в радуге. Насыщенность – это чистота цвета, величина, характеризующая присутствие белого цвета. Меры яркости изучаются в фотометрии, а цвета – в колориметрии. Так как цвет описывается тремя параметрами, можно утверждать, что цветовое пространство трехмерно.

Существует ряд систем координат для представления характеристик цвета [21, 43]. В целом все системы координат можно разделить на три типа:

1. Основанные на смешении цветов. В данном случае направление осей координат соответствует конкретным чистым цветам, а численные значения на оси характеризуют насыщенность и яркость для данного цвета [21, 43, 57].

2. В которых одна из координат соответствует яркости, а две другие отвечают за цветность и насыщенность, другими словами, выделяются две компоненты: люминесцентная и хроматическая [21].

3. Являющиеся эмуляцией, или приближением к HLS (цветность, яркость, насыщенность) [16, 21, 43].

Разумеется, существует переход от одной системы координат цвета к другой.

Общей особенностью всех цветовых координатных систем является одна точка начала координат, которая называется опорным чёрным цветом. Координаты, основанные на смешении цветов, наиболее удобны для показа цветного изображения на устройствах отображения. Люминесцентно-хроматические координаты были разработаны для передачи

телевизионного сигнала, основная их задача – одновременная передача цветного и черно-белого изображений.

Координаты, являющиеся вариациями координат HLS, отражают реальные характеристики цвета. Использование этих координат позволяет добиться эффективного результата, но при индивидуальном анализе каждой оси в отдельности.

Рассмотрим некоторые типы цветовых пространств. Для аппаратных систем типа RGB к положительным моментам можно отнести следующие:

- аппаратную поддержку системы координат;
- линейную систему координат;
- декартову систему координат.

К отрицательным моментам относятся:

- сложность определения цвета для человека;
- несоответствие равномерности цветового пространства;
- неравномерное геометрическое расстояние между основными тонами;
- изменение яркости, цветности и насыщенности при смене координат.

Для систем, введенных международным комитетом по освещению (МКО), положительными моментами являются:

- соответствие цветовой гамме;
- близость к человеческому восприятию;
- линейность;
- простота преобразования в другие пространства.

Отсутствие равноконтрастности цветов на цветовой плоскости (за исключением системы Lab) можно отнести к отрицательным моментам этого класса систем.

Системы типа HLS были специально разработаны так, чтобы весь набор цвета легко воспринимался человеком. Главным достоинством этих систем является простота их преобразования из RGB-подобных систем, но в то же время они имеют ряд недостатков:

- нелинейность;
- отсутствие равномерности восприятия и равноконтрастности цвета на цветовом круге.

Получается, что системы, которая однозначно подходила бы для выполнения всех работ, не существует.

Полутоновое изображение – это изображение, в котором значение пикселя может быть представлено числом из ограниченного ряда величин. В чёрно-белых изображениях полутоновой величиной является яркость. С цветными изображениями дело обстоит намного сложнее, так

как и яркость, и цветность, и насыщенность являются полутоновыми величинами.

Существует несколько методов обработки цветных изображений [15]. Можно считать, что изменение полутона соответствует только перепаду яркости. Однако это определение не применимо к случаям, когда происходит изменение цветности и насыщенности без изменения яркости [15, 57]:

$$F(H,L,S)=f(L) ,$$

где $F(H,L,S)$ – функция обработки изображения; H – цветность; L – яркость; S – насыщенность; $f(L)$ – функция яркости.

Другой метод заключается в том, что все координаты обрабатываются как полутоновые и результат принимается либо как дизъюнкция [45], либо как конъюнкция [15, 21] результатов обработки каждой оси, например

$$F(R,G,B)=f(R \text{ and } G \text{ and } B)$$

или

$$F(R,G,B)=f(R \text{ or } G \text{ or } B),$$

где $F(R,G,B)$ – функция обработки изображения; R – интенсивность красного луча; G – интенсивность зелёного луча; B – интенсивность синего луча; $f(x)$ – реально реализованная функция.

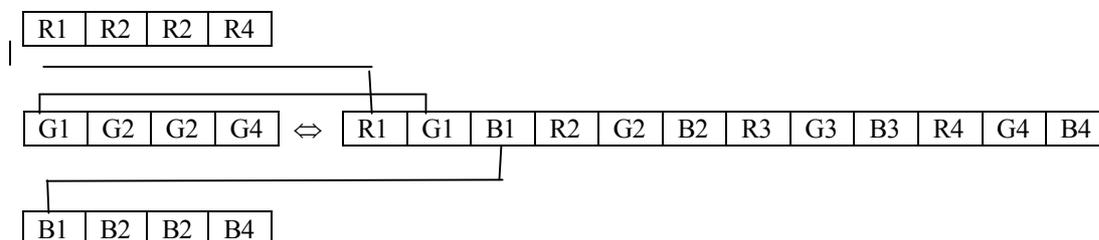
Рассматривая третий метод, будем полагать, что изменение полутона имеет место, если расстояние между векторами цвета по обе стороны предполагаемого перепада превосходит некоторый пороговый уровень. Результаты двух последних методов полностью зависят от выбранной системы координат цвета.

4.3. Система координат для морфологических операций на цветных изображениях

Каждый пиксель цветного изображения человеку удобно характеризовать тремя значениями: яркостью, цветностью и насыщенностью. Когда говорят об идентификации цвета, чаще всего имеют в виду характеристику цветности. Не вызывает сомнения, что если фрагменты изображения имеют резкий перепад в цветности, то они являются отдельным объектом или его частью.

Операции математической морфологии основаны на работе с множествами и оперируют понятиями «больше» и «меньше», но применять подобные понятия к цветности некорректно, потому что выражение изменения цветности посредством числового ряда является математической абстракцией, соответствующей последовательности цветов в спектре (рис. 4.4). Невозможно определить, для какого цвета полутоновая величина больше: для красного или зелёного. Цветность можно только ограничить пороговыми значениями в спектре. Поэтому цветность нельзя считать полутоновой величиной, несмотря на то, что она обладает такими свойствами, как возможность определения пороговых значений при помощи вычисления градиента. Как указывалось выше, для цветности при выделении объекта основным признаком является резкий перепад её величины, следовательно, цветность почти не несёт нагрузки в топологии объекта. Насыщенность характеризует близость к «чистым» цветам или удаление от серой бесцветной оси (рис. 4.5), а яркость является расстоянием от опорного черного или белого цвета по серой бесцветной оси.

Одним из перспективных методов обработки цветных изображений посредством математической морфологии является смешивание битов. В основе этого метода лежит создание полутоновой величины на основе смешивания битов величин, соответствующих красному, зелёному и синему лучу по схеме



где R_i , G_i , B_i – i -е биты для красного, зелёного и синего луча соответственно.

Метод смешивания битов работает быстро и часто дает качественный результат, но его недостатками является то, что существует некоторый приоритет цветности от красного к синему и непонятен статус промежуточных цветов, например желтого. Все эти недостатки выявляются при обработке слабоконтрастных изображений, хотя для контрастных они практически отсутствуют.

Большинство функций обработки цветных изображений, например усредняющие фильтры, работают довольно качественно, используя вышеописание методы во многих системах координат, в том числе и в RGB. Но операции полутоновой морфологии приводят к спорным результатам, которые имеют смысл только в различных частных случаях.

Изменения яркости и насыщенности несут явную топологическую нагрузку в определении свойств объекта. Кроме того, операции математической морфологии для полутоновых изображений дают бесспорный результат для этих параметров, но задача объединения результатов довольно сложная. При использовании конъюнкции результат является неполным. При дизъюнкции результат полный, но некоторые его фрагменты имеют неверное соотношение яркости и насыщенности, хотя могут быть вполне допустимыми. Кроме того, для получения результата необходимо использовать три цикла: операцию по яркости, операцию по насыщенности, объединение результатов. Очевидно, что при обработке одной координаты вместо двух получается выигрыш в скорости в два раза. В операциях математической морфологии, где в большинстве случаев обработка изображения состоит из множества итераций, этот выигрыш весьма существен. Поэтому эффективной является обработка вектора расстояния цвета от опорного чёрного (начала координат для большинства систем, описывающих цвет) до искомой точки. Вектор расстояния цвета равен сумме векторов яркости и насыщенности или сумме базисных векторов RGB, которые непосредственно характеризуют цвет. Следовательно, он несет информацию как о яркости, так и о насыщенности и является полутоновой величиной, наиболее удобной для морфологических операций на цветных изображениях.

Для морфологической обработки изображения необходимо ввести систему координат, в которой одной из осей будет вектор расстояния цвета, а по другой будет откладываться величина, характеризующая цветность.

Итак, какими особенностями должна обладать координатная система, описывающая цвет и работающая в пространстве, удобном для применения методов математической морфологии?

Для морфологических операций на цветных изображениях необходима система координат, в которой есть координатная ось, отражающая все полутоновые свойства цвета. Так как после полутоновой обработки идёт обработка цветности, было бы удобно, чтобы одна из осей новых координат её характеризовала.

МКО выполнил огромную работу по изучению восприятия цвета и отметил, что эти координаты имеют существенный недостаток для колориметрических расчетов: координаты, связанные с цветовым графиком, характеризуются неравномерностью цветового тона. Это связано с наличием четырех основных тонов в восприятии человека [21].

Для учета цветоделения необходимо использовать систему, близкую к человеческому восприятию. Наиболее близкой по цветовому кругу считается оппонентная система координат, аналогичная цветовосприятию колбочек человеческого глаза и состоящая из трех осей:

$$\begin{bmatrix} O_1 \\ O_2 \\ O_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,2814 & 0,6938 & 0,0638 \\ -0,0971 & 0,1458 & -0,0250 \\ -0,0930 & -0,2529 & 0,4665 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix},$$

где O_1 – яркостная составляющая, O_2 соответствует красно-зеленой оси, O_3 соответствует сине-желтой оси.

Такая система не является равноконтрастной. Небольшое изменение цвета может привести к существенному изменению восприятия, что обуславливает дополнительное введение равноконтрастных систем координат, самой удачной из которых является Lab:

$$\begin{aligned} L &= 116 (Y/Y_n)^{1/3} - 16 \text{ для } Y/Y_n > 0,008856; \\ L &= 903,3 (Y/Y_n) \text{ в другом случае;} \\ a &= 500 (f(X/X_n) - f(Y/Y_n)); \\ b &= 200 (f(X/X_n) - f(Z/Z_n)), \end{aligned}$$

где $f(t) = t^{1/3}$ для $t > 0,008856$ и $f(t) = 7,787 t + 16/116$ в другом случае.

Декартова система координат наиболее близка к человеческому восприятию и характеризуется равноконтрастностью цветов, т. е. светло-желтый цвет имеет большую яркость, чем светло-голубой. В системе координат Lab четыре тона восприятия (красный – зеленый, синий – желтый) приблизительно ортогональны.

Рассмотрим сферическую систему координат, производную от Lab. Прежде всего следует отметить, что цветность, которая характеризуется углом вращения, является независимой характеристикой объекта, в то время как насыщенность и яркость зависят от внешних характеристик (например, от угла освещения). Поэтому наиболее эффективным будет использование сферической системы координат на основе базисных векторов системы Lab, известной под названием LCH (рис. 4.8):

$$\begin{cases} L = L; \\ C = \sqrt{a^2 + b^2}; \\ H = \begin{cases} \arccos(a/C) & | b \geq 0; \\ 2\pi - \arccos(a/C) & | b < 0, \end{cases} \end{cases}$$

где L – яркость; H – цветность; C – относительная насыщенность. Основную полутоновую нагрузку несет на себе яркость (L). В то же время

по координатам цветности (H) и насыщенности (C) можно судить о связности цветного пикселя с его окружением.

В данной системе координат для операций полутоновой морфологии применяется величина L . Для выделения по цветовому тону используется значение H , а C несет нагрузку оценки разницы цветности для соседних пикселей.

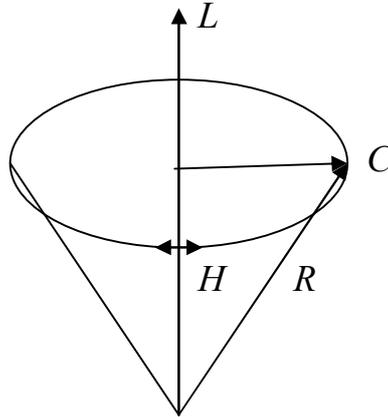


Рис. 4.8. Координатная система LCH , R – вектор цвета

Рассмотрим внимательнее цветовой тон H . По одному из определений Грассмана [29] эта величина непрерывна, поэтому не является полутоновой. При сравнении характеристик пикселей на предмет морфологических свойств основную роль играет не угол H , а разница углов, которую можно ввести как дополнительную поправку при определении морфологических свойств пикселя.

Информативными для обработки являются величины L и H , причем L отличается полутоновыми свойствами. H описывается кругом, в котором поворот на 20° меняет восприятие цвета и не приводит к изменению насыщенности. Полутоновую нагрузку в системе LCH несут яркость и насыщенность. Эти две величины определяют вектор цвета.

Изменение цветовых характеристик происходит вдоль вектора цвета $R = \sqrt{L^2 + C^2}$. Однако использовать этот вектор для операций сравнения в математической морфологии не совсем корректно, так как система LCH – равноконтрастная и вектор для пикселя с большой насыщенностью будет превышать равноконтрастную величину с меньшей насыщенностью. Поэтому для проверки условий математической морфологии удобно использовать систему LCH , а значение цветного пикселя менять по вектору цвета R .

4.4. Понятие связности для пикселей цветного изображения

Определение связности в окружении пикселя можно разделить на две задачи:

- определение связности по яркости;
- определение связности по цветовому тону.

Роль яркости в определении связности цветного пикселя такая же, как и в полутоновом случае (определяется сравнением на полутоновой шкале яркости), но для цвета начинают играть важную роль особенности человеческого восприятия.

Человек различает четыре основных цветовых тона, причем край сектора основного цветового тона воспринимается как контрастный переход. Для системы Lab изменение на 20° влияет на восприятие цвета, т. е. для ощутимого изменения восприятия угол для цвета должен меняться за пределами диапазона $-20 - +20^\circ$, что составляет приблизительно четверть круга. Поэтому за сектор со слабоконтрастным переходом можно принять $1/8$ от цветового круга. За дополнительное условие связности пикселей можно положить разность в цветовом тоне не более $\pi/4$. С уменьшением насыщенности цвета угол восприятия близкого цвета возрастает, поэтому для анализа имеет смысл ввести псевдоугол цветности:

$$A = H C_{\max} / C,$$

где A – псевдоугол; H – цветность; C_{\max} – максимальное изменение насыщенности; C – насыщенность.

В результате условие связности пикселя можно определить следующим образом:

$$(L_j \geq L_x \text{ AND } |A_i - A_x| < \pi/4),$$

где L_j – яркость соседнего пикселя; L_x – яркость пикселя обработки; $|A_i - A_x|$ – разница псевдоугла между пикселями.

Следует отметить, что на бинарном и полутоновом изображениях пиксель имеет одно значение, поэтому изменение пикселя выполняется простым присвоением ему значения соответствующего соседа. Для цветного изображения в изменении значения пикселя участвуют все его характеристики (LCH), и эту операцию можно рассматривать не как изменение пикселя, а как сдвиг его максимального соседа из минимального окружения в сторону анализируемого пикселя. При правильной организации итерации это даже позволяет ускорить обработку.

Предложенное определение связности позволяет получить качественные результаты не только на простых операциях математической морфологии, но и на таких сложных, как утоньшение. В связи с тем что система *LCH* построена на базе системы *CIELab*, она наиболее приближена к характеристикам человеческого зрения и охватывает полный набор цветов наиболее распространенных электронных устройств отображения. Введение псевдоугла при анализе изображения позволяет отнести пиксели к тому или иному цветному объекту.

Данное определение связности тестировалось посредством операции утоньшения с помощью системы анализа изображений «Биоскан» на изображении, состоящем из цветных линий, в системах RGB (с последующим объединением результатов), HLS (по яркости, по псевдоизображению), BITMIX (образованному от системы RGB) и в Lab(R) (с учетом псевдоугла цветности) (рис. 4.9).

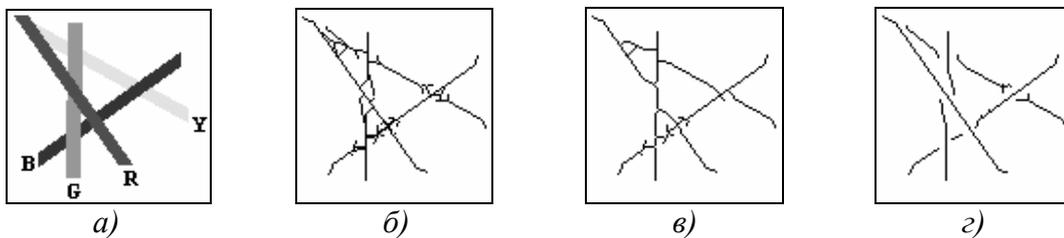


Рис. 4.9. Результаты тестирования: а) исходное изображение; б) утоньшение с объединением в системе RGB; в) утоньшение по яркости в системе HLS и методом BITMIX; г) утоньшение по яркости в системе LCH

Скелет изображения в системе RGB получился связным на желтом цвете. На месте пересечения смешанных и основных цветов образовались неправильные ветви, соединяющие средние линии объектов.

Результаты утоньшения в системе HLS и методом Bitmix оказались практически идентичными. Это связано с тем, что разноцветные линии воспринимаются как один связный объект переменной яркости. В предлагаемом способе такой недостаток отсутствует.

Следует отметить, что восприятие человеком цветового тона при смешивании цветов является нелинейным и требует дополнительного исследования. Это влечет модернизацию системы координат, в которой проводится утоньшение. Кроме того, в связи с тем что восприятие цветового тона зависит от яркости, условие связности для цветового тона тоже должно иметь такую зависимость.

4.5. Сегментация цветных медицинских изображений в пространстве HSB

4.5.1. Предварительная оценка изображений

Цветные изображения ядер и агрегатов отличаются не только типом выделяемых объектов, но и цветовыми характеристиками. Для выявления таких закономерных отличий все снимки были изучены в пространстве HSB, так как известно, что цветовой тон (Hue) близок к человеческому восприятию цвета и позволяет выделять объекты независимо от освещенности или преобладания какой-либо из трех компонент в RGB-пространстве [53].

По значениям, лежащим в тех или иных пределах на цветовом круге цветового тона (Hue), анализируемые изображения были разделены на три класса:

- изображения отдельных ядер клеток (рис. 4.10, а), цветовой тон которых находится в диапазоне $345 - 360^\circ$ (фон в зависимости от присутствия различных вкраплений варьируется в рамках $40 - 55^\circ$);

- снимки отдельных ядер и агрегатов (рис. 4.10, б) со значениями цвета $330 - 60^\circ$ (основной тон фона лежит в пределах $55 - 75^\circ$);

- изображения агрегатов (рис. 4.10, в), на которых объекты имеют значения цветового тона в рамках $285 - 300^\circ$, а фона – $298 - 30^\circ$.

Следует отметить, что классификация не является строгой и изображения обладают цветовыми характеристиками, общими для некоторых классов. Изображение третьего класса (рис. 4.10, в) наиболее сложное, имеет множество различных вкраплений, а цвет как ядер клеток, так и фона весьма насыщенный. Однако в данном случае объектом для выделения является не ядро, а агрегат, т. е. совокупность близлежащих ядер и пространство между такими ядрами, что, конечно, облегчает задачу.

Процедура предварительной оценки изображений в HSB-пространстве (рис. 4.11, а) выявила неоспоримые преимущества работы в этом пространстве, а не в RGB (рис. 4.11, б). На графике hue-профиля четко просматриваются возмущения в местах объекта (профили построены по пути, показанному стрелкой на рис. 4.11, б, а значения цветового тона на графике нормализованы для удобства сравнения с rgb-профилем). Такую процедуру можно провести для изображений всех классов, и результат не будет зависеть от того, какой цвет имеют пиксели объектов. Это позволяет избежать необходимости экспериментально выявлять доминирующий канал в RGB-пространстве [37].

Однако задача сегментации не является простой, так как значения цветового тона объектов и фона иногда могут входить в «чужой» диапа-

зон. Можно утверждать, что при сегментации анализ изображений в HSB-пространстве даст достаточно хорошие результаты, если кроме компоненты цветового тона рассмотреть еще и компоненту насыщенности (Saturation). Гистограмма, построенная по этой координате цветового пространства (рис. 4.12, б), дает дополнительную информацию о спорных пикселях, на первый взгляд принадлежащих объектам. Третья составляющая – яркость (Brightness) – характеризует относительную освещенность или затемненность пикселя объекта или фона. В процессе проведения экспериментов было выявлено, что важна другая характеристика – интенсивность (Intensity), которую иногда называют яркостью пикселя, хотя в случае с цветными изображениями эту характеристику получают, например, усреднением значений трех основных цветов модели RGB.

