

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ АНАЛИЗА ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ЦИФРОВЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ МИКРОПРЕПАРАТОВ

Н.П. СЕРЕЖЕНКО\*, Н.Т. АЛЕКСЕЕВА\*, В.Г. РУДАЛЕВ\*\*, К.А. БАЗУРИНА\*\*

\* ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, Россия, 394036

\*\* ФГБОУ ВПО «ВГУ», Университетская площадь, 1, г. Воронеж, Россия, 394006

**Аннотация.** В настоящее время актуальным является разработка программного обеспечения для проведения денситометрических исследований. При проведении денситометрического анализа важнейшей задачей является анализ соотношения количества прошедшего через микропрепарат с определенной гистохимической реакцией света по отношению к некоторому эталонному полю, не содержащему анализируемый объект, но, тем не менее, имеющий в своем составе все прозрачные среды, задерживающие световой поток: предметные и покровные стекла, среду в которой зафиксирован срез и бальзам для фиксации стекол. Таким образом, в наиболее частом на практике случае, не представляет интереса информация о цветовом компоненте изображения. Поэтому для проведения денситометрического исследования представляется предпочтительным использование цифровых камер не цветного, а черно-белого изображения.

В статье изложены вопросы создания программного обеспечения для анализа цифровых микрофотографий биологических объектов. Во введении изложены постановка проблемы и артефакты, приводящие к появлению ошибок при проведении денситометрического анализа. Рассмотрена проблема построения программного обеспечения для цифровой обработки изображений микропрепаратов, полученных с помощью микроскопа. Описана реализация программного продукта, математические методы обработки, приводятся результаты применения этих методов на реальных данных.

**Ключевые слова:** микроденситометрия, цифровая фотография, гистохимия

SPECIALIZED SOFTWARE FOR ANALYSIS OF OPTICAL DENSITY DIGITAL IMAGES  
MICROPREPARATIONS

N.P. SEREZHENKO\*, N.T. ALEXEEVA\*, V.G. RUDALEV\*\*, S.A. BAZURINA\*\*

\* Medical University "Voronezh State Medical Academy. NN Burdenko Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Student, 10, Voronezh, Russia, 394036

\*\* VPO "MAD", University Square, 1, Voronezh, Russia, 394006

**Abstract.** The development of software for densitometric analysis is actual nowadays. The main task in performing the densitometric analysis is the estimation of light quantity rate which passed through the product of histochemical reaction of examined object to some sample transparent field without an analyzed object, delaying the light flow, such as slide-glass, coverslip, mounts environment. As a rule, the information on the color of reaction products is of no interest to the study. That is why monochrome digital cameras are preferred for densitometric analysis.

The article presents the issues of creating software for the analysis of digital micrographs of biological objects. The introduction sets out the problem statement and artifacts that result in errors during the densitometric analysis. The problem of constructing software for digital image processing micropreparations obtained using a microscope. The realization of software, mathematical methods of treatment, the results of applying these methods to real data.

**Key words:** microdensitometry, digital photography, histochemistry.

Актуальной задачей экспериментальной и клинической медицины является определение денситометрических показателей клетки: оптической плотности, коэффициента пропускания, показателей поглощения [1]. При проведении денситометрического анализа важнейшей задачей является анализ соотношения количества прошедшего через микропрепарат с определенной гистохимической реакцией света по отношению к некоторому эталонному полю, не содержащему анализируемый объект, но, тем не менее, имеющий в своем составе все прозрачные среды, задерживающие световой поток: предметные и покровные стекла, среду в которой зафиксирован срез и бальзам для фиксации стекол. Таким образом, в наиболее частом на практике случае, не представляет интереса информация о цветовом компоненте изо-

**Библиографическая ссылка:**

Сереженко Н.П., Алексеева Н.Т., Рудалев В.Г., Базурина К.А. Специализированное программное обеспечение анализа оптической плотности цифровых изображений микропрепаратов // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 7-16. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5057.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

