

О. А. Янковський, С. О. Партика, В. В. Філіппов

Харківський національний технічний університет радіоелектроніки, Харків, Україна

ЗАСТОСУВАННЯ КОМП'ЮТЕРНИХ МЕТОДІВ ОБРОБКИ ЗОБРАЖЕНЬ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ТА КЛІНІЧНІЙ МЕДИЦИНІ

Анотація. Актуальність. В наш час в світі широко застосовуються в харчовій промисловості біологічні домішки, зокрема карагенани (E407a). Відомо, що карагенани використовуються як емульгатори та желеутворювачі. В експериментальних дослідженнях визначено вплив карагенанів на організм людей та тварин. З наукової літератури відомо вплив цієї біодомішки на розвиток запалення кишківника. **Метою даної роботи** є вибір алгоритмів цифрової обробки зображень для об'єктивного аналізу результатів експериментальних досліджень. **Об'єктом дослідження** є біологічні об'єкти, а саме суспензія лейкоцитів та еритроцити крові щурів. **Предметом дослідження** є методи та алгоритми обробки зображень методами бінаризації. **Результати.** У даній роботі розглянути методи комп'ютерної обробки зображень біологічних об'єктів, які дозволяють покращити якість аналізу результатів експериментальних досліджень. Визначені рішення стають особливо ефективними при великому обсязі отриманих результатів досліджень, які необхідно опрацювати за короткий час. **Висновок.** Цей підхід зменшує кількість помилок, зумовлених людським фактором. Використані алгоритми можна застосувати і до інших зображень, отриманих методами, які застосовують в експериментальній та клінічній медицині. Також можна розширити функціональні можливості аналізу.

Ключові слова: суспензія лейкоцитів, зображення, клітина, карагенан, еритроцити, активні форми кисню.

Вступ

На теперішній час в світі дуже широко в харчовій промисловості застосовують біологічні домішки, однією з таких харчових добавок є карагенан. У науковій літературі визначається, що гідроколоїдні та желеутворюючі властивості карагенанів роблять їх придатними для використання у харчовій промисловості, де вони десятиліттями широко застосовуються як желеутворювачі, загусники, покращувачі текстури продуктів та емульгатори тощо [1,2].

Морські водорості є джерелами полісахаридів, зокрема агару та алгінатів. У багатьох експериментальних дослідженнях показаний вплив карагенанів на кишечник в залежності від дози застосування, та розвиток запального процесу в кишечнику [3,4].

У цілому, карагенани додаються до молочних продуктів (морозиво, молочні напої, вершки, йогурт, сир тощо) та м'ясних продуктів (ковбаси, сушене м'ясо тощо). λ -Карагенан частіше за все зустрічається в молочних продуктах та застосовується для покращення органолептичних властивостей харчових продуктів та забезпечення вершкової в'язкості.

Крім того, численні експериментальні дослідження *in vitro* та *in vivo* демонструють здатність карагенанів викликати запалення в епітеліальних клітинах кишечника шляхом сприяння вивільненню прозапальних цитокінів [5, 6]. Існують також експериментальні докази того, що макрофаги можуть поглинати харчовий карагенан з наступною міграцією до лімфатичних вузлів [7]. Робота виконана в рамках співробітництва між кафедрою біологічної хімії Харківського національного медичного університету, Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини ХНМУ та кафедрою ЕОМ Харківського національного університету радіоелектроніки.

Метою цієї роботи є застосування комп'ютерних методів обробки зображень для покращення аналізу отриманих експериментальних досліджень, зменшення суб'єктивних похибок досліджень, викликаних людським фактором.

Основна частина

В якості першого приклада розглянемо ситуацію, коли треба оцінити відсоток морфологічно змінених клітин, наприклад на зображенні епітелію кишечника (рис. 1). У цьому дослідженні оцінювали вплив E407a на морфологічний стан тонкої кишки з використанням фарбування гематоксилін-еозином. Результати морфологічного дослідження показали, що вживання цієї харчової добавки призвело до розвитку запалення [8, 9]. У щурів, які вживали напівочищений карагенан спостерігається пошкодження ворсинок з десквамованими епітеліальними клітинами, ділянки без ворсинок або ділянки зі зміненою ворсинчастою архітектурою, запальна клітинна інфільтрація у власній пластинці. Фарбованими були відкладення колагену у слизовій оболонці тонкого кишечника щурів, які отримували E407a, порівняно з контролем [10]. Відкладення відрізняються темним відтінком по відношенню до фону, який заповнений здоровими клітинами.