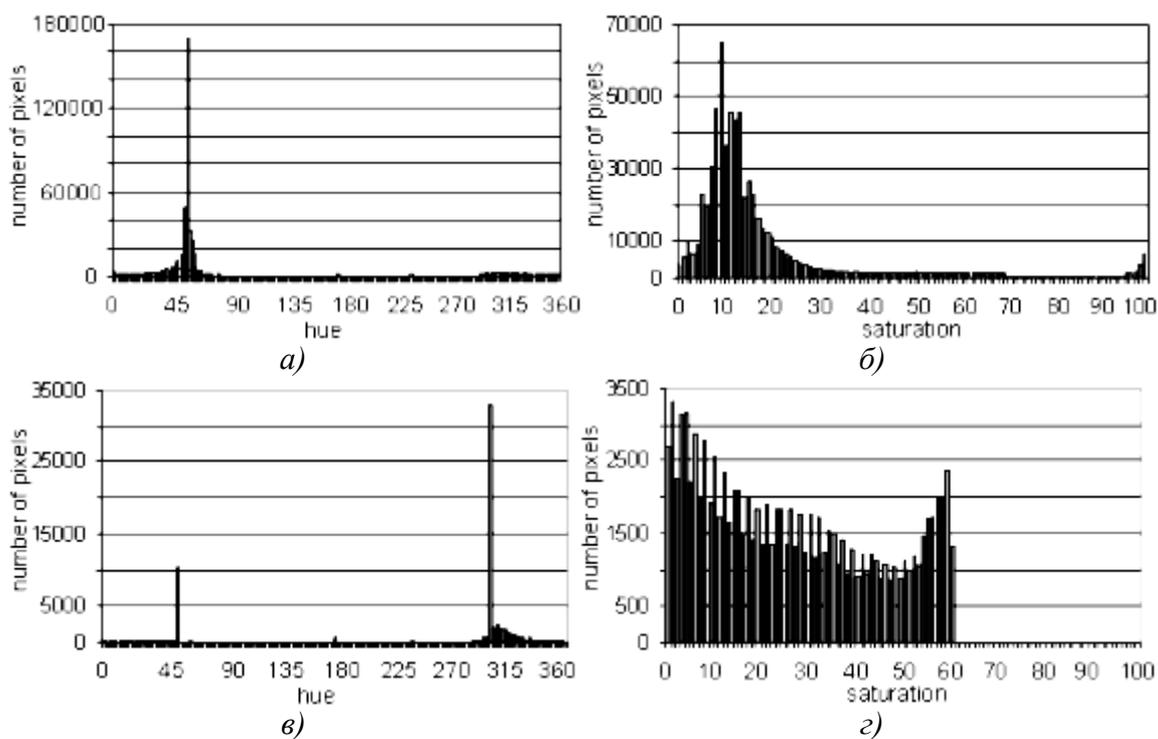


Рис. 4.12. Анализ гистограмм: а), в) гистограммы цветового тона изображения до и после инкремента интенсивности соответственно; б), з) гистограммы насыщенности изображения до и после инкремента интенсивности

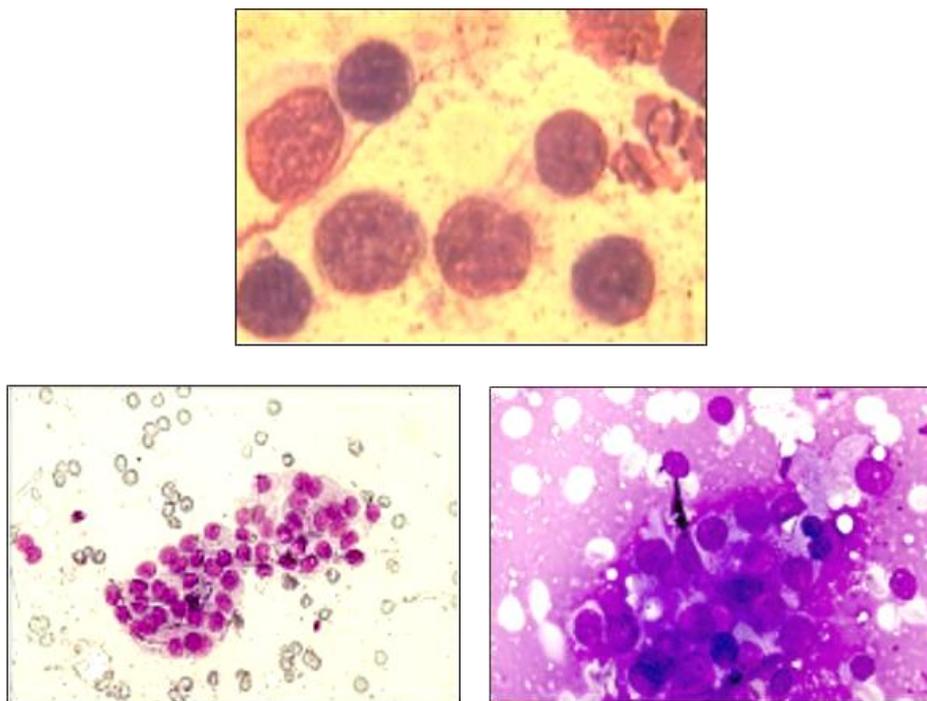


Рис. 4.10. Изображения ядер клеток и агрегатов

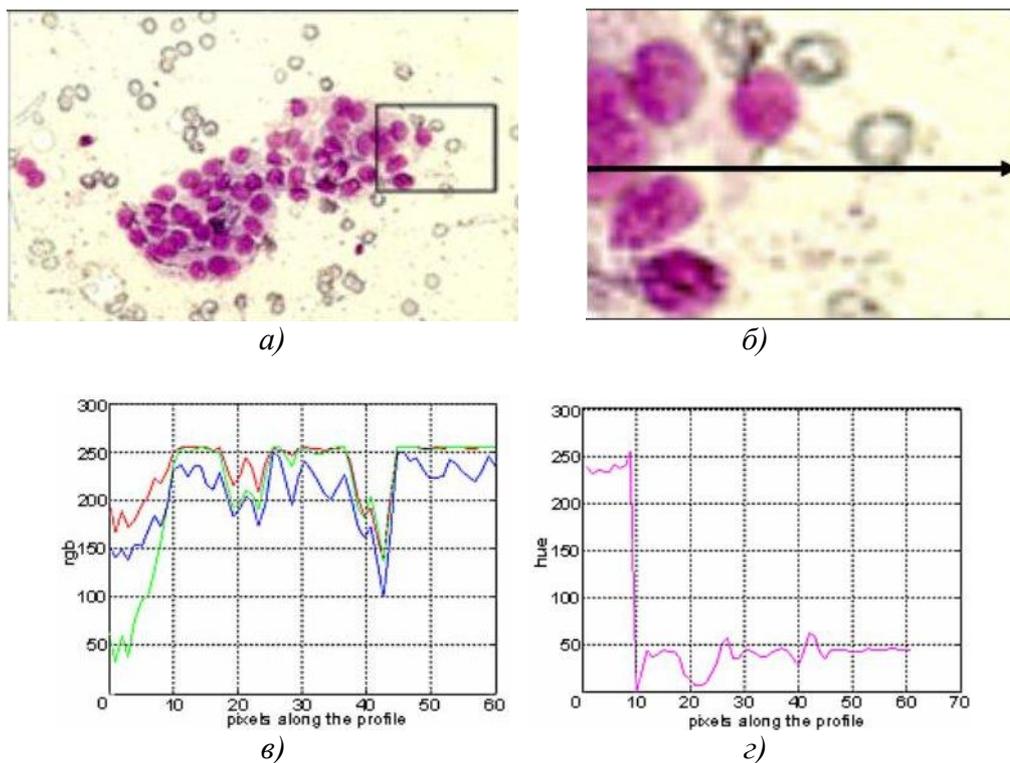


Рис. 4.11. Анализ изображения в пространствах RGB и HSB: а) исходное изображение; б) фрагмент исходного изображения и путь построения профиля; в) RGB-профиль изображения; г) hue-профиль изображения

Если увеличивать значение интенсивности до тех пор, пока яркость не станет равной 100%, то пики на гистограммах цветового тона и насыщенности (рис. 4.12, *a*, *б*) будут выглядеть так, как показано на рис. 4.12, *в*, *г*. Предположив, что пиксели объектов будут самыми «насыщенными», для них можно построить еще одну гистограмму цветового тона.

Последний этап сегментации теперь выглядит достаточно просто: пороговая обработка этой гистограммы с учетом того, что все пиксели пика новой гистограммы должны составлять пики на модифицированной гистограмме цветового тона после увеличения интенсивности.

4.5.2. Алгоритм сегментации

На основании проведенных исследований можно сформулировать следующие этапы алгоритма сегментации цветных медицинских изображений клеток:

- увеличение интенсивности пикселей и RGB-HSB-преобразование;
- построение и пороговая обработка гистограмм цветового тона и насыщенности;
- выявление самых «насыщенных» пикселей и построение для них гистограммы цветового тона;
- пороговая обработка гистограммы, построенной на предыдущем шаге, и формирование сегментов изображения.

Увеличение интенсивности пикселей и RGB-HSB-преобразование. Для того чтобы выяснить, насколько следует увеличивать значение интенсивности пикселей, можно построить гистограмму цветового тона, или hue-профиль и, оценив, какие пиксели могут принадлежать области фона, определить значение инкремента. В нашем случае для упрощения процедуры сегментации экспериментально было найдено значение, равное 100. Таким образом, формула нахождения новых значений $R'G'B'$ пикселей изображения выглядит следующим образом:

$$R'=R+100; G'=G+100; B'=B+100.$$

Существует много способов взаимного преобразования координат различных пространств [1, 53], и все они достаточно сложны, так как связаны с нахождением координат в таких пространствах, как Lab, XYZ. Однако имеется ряд алгоритмов [6, 59], которые позволяют упростить нахождение координат H и S и в вычислительном отношении являются более простыми способами. Яркость B можно найти из соотношения

$$B = \frac{\max\{R', G', B'\}}{256} 100\%$$

Построение и пороговая обработка гистограмм цветового тона и насыщенности. Формулы для построения гистограмм изображения ($M \times N$) имеют следующий вид:

$$HueHist = \sum_{i=0}^M \sum_{j=0}^N H_{ij};$$

$$SatHist = \sum_{i=0}^M \sum_{j=0}^N S_{ij},$$

где $0 \leq i, m \leq M - 1$, $0 \leq i, n \leq N - 1$, а H_{ij} и S_{ij} – значения цвета и насыщенности в текущем пикселе (i, j).

На рис. 4.12, в, г приведены гистограммы для изображения, представленного на рис. 4.10, б. Найти значимые пики и, соответственно, области между минимумами на гистограмме можно, например, по алгоритму, описанному в [6].

Построение модифицированной гистограммы цветового тона (рис. 4.13, а). Гистограмма для «насыщенных» пикселей, которые предположительно являются пикселями объектов, формируется по условию

$$HueHist' = \sum_{i=0}^M \sum_{j=0}^N H_{ij}, \quad S_{ij} = Sat^{right},$$

где Sat^{right} – самое правое значение насыщенности на гистограмме SatHist. (рис. 4.13, а).

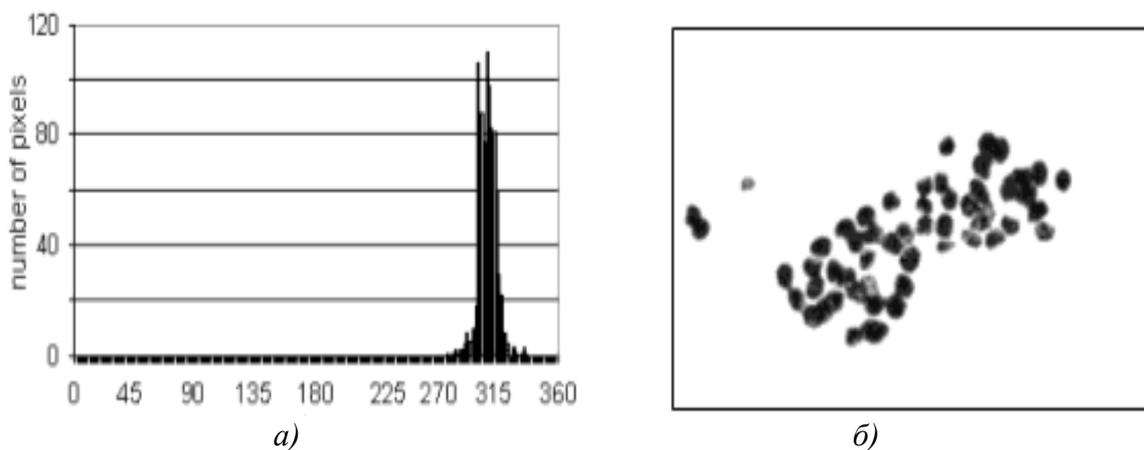


Рис. 4.13. Результат работы алгоритма: а) модифицированная гистограмма цветового тона для «насыщенных» пикселей; б) сегментированное изображение

Формирование сегментов. Проведя пороговую обработку модифицированной гистограммы, аналогичную этапу 2, представим исход-

ное изображение в виде совокупности областей, которой будет соответствовать следующее разбиение:

$$P = \{P^{background}, P^{object} = P^{HueHist} \cap P^{HueHist'}\},$$

где $P^{background}$ – множество пикселей, принадлежащих фону; $P^{HueHist}$ и $P^{HueHist'}$ – множества пикселей, составляющих пики на гистограммах $HueHist$ и $HueHist'$ соответственно. Окончательный результат работы алгоритма показан на рис. 4.13, б.

4.6. Морфологическая сегментация цветного изображения клетки

Использование полутоновой морфологии для цветных изображений позволяет более эффективно решать целый ряд задач, в частности, в области медицинских изображений. Одной из таких задач является выделение ядра клетки из изображения гистологического препарата.

Часто изображение гистологического препарата имеет неоднородный фон, и определение объекта с помощью методов пороговой сегментации становится невозможным. Эту проблему можно решить, анализируя не значения яркостей пикселей, а их изменения между соседними пикселями. Большие изменения соответствуют возможным границам предполагаемых объектов. Для того чтобы определить изменения яркости, изображение обрабатывается фильтром Собеля (рис. 4.14, б) в системе координат цвета LCH. Результат этой операции не соответствует точным границам, поэтому в той же самой системе координат цвета проводится утоньшение (рис. 4.14, в).

Резкий перепад характеристик пикселей на границе клетки приводит к появлению линий высокой яркости, при этом цветность не меняется, поэтому клетки, имеющие свою индивидуальную цветность, могут быть выделены методом пороговой сегментации по цветности. Мелкие перепады яркости, не соответствующие границам клетки, удаляются пороговой сегментацией по яркости, поэтому после выполнения утоньшения для цветного изображения проводится пороговая сегментация (рис. 4.14, г) как по яркости, так и по цветности.

В ходе выполнения этих операций получается довольно качественный скелет объектов на цветном изображении, благодаря которому можно получать более подробную информацию об объекте, а также выделять клетки как выпуклые объекты, используя метод морфологической сегментации и обрабатывая псевдоизображение, состоящее из векторов расстояния цвета в системе LCH, как полутоновое.

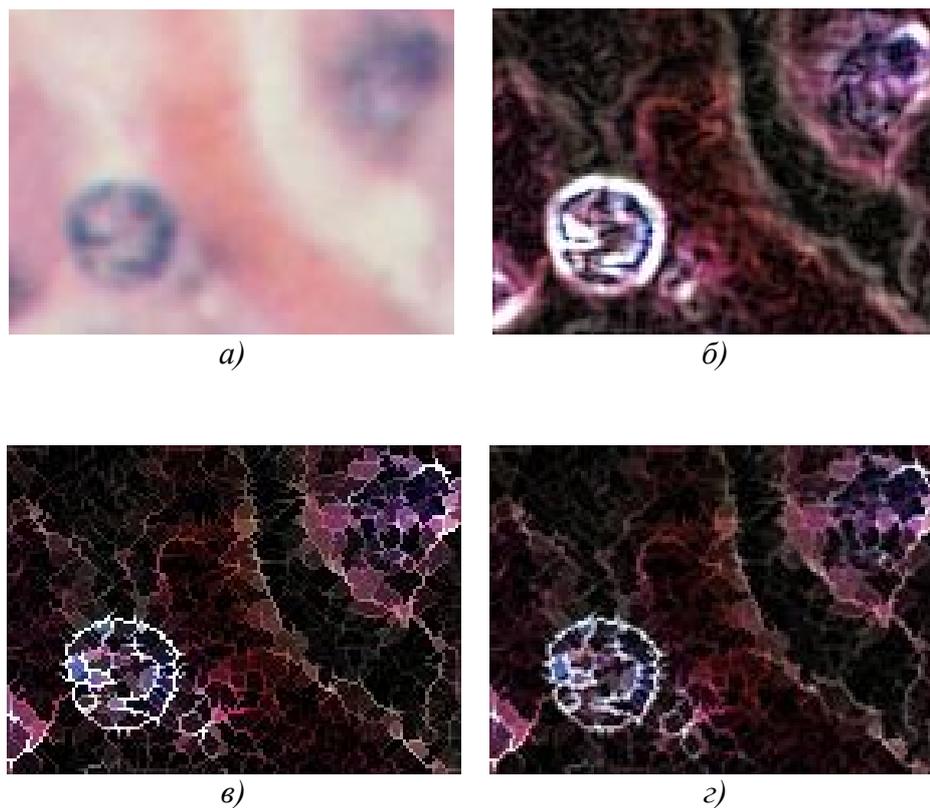


Рис. 4.14. Процесс выделения ядра клетки из изображения гистологического препарата: *а)* исходное изображение; *б)* градиентное преобразование Собеля по вектору расстояния цвета; *в)* полутонное утоньшение по вектору расстояния цвета; *г)* пороговая сегментация по цветности и бинаризация

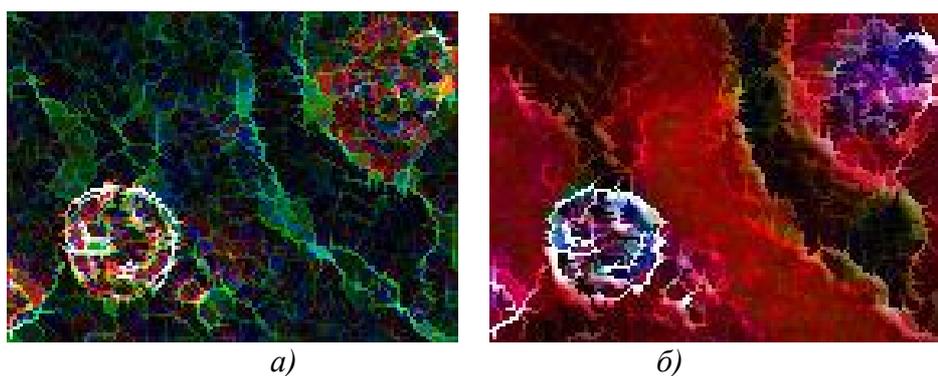


Рис. 4.15. Результаты полутонного утоньшения в задаче выделения ядра клетки из изображения гистологического препарата: *а)* в системе координат RGB; *б)* в системе координат YIQ

Система координат цвета LCH позволяет получить лучший результат, чем системы RGB или YIQ. Использование RGB и YIQ (рис. 4.15, б) приводит к возникновению ложных ветвей, а в случае RGB ещё к раздвоению хребтов, искажению геометрических колориметрических свойств (рис. 4.15, а). Отличия обработки в разных координатных системах проявляются намного сильнее при сложных морфологических операциях.

Глава 5

Вычисление характеристик объектов изображений

5.1. Типы характеристик и предварительная подготовка

Объекты определяются как области на изображении, соответствующие информативным структурам (тканям, волокнам, клеткам, их структурам и объединениям).

Для извлечения полной информации об объектах изображения и использования ее для постановки диагноза необходимо вычислить характеристики (параметры) объектов изображения: форму, структуру и содержимое объекта, текстурные и денситометрические характеристики и др. На их основе делаются выводы о типе объекта или о качестве содержимого изображения.

Выделяют следующие типы характеристик:

- геометрические;
- денситометрические;
- колориметрические;
- текстурные;
- количественные;
- дополнительные.

Существует два основных способа вычисления характеристик – интерактивный и автоматический. При интерактивном способе пользователь с помощью мыши обводит на изображении необходимый объект, например клетку, и программа автоматически измеряет все необходимые характеристики. Автоматическое измерение выполняется по бинарному изображению без участия человека.

Изначально вычисление характеристик выполняется в единицах, определяемых системой (системных), например, геометрические параметры вычисляются в пикселях.

Для получения результатов в реальных единицах перед вычислениями выполняется калибровка. Её суть заключается в приведении системных единиц к реальным. Традиционно различают два типа калибровки: линейную и нелинейную (рис. 5.1). Линейная калибровка задается путем определения расстояния между двумя точками, по которому на-

ходятся масштабные коэффициенты, используемые в вычислениях. Чаще всего линейная калибровка применяется для вычисления геометрических характеристик. Для нелинейной калибровки строится массив реперных точек, состоящий из системных величин и соответствующих им реальных значений, и определяется метод аппроксимации между точками, например полиномом Лагранжа. Этот способ калибровки часто используется в оптических и колориметрических измерениях.