бражения. Поэтому для проведения денситометрического исследования представляется предпочтительным использование цифровых камер не цветного, а черно-белого изображения. К преимуществам цифровых черно-белых камер, применяющихся для денситометрии можно отнести их сравнительно высокую разрешающую способность (600 телевизионных линий) и чувствительность (не менее 0,01 лк), меньший цифровой шум. Для качественного проведения денситометрического анализа необходимо обеспечения ряда условий. Во-первых, необходимо создание стабильного светового потока в оптическом тракте микроскопа. Для обеспечения данного условия применялся стабилизированный как по току, так и по напряжению источник тока. Такой подход позволяет добиться стабильности не только светового потока, но и цветовой температуры источника света. Кроме того, применение стабилизированного источника постоянного напряжения позволяет уменьшить вероятность появления артефактов мерцания, связанных с нестабильностью частоты сетевого напряжения и несовпадения частот опроса ячеек камеры и изменения светового потока, что приводит к появлению движущихся полос различной яркости, вносящих существенные искажения в результаты измерений.

Во-вторых, необходимым является учет высокочастотных шумов камеры. В данном случае необходимо помнить, что увеличение числа световоспринимающих элементов в определенной степени считается фактором, позволяющим «усреднить» данную помеху. Тем не менее, общепризнанным фактом является именно увеличение цифрового шума при росте числа воспринимающих элементов. Фактором, позволяющим существенно снизить собственные шумы матрицы камеры является использование различных систем ее охлаждения.

Третьим важным фактором является неравномерность освещения поля зрения микроскопа. Безусловно, для устранения данного артефакта важнейшим является проведение адекватной юстировки источника освещения для устранения его эксцентричного положения и возникающего виньетирования. Тем не менее, даже воспринимаемое глазом как равномерно освещенное поле зрения в силу инертности зрительного анализатора, может иметь перепады яркости, превышающие 5%, что существенно влияет на точность проводимых измерений. Одним из возможных способов устранения данного фактора является использование дополнительных рассеивающих приспособлений, например – матового стекла или специальная конструкция источника освещения. Другим способом, представляющимся более адекватным, является использование калибровочного поля для каждого измерения и сравнения анализируемого изображения с областью эталонного поля, соответствующим положению объекта.

Следующим важным фактором является учет собственных шумов используемого цифрового приемника света. Это уже упоминавшиеся собственные шумы матрицы. При этом важно помнить, что в данном случае в их составе можно выделить несколько компонентов: влияние так называемых «битых пикселей», соответствующих вышедшим из строя световоспринимающим элементам, дающим значения потока «0» и «горячих пикселей», аналогичных предыдущим и дающих значения «255», т.е. значения абсолютного максимума и минимума. Для учета первых необходимо проведение предварительной съемки равномерно засвеченного поля с получением изображений так называемых «flat fields», а для вторых – изображений неосвещенного поля зрения – «dark fields». Вторые позволяют получить эквивалент темнового тока в классической денситометрии. Безусловно полезным является использование и съемки так называемых offset- или bias-frames. Они позволяют в определенной степени уменьшить ошибки, связанные со стохастическим шумом. К сожалению, использование данных подходов бывает иногда затруднено из-за невозможности регулировки длительности выдержки при получении микрофотоизображений.

Нельзя забывать и об общепринятых принципах получения любых фотоизображений. Так как при проведении денситометрических исследований мы проводим по существу анализ относительного распределения полутонов в некоторой усредненной по яркости области, обязательным условием является контроль гистограммы яркости анализируемого объекта. Она должна быть максимально полной, т.е. по возможности занимать весь диапазон градаций яркости – от 1 до 254, исключая крайние значения, соответствующие нефункционирующим световоспринимающим элементам при их наличии в используемой камере. При возможности использования не 8-битного преобразования исходного изображения необходимо работать именно в нем, т.к. мы получим большую степень градаций полутонов. Однако не стоит прибегать к искусственному их расширению путем изменений имеющейся разрядности изображения с помощью программ их обработки. В последнем случае мы получаем некоторый результат, весьма мало соотносящийся с реальностью, тем более, после проведения программной цветокоррекции. В то же время ощущается нехватка доступных специалистам программных продуктов, позволяющих автоматизировать методики рутинного анализа изображений препаратов и образцов.