Рис. 1. Мікропрепарати тонкої кишки, які були пофарбовані гематоксилін-еозином

Для зменшення похибок аналізу, обумовлених людським фактором, отримане зображення було оброблене різними методами бінаризації [11], з яких найкращий результат був отриманий за методом Отса (рис. 2).



Рис. 2. Зображення на рис.1 после бінаризації

У цьому методі обчислюється поріг t , який мінімізує середню помилку від ухвалення рішення про належність пікселів зображення об'єкту або фону. Значення яскравостей пікселів зображення розглядаються як випадкові величини, які гістограма – як оцінка щільності розподілу ймовірностей. Якщо щільності розподілу ймовірностей відомі, можна визначити оптимальний поріг для сегментації зображення на два класи c_0 і c_1 (об'єкти і тло) [12].

Дослідження ґрунтувалися на наступному: зображення подається за допомогою L рівнів яскравості; h_i - число елементів зображення, що мають яскравість i , $i = 0, 1, \dots, L-1$; N – загальна кількість пікселів на зображенні; гістограма зображення є нормалізованою і її можна розглядати як розподіл ймовірностей

$$p_i = \frac{h_i}{N}, i = 0, 1, \dots, L-1; \sum_{i=0}^{L-1} p_i = 1. \quad (1)$$

Елементи зображення діляться на два класи c_0 та c_1 за допомогою порогового значення t , де клас c_0 містить пікселі з яскравостями з множини $(0, 1, \dots, t)$, а клас c_1 – пікселі з яскравостями з множини $(t+1, \dots, L-1)$. Імовірності кожного з цих двох класів та середні значення їх яскравості описуються виразами:

$$P_0 = \sum_{i=0}^t p_i = P_t; \quad (2)$$

$$P_1 = \sum_{i=t+1}^{L-1} p_i = 1 - P_t; \quad (3)$$

$$\mu_0 = \sum i p_i / P_0 = \mu_t / P_t; \quad (4)$$

$$\mu_1 = \sum_{i=t+1}^{L-1} i p_i / P_1 = (\mu_T - \mu_t) / (1 - P_t), \quad (5)$$

де $\mu_T = \sum_{i=0}^{L-1} i p_i$ – середня яскравість зображення.

Після отримання бінарного зображення було виконано підрахунок чорних пікселів на зображенні, який становив 60%, що дозволяє зробити висновки про ступінь відкладення колагену на даному етапі експерименту.

Другий приклад пов'язаний з оцінкою токсичного впливу дослідженої харчової домішки (E407a) карагенану на життєздатність лейкоцитів крові [13]. У попередніх експериментальних дослідженнях визначено достатній вплив карагенану на клітини крові зокрема, лейкоцити, які забезпечують імунний стан організму [14]. Для цього в Інституті експериментальної та

клінічної медицини ХНМУ дослідники фарбували ці клітини трипановим синім після інкубації цієї добавки з суспензією лейкоцитів протягом 2 годин. Використовували концентрацію 0-10 мг/мл. На рис.3, 4 наведені зображення суспензій лейкоцитів, отриманих за допомогою мікроскопа. На цих зображеннях необхідно проаналізувати кількість нежиттєздатних лейкоцитів (зафарбованих в чорний колір). До зображень на рис.3, 4 застосували метод бінаризації Отса (рис.5, 6).

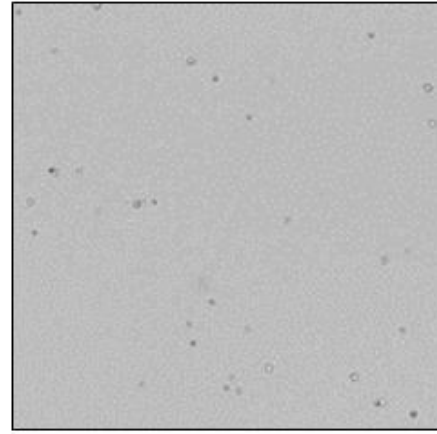


Рис. 3. Репрезентативні зображення суспензії лейкоцитів контрольної групи, забарвлених трипановим синім