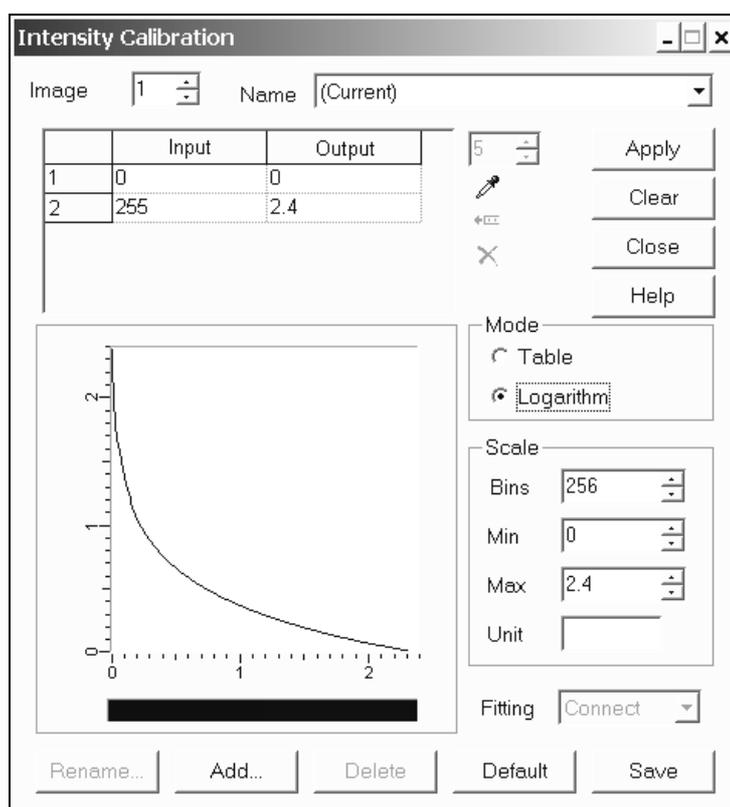


Рис. 5.1. Окно оптической калибровки системы «Биоскан», в котором установлена логарифмическая шкала оптической плотности

В случае неравномерной засветки данные также искажаются, что требует дополнительной обработки. Одним из путей коррекции изображений (для более точного вычисления характеристик объектов) является юстировка комплекса ввода изображения. Суть этого процесса заключается в аппаратной и программной регулировке устройств захвата и преобразования изображений по эталонному образцу. Подобная операция полезна для проведения денситометрических исследований, определения светового потока, колориметрических характеристик и соответствия спектральных характеристик системы реальным цветам.

Результирующие характеристики зависят от качества исходного изображения и от того, насколько хорошо были подготовлены объекты.

Если исследуются не только количественные характеристики, рекомендуется, чтобы объекты занимали от 40 до 80% от поля зрения. Анализ объектов с искаженной формой, артефактами и шумами приводит к плохим результатам и требует дополнительной обработки или удаления этих объектов.

5.2. Геометрические характеристики

Геометрические характеристики объектов лежат в основе любого исследования. Высокое разрешение электронной и оптической техники позволяет проводить вычисление геометрических характеристик объектов с высокой точностью. Наиболее часто измеряемыми параметрами являются площадь клетки или ядра, периметр клетки, линейные размеры, коэффициент вытянутости (отношение двух главных моментов) и коэффициент формы (степень отличия от круга).

В связи с дискретностью изображения существует два способа вычисления геометрических характеристик: традиционный и контурный. Это связано с тем, что пиксель имеет линейные размеры, а вычисление геометрических характеристик выполняется по узловым точкам. При традиционном способе эта точка находится в центре пикселя и имеет размер, равный площади пикселя; при выполнении контурного вычисления характеристик оперируют линейными размерами между точками, которые лежат на углах пикселя. Таким образом, при контурном способе вычисления вертикальное и горизонтальное расстояния между точками равны линейным размерам пикселя, диагональное определяется по теореме Пифагора и в случае равенства горизонтальных и вертикальных размеров кратно $\sqrt{2}$.

На рис. 5.2 показаны одни и те же объекты, но их площади в разных случаях отличаются. Например, в идеальном случае для квадрата, треугольника и круга площади будут равны 16, 8, 28, 26 пикселей, при традиционных вычислениях характеристик – 16, 10, 32 пикселей, при контурных – 14, 8, 28 пикселей. Нельзя говорить, что какой-либо из этих методов является неправильным. Выбор метода определяется качеством оцифровки и формой объекта, но в большинстве случаев, при правильном выборе увеличения, эта разница невелика и вполне сравнима с погрешностями, возникающими в результате оптических искажений и при приготовлении препарата, поэтому за основу принимается алгоритмически более удобный способ. Так, если исходные данные определены контуром, то выполняется контурное вычисление характеристик, в противном случае – традиционное.

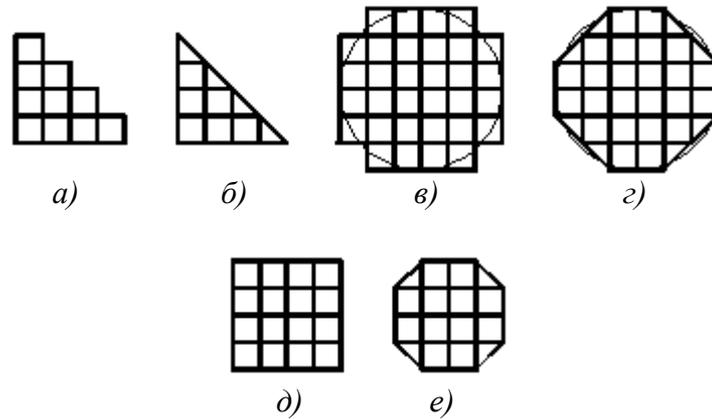


Рис. 5.2. Способы измерения площади объектов: а) треугольник – традиционным способом; б) треугольник – контурным способом; в) круг – традиционным способом; г) круг – контурным способом; д) квадрат – традиционным способом; е) квадрат – контурным способом

Геометрические характеристики делятся на плоскостные и стереометрические (объёмные). Изображения, исследуемые в оптической микроскопии, отображают проекцию объекта на плоскости, поэтому все стереологические характеристики являются аппроксимацией на основе какой-либо модели, рассчитываемой по геометрическим параметрам.

Прежде чем обсуждать геометрические плоскостные характеристики, следует отметить, что существует три формы представления объектов: обычная, заполненная и выпуклая. Обычная представляет объект после сегментации. Заполненная соответствует объекту без отверстий. Достигается она посредством операции заливания дыр. Выпуклая форма соответствует объекту без впадин. Строится она на основе поиска выступов на объекте и их соединения.

Выпуклая форма применяется при коррекции результатов сегментации выпуклых объектов, а также при вычислении топологических характеристик.

При определении характеристик пиксели объекта делятся на внутренние и граничные. Для геометрических характеристик различают три типа граничных пикселей, делающих определённый вклад в величину площади или периметра:

– вертикальный, если имеется сосед по вертикали, при этом вклад соответствует масштабному значению пикселя;

– горизонтальный, если имеется сосед по горизонтали, при этом вклад соответствует масштабному значению пикселя;

– диагональный, если имеется сосед по диагонали; линейный размер определяется по теореме Пифагора как $DU = \sqrt{sw^2 + sh^2}$, где sw –

горизонтальный масштабный коэффициент; sh – вертикальный масштабный элемент, площадь этого элемента определяется как $S=(sh \cdot sw)/2$.

Очень часто масштабные коэффициенты по вертикали и горизонтали равны, в этом случае вклад диагонального пикселя соответствует для линейных величин $\sqrt{2}$ от масштабного значения пикселя и $1/2$ для площади.

Рассмотрим основные геометрические характеристики. Одной из них является площадь. Этот параметр характеризует общие размеры объекта, поэтому является наиболее популярным среди исследователей.

При традиционном способе измерений площадь равна сумме всех пикселей, умноженной на горизонтальный и вертикальный масштабные коэффициенты:

$$AREA = \sum_{\text{объект}} sw \cdot sh,$$

где sw – горизонтальный масштабный коэффициент; sh – вертикальный масштабный элемент. В случае, если масштабные единицы равны, это будет сумма всех пикселей, умноженная на квадрат масштабного коэффициента.

При контурном способе вычисления площадь характеризуется областью, ограниченной замкнутым контуром, т. е. основную роль в расчетах играют граничные элементы, а именно их линейные размеры. На традиционном изображении с прямоугольными пикселями границы делятся на вертикальные, горизонтальные и диагональные. Соответственно пиксель характеризуется вертикальным, горизонтальным и диагональным линейными размерами, которые участвуют в определении площади.

Площадь определяется как сумма всех пикселей объекта за исключением граничных. Если масштабные коэффициенты равны, получаем формулу

$$AREA = \sum_{\text{объект}} \begin{cases} \frac{1}{2} \cdot unit & \text{для диагональных пикселей;} \\ unit & \text{в противном случае,} \end{cases}$$

где $AREA$ – площадь клетки; $unit$ – единица измерения.

В итоге количественные результаты измерения площади разными методами будут различными.

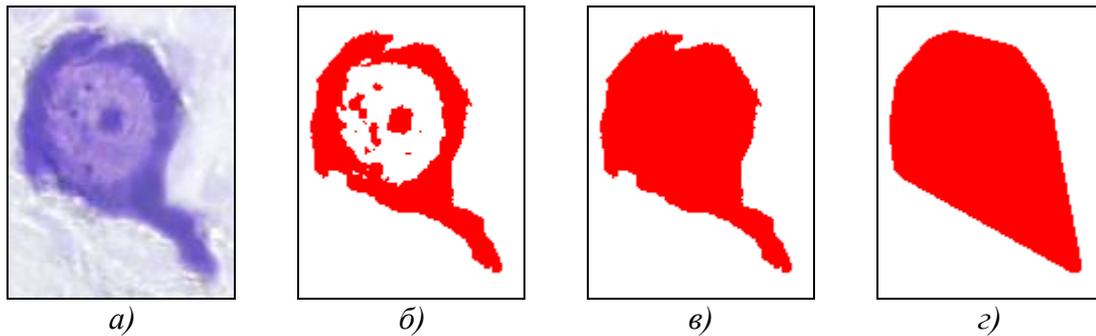


Рис. 5.3. Представление различных площадей на изображении нервной клетки:
а) исходное изображение; б) простая площадь; в) заполненная; з) выпуклая

Существует несколько способов вычисления площади. Выпуклая площадь (convex area) – это площадь многоугольника, вершины которого соответствуют выступам объекта (рис. 5.3, з). Простую площадь объекта иногда называют сетевой (net area) (рис. 5.3, б). Под полной площадью (filled area) понимают площадь заполненного объекта, т. е. объекта, в котором отсутствуют отверстия (рис. 5.3, в).

Периметр (perimeter) является контурной характеристикой, поэтому к нему применяются правила контурного способа вычислений. Он определяется как сумма расстояний между граничными пикселями и характеризует длину контура объекта. Определяют два типа периметров, состоящих из 4-связных граничных точек (N_4) и 8-связных (N_8). На практике чаще всего используется определение на основе 8-связности, тогда как определение на основе 4-связности используется только для решения частных или промежуточных задач.

Число диагональных связей $N_4 - N_8$ и оставшиеся пиксели в 8-окрестности $N_8 - (N_4 - N_8)$ определяют общий периметр, который при равных масштабных коэффициентах определяется как

$$perimeter = (\sqrt{2} - 1) \cdot N_4 + (2 - \sqrt{2}) \cdot N_8 .$$

По топологическим признакам различают реальный (рис. 5.4, б) и выпуклый (рис. 5.4, в) периметры. Для клетки границы соответствуют мембране, поэтому периметр может применяться для описания её свойств, но эта характеристика является более информативной, если используется совместно с другими.

Многие характеристики являются производными от других, например, диаметр определяется по формуле

$$D = \sqrt{\frac{4 \cdot AREA}{\pi}} .$$

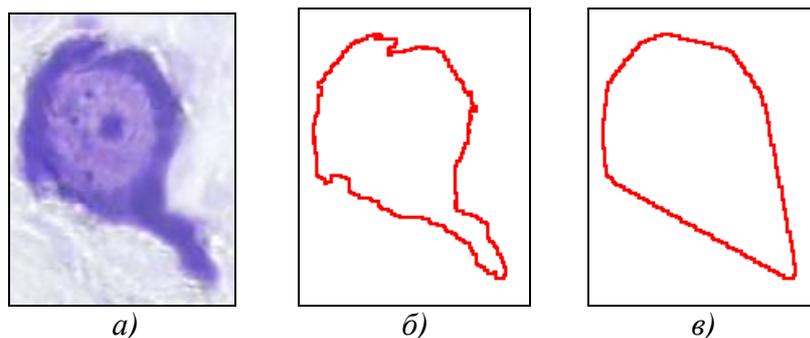


Рис. 5.4. Представление различных площадей на изображении нервной клетки:
а) исходное изображение; б) реальный периметр; в) выпуклый

Основная и малая (ортогональная) оси играют важную роль при описании объектов (major axis, minor axis) (рис. 5.5). Первая из них соответствует максимальной линии, которую можно провести через объект. Одним из способов поиска этих осей является простейший перебор.

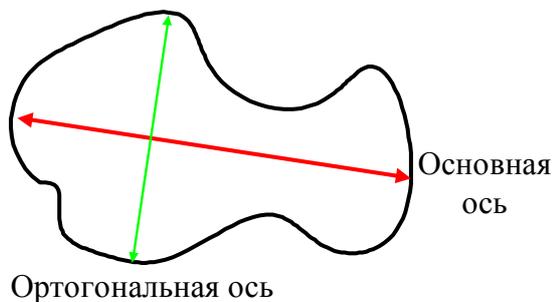


Рис. 5.5. Основная и малая оси объектов

Чаще всего для выпуклых объектов и клеток основная ось соответствует длине. Её назначение – охарактеризовать ориентацию объекта в пространстве. Производной характеристикой формы от основной оси является ортогональная ось (minor axis), которая определяется как максимальная линия внутри объекта, проходящая перпендикулярно основной оси. Ортогональная и основная оси образуют систему ординат, в которой изучаются индивидуальные характеристики объекта.

Комбинация характеристик осей, например соотношение их длин или угол между ними, характеризует топологию объекта. Форму объекта описывают несколько характеристик. Одна из них – это компактность (compactness, или *fcircle*) (рис. 5.6). Она определяется как отношение площади объекта к площади круга с одинаковыми периметрами:

$$\text{compactness} = \frac{4 \cdot \pi \cdot \text{AREA}}{\text{perimeter}^2}.$$

Круг считается объектом самой компактной формы, для него компактность равна 1, для квадрата компактность равна $\pi/4$.



Рис. 5.6. Объекты с разной компактностью

5.3. Топологические характеристики

Топологические характеристики описывают форму объектов и их морфологическую взаимосвязь. Наиболее яркими и интересными из них являются следующие: число Эйлера, характеризующее вложенность объектов внутри измеряемого; выпуклый периметр, соответствующий периметру минимального выпуклого полигона, в который вписывается объект; количество дыр (holes) или отверстий внутри объекта.

Еще одной топологической характеристикой является элонгация (elongation), которая определяется как отношение длины и ширины объекта (рис. 5.7):

$$elongation = \frac{width}{length},$$

где *width* – ширина описанного прямоугольника; *length* – его длина.

Величина этого параметра меняется от 0 до 1; если она равна 1, то объект имеет квадратную или круглую форму.

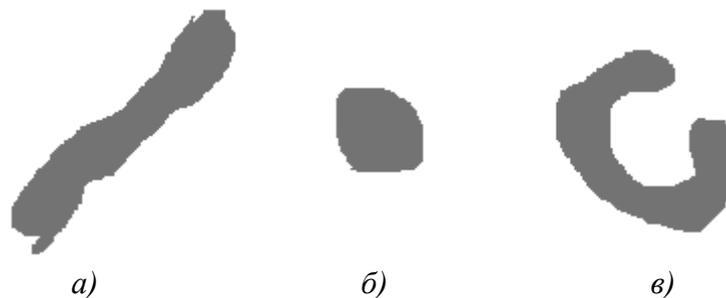


Рис. 5.7. Объекты с разной элонгацией: а) высокая элонгация; б) и в) низкая

Данное определение элонгации не может качественно описать форму искривленных областей, для которых длина не соответствует ос-

новой оси. В таком случае элонгация определяется как отношение площади объекта к квадрату его настоящей длины, которая соответствует максимальной области утоньшения:

$$elongation = \frac{AREA}{2 \cdot d^2},$$

где d – максимальное число итераций эрозии, необходимых для удаления объекта.

Эллиптичность (*essentricity*, или *ellipticity*) является отношением длин ортогональной оси к основной. Результат вычисления может меняться от 0 до 1 (рис. 5.8).

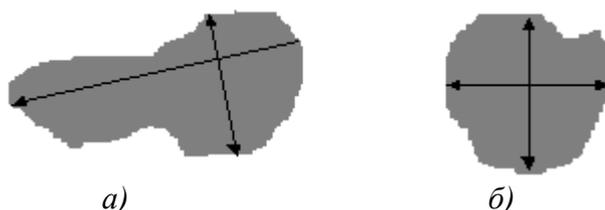


Рис. 5.8. Объекты с разной эллиптичностью: а) высокая эллиптичность; б) низкая

Этот параметр также вычисляется с помощью центральных моментов:

$$essentricity = \frac{(\mu_{02} - \mu_{20})^2 + 4 \cdot \mu_{11}}{AREA},$$

где μ_{02} , μ_{20} , μ_{11} – центральные моменты.

Иногда встречаются объекты, чувствительные только к округлости определенного типа (*roundness* или *circularity*) (рис 5.9), которая свидетельствует о локальной нерегулярности и вычисляется как отношение площади объекта к площади эквивалентного круга:

$$roudness = \frac{4\pi \cdot AREA}{(convex\ perimeter)^2}.$$

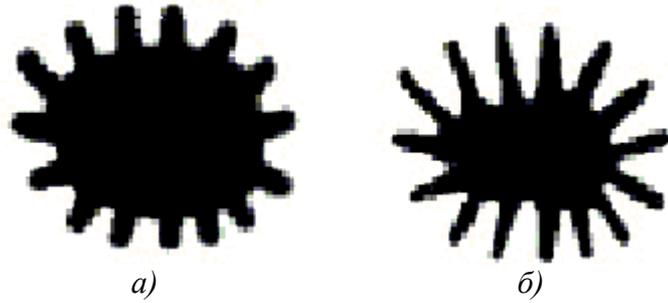


Рис. 5.9. Объекты с разной округлостью: а) округлость равна 0,584; б) округлость равна 0,447

Еще одной характеристикой, описывающей форму, является сферичность (*sphericity*, или *gratio*), которая определяется как отношение описанной и вписанной окружности (рис. 5.10):

$$sphericity = \frac{R_{in}}{R_{out}},$$

где R_{in} – внутренний радиус; R_{out} – внешний.

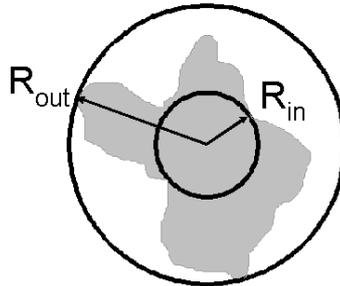


Рис. 5.10. Внутренний и внешний радиус объекта

Несмотря на большое количество характеристик, описывающих форму объекта, для характеристики выпуклости (*convexity*) используется отношение выпуклого периметра к обычному (рис. 5.11):

$$convexity = \frac{convex\ perimeter}{perimeter}$$

Если объект выпуклый, эта величина будет равна 1, при появлении впадин она уменьшается.

Похожая величина используется при изучении плотности объекта. Называется она целостностью (*solidity*) и определяется как отношение обычной и выпуклой площади:

$$solidity = \frac{AREA}{convex\ area}.$$

Если объект целый и не имеет дыр и впадин, эта величина равна единице, при их появлении она уменьшается.

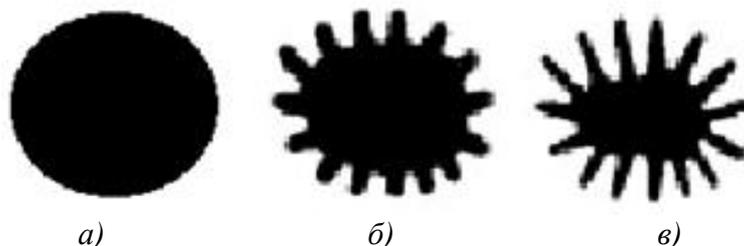


Рис. 5.11. Объекты разной выпуклости и целостности: а) выпуклость и целостность равны 1; б) выпуклость равна 0,483, целостность – 0,782; в) выпуклость равна 0,349, целостность – 0,592

Когда анализируются изображения со многими объектами, параметры формы вычисляются индивидуально. Описание общей формы выполняется на основе индивидуальных параметров, например таких, как стандартное отклонение площади, основная и дополнительная оси, периметр и округлость или среднее компактности, элонгации, периметра и площади. Все эти величины предназначены в основном для описания площадных объектов типа клеток.

Для протяженных объектов, например сосудов и волокон, в продольном сечении многие измерения имеют свою специфику (рис. 5.12), например длина обычного объекта определяется как максимальное расстояние между двумя точками объекта, в то же время основной физической смысл имеют длина и толщина развернутого, вытянутого волокна. Такая длина соответствует размерам средней линии, а толщина – минимальному расстоянию между двумя граничными точками внутри объекта и может определяться как

$$fibre\ length = \frac{perimeter - \sqrt{perimeter^2 - 16 \cdot area}}{4};$$

$$fibre\ width = \frac{area}{fibre\ length},$$

где *fibre length* – длина волокна; *fibre width* – толщина волокна.

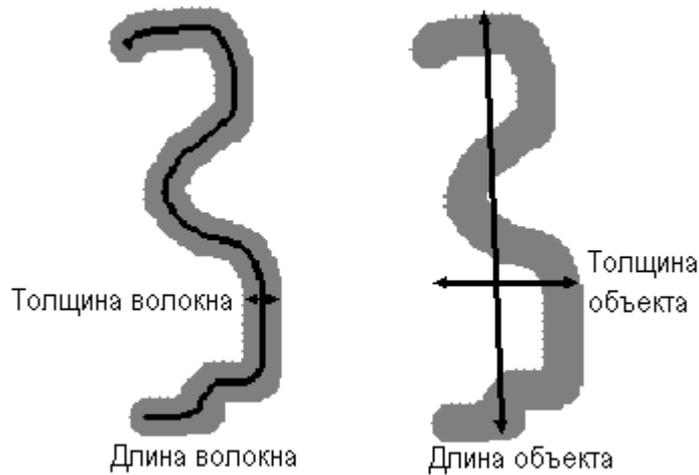


Рис. 5.12. Отличие между линейными характеристиками волокна и объекта

На основе разницы между этими понятиями определяют ряд новых параметров, например закрученность (*curl*) волокна – отношение длины объекта к длине волокна:

$$curl = \frac{length}{fibre\ length}$$

Очень много информации о характеристиках объектов несут в себе статистические моменты. Они играют важную роль при анализе формы и лежат в основе многих параметров. Выделяют пространственные (*spatial*), центральные и нормализованные центральные моменты.