Широкое распространение получили системы цифровой микроскопии, которые позволяют регистрировать изображения с использованием различных цифровых фото- или видеокамер. Существенным недостатком данных аппаратно-программных комплексов является их преимущественная направленность на получение именно фотоизображений с возможностями его редактирования и количественного анализа (измерение длины, углов, периметра, площади объектов и т.д.). При этом задачи денситометри-

---

**Библиографическая ссылка:**

Сереженко Н.П., Алексеева Н.Т., Рудалев В.Г., Базурина К.А. Специализированное программное обеспечение анализа оптической плотности цифровых изображений микропрепаратов // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 7-16. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5057.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

ческого исследования решены лишь в немногих случаях, например, при использовании отечественной системы «ВИДЕОТЕСТ» производства ООО «Иста-Видеотест» [3]. Указанное решение представляет собой дорогостоящий сложный программно-аппаратный комплекс, который имеет жесткую привязку к используемому в нем оборудованию, что с одной стороны, позволяет достичь высокой точности и совместимости аппаратных ресурсов и программного обеспечения, а с другой стороны – делает невозможным обработку изображений, полученных с использованием других систем. Универсальные коммерческие графические пакеты (например, Photoshop) также дорогостоящи, ресурсоемки, а их набор функций не соответствует задачам денситометрии.

В данной статье описывается реализация и функциональные возможности разработанной авторами специализированной программы для ЭВМ анализа оптической плотности. Программа использует для анализа графические файлы в формате JPEG, полученные с помощью обычного цифрового фотоаппарата и микроскопа, и может использоваться автономно от них. Программа написана на алгоритмическом языке C#. Для запуска и корректного функционирования приложения необходимо наличие на компьютере операционной системы Windows семейства XP/Vista/7, а также установленной исполняющей среды Microsoft .Net Framework 4.0.

Для вычисления степени прозрачности анализируемых сред проводится конвертация изображения из наиболее распространенного на практике цветового пространства sRGB в LAB [2] с возможностью оперировать яркостным каналом L. Данный подход позволяет одновременно решить целый комплекс проблем. Во-первых, пространство LAB является аппаратно-независимой платформой, что исключает ошибки, связанные с регистрацией изображений, полученных с помощью различного световоспринимающего оборудования. Во-вторых, канал L содержит информацию именно об изменении «яркости» объекта, которое напрямую соотносится в используемых понятиях со степенью прозрачности анализируемых сред.

Необходимо загружать несколько изображений, исследуемое и эталонное, чтобы при проведении вычислений анализировать соотношение количества света, прошедшего через микропрепарат с определенной гистохимической реакцией, по отношению к некоторому эталонному полю, не содержащему анализируемый объект.

Реализованы различные методы выделения анализируемых зон изображений – прямоугольная, эллипсовидная или произвольная форма.

Введен принцип обязательной калибрации исследуемого изображения по «свободному» полю и сравнения идентичных по местоположению областей изображений, что позволяет исключить ошибки, связанные с неравномерностью освещения препаратов.

Реализованы различные методы денситометрического исследования: плаг-метод, многоточечный или микроплаг-метод, метод сканирования с усреднением [1].

Осуществлена регистрация серийных данных при последовательных измерениях с их накоплением и возможностью вывода и элементарной статистической обработкой по полученной выборке, а также экспорт получаемых результатов. Реализовано построение гистограмм распределения оптической плотности, что позволяет проводить углубленный анализ получаемых данных.

Для упрощения сопровождения и дальнейшей модернизации программа выполнена в объектно-ориентированном стиле. Разработана библиотека классов, состоящая из следующих трех функциональных групп.