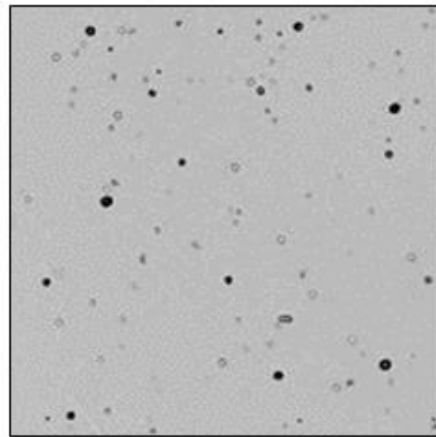


Рис. 4. Репрезентативні зображення суспензії лейкоцитів, забарвлених трипановим синім, які інкубували з E407a у концентрації 10 мг / мл протягом 2 годин in vitro

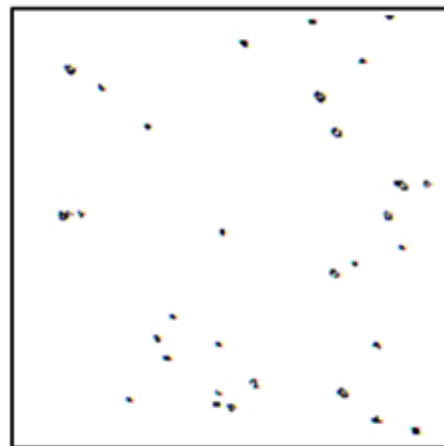


Рис. 5. Зображення суспензії лейкоцитів на рис.3 після бінаризації

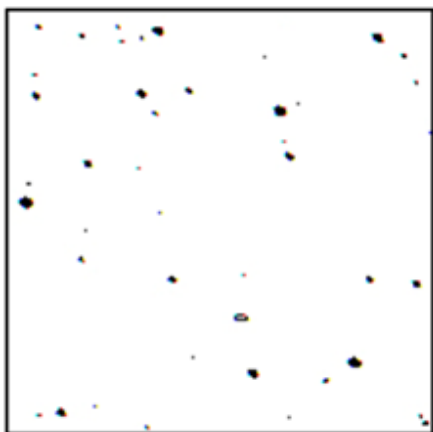


Рис. 6. Зображення суспензії лейкоцитів на рис.4 після бінаризації

Як видно на рис. 5, 6, мертві лейкоцити стають помітнішими ніж на рис. 3, 4.

Аналіз зображень на рис. 5, 6 показує, що навіть незначна концентрація E407 сприяла загибелі лейкоцитів [14].

Наступний приклад - аналіз генерації активних форм кисню в еритроцитах, що зазнали впливу харчової добавки E407a [15]. Оцінку проводили методом проточної цитометрії з використанням барвника H2DCFDA. Для цього еритроцити інкубували з E407a, фарбували анексином V-FITC для візуалізації еритроцитичних клітин за допомогою конфокальної скануючої лазерної мікроскопії [15]. Було проаналізовано зображення суспензій із концентрацією 10 мг /мл (рис. 7). Візуально зображення на рис. 3 важко проаналізувати, тому до нього були застосовані різні методи обробки зображень, з яких найкращий результат показав метод бінаризації Ніблека (рис. 8) [16].

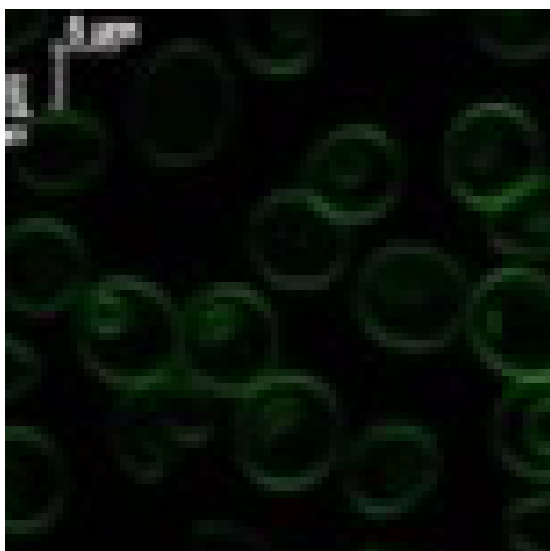


Рис. 7. Візуалізація еритроцитів, пофарбованих за допомогою анексіну V-FITC за допомогою конфокальної мікроскопії

У цьому методі для кожного пікселя зображення використовується значення порога. Визначення величини порога відбувається на основі обчислення локального середнього та локального середньоквадратичного відхилення.