Пространственные моменты определяются как

$$\mu_{pq} = \sum_p \sum_q x^p y^q,$$

где x , y – координаты точек объекта, p и q определяют порядок момента.

Нулевой момент μ_{00} соответствует сумме пикселей внутри объекта и равен традиционной площади. Моменты первого порядка (μ_{10} по горизонтали и μ_{01} по вертикали), нормализованные к площади, соответствуют центру тяжести объекта. Центральными называются моменты большего порядка. Они описывают объекты без учета их положения в пространстве. На практике используют нормализованные к площади центральные моменты, по которым судят о форме объектов. Так, первый центральный момент μ_{11} свидетельствует об отличии от круглой формы, вторые центральные моменты μ_{20} и μ_{02} – о симметричности объекта относительно горизонтальной и вертикальной осей.

На практике большой информативностью обладают комбинации параметров между различными объектами, являющиеся составляющими одного целого, так называемые межобъектные характеристики, например ядерно-цитоплазматическое отношение. Особенность измерения в этом случае заключается в использовании данных объектов разного типа и отслеживании, в какой конкретный момент объект измеряется. Сложность измерения такого параметра заключается в том, что он является математической комбинацией площадей различных объектов и вычисляется по формуле $N=A_{я}/A_{ц}$, где $A_{я}$ – площадь ядра, $A_{ц}$ – площадь цитоплазмы, причем $A_{ц}=A_{к}-A_{я}$, где $A_{к}$ – площадь клетки. В данном случае реализовать измерение можно только с помощью канала (*class*) – параметра, характеризующего принадлежность объекта к определенному типу. Используя встроенный макроязык-скрипт, который поддерживают большинство систем анализа изображений, можно сохранить значение площади клетки в специальной переменной, затем с помощью параметра канала можно классифицировать объекты во время вычисления их характеристик и определить момент измерения ядра для расчета ядерно-цитоплазматического отношения.

Ядерно-цитоплазматическое отношение является характеристикой покоящихся клеток. Его величина различна для разных типов клеток, но для одного типа это отношение остается постоянным. Ядро и цитоплазма претерпевают изменения аллометрического типа. В условиях патологии это отношение коренным образом меняется, особенно при онкологических заболеваниях. Объемные изменения ядра, наступающие в результате функциональных сдвигов, предшествуют изменению объема цитоплазмы, поэтому по ядерно-цитоплазматическому отношению можно судить о стадии и тяжести протекающей болезни.

5.4. Объемные характеристики

Все характеристики объема можно разделить на три класса [2]:

- основанные на количестве составляющих;
- использующие поверхность объекта;
- определяемые на основе объема.

Параметры объема вычисляются с помощью стереологических измерений. Один из самых распространенных стереологических параметров – объем. Понятие объема на плоскости не имеет смысла, однако если объект имеет симметричную форму, объем можно аппроксимировать. Наиболее известны два способа вычисления объемов.

1. Если форма объекта стремится к шару, то объем можно вычислить по формуле

$$V=4/3\pi r^3 = \pi D^3/6=0,5236D^3,$$

где D – диаметр круга, эквивалентного по площади объекту [2].

2. Если форма объекта стремится к эллипсоиду, то объем можно вычислить по формуле

$$V=\pi D_{\max} D_{\min}^2/6=0,5236 D_{\max} D_{\min}^2,$$

где D_{\max} – максимальный диаметр объекта; D_{\min} – минимальный диаметр [2].

Многими исследователями доказано, что объём ядра зависит не только от внутренних функциональных признаков, например количества ДНК и РНК, но и связан с его окружением, поэтому на практике является более устойчивым и информативным параметром.

Аналогично определяется площадь поверхности. Если форма объекта стремится к шару, то объем можно вычислить по формуле

$$S=4\pi r^2=2\pi D^2,$$

где D – диаметр круга, эквивалентного по площади объекту.

5.5. Текстурные характеристики

Несмотря на широкое применения термина «текстура», для него нет точного определения [24]. Часто под текстурой понимают неоднородность либо повторяемость фрагментов изображения. Поэтому наличие какой-либо периодичности является текстурной характеристикой объекта.



Рис. 5.13. Наложение сетки горизонтального интерцепта (пунктирные линии) и горизонтальные хорды (прямые линии)

Наиболее известные текстурные характеристики:

Interceptx, Intercepty – горизонтальный и вертикальный интерцепт, число пересечений горизонтальной или вертикальной сетки, наложен-

ной на изображение, с границами объектов (рис. 5.13). Шаг сетки задается глобальной переменной и по умолчанию равен 1.

Refchord – стереологический параметр, равный суммарной длине горизонтальных линий, наложенных на изображение сетки.

Sumchord – стереологический параметр, равный суммарной длине горизонтальных хорд, наложенных на изображение сетки, которые попадают внутрь объектов.

Anisotropy – общая анизотропия бинарного изображения по отношению к координатным осям.

5.6. Денситометрические и колориметрические характеристики

Денситометрические характеристики базируются на определении оптической плотности изображения.

Оптическая плотность ядра клетки может быть измерена путем сравнения количества света, прошедшего через ядро клетки и через чистое поле. Величина светового потока аппаратно представляется в виде значения яркости – числа от 0 до 255 (0 – 65535 или 0 – 4294967295 для изображений с глубоким денситометрическим разрешением). Это не абсолютное значение величины светового потока, а относительная величина. Для того чтобы измерить абсолютную величину светового потока, необходимо провести калибровку и получить кривую, по которой пересчитывается величина яркости в абсолютное значение светового потока. Очевидно, что для пересчета вычисленной величины яркости в значение оптической плотности нужна другая кривая.

Другим способом получения оптической плотности является использование дополнительного изображения без объектов в качестве фона, тогда оптическая плотность пересчитывается по стандартной формуле. Этот способ является более точным для микроскопических измерений, так как позволяет учитывать неравномерность фона, возникающую из-за дефектов освещения. В таком случае оптическая плотность определяется как

$$OD_i = -\log\left(\frac{I_i}{I_0}\right),$$

где OD_i – оптическая плотность; I_i – яркость точки; I_0 – яркость фона (рис. 5.14).

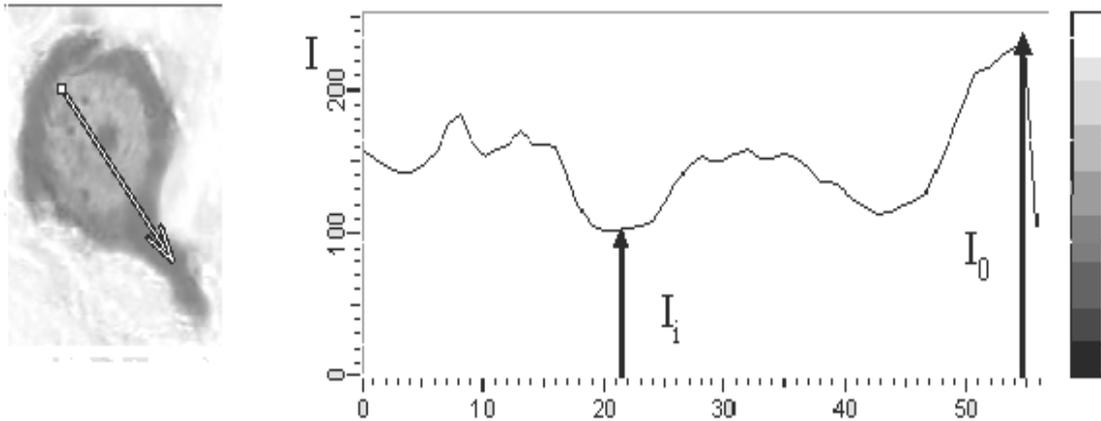


Рис. 5.14. Профиль яркости: I_i – яркость точки; I_0 – яркость фона

Распространенный способ определения оптической плотности использует граничные значения интенсивности:

$$OD_{x,y} = -\log\left(\frac{I_{x,y} - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}}\right),$$

где OD_{xy} – оптическая плотность; I_{xy} – яркость точки; I_{\min} – минимальная яркость; I_{\max} – максимальная.

Кроме оптической плотности, к денситометрическим параметрам относится трансмиссия – отношение яркости объекта к яркости фона:

$$T_i = \frac{I_i}{I_0}.$$

На практике эти параметры рассчитываются для каждого пикселя, для объектов используются их среднее и интегральное значения, а также дисперсия.

Измерение цвета клеток (колориметрия) имеет большое значение при изучении ферментативных реакций и миграции вещества в клетке или ткани. Колориметрия – это вычисление цветовых характеристик на изображении. Если диагностика строится на основе анализа цвета и оттенков цветов клеток и тканей, то без точного определения цветовых характеристик трудно поставить точный диагноз. Компьютер может с большой точностью вычислять цветовые характеристики, что дает возможность ставить более точный диагноз.

Определение яркости флуоресценции также относится к денситометрическим характеристикам. При работе с флуоресценцией необходимы специальные цветные телекамеры, работающие в режиме накоп-

ления, черно-белые камеры или сканеры, позволяющие получать изображения с глубоким денситометрическим разрешением (в которых яркость меняется в пределах 0 – 65535 или 0 – 4294967295). Наиболее ярким примером использования такого разрешения являются работы с геномными микромассивами. Существует несколько способов получения цветного изображения:

1. Излучается только одна длина волны, и флуоресцентное изображение светится только одним цветом. В этом случае в компьютер вводится черно-белое изображение и программно преобразуется в изображение необходимого цвета.

2. Излучается несколько длин волн. В этом случае необходимо ввести в компьютер три изображения с помощью трех фильтров – красного, зеленого и синего. После этого в компьютере из трех изображений синтезируется одно цветное. Однако это будут не реальные цвета, а псевдоцвета (искусственная окраска).

Применение цветной телекамеры позволяет провести простой спектральный анализ в трех спектральных областях – красной, зеленой и синей, так как цветное изображение состоит из трех соответствующих изображений. Однако возможно проведение и более тонкого спектрального анализа. Например, при использовании черно-белой телевизионной камеры и десяти узкополосных интерференционных светофильтров возможно получение характеристик излучения в десяти спектральных диапазонах. При этом с помощью подбора фильтров можно выделить любое количество спектральных линий в области спектральной чувствительности телекамеры – от 400 до 1 000 нм. Преимущество такого подхода состоит в том, что в результате фиксируется распределение излучения сразу во всей плоскости, а не в точке, как при стандартных методах спектрометрии.

При соответствующей калибровке можно переходить от относительных к абсолютным величинам для описания свечения и энергии излучения. Существует несколько способов определения спектральных характеристик. Большинство из них основаны на составлении калибровочных таблиц.

Для традиционной цветной камеры, с диапазоном цветных компонент от 0 до 255, самым простым способом определения спектральных характеристик является использование хроматической диаграммы МКО (CIE). Волны спектра соответствуют углу на кривой диаграммы. Пространство RGB необходимо преобразовать в XYZ. После этого можно получить длину волны от 380 до 780 нм с шагом в 5 нм, используя специальный массив, в котором длина волны определяется по координатам X, Y:

```
spectrum_xy[][2] = {  
    {0.1741, 0.0050}, {0.1740, 0.0050}, {0.1738, 0.0049}, {0.1736, 0.0049},  
    {0.1733, 0.0048}, {0.1730, 0.0048}, {0.1726, 0.0048}, {0.1721, 0.0048},  
    {0.1714, 0.0051}, {0.1703, 0.0058}, {0.1689, 0.0069}, {0.1669, 0.0086},  
    {0.1644, 0.0109}, {0.1611, 0.0138}, {0.1566, 0.0177}, {0.1510, 0.0227},  
    {0.1440, 0.0297}, {0.1355, 0.0399}, {0.1241, 0.0578}, {0.1096, 0.0868},  
    {0.0913, 0.1327}, {0.0687, 0.2007}, {0.0454, 0.2950}, {0.0235, 0.4127},  
    {0.0082, 0.5384}, {0.0039, 0.6548}, {0.0139, 0.7502}, {0.0389, 0.8120},  
    {0.0743, 0.8338}, {0.1142, 0.8262}, {0.1547, 0.8059}, {0.1929, 0.7816},  
    {0.2296, 0.7543}, {0.2658, 0.7243}, {0.3016, 0.6923}, {0.3373, 0.6589},  
    {0.3731, 0.6245}, {0.4087, 0.5896}, {0.4441, 0.5547}, {0.4788, 0.5202},  
    {0.5125, 0.4866}, {0.5448, 0.4544}, {0.5752, 0.4242}, {0.6029, 0.3965},  
    {0.6270, 0.3725}, {0.6482, 0.3514}, {0.6658, 0.3340}, {0.6801, 0.3197},  
    {0.6915, 0.3083}, {0.7006, 0.2993}, {0.7079, 0.2920}, {0.7140, 0.2859},  
    {0.7190, 0.2809}, {0.7230, 0.2770}, {0.7260, 0.2740}, {0.7283, 0.2717},  
    {0.7300, 0.2700}, {0.7311, 0.2689}, {0.7320, 0.2680}, {0.7327, 0.2673},  
    {0.7334, 0.2666}, {0.7340, 0.2660}, {0.7344, 0.2656}, {0.7346, 0.2654},  
    {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653},  
    {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653},  
    {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653},  
    {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653}, {0.7347, 0.2653},  
    {0.7347, 0.2653}}}
```

Следует отметить, что все описанные способы вычисления характеристик цвета можно использовать только при качественно откалиброванных и отъюстированных системах ввода изображения, так как даже незначительные ошибки при вводе приводят к неправильным результатам.

Глава 6

Задачи оптической микроскопии, решаемые с помощью систем анализа изображений

6.1. Исследование пирамидальных нейронов головного мозга разной степени поражения вирусом простого герпеса

Среди всех вирусных инфекций наиболее распространен герпес. Свыше 90% людей земного шара в настоящее время инфицировано вирусом простого герпеса и до 20% из них имеют те или иные клинические проявления инфекции. По данным ВОЗ, смертность из-за вируса герпеса стоит на втором месте после гриппа. Это обусловлено повсеместным распространением вируса простого герпеса, многообразием клинических проявлений заболевания и, как правило, хроническим его течением, а также разнообразными путями передачи возбудителя инфекции. Герпес может сопровождаться поражениями центральной нервной системы, глаз, печени, слизистых оболочек и кожных покровов. Герпес – самая распространенная вирусная инфекция человека, длительно существующая в организме, преимущественно в латентной форме.

Нейроны в пораженных герпесом тканях делятся на здоровые (рис. 6.1, *а*), первого (рис. 6.2, *а*) и второго типа поражения (рис. 6.3, *а*). Для выделения клеток проводится адаптивная пороговая сегментация. Учитывая то, что площади пирамидальных нейронов меняются от 8 до 2 000 мк², объекты, не попадающие в этот промежуток, удаляются. Затем строится иерархическое изображение клеток для просветлённых ядер.

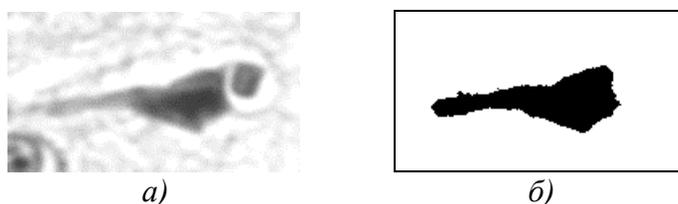


Рис. 6.1. Изображение здорового нейрона: *а*) полутоновое; *б*) иерархическое

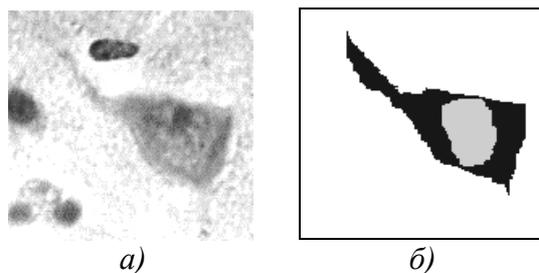


Рис.6.2. Нервные клетки с первым типом поражения: *а)* исходное изображение; *б)* иерархическое

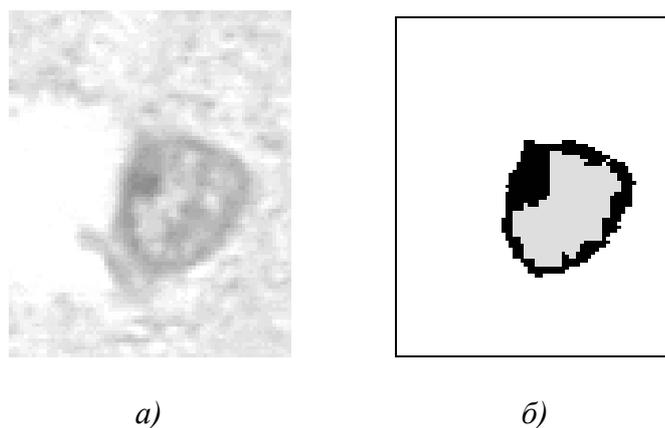


Рис. 6.3. Нервные клетки со вторым типом поражения: *а)* исходное изображение; *б)* иерархическое

Все оставшиеся объекты делятся на четыре класса.

К первому классу относятся здоровые клетки (рис. 6.1). Они обладают треугольным телом. Поэтому для классификации этих клеток используется значение фактора формы, которое может меняться в пределах от 0,001 до 0,7. Ядра здоровых клеток хорошо прокрашены и темнее цитоплазмы, поэтому на иерархическом изображении они не выделяются. Следовательно, вторым параметром, характеризующим такие клетки, является число Эйлера (E_8). В данном случае для здоровых нейронов оно равно 0.

Ко второму классу относятся клетки с включениями первого типа (рис. 6.2). Форма их тела меняется от треугольной к круглой. Поэтому фактор формы для этих клеток меняется от 0,001 до 1 и не может являться основным параметром классификации. Ядро, пораженное вирусом, не прокрашивается и имеет светлый оттенок. Следовательно, оно выделяется на иерархическом изображении отдельным цветом. В данном случае число Эйлера будет равно 1. Основным отличием второго класса является ядерно-клеточное отношение, которое меньше 0,8.

Третий класс состоит из клеток с включениями третьего типа (рис. 6.3). Форма таких клеток близка к кругу, причем цитоплазмы у

клетки практически не осталось. Поэтому для третьего класса используются следующие параметры: фактор формы меняется от 0,8 до 1, число Эйлера равно 1, ядерно-клеточное отношение меняется от 0,8 до 1.

Четвёртый класс включает все оставшиеся объекты, которые удаляются сразу после их определения. В результате остаются изображения здоровых нейронов и клеток с включениями первого и второго типа, геометрические и оптические параметры которых могут служить не только для научных исследований, но и применяться в задачах практической диагностики заболевания.

6.2. Определение плотности радиальных и тангенциальных волокон мозговой ткани

Нервные волокна играют важную роль в функционировании органов млекопитающих. Именно по ним передаются управляющие сигналы, позволяющие одновременно функционировать разным органам. Поэтому показатель относительной плотности является важным параметром, характеризующим деятельность нервной системы и организма в целом. Результаты измерения относительной длины и плотности волокон на единице площади нервных волокон головного мозга могут свидетельствовать об их гибели при различных болезнях, например при слабоумии.

Изображение радиальных и тангенциальных волокон достаточно сложное (рис. 6.4, *а*). В отдельных областях из-за близкого расположения волокон происходит затемнение фона, что приводит к неправильному результату при пороговой сегментации (рис. 6.4, *б*).

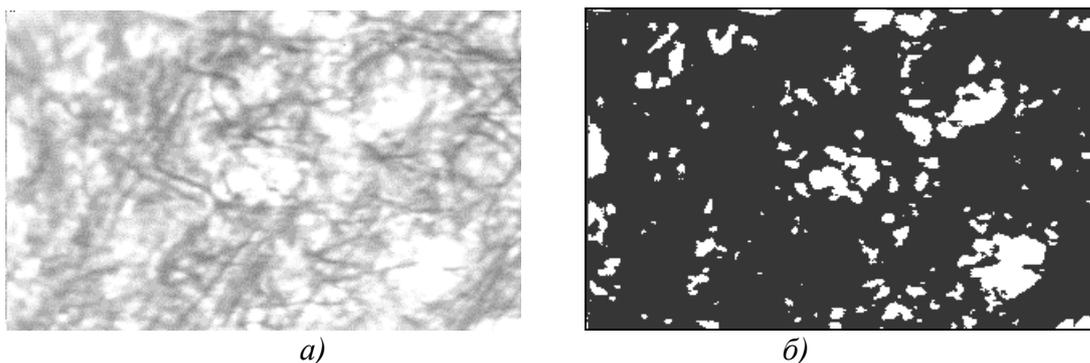


Рис. 6.4. Радиальные и тангенциальные волокна мозговой ткани: *а*) исходное изображение (светлые округлые участки – клетки с более светлым ядром и нечеткой цитоплазмой); *б*) результат адаптивной пороговой сегментации нервных волокон

Добиться улучшения результата можно, применив полутонное утоньшение с последующей бинаризацией (рис. 6.5, *а*).