- Работа с цветом (для конвертации в LAB)
  - AbstractColor – абстрактный класс, реализующий интерфейс для всех наследующих классов цветовых пространств.
  - RGB – класс описывающий элемент пространства RGB, реализует конвертацию в пространства XYZ и LAB.
  - XYZ – класс описывающий элемент пространства XYZ, реализует конвертацию в пространства RGB и LAB.
  - LAB – класс описывающий элемент пространства Lab, реализует конвертацию в пространства RGB и XYZ.
- Работа с данными
  - Entity – класс, содержащий все вычисленные параметры клетки.
  - Indicators – содержит характеристики некоторой, передаваемой в конструктор, области изображения. Реализует методы вычисления параметров.
  - Statistics – содержит статистические характеристики и реализует их расчет по передаваемому в конструктор набору данных.
- Коррекция изображения
  - Calculate – класс, содержащий функции для размытия изображения.

**Библиографическая ссылка:**

Сереженко Н.П., Алексеева Н.Т., Рудалев В.Г., Базурина К.А. Специализированное программное обеспечение анализа оптической плотности цифровых изображений микропрепаратов // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 7-16. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5057.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

Расширение функциональности программы потребует создания новых унаследованных классов без изменения уже разработанного кода.

Реализованное WinForms приложение предусматривает ввод входных изображений из файла, после выделения области рассчитываются необходимые параметры, которые выбираются пользователем. Для исследования микропрепарата необходимо загрузить его изображение, а также эталонное изображение, не содержащее анализируемое вещество (рис. 1).

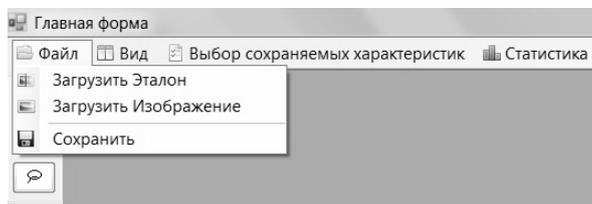


Рис. 1. Меню выбора загружаемых изображений

После того, как изображение эталона и изображение с исследуемой областью загружено (см. рис. 6.5), пользователь выделяет конкретную анализируемую зону изображения. Методы выделения (эллипс, прямоугольник или произвольная кривая) представлены на панели слева. В меню есть возможность выбора необходимых характеристик для сохранения (рис. 2) и толщины слоя микропрепарата в единицах мкм. Выбранные параметры сохраняются в файле отчета.

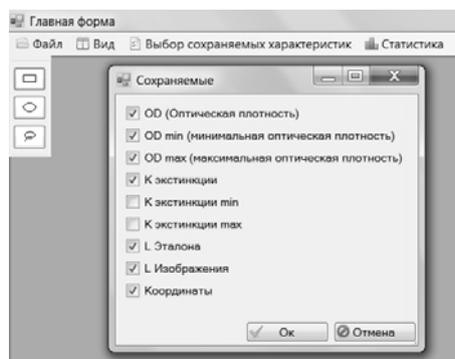


Рис. 2. Выбор сохраняемых характеристик

Экран приложения после загрузки изображения имеет вид рис. 3, где в ближнем окне на переднем плане представлено исследуемое изображение, а дальнем – эталонное изображение.

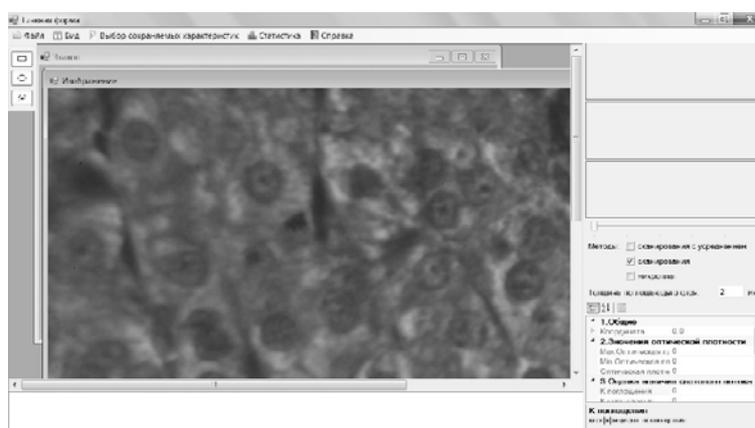


Рис. 3. Экран приложения после загрузки изображений

После того, как изображение эталона и изображение с исследуемой областью загружено, пользователь выделяет «мышью» конкретную анализируемую зону изображения (обычно это клетка микропрепарата). После выделения область изображения автоматически накладывается на идентичную по место-

#### Библиографическая ссылка:

Сереженко Н.П., Алексеева Н.Т., Рудалев В.Г., Базурина К.А. Специализированное программное обеспечение анализа оптической плотности цифровых изображений микропрепаратов // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 7-16. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5057.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).