Значення порога у точці з координатами (m, n) обчислюється відповідно до формули:

$$t(m, n) = \mu(m, n) + k \cdot \sigma(m, n), \quad (6)$$

де $\mu(m, n)$ – середнє, а $\sigma(m, n)$ – середньоквадратичне відхилення у локальній околиці точки зображення (m, n) [5]. Розмір околу пікселя було обрано $r = 15 \times 15$, а $k = -0.2$.

Зображення на рис.8 більш інформативно у порівнянні зі зображенням на рис.7, тому що пофарбовані еритроцити видно краще.



Рис. 8. Результат обробки зображення на рис.7 за методом бінаризації Ніблека

Проведений аналіз генерації АФК в еритроцитах за умов впливу харчової добавки E407a, дозволив оцінити підвищення інтенсивності флуоресценції ДХФ [18].

Висновки

В результаті проведених досліджень вибрано методи комп'ютерної обробки зображень біологічних об'єктів, що дозволяють покращити якість аналізу результатів експериментальних досліджень. Визначені рішення стають особливо ефективними при великому обсязі отриманих результатів досліджень, які необхідно опрацювати за короткий час. Використані алгоритми можна застосувати і до інших зображень, отриманих методами, які застосовують в експериментальній та клінічній медицині. Також можна розширити функціональні можливості аналізу. Цей підхід зменшує кількість помилок, зумовлених людським фактором.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pogozhykh D, Posokhov Y, Myasoedov V, Gubina-Vakulyck G, Chumachenko T, Knigavko O, Polikarpova H, Kalashnyk-Vakulenko Y, Sharashydzhe K, Nakonechna O, Prokopyuk V, Onishchenko A, Tkachenko A. Experimental Evaluation of Food-