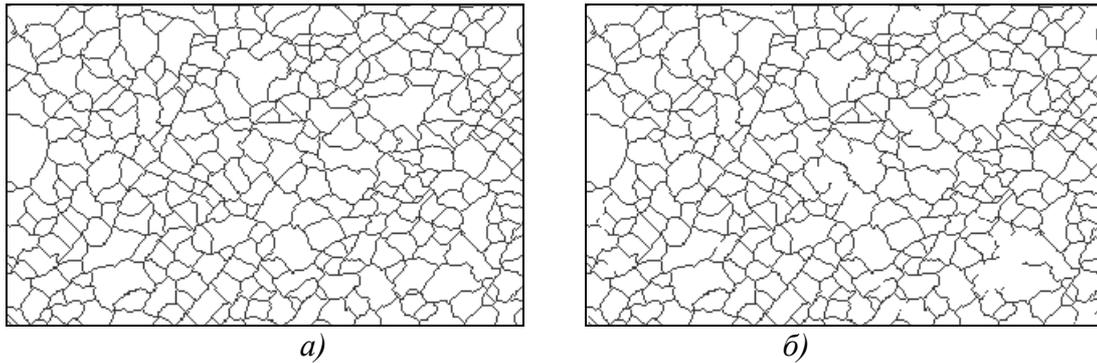


Рис. 6.5. Бинарные изображения радиальных и тангенциальных нервных волокон головного мозга: а) после полутонного утоньшения изображения, б) после объединения результатов пороговой сегментации и утоньшения.

Результат полутонного утоньшения также не является правильным, так как на светлых областях клеток, находятся волокна. Заметим, что эти области отлично выделены на изображении, полученном с помощью пороговой сегментации (рис. 6.4, б). Если выполнить конъюнкцию изображений с результатом пороговой сегментации и полутонного утоньшения, получим бинарное изображение сети нервных волокон (рис. 6.5, б).

Для вычисления относительной длины достаточно измерить площадь сети нервных волокон на бинарном изображении (рис. 6.7) и разделить её на общую площадь изображения; например, для изображения размером 320×248 пикселей этот параметр будет вычисляться по формуле $Lenght_{rel} = AREA / 79360$. Для определения плотности волокон на единицу площади относительная длина умножается на среднюю ширину волокна.

Таким образом, из достаточно сложных изображений волокон удалось получить их точные количественные характеристики.

6.3. Наблюдение обмена веществ в клетке с помощью радиоавтографии

Радиоавтография – относительно новый гистологический метод, расширивший возможности световой и электронной микроскопии. Для радиоавтографии необходимы либо изотопы элементов, непосредственно используемых клеткой, либо изотопы, способные связываться с веществами, используемыми клеткой. Поскольку радиоактивный изотоп участвует в биохимических процессах так же, как и его нерадиоактивный аналог, и в то же время испускает излучение, путь изотопов в организме можно проследить с помощью различных методов обнаружения радиоактивности.

На рис. 6.6, *а* показаны клетки крови с радиоизотопными метками. С помощью пороговой сегментации можно получить бинарные изображения для определения клеток (рис. 6.6, *б*) и радиоизотопных меток (рис. 6.6, *в*).

После удаления мелких по площади объектов и объектов, прижатых к краю, получаем бинарное изображение клеток. Для последующего анализа каждой клетке присваиваем свой индивидуальный цвет (рис. 6.7, *а*). С помощью операции конъюнкции для изображений меток (рис. 6.6, *в*) и клеток (рис. 6.6, *а*) получаем изображение меток в клетках, причем метки, принадлежащие одной клетке, отмечены своим индивидуальным цветом.

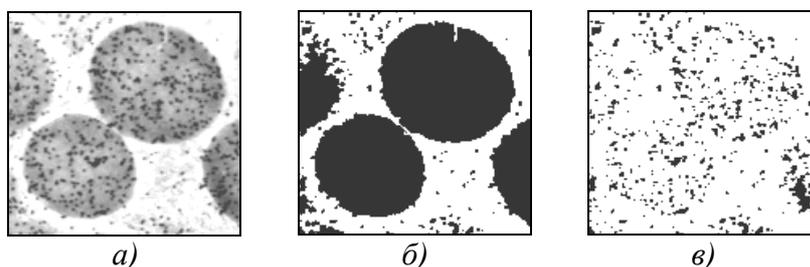


Рис. 6.6. Клетки крови с радиоизотопными метками: *а*) полутоновое изображение; *б*) результат пороговой сегментации для сегментации клеток; *в*) бинарное изображение радиоизотопных меток, полученных пороговой сегментацией

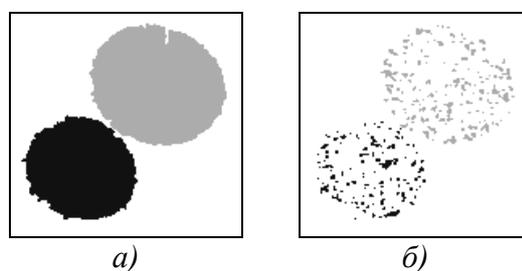


Рис. 6.7. Обработанные изображения: *а*) клетки крови; *б*) радиоизотопные метки в клетках

Object #	Class	area, 2	count
1	1	7.5985	99
2	2	15.245	129

Рис. 6.8. Результаты измерений: AREA – площадь меток в клетке; CONT – их количество

После подсчета количества меток каждого цвета (N) и измерения площади клеток ($AREA$) (рис. 6.8) рассчитывается концентрация вещества в клетке как отношение количества меток к площади клетки ($N/AREA$) (рис. 6.7). Этот параметр позволяет создавать модель обмена веществ в клетке и прогнозировать развитие клетки в дальнейшем.

6.4. Исследование оптических характеристик культуры нервных клеток

Для изучения физиологических особенностей клеток исследования часто проводятся на высаженных культурах. Одним из наиболее популярных объектов, исследуемых в искусственных средах, являются нервные клетки. Обычно изучаются геометрические особенности и оптические характеристики, позволяющие делать выводы об обмене веществ и прочих физиологических процессах в клетке. Для решения этих задач необходимо получить образ клетки на изображении.

Высаживаемые культуры можно разделить на два типа: содержащие изолированные клетки и конгломераты клеток. Для культур первого типа исследуются индивидуальные особенности клеток. Образ клетки легко определяется – с помощью пороговой сегментации. Второй тип более интересный и более сложный. Исследование клеток в конгломерате позволяет не только оценить особенности индивидуальной клетки, но и изучить влияние клеток друг на друга и их взаимодействие.

Рассмотрим изображение конгломерата нервных клеток, полученное посредством фазово-контрастного микроскопа (рис. 6.9, *а*). Клетки сливаются и образуют единое тело, но необходимо знать геометрическое положение каждой. Для этого в другой фазе создается изображение ядер этих клеток (рис. 6.9, *б*), при этом геометрическое положение препарата не меняется. Эти ядра легко сегментируются и могут служить реперными точками при определении тела клетки.

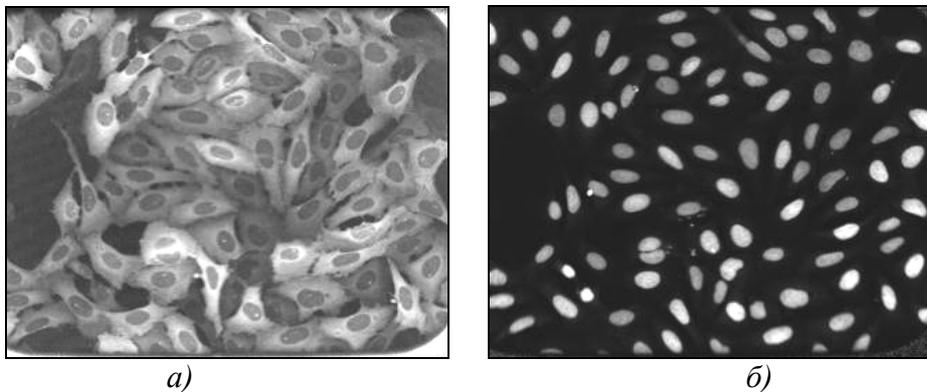


Рис. 6.9. Изображения конгломерата нервных клеток: *а*) цитоплазма; *б*) ядра

Изображение цитоплазмы является сложным и не позволяет применить стандартные методы пороговой сегментации. Методы морфологической сегментации также неприменимы к такому изображению из-за поллой структуры клеток. Полости в клетке соответствуют ядрам. Для получения целого изображения проводится объединение изображений ядер и цитоплазмы посредством арифметического суммирования (рис. 6.10, *а*).

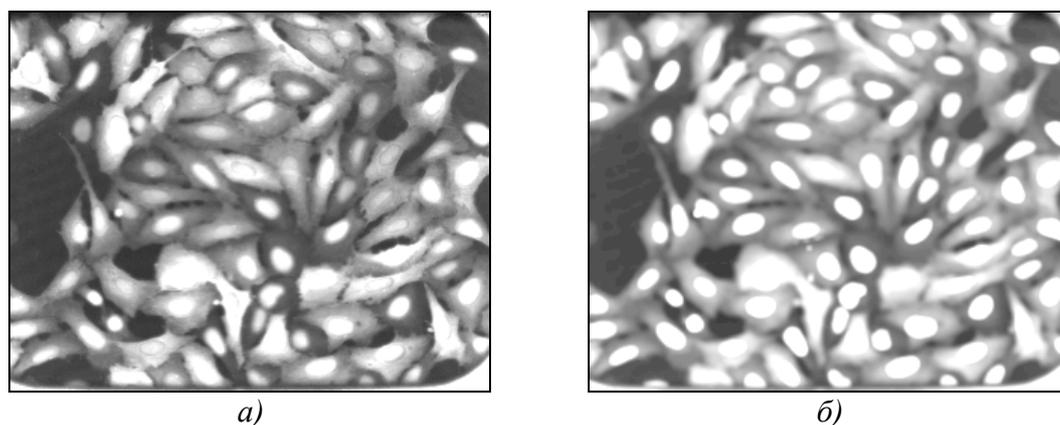


Рис. 6.10. Совмещенное изображение клеток: *а*) после суммирования; *б*) после предобработки

Полученное изображение включает точечные и топологические шумы, которые препятствуют морфологической сегментации, поэтому выполняется предобработка. Для усиления топологических свойств клеток проводятся гамма-контрастирование, а затем обработка топологических дефектов и шумов. Удаляются точечные шумы, проводятся коррекция ландшафта посредством операции отмыкания (open) и сглаживание топологических шумов посредством стандартного усредняющего фильтра большого раstra, увеличивается контраст границ с помощью *min*-фильтрации. В результате получается изображение, состоящее из ярких холмов, соответствующих клеткам (рис. 6.10, *б*). Учитывая этот факт, можно определить зоны, в которых находятся клетки. Для удаления возможных ошибок необходимо выполнить контрольную операцию вычитания бинарного образа ядер клеток, который легко получается методом пороговой сегментации Отсу [22]. После этого проводится морфологическая операция удаления хвостов (рис. 6.11, *а*). В результате получают зоны, часть которых соответствует фону. Для их локализации выполняется пороговая сегментация предыдущего полутонового изображения (рис. 6.11, *б*), и от полученного изображения отнимаются границы зон. При наложении бинарного изображения ядер получается бинарный образ клеток (рис. 6.12).

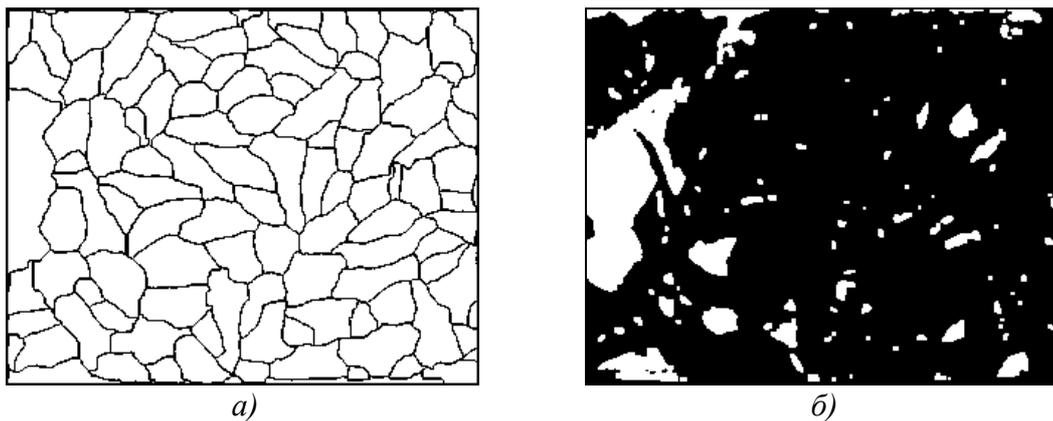


Рис. 6.11. Зоны ограничения: *а)* для индивидуальных клеток; *б)* для всех клеток

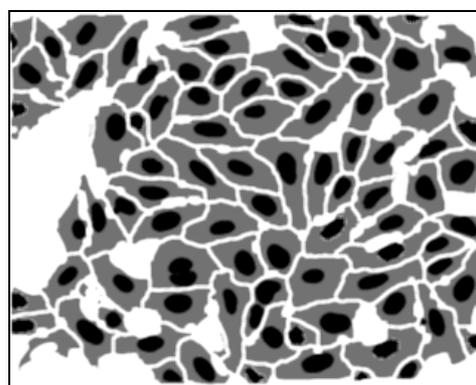


Рис. 6.12. Бинарное изображение клеток, пригодное для индивидуальных измерений

Полученное изображение клеток пригодно для измерения их индивидуальных параметров. Важными характеристиками, позволяющими судить о процессах, происходящих внутри клеток при их взаимодействии, являются оптическая плотность и ядерно-цитоплазматическое отношение. По результатам измерений, которые выполнены для изображений клеток, снятых в различных условиях, можно делать выводы о их физиологических особенностях.

Глава 7

Система анализа цитологических изображений «Контур»

7.1. Общее назначение системы

Для дифференциальной диагностики тиреоидных заболеваний разработана система «Контур», функционирующая на базе персонального компьютера, светового микроскопа, цветной телекамеры и захватчика кадров. Наряду с высокими техническими характеристиками система имеет мощную программную поддержку.

Программное обеспечение системы, работающее в среде Windows, включает пакеты программ:

- для автоматизированной обработки и бинаризации цветных изображений;
- автоматического растр-векторного преобразования и формирования объектов в терминах цитологической диагностики;
- автоматического анализа изображений с элементами распознавания биологических объектов;
- автоматизации операций по морфометрической оценке биологических объектов по 25 количественным параметрам, характеризующим изменения как самих объектов, так и степени их агрегированности;
- статистической обработки результатов, реализации способов дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных заболеваний щитовидной железы.

Система «Контур» является приложением Microsoft Windows, построенным на основе интерфейса составных документов. Система поддерживает загрузку цитологических растровых изображений основных графических форматов. Единая графическая оболочка позволяет одновременно производить обработку изображений, сегментацию и морфометрический анализ.

Система предоставляет возможность морфометрической оценки следующих объектов:

- клеток лимфоидного ряда ткани щитовидной железы (одиночных объектов);
- ядер тиреоцитов (пар объектов);

– агрегатов тиреоцитов (составных объектов).

Выбор типа объектов для анализа может происходить через меню или через панель инструментов. При этом пользователю предоставляется возможность создания новой базы данных для одного из трех режимов диагностики либо загрузки уже созданных баз данных для проведения статистического анализа.

Работа программы может происходить в ручном, полуавтоматическом или автоматизированном режимах. Основным режимом работы является автоматизированный. Обычная последовательность операций состоит в применении автоматических алгоритмов сегментации, и только в случае необходимости осуществляется переход в другие режимы.

На выходе операций сегментации и оконтуривания создается векторное описание биологических объектов. Встроенный редактор векторной графики позволяет производить присвоение семантики выделенным объектам и обеспечивает набор стандартных операций над векторными объектами, таких как создание и удаление объекта, добавление точек в выбранный контур, разбиение объекта и т. п.

При работе в ручном режиме пользователь получает возможность одновременно производить операции над растровым и векторным содержанием документа, что является несомненным преимуществом разработанной системы. При манипуляции векторными объектами происходит автоматическое (в зависимости от текущего положения курсора) переключение между различными режимами работы векторного редактора. Это позволяет пользователю уменьшить потенциальные потери и в целом повышает удобство работы с системой.

Полученное векторное описание объектов данного изображения может быть сохранено и восстановлено при изменении или разработке новой методики постановки диагноза. Подготовленные таким образом данные с одного изображения передаются для дальнейшей статистической обработки. При этом пользователь системы всегда может контролировать способ постановки диагноза, количество уже обработанных объектов из других изображений и выделенных объектов на текущем снимке. Результаты измерений и статистической обработки сохраняются в отдельной базе данных. Полученные данные могут быть использованы для продолжения медицинской исследовательской деятельности, и система располагает для этого всеми возможностями. В любой момент пользователь имеет возможность просмотра уже накопленных данных. В системе также реализован режим калибровки объектива микроскопа. Откалиброванный объектив хранится в отдельной базе данных объективов. Это позволяет исследователю легко настроить программу для работы с различными микроскопами и методиками постановки диагноза.

7.2. Функциональные возможности системы

Разработанная система «Контур» является пакетом программ для морфометрии биологических объектов. Система имеет единую графическую оболочку, которая позволяет одновременно производить обработку изображений, сегментацию и морфометрический анализ (рис. 7.1, а).

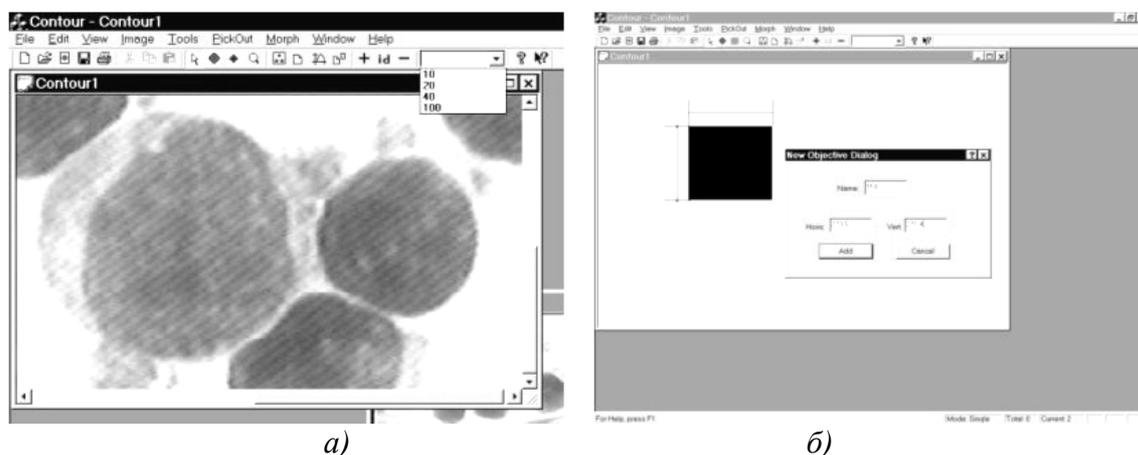


Рис. 7.1. Копии экранов во время работы системы «Контур»: а) общий вид системы; б) процесс калибровки.

Работа системы может происходить в ручном, полуавтоматическом или автоматизированном режимах. Основным режимом работы программы является автоматизированный. Обычная последовательность операций состоит в применении автоматизированных алгоритмов морфометрии, и только в случае необходимости осуществляется переход в другие режимы.

Основные функциональные возможности системы:

Выбор исследуемых объектов. Система предоставляет возможность морфометрической оценки следующих объектов: ядер тиреоцитов (одиночные объекты, режим Single); клеток лимфоидного ряда (пары объектов, режим Pair); агрегатов тиреоцитов (составные объекты, режим Multiple).

Загрузка растровых изображений. Разработанное программное обеспечение поддерживает загрузку цитологических растровых изображений основных растровых форматов. В качестве таких форматов были выбраны следующие: BMP (битовые карты Windows), JPG (формат Joint Photograph Group), TIFF (формат корпорации Adobe).

Выбор объектива микроскопа. Для морфометрической оценки биологических объектов необходимо знать их реальные физические размеры в микрометрах. Данная информация отсутствует в растровом описании, где хранятся только пиксели изображения, но для каждого такого снимка имеется информация об объективе микроскопа, при помо-

щи которого был произведен данный снимок. Для правильного сопоставления физических размеров изображения с растровой информацией пользователь должен выбрать объектив при помощи управляющего элемента панели инструментов «Change Objective». В выпадающем списке (рис. 7.1, а) можно отметить требуемый объектив среди уже откалиброванных. В случае если такого объектива в списке не оказалось, в программе предусмотрена возможность калибровки произвольного объектива.

Калибровка объектива. В системе реализован режим калибровки объектива микроскопа. Это позволяет пользователю легко настроить программу для работы с различными микроскопами и методиками постановки диагноза. Режим калибровки объектива активизируется всякий раз, когда в сессии загружено какое-либо растровое изображение. Обычно калибровка нового объектива требует загрузки снимка, на котором присутствует стандартный объект с заранее известными в микрометрах размерами по горизонтали и вертикали. Такой объект называется калибровочной меткой.