положению область эталонного изображения. Результат выделения отображается на правой панели в верхней ее части (рис.4), первое изображение – эталонная часть, второе – выделенная область, наложенная на эталон, третье изображение отображает второе изображение после размытия, степень которого регулируется представленным ниже ползунком. Также на правой панели выбирается необходимый метод денситометрического исследования.

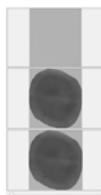


Рис. 4. Выделенная область

Представляет научный и практический интерес изучение распределения оптических плотностей по множеству пикселей в выделенной области изображения (внутри клетки), или по множеству клеток на препарате в целом (пункт главного меню «Статистика»). Как следует из рис. 5, наиболее частыми значениями плотности внутри клетки являются значения от 1.7 до 2.1. Выборочное среднее равно 1.89. Полученное распределение асимметрично и существенно отличается от нормального. Один пик гистограммы обусловлен наличием ядра в клетке, а второй – наличием клеточной оболочки.

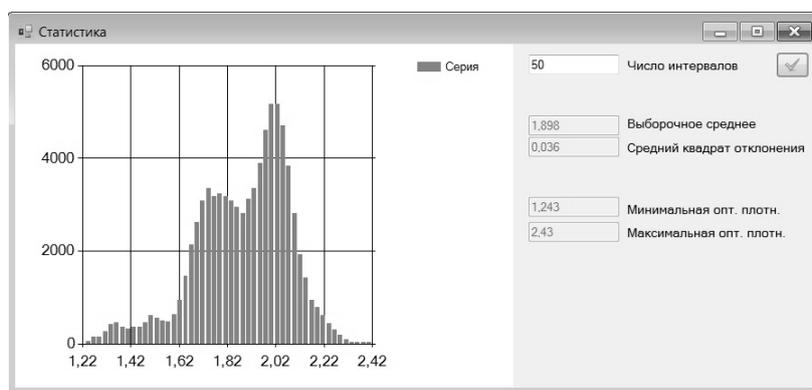


Рис. 5. Гистограмма оптической плотности для выделенной клетки

Разработанное программное обеспечение внедрено и используется в научно-исследовательской и педагогической работе кафедры нормальной анатомии человека ГБОУ ВПО Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко.

### Литература

1. Морфологическая характеристика тканевой реакции в ране при применении светотерапии / Алексеева Н.Т. [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2008. Т. 1. № 1. С. 51–56.
2. Douglas B. Murphy, Michael W. Douglas B. Murphy. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging // Davidson. WILEY-BLACKWELL, 2013. 552 p.
3. Маргулис Д. Photoshop Lab Color. М.: Интелбук, 2006. 480 с.

### References

1. Alekseeva NT, et al. Morfologicheskaya kharakteristika tkanevoy reaktzii v rane pri primene-nii svetoterapii // Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii. 2008;1(1):51-6. Russian.
2. Douglas B. Murphy, Michael W. Douglas B. Murphy. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Davidson. WILEY-BLACKWELL; 2013.
3. Margulis D. Photoshop Lab Color. Moscow: Intelbuk; 2006. Russian.

### Библиографическая ссылка:

Сереженко Н.П., Алексеева Н.Т., Рудалев В.Г., Базурина К.А. Специализированное программное обеспечение анализа оптической плотности цифровых изображений микропрепаратов // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2014. №1. Публикация 7-16. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2014-1/5057.pdf> (дата обращения: 26.12.2014).