- Grade Semi-Refined Carrageenan Toxicity. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(20):11178. <https://doi.org/10.3390/ijms22011178>
2. Ткаченко А.С. Влияние перорального употребления пищевой добавки E407a на апоптоз моноцитов крови крыс. Материали Всеукраїнської конференції з міжнародною участю «Сучасні підходи до терапії та медичної реабілітації хворих з внутрішньою та професійною патологією» – 2019. – (20-21 листопада 2019 р.). – м. Запоріжжя. — С. 18-19.
 3. Tkachenko AS, Onishchenko AI, Gorbach TV, Nakonechna OA, Shekhovtsova EV, Gubina-Vakulyck GI. HSP90 α overexpression in small intestinal mucosa and high blood serum levels of HSP70 and 8-isoprostane in carrageenan-induced intestinal inflammation. HVM Bioflux 2019;11(1):1-5.
 4. Ткаченко АС, Онищенко АИ, Ткаченко МА, Тонкошкур СН. Оценка экспрессии HSP90 α в тонком кишечнике крыс при E407a-индуцированном энтерите. Материали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» – 2018. – (26 жовтня 2018 р.). – м. Запоріжжя. — С. 88-89.
 5. A.S. Tkachenko, A.I. Onishchenko, H.V. Polikarpova. A common food additive E407a promotes infiltration of the small intestinal lamina propria with CD3⁺ and CD68⁺ cells in rats. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології 2021» -2021. – (20-21 травня 2021 р.). – м. Київ. – С. 10.
 6. А.С. Ткаченко, А.І. Онищенко, Г.І. Губіна-Вакулик, О.А. Наконечна. Пероральне вживання харчової добавки E407A індукує коліт у шурів. Материали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «ТЕОРІЯ ТА ПРАКТИКА СУЧАСНОЇ МОРФОЛОГІЇ» (4-6 листопада 2020 року). - м. Дніпро, Україна. – с. 108-109.
 7. Álvarez-Viñas M, Souto S, Flórez-Fernández N, Torres MD, Bandín I, Domínguez H. Antiviral Activity of Carrageenans and Processing Implications. Marine Drugs. 2021; 19(8):437. <https://doi.org/10.3390/md19080437>
 8. Tkachenko AS, Onishchenko AI, Gorbach TV, Nakonechna OA, Gubina –Vakulyck GI. HSP90 α expression in the small intestine and HSP70 blood serum levels in rats with carrageenan-induced enteritis. FEBS3+ Meeting – XIth Parnas Conference. Poster session VII. Ukr. Biochem. J., 2018, Vol. 90, Special Issue–P. 148.
 9. А.С. Ткаченко, Г.І. Губіна-Вакулик, О.А. Наконечна, Г.В. Полікарпова, А.І. Онищенко. Зміни експресії фасцину, віментину та Е-кадгерину у власній пластинці товстої кишки при вживанні харчової добавки E407a шурами. Материали п'ятої міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології». - 2020. – 1-2 жовтня 2020 р. - м. Дніпро, Україна. – с. 46-47.
 10. А.С. Ткаченко, А.І. Онищенко, Г.І. Губіна-Вакулик, О.А. Наконечна. Пероральне вживання харчової добавки E407A індукує коліт у шурів. Материали четвертої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «ТЕОРІЯ ТА ПРАКТИКА СУЧАСНОЇ МОРФОЛОГІЇ» (4-6 листопада 2020 року). - м. Дніпро, Україна. – с. 108-109.
 11. Гонсалес Р. Вудс Р. Цифровая обработка изображений в среде MATLAB – [Текст] / Р. Гонсалес Р. Вудс. – М.: Техносфера, 2006 – 616 с.
 12. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms IEEE Trans. Systems, Man, and Cybernetics, vol. 9, no. 1, pp. 62–66,1979.
 13. Tkachenko AS, Kot YG, Kapustnik VA, Myasoedov VV, Makieieva NI, Chumachenko TO, Onishchenko AI, Lukyanova YM, Nakonechna OA. Semi-refined carrageenan promotes generation of reactive oxygen species in leukocytes of rats upon oral exposure but not in vitro. Wien Med Wochenschr. 2021 Mar;171(3-4):68-78. doi: 10.1007/s10354-020-00786-7.
 14. Tkachenko A, Onishchenko A. Oral Intake of Semi-refined Carrageenan by Rats Affects Apoptosis of Lymphocytes. Annals of Colorectal Research, 2020;8(4):170-174. doi: 10.30476/acrr.2021.88624.1068
 15. Tkachenko A, Kot Y, Prokoryuk V, Onishchenko A, Bondareva A, Kapustnik V, Chumachenko T, Perskiy Y, Butov D, Nakonechna O. Food additive E407a stimulates eryptosis in a dose-dependent manner. Wien Med Wochenschr. 2021 Aug 12. doi: 10.1007/s10354-021-00874-2. Epub ahead of print. PMID: 34383224. <https://doi.org/10.1007/s10354-021-00874-2>.
 16. Niblack W. An Introduction to Digital Image Processing, pp. 115–116. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, 1986.
 17. Ткаченко АС, Онищенко АИ, Ткаченко МА, Тонкошкур СН. Оценка экспрессии HSP90 α в тонком кишечнике крыс при E407a-индуцированном энтерите. Материали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» – 2018. – (26 жовтня 2018 р.). – м. Запоріжжя. — С. 88-89.

Received (Надійшла) 22.01.2023

Accepted for publication (Прийнята до друку) 15.03.2023

Application of computer image processing methods in experimental and clinical medicine

Oleksandr Yankovsky, Stanislav Partyka, Vladlen Filippov

Abstract. Topicality. Nowadays, biological additives, in particular carrageenans (E407a), are widely used in the food industry. It is known that carrageenans are used as emulsifiers and gelling agents. In experimental studies, the influence of carrageenans on the body of humans and animals has been determined. The impact of this bioadmixture on the development of intestinal inflammation is known from the scientific literature. **The goal of this work** is the selection of digital image processing algorithms for the objective analysis of experimental research results. **The object of research** is biological objects, namely a suspension of leukocytes and erythrocytes of rat blood. **The subject of research** is the methods and algorithms of image processing by binarization methods. **Results.** In this work, we consider the methods of computer processing of images of biological objects, which allow to improve the quality of the analysis of the results of experimental studies. The identified solutions become especially effective when there is a large amount of research results obtained, which must be processed in a short time. **Conclusions.** This approach reduces the number of errors caused by the human factor. The used algorithms can be applied to other images obtained by methods used in experimental and clinical medicine. You can also expand the functionality of the analysis.

Keywords: leukocyte suspension, image, cell, carrageenan, erythrocyte, reactive oxygen species