Задача оператора программы при калибровке является следующей: при помощи перемещения и изменения метрики маркеров совместить их с калибровочной меткой так, как это показано на рис. 7.1, б (где в качестве калибровочной метки выбран черный прямоугольник). После того как объекты совместятся, в диалоговом окне в ячейке «Name» необходимо ввести имя нового объектива (например, 150 для рис. 7.1), а в ячейках «Horiz» и «Vert» – горизонтальные и вертикальные размеры калибровочной метки в микрометрах соответственно. Для завершения операции нужно нажать кнопку «Add». При этом новый объектив появится в списке уже откалиброванных. Во время выполнения операции калибровки производится комплексная проверка достоверности процедуры. В случае, если разница величин горизонтального и вертикального разрешения превышает 5%, появляется сообщение «Horizontal and Vertical resolution are incompatible!» и объектив не добавляется в список откалиброванных. Это позволяет гарантировать достоверность постановки диагноза для объективов, уже откалиброванных при помощи программы, и избегать потенциальных ошибок, связанных с неправильно введенными данными о реальных размерах калибровочной метки.

Для выделения биологических объектов в системе выполняются операции сегментации и оконтуривания. На выходе этих операций создается векторное описание биологических объектов. Подготовленные таким образом данные с одного изображения передаются для дальнейшей статистической обработки. В текущую сессию загружается новое изображение, к которому также применяются указанные операции. Век-

торное описание может быть получено в одном из трех имеющихся режимов.

Остановимся более подробно на описании особенностей функционирования различных режимов.

Ручной режим. Переход в этот режим осуществляется при помощи основного меню программы «Tools | “Контур”» или при нажатии кнопки «Контур» на панели инструментов. При этом оператору программы предоставляется возможность ручного оконтуривания объектов. В зависимости от типов объектов пользователь создает при помощи нажатий мыши контуры для клеток, их ядер (рис. 7.2, а) и для агрегатов (рис. 7.2, б). Если в качестве объекта исследования выбран агрегат, то после ввода контура, можно перейти к выделению клеток внутри агрегата посредством нажатия кнопки мыши (рис. 7.2, б).

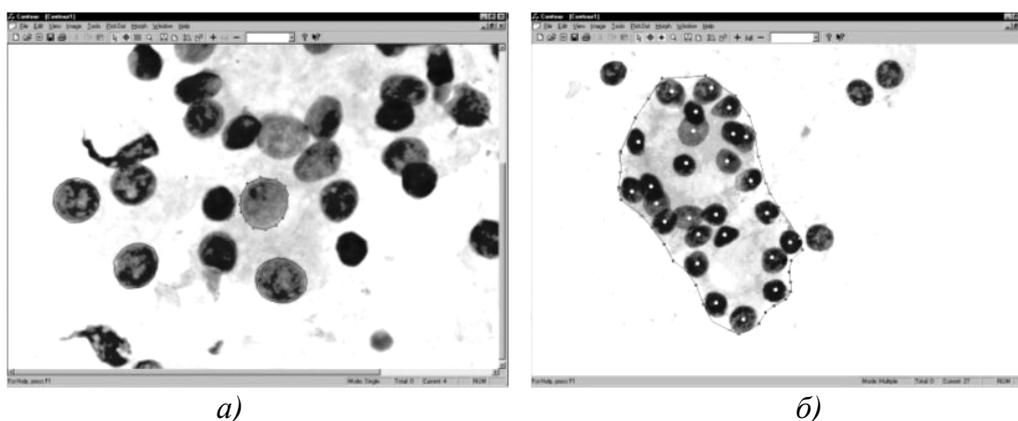


Рис. 7.2. Ручная обводка: а) ядра; б) агрегата

Система «Контур» располагает полноценным встроенным векторным редактором. Редактор обеспечивает набор стандартных операций над векторными объектами, таких как создание и удаление объекта, добавление и удаление точек для выбранного контура, разделение объекта на несколько составных частей. При работе в ручном режиме пользователь получает возможность одновременно производить операции над растровым и векторным содержаниями документа, что является несомненным преимуществом разработанной системы.

При манипуляциях с векторными объектами происходит автоматическое переключение между различными режимами работы векторного редактора. Например, при нахождении курсора в окрестности стороны контура изменяется форма курсора и предлагается добавить точку в контур. При совмещении двух различных точек контура форма курсора изменяется на символ «ножницы» и предлагается произвести разрез контура в данном месте. Точность работы ручного режима может быть

существенно повышена при применении различных средств изменения масштаба изображения.

Полуавтоматический режим. Переход в режим происходит при нажатии правой кнопки мыши на область изображения, на которой визуально наблюдаемые объекты не выделены при ручном или автоматизированном режиме. При этом появляется всплывающее меню, которое приглашает к попытке поиска требуемых объектов в окрестности точки (рис. 7.3). Если объекты являются парой ядро и клетка, то будет выделена соответствующая пара контуров.

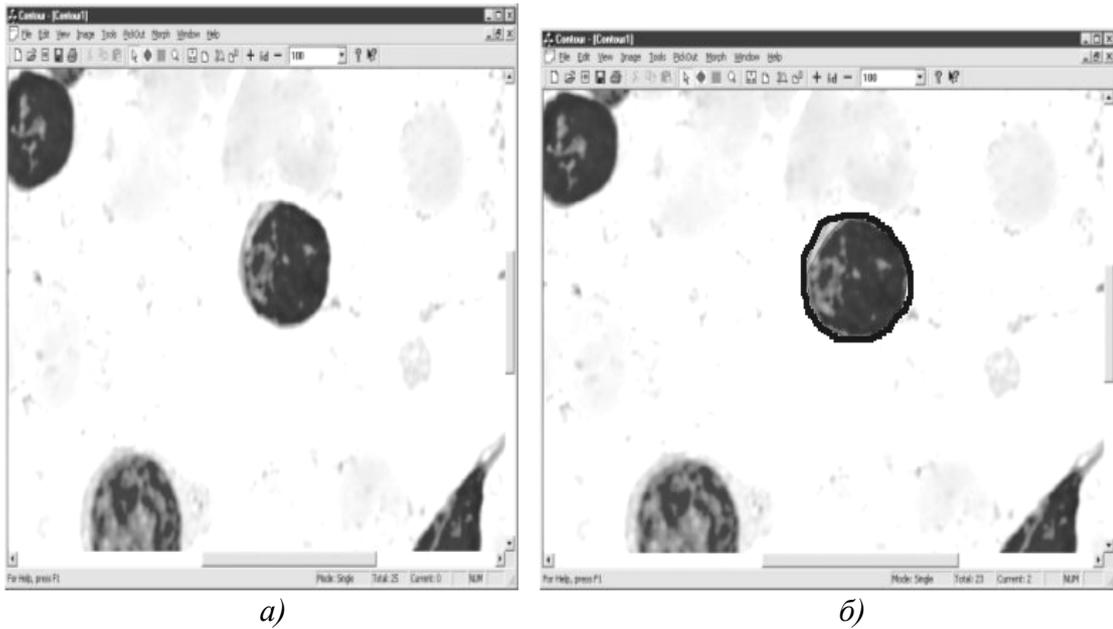


Рис. 7.3. Изображения лимфоидных клеток: а) исходное; б) результат их выделения

Автоматизированный режим. Автоматизированный режим выделения объектов цитологических изображений основывается на алгоритмах анализа и сегментации цветных изображений. Его целью является сведение к минимуму доли ручного труда при проведении диагностики. При автоматизированной обработке изображений проводятся следующие операции: сегментация цветного изображения ядра, клетки, агрегатов (автоматическое определение, какие области изображения соответствуют клеткам, ядрам, агрегатам, а какие – нет); логическая фильтрация для устранения шумовых областей на сегментированном изображении; анализ выделенных объектов (удаление больших или малых объектов, заведомо не представляющих интерес для исследователя); анализ формы объектов (частичное сглаживание контура) и векторизация полученных объектов (получение векторного представления контуров объектов).

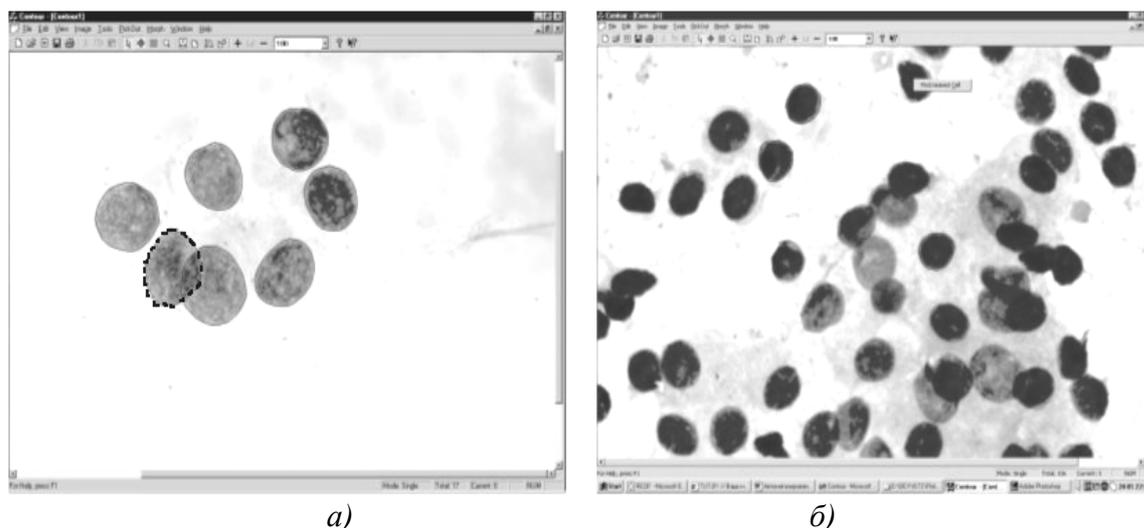


Рис. 7.4. Результат выделения контуров, ядер тиреоцитов: а) в интерактивном режиме б) в автоматическом режиме

Результатом работы программы является векторное представление контуров объектов. Оно в точности соответствует контурному представлению, получаемому при ручном вводе. После запуска автоматического выделения объектов исследователь визуально оценивает качество выделения контуров (рис. 7.4, б) и при необходимости может скорректировать форму либо удалить ошибочно выделенный объект (рис. 7.4, а).

Программой предусмотрены следующие возможности работы с экспертной системой для постановки диагноза:

1. Выбор нового метода постановки диагноза. Активируется при помощи основного меню программы «Morph | New» или кнопкой «New Data» на панели инструментов.

2. Просмотр текущих данных метода. Активируется при помощи основного меню программы «Morph | Show» или кнопкой «Show Data» на панели инструментов.

3. Добавление данных с текущего снимка к аналогичным данным предыдущих снимков. Просмотр текущих данных метода. Активируется при помощи основного меню программы «Morph | Add» или кнопкой «Add Data» на панели инструментов.

7.3. Диагностические возможности

В системе имеется возможность использовать три метода постановки диагноза в соответствии с тремя типами объектов: по ядрам тиреоцитов (одиночные объекты, режим Single); по клеткам лимфоидного ряда (пары объектов, режим Pair); по агрегатам тиреоцитов (составные объекты, режим Multiple).

Экспертной системе для постановки диагноза передается векторное описание объектов (ядер, клеток, агрегатов), заданное набором точек $\{x, y\}$ и представляющее собой замкнутый многоугольник.

Метод диагностики заболевания по ядрам тиреоцитов (режим Single). По нажатии клавиши меню «Add data» в экспертную систему поступает список объектов, для каждого из которых вычисляются и заносятся в базу данных следующие параметры: Area – площадь; Perimeter – периметр; FF – фактор формы; MIDD – средний диаметр, MIND и MAXD – минимальный и максимальный диаметры; KOEF – коэффициент элонгации; NRF – фактор округлости; DMIN – диаметр минимальной вписанной в контур окружности; DMAX – диаметр максимальной описанной окружности; DMID – средний диаметр от DMIN и DMAX.

Отображение базы данных осуществляется кнопкой «Show Data» на панели инструментов. На рис. 7.5, а приведено диалоговое окно системы, которое содержит список с перечисленными параметрами для каждого выделенного ядра. Выше над списком располагаются подсчитанные для каждого столбца списка среднее, минимальное и максимальное значения, размах между максимальным и минимальным значениями столбца, а также среднеквадратичное отклонение для каждого параметра.

Проведенный анализ морфометрических параметров ядер тиреоцитов выявил шесть кариометрических параметров, которые необходимо вычислить для постановки диагноза: среднюю площадь ядер, соотношение частот на гистограмме распределения площади, число классов на гистограмме, коэффициент b и свободный член c уравнения регрессии, а также дискриминантный порог.

Вычисление первых трех величин в системе осуществляется по нажатии кнопки «Histogram», расположенной в правой части диалогового окна. При этом на экране появляется новое окно (рис. 7.5, б), в котором с заданным шагом строится гистограмма распределения площади исследуемых ядер тиреоцитов. В нижней части окна выведены значения средней площади и численные характеристики гистограммы.

Вычисление следующих двух кариометрических параметров осуществляется по нажатии клавиши «Scatterplot» в диалоговом окне. В появившемся при этом окне (рис. 7.6, а) набором точек отображается диаграмма рассеяния значений периметра от площади ядер тиреоцитов. Здесь же представлена аппроксимирующая эту зависимость регрессионная кривая второго порядка. Ниже приведено полученное в результате регрессионного анализа уравнение этой кривой, имеющее вид $y = ax^2 + bx + c$. Коэффициенты b и c учитываются при постановке диагноза.

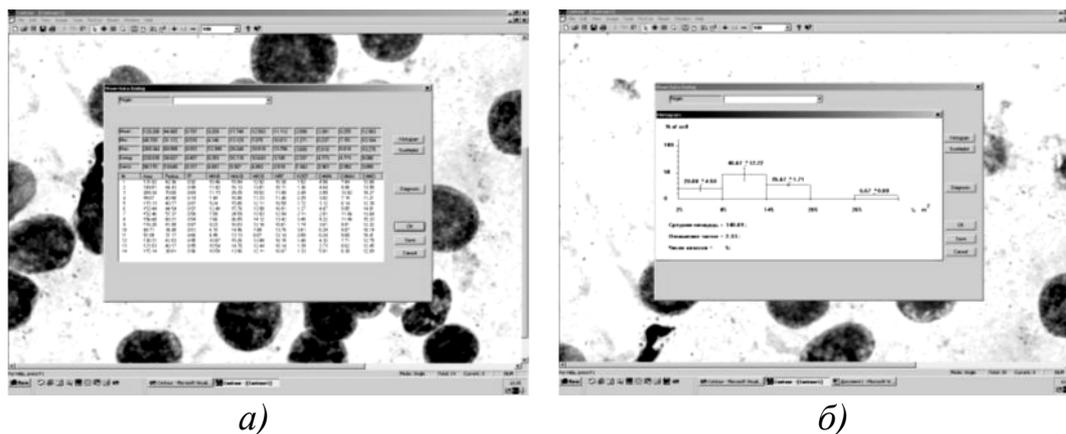


Рис. 7.5. Вывод результатов в системе «Контур»: а) морфометрическая база данных для одиночных объектов; б) гистограмма распределения площадей объектов и ее числовые значения

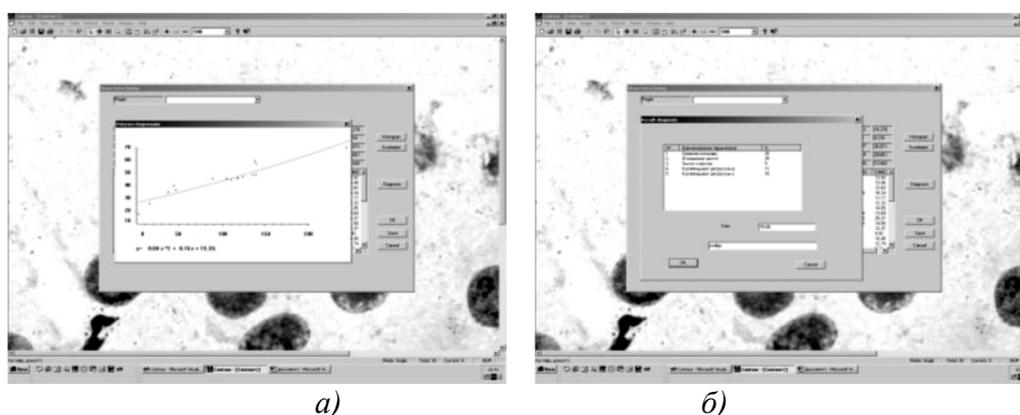


Рис. 7.6. Вывод результатов в системе «Контур»: а) диаграмма рассеяния периметра от площади и регрессионная зависимость к ней; б) диалоговое окно с верифицированным диагнозом

Чтобы верифицировать диагноз, полученные результаты сравниваются с данными экспертной системы. В появившемся окне (рис. 7.6, б) выводится табличка. В ней представлены весовые коэффициенты кариметрических параметров, по сумме которых определяется диагноз заболевания. Экспертная система позволяет дифференцировать злокачественные и доброкачественные тиреоидные заболевания. Диагноз может принимать одно из двух значений: «malignant» – злокачественная патология или «benign» – доброкачественная.

Морфометрический анализ лимфоидных клеток (режим Pair). Для постановки диагноза в базу данных экспертной системы заносятся векторные данные о лимфоидной клетке и ее ядре. Система анализирует векторные данные, находит пары ядер и клеток, принадлежащих одному объекту, и вычисляет отдельно их параметры, как в режиме «Single».

Кроме этого, для каждой пары вычисляются отношения всех одиннадцати параметров. База данных для режима анализа показана на рис. 7.7, а. Параметры каждой клетки представлены тремя строками, а клетки отделены друг от друга пустой строкой. Выше над списком располагаются данные, подсчитанные отдельно для ядра, клетки и ядерно-цитоплазматического отношения. В каждом столбце списка приводятся среднее, минимальное и максимальное значения, размах между максимальным и минимальным значением, а также среднеквадратичное отклонение для каждого параметра. Для постановки диагноза полученные результаты сравниваются с данными экспертной системы. Верификация злокачественных и доброкачественных тиреоидных заболеваний осуществляется в дальнейшем так же, как и для ядер тиреоцитов.

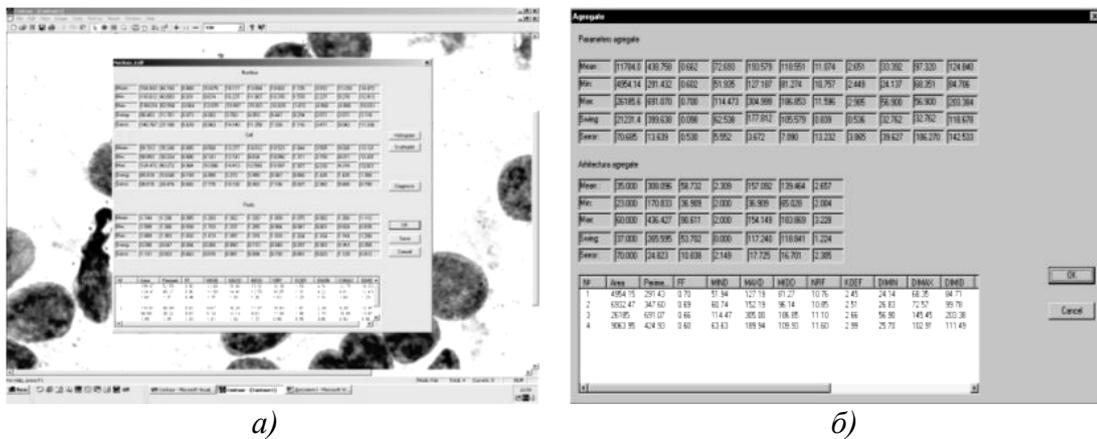


Рис. 7.7. Вывод результатов морфометрического анализа в системе «Контур»: а) морфометрическая база данных для режима Pair; б) морфометрический анализ агрегатов в режиме Multiple.

Морфометрический анализ агрегатов (режим Multiple). В этом режиме в базу данных экспертной системы заносятся векторные данные об агрегате, включающие координаты внешнего контура агрегата и центральных точек входящих в него ядер. В системе для агрегата выполняются те же параметры, что и в режимах анализа. Кроме этого, вычисляются и заносятся в базу данных еще семь параметров: количество ядер в агрегате; площадь, приходящаяся на одну клетку; среднее расстояние между клетками; минимальное расстояние между клетками; максимальное расстояние между клетками; момент инерции; отклонение координаты (рис. 7.7, б).

Глава 8

Система анализа гистологических изображений «Биоскан»

8.1. Общее назначение

Автоматизированная система «Биоскан» разработана для обработки и анализа изображений и ориентирована на применение в гистологии и цитологии. Она является универсальным комплексом для научных исследований, в основе которых лежит измерение объектов на изображении. Система может решать большинство задач анализа изображений, но используется чаще всего в оптической микроскопии:

- для исследования сосудов, клеток и клеточных популяций;
- исследования влияния протезов на ткань;
- измерения характеристик волокон;
- изучения деформации протезов;
- клеточного подсчета;
- определения характеристик органов (преимущественно у эмбрионов);
- определения характеристик различных областей ткани, например области воспаления.

Специализация системы выражена в большом наборе функций и понятий медицинской морфометрии и возможности их комбинации. При решении задач оптической микроскопии очень удобным является использование мультифазных изображений, позволяющих проводить классификацию и выделять гистологическую структуру клеток и ткани непосредственно во время процесса анализа, при выполнении индивидуальных измерений и определении характеристики поля.

В дальнейшем система «Биоскан» нашла применение в следующих областях медицины:

- диагностика в клинической онкологии;
- экспертиза в патологической анатомии;
- экспериментальная онкология;
- анализ клеточного роста;

– контроль за влиянием лекарственных препаратов в фармакологии;

– измерение геометрических и оптических характеристик гистологических объектов в специфических научных исследованиях.

Полный набор классических функций анализа и обработки изображений делает возможным применение этой системы и во многих других областях, связанных с обработкой изображений.

8.2. Функциональные возможности

«Биоскан» представляет собой высокоинтегрированную гибкую аналитическую систему, основной принцип построения которой – получение предельно широких возможностей для обработки и анализа изображений оптической микроскопии за счёт развитого оптимизированного программного обеспечения при минимальной сложности аппаратной части.

Особенностью системы является одномониторное исполнение. Посредством установки в компьютере специального устройства ввода изображения на программном уровне решена задача получения изображения непосредственно с телекамеры. Это устройство имеет прямой доступ к памяти и позволяет передавать изображения разного программно-регулируемого формата, что необходимо для поиска объекта исследования в реальном масштабе времени, регулировки освещённости, наведения на резкость. Встроенный интерпретатор языка высокого уровня позволяет выполнять программу анализа изображений в автоматическом режиме, составлять пользователем дополнительные алгоритмы выделения и анализа объектов для специализированных задач. На программном уровне решена задача интерактивных (полуавтоматических) измерений и редактирования изображений с помощью манипулятора «мышь». Предусмотрена возможность подключения устройств ввода графической информации для более точной работы с фотографиями, рентгенограммами и рисунками. Встроенные в систему функции обработки и анализа изображений реализуют большинство известных в настоящее время подходов к получению, коррекции, преобразованию, измерению, реконструкции и хранению изображений, в том числе методы математической морфологии для бинарных полутоновых и цветных изображений.

В состав системы «Биоскан» входят (рис. 8.1):

– персональный компьютер РС типа стандартной конфигурации с РСІ-шиной и свободным слотом;

– электронный модуль ввода телевизионного сигнала в компьютер, который обеспечивает преобразование видеосигнала в код с дис-

клеточными структурами от 8 до 48 двоичных разрядов с возможными масштабированием и фильтрацией изображения, максимальный размер которого 640x480 пикселей при частоте 30 кадров в секунду;

- печатающее устройство;
- световой микроскоп;
- телевизионный датчик или цифровая камера;
- комплект системного программного обеспечения «Биоскан», включающий интерпретатор языка высокого уровня, встроенные функции анализа изображений, утилиты, описание применения программных средств, отражающее особенности их использования.

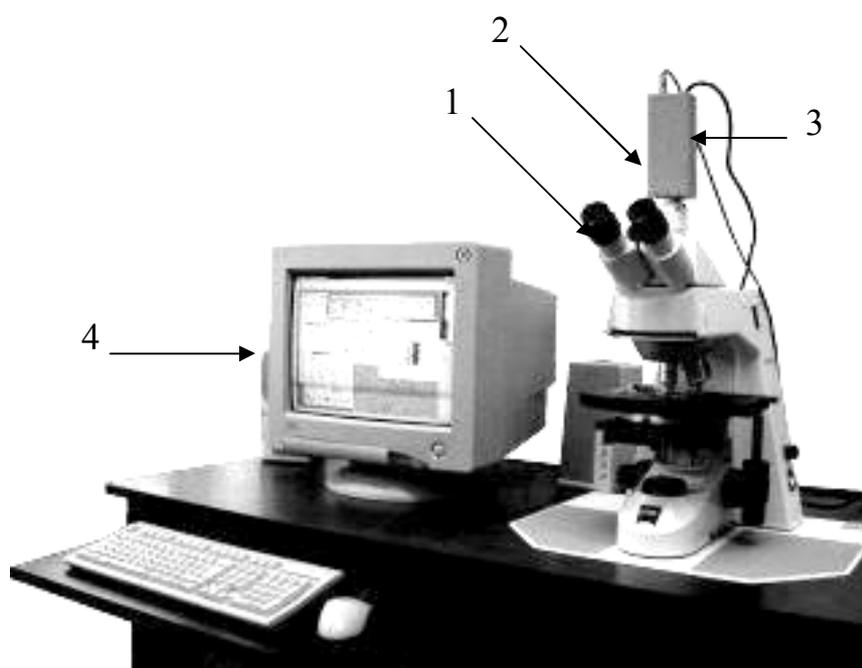


Рис. 8.1. Принципиальная схема работы системы анализа изображений «Биоскан»: 1 – микроскоп; 2 – фотонасадка; 3 – ПЗС-камера; 4 – компьютер с фреймграббером

Обработка изображений системой «Биоскан» состоит из четырёх основных шагов:

- формирование оптического образа;
- ввод изображения;
- обработка;
- отображение результатов.

Оптический образ формируется посредством использования микроскопа и фотонасадки. Микроскоп с помощью оптической системы линз позволяет получить увеличенное изображение объекта. Фотонасад-

ка проецирует это изображение на матрицу ПЗС-камеры с минимальными потерями оптических характеристик.

Захват изображения выполняется с помощью ПЗС-камеры и фреймграббера. ПЗС-камера преобразует спроецированный на её матрицу оптический образ в видеосигнал. Одним из основных требований, предъявляемых к камере, является сохранение реального цвета на изображении. Традиционно в видеосигнале, преобразованном обычной камерой, имеется 300 линий на кадр. Эта характеристика является неудовлетворительной для современных систем, так как подобное разрешение не позволяет анализировать большие поля зрения и приводит к некоторому размыванию границ изображения. Поэтому в системе «Биоскан» используются видеокамеры высокого разрешения, позволяющие получить более 480 линий на кадр, например Panasonic CCD-380.

Фреймграббер состоит из платы, которая устанавливается в свободный соединитель системной магистрали компьютера, и кабеля для подключения платы к датчику телевизионного сигнала, в частности к видеокамере. Благодаря высокой пропускной способности шины PCI фреймграббер работает напрямую с видеопамятью компьютера. Он содержит высокоскоростной аналого-цифровой преобразователь (АЦП) TDA8708, видеопроцессор SAA7196 и однокристальный интерфейс SAA7116, обеспечивающий связь с шиной PCI. Аналоговый видеосигнал поступает из ПЗС-камеры в фреймграббер и оцифровывается АЦП TDA8708. АЦП работает на частоте 27 МГц с разрешением 8 бит, что обеспечивает качественную обработку полного видеосигнала любой системы цветового кодирования. Полный цифровой видеосигнал подаётся в видеопамять (SAA7196), где преобразуется в RGB-формат. SAA7196 работает со стандартами NTSC, PAL и SECAM. Кроме того, видеопамять масштабирует и фильтрует изображение, что позволяет выводить его в окно любого размера на экране монитора. Интерфейс SAA7116 служит для преобразования обработанной видеоинформации в системную память компьютера. Интерфейс содержит однокилобайтный буфер, позволяющий передавать данные пакетами и тем самым разгружать системную шину, а также управляет режимами работы видеопамяти по последовательной двухпроводной I2C-шине. Захватывая системную шину как MASTER, интерфейс работает в режиме прямого доступа в память (DMA) и обеспечивает скорость обмена до 4Мб 24-битной RGB-информации в секунду. Это соответствует полноэкранному (640x480 пикселей) режиму TRUECOLOR при частоте 30 кадров в секунду.

После того как изображение захвачено и преобразовано в пятимерную матрицу (смещение по горизонтали и вертикали, значения для красного, зеленого и синего лучей), начинается этап его обработки. Об-

работку выполняет компьютер посредством пакета прикладных программ. Результатами обработки являются как изображения с измененным содержанием, подчеркивающие особенности объекта, так и числовые характеристики геометрических и оптических параметров объектов.

Часто для контроля качества обработки используется промежуточное отображение результатов. Для отображения результатов применяются стандартные устройства вывода персонального компьютера: монитор, принтер и т. д. Изображение может отображаться полностью или фрагментарно в качестве картинки.

Для геометрических и оптических характеристик используются стандартные статистические методы отображения данных, например электронная таблица, набор параметров элементарной статистики, гистограмма, диаграмма и т. д.

Одной из особенностей системы является возможность сохранения и перемещения данных. Результаты обработки сохраняются в файлах. Для сохранения изображений используются графические форматы Windows Bitmap (BMP, DIB), CompuServe Interchange (GIF), JPEG (JPG), Zsoft PaintBrush (PCX), TrueVision (TGA), Tagged Image Files (TGA), DICOM и т. д. Эти форматы поддерживаются многими другими программными продуктами.

Для сохранения геометрических и оптических параметров разработан формат файла, получивший название DataBioscan (DBS). Он позволяет быстро и эффективно сохранять данные, легко рассчитывать статистические характеристики, хотя для интеграции с другими программными пакетами система поддерживает файлы Microsoft Excel (XLS), формат обмена данными (DIF), файлы Dbase (DBF), таблицы в текстовых файлах (TXT).

Подобная организация системы качественно и эффективно обеспечивает как длительную, многоэтапную, так и быструю, кратковременную работу.

8.3. Программное обеспечение

Программная часть системы «Биоскан» используется как приложение Microsoft Windows, таким образом она унаследовала преимущества программного интерфейса. Программное обеспечение, ориентированное на PC-совместимые компьютеры, обеспечивает быстрый, легко воспроизводимый путь обработки чёрно-белых и цветных изображений, выполнения на них различных измерений.

Программное обеспечение содержит более 260 различных функций и алгоритмов по анализу и обработке изображений, начиная с оцифровки телевизионного кадра и кончая получением числовых пара-

метров, характеризующих изображение, и их интерпретацией. Каждая функция имеет кодовое имя и набор аргументов, информация о которых содержится в тексте помощи для этой функции. Вызвать необходимую функцию можно тремя способами: через меню, в программном режиме и с помощью командной строки.

Система «Биоскан» имеет высокоразвитый экранный интерфейс, функционирующий в среде Microsoft Windows. Управление программным пакетом может реализовываться через пункты меню и через команды, описанные в небольших подпрограммах встроенного языка интерпретатора (рис. 8.2). Все функции доступны и из подпрограмм интерпретатора, и из меню. Отдельные функции могут вызываться через панель инструментов, которая также реализована в этой системе. При работе с меню и панелью инструментов используются динамические окна, в которых описываются и задаются основные параметры и характеристики вызванных функций. Подпрограммы интерпретатора редактируются и запускаются на выполнение.

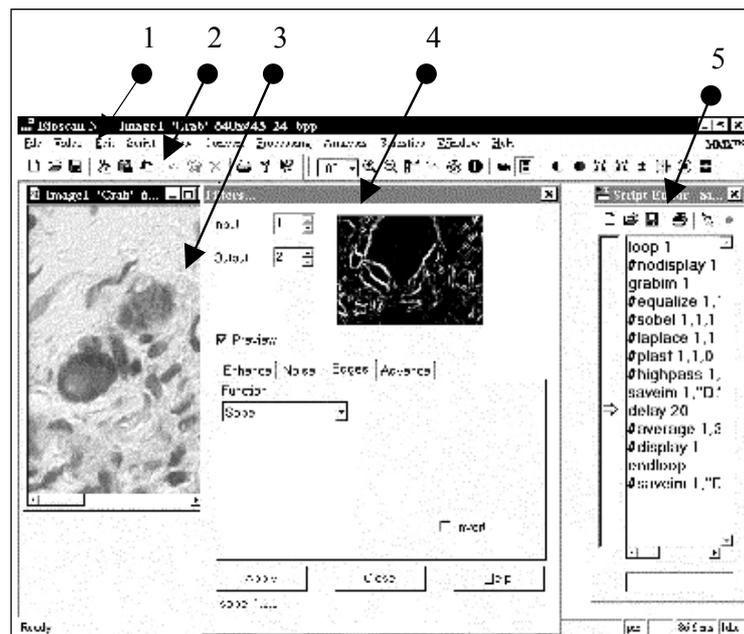


Рис. 8.2. Рабочая панель системы «Биоскан»: 1 – меню; 2 – панель инструментов; 3 – окно с изображением; 4 – динамическое окно вызова функций; 5 – редактор подпрограмм интерпретатора

Окно изображений – это динамическое окно, предназначенное для просмотра системных кадров. Оно не появляется на экране сразу после загрузки программы «Биоскан», а только после выполнения какой-либо функции. Кроме того, оно может изменять свой размер при изменении системного формата. Если размеры кадра больше отведенных под окно на экране, то оно отображает кадр в виртуальном режиме. Расположен-

ные на правом и нижнем бордюрах окна панели скроллинга показывают, какую часть всего кадра занимает участок, помещающийся в окно. Прокрутка кадра обеспечивается клавишами и мышью путем наложения экранного маркера на панели скроллинга и смещения панелей в нужном направлении при нажатой левой кнопке мыши. После выполнения очередной функции текущим кадром, отображаемым в окне, становится результирующий кадр этой функции. Изменение номера кадра производится нажатием на соответствующие цифровые клавиши.

Изображение может отображаться, конвертироваться и обрабатываться в следующих форматах: в системе RGB (по 32, 24, 16 битов на пиксель), палитризуемом (8, 4 бита на пиксель), полутоновом (8, 16, 32 бита на пиксель), вещественном, бинарном, мультифазном.

Функции по обработке изображений выделены отдельным пунктом меню и разбиты на тематические группы и подгруппы:

1. Фильтры, которые выполняются для полутоновых и цветных изображений:

– контрастирующие, предназначенные для улучшения контрастности и чёткости изображений, например нормировка яркости и выпрямление границ;

– сглаживающие, предназначенные для удаления точечных шумов, например нелинейный, низкочастотный и медианный фильтры;

– выделения границ, предназначенные для выделения перепадов яркости, например градиентный фильтр и фильтр Собеля;

– Фурье-преобразования;

– дополнительные – все фильтры по обработке изображений, не вошедшие в предыдущие группы, такие как псевдопластические, фильтры Флойда, Лапласа и др., и функция конволюции изображений.

2. Арифметико-логические операции с одним или двумя разными изображениями любого типа:

– арифметические, включая инвертирование, сложение, вычитание, умножение, деление двух изображений, получение усреднённого изображения из двух других, построение изображений по минимуму или максимуму двух других и прочие арифметические комбинации изображений;

– логические: отрицание, конъюнкция, дизъюнкция, исключающая дизъюнкция, исключающая конъюнкция.

3. Операции математической морфологии:

– основные: эрозия, дилатация, отмыкание, замыкание, выделение контура, утоньшение, утолщение, удаление хвостов, TopHat, BottonHat, причем эти операции работают для всех типов изображений;

– выделения геодезических признаков всех типов изображений, например построение карты расстояний, выделение локальных минимумов и максимумов на изображении, диагломерация, ватершед, выделение средней линии (несвязанного скелета), точек конца, узлов, седла и т. д.;

– учитывающие комбинации пикселей и связность между ними, например идентификация, заполнение дыр, удаление объектов, прижатых к краю, удаление объектов по их геометрическим параметрам и т. д., эта группа функций работает только с бинарными или мультифазными изображениями;

– функции морфологической конволюции на базе эрозии, дилатации, отмыкания, замыкания, выделения контура.

4. Функции сегментации – получение бинарного или мультифазного изображения посредством выставления порогов на полутоновых характеристиках цветного изображения (яркости, цветности, насыщенности, значениях красного, зелёного, синего лучей) или их комбинациях:

– интерактивные;

– автоматические (методы разложения гистограммы яркости на нормальные распределения, отсечения заданного процента, Отсу, минимальной ошибки, ватершед), работающие адаптивно для регионов и по всему изображению.

5. Функции генерации:

– точечных шумов (с прямоугольным, нормальным, экспоненциальным, логарифмическим распределением и распределением Лапласа);

– синусоидальных помех;

– щелевой и точечной засветок;

– оптического клина;

– решетки.

6. Полный набор элементарных арифметических и логических операций.

7. Функции интерактивной оптической и колориметрической коррекции изображения;

8. Конверсия изображений по разным типам, их разложение и собиране в системах RGB, YIQ, HLS, HSI, Lab, LCH.

9. Цифровое и графическое редактирование изображения.

10. Измерения:

– интерактивные:

– контурные;

– линий (прямых и произвольных);

– углов;

- точек и окружающих их областей;
- простой и относительный счет;
- автоматические на бинарных и мультифазных изображениях;
- отдельных объектов;
- полей (группы объектов с одинаковым признаком классификации);
- профиля яркости вдоль линии;
- гистограммы изображения и её характеристик.

Всего с помощью этой системы можно измерять около 80 параметров, включая параметры-массивы, такие как радиусы и диаметры, проходящие через центр масс, профиль яркости по контуру объекта, гистограмма яркости объекта и т. д. Параметры задаются для интерактивных измерений через специальное окно, для автоматических измерений имеется нестандартный вызов как через меню, так и через интерпретатор.

При вызове из меню, минуя функциональное окно, на экран выдается специальное окно параметров (рис. 8.3). При вызове через интерпретатор функция может иметь неограниченное число строковых аргументов, каждый из которых является именем инициализируемого параметра. При необходимости функция может вызываться повторно, при этом новые выбранные параметры добавляются в общий список. Система «Биоскан» может измерять более сотни количественных характеристик объектов, включая параметры пользователя, которые задаются и рассчитываются посредством формулы, заданной в строке интерпретатора.

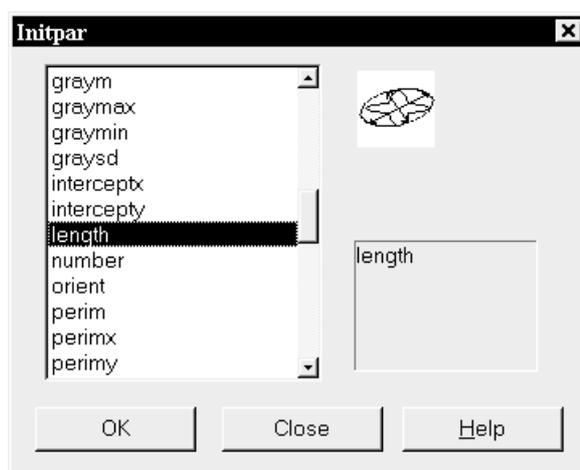


Рис. 8.3. Специальное окно для инициализации параметров

Все параметры измеряются в реальных единицах согласно установленному масштабу. Измерения могут выполняться в автоматическом и интерактивном режимах. Измерение в интерактивном режиме сопровождается диалоговым окном со встроенной электронной таблицей (рис. 8.4).

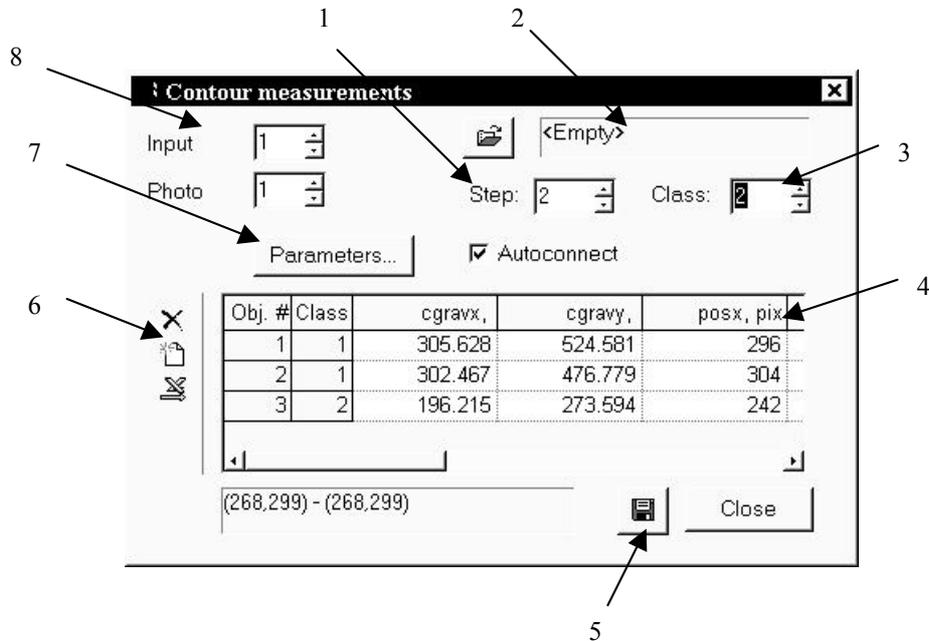
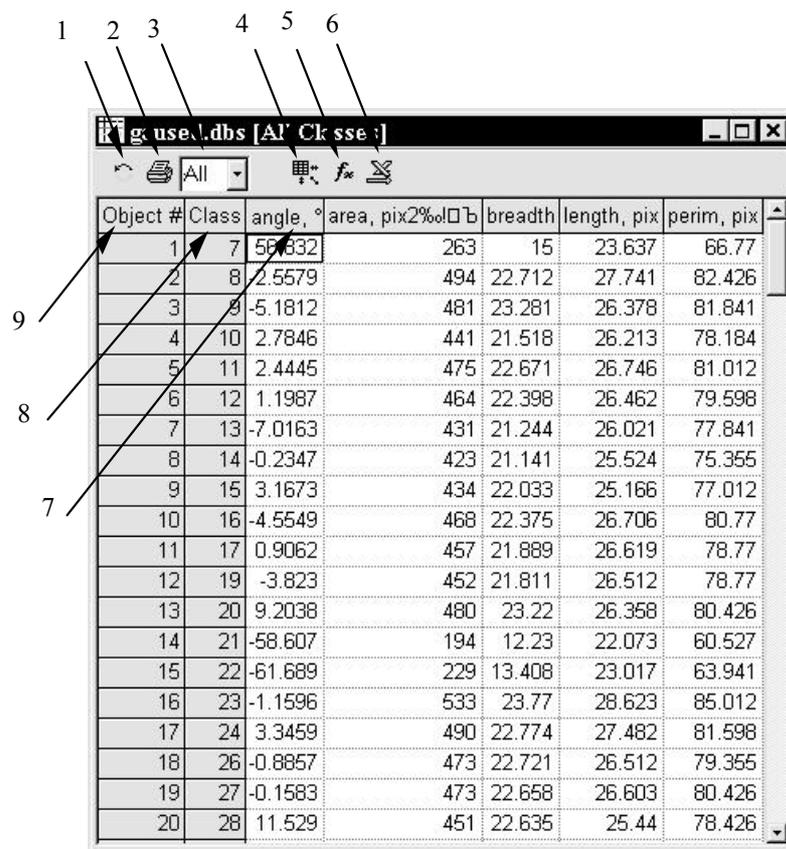


Рис. 8.4. Диалоговое окно, сопровождающее интерактивные измерения:
1 – минимальное расстояние между точками в измерениях; 2 – панель, описывающая файл базы данных; 3 – номер класса, включающего в себя измеряемый объект; 4 – электронная таблица с результатами измерений; 5 – панель управляющих кнопок электронной таблицы; 7 – кнопка для вызова окна параметров; 8 – панель для указания изображения, по которому проводится измерение, и изображения с фоном

Результаты автоматических и интерактивных измерений, сохранённые в базе данных, можно также просмотреть с помощью встроенной электронной таблицы (рис. 8.5). С помощью переключателя результаты можно просматривать как для всех объектов вместе, так и для каждого класса объектов в отдельности. Таблица позволяет не только просматривать результаты, но и обрабатывать их, например в них можно добавить дополнительный столбец, в котором будут находиться результаты элементарной статистики по одному из параметров.

Задачи анализа изображений в оптической микроскопии и распознавания объектов на этих изображениях обычно разбивают на целый ряд подзадач, количество которых зависит от сложности изображения и от целей распознавания и анализа.



Object #	Class	angle, °	area, pix ²	breadth	length, pix	perim, pix
1	7	56.832	263	15	23.637	66.77
2	8	2.5579	494	22.712	27.741	82.426
3	9	-5.1812	481	23.281	26.378	81.841
4	10	2.7846	441	21.518	26.213	78.184
5	11	2.4445	475	22.671	26.746	81.012
6	12	1.1987	464	22.398	26.462	79.598
7	13	-7.0163	431	21.244	26.021	77.841
8	14	-0.2347	423	21.141	25.524	75.355
9	15	3.1673	434	22.033	25.166	77.012
10	16	-4.5549	468	22.375	26.706	80.77
11	17	0.9062	457	21.889	26.619	78.77
12	19	-3.823	452	21.811	26.512	78.77
13	20	9.2038	480	23.22	26.358	80.426
14	21	-58.607	194	12.23	22.073	60.527
15	22	-61.689	229	13.408	23.017	63.941
16	23	-1.1596	533	23.77	28.623	85.012
17	24	3.3459	490	22.774	27.482	81.598
18	26	-0.8857	473	22.721	26.512	79.355
19	27	-0.1583	473	22.658	26.603	80.426
20	28	11.529	451	22.635	25.44	78.426

Рис. 8.5. Электронная таблица для отображения результатов измерений, выполненных в системе «Биоскан»: 1 – кнопка обновления электронной таблицы; 2 – вывод на печать; 3 – определение класса объектов для отображения в таблице; 4 – форматирование таблицы; 5 – вставка функции; 6 – вызов результатов в таблице Microsoft Excel; 7 – название измеренного параметра; 8 – номер класса, к которому относится измеренный объект; 9 – номер измеренного объекта

Программное обеспечение системы «Биоскан» имеет полный набор функций по обработке изображений, измерениям объектов на них, а также по элементарной обработке объектов, что позволяет гибко решать большинство задач оптической микроскопии и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к современным системам.

Более подробную информацию о системе можно получить на сайте <http://www.itlab.anitex.by/bioscan/>.

Заключение

Совершенствование надежности и точности методов оптической микроскопии, морфологической диагностики болезней и быстрое принятие оптимальных научных и практических решений во многих случаях достигаются автоматизацией процесса поиска и анализа объектов на изображениях. Проблемы автоматизации в оптической микроскопии решаются посредством использования аппарата анализа изображений, операций математической морфологии, методов биологической морфометрии. Дополняя традиционные методы изучения патологии человека и животных, автоматизированные методы позволяют повысить скорость и качество обработки многих исследований, снизить уровень ручного труда.

В книге описаны основы построения прикладных систем анализа и обработки изображений оптической микроскопии. Она содержит подробное описание понятий, начиная с объектов на изображениях и методов их выделения и заканчивая описанием систем в целом. Это позволяет получить полную картину проблемы автоматизации исследований оптической микроскопии и способов её решения. Кроме того, приведены краткие обзоры наиболее известных систем и подробно описываются аналогичные системы, разработанные в Беларуси. Авторы надеются, что книга даст достаточно полную информацию, необходимую как для разработки, так и для использования систем анализа изображений оптической микроскопии.

Быстрое развитие вычислительной техники открывает новые возможности в использовании сложных методов обработки изображений для решения задач оптической микроскопии.

Одним из таких методов является применение нейронных сетей, мощного средства дополняющего классические методы выделения объектов при исследовании клеток и клеточных структур. Нейронная сеть объединяет информацию различного характера из разных источников и принимает решения, необходимые для корректной сегментации областей. Кроме того, в работу сети можно заложить возможность обучения, т. е. пополнить базу данных, необходимую для сегментации, или изменить условия для отдельных нейронов.

Другим перспективным направлением является использование стереопар, которые позволят существенно расширить количество объемных характеристик объектов, но данное направление будет иметь

практическое применение только при использовании соответствующей оптической техники.

Развитие теоретических основ и разработка новых подходов к автоматизации исследований в оптической микроскопии создают благоприятные условия для решения ряда проблем нормальной и патологической анатомии и морфологии человека, способствуют развитию их теоретической и практической базы.

Приведенные в книге сведения будут полезны студентам, аспирантам и научным работникам, деятельность которых связана с обработкой изображений, а также специалистам в области медицины, работающим с гистологическими и цитологическими препаратами. В книге приведен обширный список литературы, с помощью которого можно найти более полные данные по всем упоминаемым вопросам.

Литература

1. Абламейко С.В., Лагуновский Д.М. Обработка изображений: технология, методы, применение. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 1999. – 300 с.
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
3. Аппаратная и программная поддержка системы обработки и анализа изображений «Bioscan-AT» / Б.В. Налибоцкий, А.М. Недзьведзь, А.Я. Рубенчик и др. // Тез. докл. науч.-техн. конф. по компьютерной графике и анимации. – Мн., 1993. – 126 с.
4. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология: Учеб. – М.: Медицина, 1998. – 795 с.
5. Бамбер Дж., Тристам М. Ультразвуковая диагностика // Физика визуализации изображений в медицине / Под ред. С. Уэбба. Т. 2. – М.: Мир, 1991. – С. 5-102.
6. Белоцерковский А.М. Повышение качества сегментации цветных медицинских изображений // Докл. III Междунар. конф. «Цифровая обработка информации и управление в чрезвычайных ситуациях». Т. 1. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 2002. – С. 22-27.
7. Бутаков Е.А., Островский В.И., Фадеев И.М. Обработка изображений на ЭВМ. – М.: Радио и связь, 1987. – 234 с.
8. Данс Д. Рентгенодиагностические системы получения изображения // Физика визуализации изображений в медицине / Под ред. С. Уэбба. Т. 1. – М.: Мир, 1991. – С. 40-106.
9. Иваницкий Г.Р., Кринский В.И., Сельников Е.Е. Математическая биофизика клетки. – М.: Наука, 1978. – 308 с.
10. Компьютерная обработка изображений сосудов и волокон биологических препаратов и изменение их геометрических характеристик / А.М. Недзьведзь, Ю.Г. Ильич, Г.М. Карапетян и др. // Тез. докл. III науч. конф. по распознаванию и анализу изображений. Кн. 2. – Мн., 1995. – С. 110-113.
11. Крупников Г.П. Зарубежные серийно выпускаемые телевизионные анализаторы изображения // Автоматизация анализа цитологических препаратов / Под ред. А.Я. Хесина. – Рига: Зинатне, 1975. – С. 112-148.

12. Лич М. Получение ЯМР изображений с пространственной локализацией // Физика визуализации изображений в медицине / Под ред. С. Уэбба. Т. 2. – М.: Мир, 1991. – С. 105-223.

13. Морфометрический и стереологический анализ миокарда (тканевая ультраструктурная организация) / Л.П. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Л.В. Колесникова и др. – Новосибирск: СО академии медицинских наук СССР, 1984. – 157 с.

14. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Обработка медицинских изображений гистологических объектов // Цифровая обработка изображений. Вып. 4. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 2000. – С. 152-164.

15. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Полутоновое утоньшение цветного изображения // Цифровая обработка изображений. Вып. 2 – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 1998. – С. 41-52.

16. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Представление цветных изображений для математической морфологии // Компьютерный анализ данных и моделирование: Сб. науч. статей V Междунар. конф. / Под ред. С.А. Айвазяна, Ю.С. Харина. – Мн.: Изд-во БГУ, 1998. – Ч. 4: К-Я. – С. 86-95.

17. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Связность пикселей на цветном изображении при использовании операций математической морфологии // Информационные системы и технологии (IST'2002): Мат. междунар. конф. – Мн.: Изд-во БГУ, 2002. – С. 41-52.

18. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Сегментация изображений волокон и сосудов при большом увеличении // Цифровая обработка изображений. Вып. 4. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 1999. – С. 167-176.

19. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Сегментация изображений гистологических объектов // Мат. пятой междунар. конф. «Распознавание образов и анализ изображений: новые информационные технологии» (РОАИ-5-2000). – Нижний Новгород, 2000. – С. 89-94.

20. Недзьведзь А.М., Абламейко С.В. Сегментация клеток на гистологических препаратах для световой микроскопии // Сб. тр. пятой междунар. конф. по распознаванию образов и обработке информации PRIP-99. – Мн., 1999. – Ч. 2. – С. 143-147.

21. Претт У. Цифровая обработка изображений: В 2 кн. – М.: Мир, 1982. – 790 с.

22. Саху П.К., Солтани С., Вонг Ф.Л. Обзор по пороговым методам // Кибернетический сборник / Под ред. О.Б. Лупанова, О.М. Касим-Заде. Вып. 27. – М.: Мир, 1990. – С. 139-173.

23. Система обработки и анализа изображений «Bioscan-NT» нового поколения / Ю.Г. Ильич, Г.М. Карапетян, А.М. Недзведзь и др. // Informatics for health care. V.1. – Литва: Висагинас, 2002. – С. 27-29.

24. Старовойтов В.В. Локальные геометрические методы цифровой обработки и анализа изображений. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 1997. – 282 с.

25. Суиндел Б., Уэбб С. Рентгеновская трансмиссионная компьютерная томография // Физика визуализации изображений в медицине / Под ред. С. Уэбба. Т. 2. – М.: Мир, 1991. – С. 138-171.

26. Тринжаус Г. От клеток к органам. – М.: Мир, 1972. – 320 с.

27. Харрис Г. Ядро и цитоплазма. – М.: Мир, 1973. – 340 с.

28. Хем А., Кормак Д. Гистология: В 5 т. – М.: Мир, 1982.

29. Шлихт Г. Цифровая обработка цветных изображений. – М.: ЭКОМ, 1997. – 336 с.

30. Abe M., Mizutani A., Wang C. Thinning of Gray-Scale Images with Combined Sequential and parallel Condition for Pixel Removal // IEEE Trans. On System, Man, and Cybernetics. – 1994. – V. 24. – № 2.

31. Ablameyko S. An introduction to interpretation of graphic images. – USA: SPIE Press, 1997. – 182 p.

32. Arcelli C., Ramella G. Sketching a Gray-Tone Pattern out of its Distance Transform // Pattern Recognition. – 1996. – V. 29. – № 12. – P. 2033-2045.

33. Arrcelli C., Ramella G. Finding gray-skeleton by iterated pixel removal // Image and Vision Computing. – 1995. – V.13. – № 3. – P. 159-167.

34. Bieniek A., Moga A. A connected component approach to the watershed segmentation // Mathematical morphology and applications to image and signal processing / Edited by H.J.A.M. Heijmans and J.B.T.M. Roerdink. – London: Kluwer Academic publishers, 1998. – P. 215-222.

35. Boomgaard R. Mathematical Morphology: Extension Towards Computer Vision. – Academisch proefschrift. Faculteit der Wiskunde en Informatica de Universiteit van Amsterdam, 1992. – 155 p.

36. Bracey L.E. Image analysis for nanotechnology on the desktop // Advanced imaging. – 1997. – № 11. – P. 54-56.

37. Cell Image Segmentation: Review of Approaches / S.V. Ablameyko, A.M. Nedzved, D.M. Lagunovsky et al. // The Sixth International Conference on «Pattern Recognition and Information Processing», May 15-17, 2001. Minsk, Belarus. – P. 26-34.

38. Cell structure identification method / G. Karapetyan, A. Nedzved, Y. Ilyich et al. // Proc. of XIVth ISDQP international congress «Diagnostic molecular pathology from genomics to proteomics». Oviedo (Span), September 2001. – P. 78-79.

39. Chaundry B.B., Sarkar N. Texture segmentation using fractal dimension // IEEE Transaction on Pattern Analysis and Machine Intelligence. – V.17. – № 1. – 1995.

40. CIRES – Cell Image Retrieval and Evaluation System // Image news. Magazine for users of image analysis systems. – Kontron Electronic, 1992. – P. 18-19.

41. CIRES: Product information. – Kontron Electronic, 1994. – 7 p.

42. Color in Electronic Displays / H.L. Widdel, D.L. Post, J.D. Grossman et al. – New York, London: Plenum press. – 1991. – P. 39-91.

43. Color Thinning with Applications to Biomedical Images / A. Nedzved, Y. Ilyich, S. Ablameyko, S. Kamata // Computer Analysis of Images and Patterns. – Lecture Notes in Computer Science. – № 2124. – 2001. – P. 256-263.

44. Delanaye A. Watershed on the holodisc distance relief // Proc. of Sixth international conference «Image processing and its applications». – 1997. – V. 1. – P. 337-340.

45. Demarty C.-H. Beucher S. Color segmentation algorithm using an HLS transformation // Mathematical morphology and applications to image and signal processing. – London: Kluwer Academic publishers, 1998. – P. 231-237.

46. Dougherty E.R. An Introduction to Morphological Image Processing. – Washington, USA: SPIE OPTICAL ENGINEERING PRESS, 1992.

47. Dyer C.K., Rosenfeld A. Thinning Algorithm for Gray-Scale Pictures // IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence. – 1979. – V.1.- № 1.

48. Fassnach C., Devijver P.A. Image segmentation with a propagator Markov mesh model // Proc. of 12th International Conference on Pattern Recognition. V. 1. – Jerusalem, Israel, 1994. – P. 510-512.

49. Fioravanti S., Giusto D.D. Texture recognition by q-th order fractal analysis // Proc. of 5-th international conference Computer Analysis of Images and Patterns., CAIP93. – Budapest, Hungary: Springer-Verlag, 1993. – P. 283-289.

50. Frucci M., Marcelli A. Efficient skeletonization of binary figures through (d1,d2)-erosion and directional information // Aspect of visual form processing. Proc. of 2nd international workshop on visual form. – Italy, 1994. – P. 221-230.

51. Gamba P., Marazzi A. A comparison between wavelet and threshold detection of rain patterns from radar data // Proc. of sixth international conference on image processing and its applications. – 1997. – V. 2. – P. 541-545.

52. Haddon J.F., Boyce J.F. Neural networks for texture classification of temporally consistent segmented regions of FLIR sequences. – DERA British Crown, 1994. – P. 107-111.

53. Hanbury A.G. The Taming of the Hue, Saturation and Brightness Colour Space // Proc. of 7th Computer Vision Winter Workshop. – Austria, February 2002.

54. Identification of retinal vessels by color image analysis / V. Rakotomalala, L. Macaire, J.-G. Postaire, M. Valette // Machine graphics & vision. – 1998. – V. 7. – № 4. – P. 725-743.

55. Image manipulation using M-filters in a Pyramidal computer model / M.E. Montiel, A.S. Agueado, M.A. Garza-Jinich et al. // IEEE trans. on pattern analysis and machine intelligence. – 1995. – V. 17, 111. – P. 1110-1115.

56. Image processing and analysis system IMAGEWARP / Y. Ilyich, B. Nalibotsky, A. Nedzved et al. // XIVth ISDQP international congress «Diagnostic molecular pathology from genomics to proteomics». – Oviedo (Span), September 2001. – P. 118-120.

57. Jain A.K. Fundamentals of Digital Image Processing. – Prentice-Hall International, Inc, 1990. – P. 60-74.

58. Jang B.K., Chin R.T. Analysis of Thinning Algorithms Using Mathematical Morphology // IEEE trans. on pattern analysis and machine intelligence. – 1990. – V. 12. – № 6. – P. 541-884.

59. Kim J., Gillies D. Automatic morphometric analysis of neural cells. // Machine graphics & vision. – 1998. – V. 7. – № 4. – P. 693-710.

60. Krogh A. Hidden Markov models for labeled sequences // Proc. of 12th IAPR international conference on pattern recognition. V.1. – Jerusalem, Israel, 1994. – P. 140-144.

61. Lagunovsky D.M., Ablameyko S.V., Kirillov V.A. Segmentation of Cytological Images by Choosing Appropriate Color Components // Proc. of PRIP'2001 Conf. –V.1. – 2001. – P. 55-58.

62. Lam L., Lee S.-W., Suen C. Y. Thinning Methodologies – A Comprehensive Survey // IEEE trans. on pattern analysis and machine intelligence. – V. 14. – 1992.

63. Lee C.L., Wang P.S.P. A new thinning algorithm // 12-th IAPR international conference on pattern recognition. V.1. Jerusalem, Israel, 1994. – P. 546-548.

64. Leod G.M., Cowen A.R., Parkin G.J.S. Wavelet based computer aided detection of abnormalities in digital X-Ray mammograms // Proc. of Sixth international conference «Image processing and its applications». – 1997. – V. 2. – P. 829-832.

65. Levine M.D. Vision in man and machine. – New York: McGraw-Hill Book Company, 1987. – P. 343-369

66. Loebl J. Image analysis principles & Practice. – A Vickers company Marquisway, UK, 1989. – 247 p.

67. Mathematical morphology and active contours for object extraction and localization in medical images / S. Schupp, A. Elmoataz, R. Clouard et al. // Proc. of Sixth international conference «Image processing and its applications». – 1997. – V. 1. – P. 317-321.

68. Meyer F., Beucher S. Morphological segmentation // Journal of Visual Communication and Image Representation. – 1990. – V. 1. – № 1. – P. 21-46.

69. Morris D.S., Choo M. Thinning by thickening: Using Gaussian filtering to perform feature preserving thinning // Proc. of 12-th IAPR international conference on pattern recognition. V. 1. – Jerusalem, Israel, 1994. – P. 532-548.

70. Nedzved A., Ablameyko S. Extraction on Cell structure in Color Histological Images // Proc. of International workshop on Computer Vision, Computer Graphics, New Media.– Graz: Osterreichische Computer Gesellschaft, 2002. – P. 41-49.

71. Ramella G. Extracting Thin Lines in Gray-Level Images // Pattern Recognition and Image Analysis. – 1995.– V. 5. – № 4. – P. 570-576.

72. Ritter G.X., Wilson J.N. Handbook of Computer Vision Algorithms in Image Algebra. – CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1996. – 357 p.

73. Sanniti di baja G., Thiel E. Computing and comparing distance-driven skeleton // Proc. of 2nd international workshop on visual form. – Italy, 1994. – P. 475-486.

74. Schaefer C. Bone morphometry using the videoplan system // Image news. Magazine for users of image analysis system. – 1993. – V. 3. – P. 29

75. Schafer C. Measurement of a histological section with VIDAS // Image news. Magazine for users of image analysis system. – 1991. – V. 1. – P. 6-7.

76. Schmidts H-L., Stautz R. The connective tissue content of histological liver specimens for morphometric examination // Image news. Magazine for users of image analysis system. – 1994. – V. 4. – № 9. – P. 28-29.

77. Serra J. Image Analysis and Mathematical Morphology. – New-York: Academic, 1982.

78. Structural analysis of retinal vessels / A.J. Frame, P.E. Undrill, J.A. Olson et al. // Proc. of Sixth international conference on image processing and its applications. – 1997. – V. 2. – P. 824-827.

79. Subsol G., Thirion J.Ph., Ayache N. Non rigid registration for building 3D anatomical atlases // Proc. of 12-th IAPR international conference on pattern recognition. V. 1. – Jerusalem, Israel, 1994. – P. 576-557.

80. System for Analysis of Medical Images of Histological Objects / A.M. Nedzved, S.V. Ablameyko, B.V. Nalibotsky, Y.G. Iliyeh // Pattern Re-

cognition and Image Analysis. – V. 11. – № 4. – 2001. – P. 732-742.

81. Classification of cervical cell nuclei using morphological segmentation and textural feature extraction / R.F. Walker, P. Jackway, B. Lovell et al. // Second Australian and New Zealand conference on Intelligent information systems. – Brisbane, 1994. – P. 183-189.

82. Wang C., Abe K. A method for gray-scale image thinning: the case without region specification for thinning // Proceedings of the 11th International Conference on Pattern Recognition. – The Netherlands, 1992.

83. Zhu S.C., Yuille A. Region competition: Unifying snake region growing // IEEE trans. on pattern recognition and machine intelligence. – 1996. – V. 18. – № 9. – P. 884-900.