

# Селекция и анализ объектов при многопороговой обработке изображений

В. О. Мельников<sup>1</sup>, В. Ю. Волков, О. А. Маркелов, М. И. Богачев  
Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»

им. В.И. Ульянова (Ленина)

<sup>1</sup>email: kaktyc\_real\_i@mail.ru

**Аннотация.** Рассмотрена задача селекции однородных объектов на изображении, включающая их выделение и классификацию по совокупности признаков на основе многопороговой обработки. Реализован алгоритм с адаптивной установкой решающего порога по результатам селекции объектов интереса. Для определения порога используется признак, связанный с размером выделяемых объектов, путем поиска максимумов гистограмм размеров изолированных объектов при различных значениях порога. Предложенный алгоритм реализован в виде программного продукта, который применен в составе алгоритма двухэтапной обработки микроизображений бактериальных клеток, полученных методом флуоресцентной микроскопии. Предложенный подход показал эффективность селекции отдельных клеток на фоне конгломератов клеток, образующих биопленки, при различных условиях съемки и качестве исходных микроизображений.

**Ключевые слова:** многопороговая обработка; гистограмма размеров; флуоресцентная микроскопия

## I. ВВЕДЕНИЕ

Селекция объектов интереса на изображениях является важной задачей анализа сцен различной природы, формируемых телевизионными, инфракрасными, радиолокационными системами наблюдения [1–3], а также полученными при микроскопическом исследовании клеточных структур на биологических срезах [4–6]. Часто сцена содержит одиночные объекты определенной формы и примерно одинакового размера, и такие же объекты, слившиеся в конгломераты. Число одиночных объектов и их средние размеры неизвестно и подлежит определению. Также следует определить число подобных объектов, содержащихся в конгломератах. Эти задачи осложняются тем, что масштаб сцены неизвестен и может меняться. Кроме того, всегда присутствует неоднородный фон, статистика которого обычно неизвестна и ее трудно анализировать.

Использование обычных методов линейной или нелинейной фильтрации объектов, как правило, неэффективно вследствие отсутствия информации о форме и размерах объектов интереса. Выделение объектов такого рода можно осуществить путем многопороговой обработки с последующей селекцией объектов по признакам формы и размеров. Идея выбора и установки порога с учетом полученных результатов селекции при разных пороговых значениях развита в работах [2, 3] применительно к анализу радиолокационных изображений. В работах [4–6] рассмотрена задача селекции и выделения клеток на биологических срезах.

В данной работе представлена методика анализа изображений, алгоритм выбора признаков, программное обеспечение и результаты исследования селекции клеток на флуоресцентных микроскопических изображениях бактериальных клеток, полученные при исследовании эффективности перспективных антибактериальных препаратов. Эти изображения любезно предоставлены Институтом фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета [7–12].

## II. МЕТОДИКА АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ И ВЫБОР ПРИЗНАКОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ

Анализ изображений начинается с предварительного обнаружения пикселей, превышающих заданный порог. Предварительно обработанное изображение сегментируется на отдельные неперекрывающиеся объекты, при этом горизонтально, вертикально или диагонально смежно расположенные соседние пиксели относятся к одному объекту. Кроме того, выбираются объекты с заданным набором свойств, которые определяют субпопуляцию клеток. В дальнейшем подсчитываются выбранные объекты, вычисляется их общая площадь и определяется средний размер типичной клетки из изучаемой субпопуляции. Затем определяется эффективное количество клеток путем деления общей площади над порогом на средний размер выбранных клеток.

$$N_R^{\text{eff}} = \frac{S_R}{\bar{S}_R[s_{\min} \dots s_{\max}]} \text{ и } N_G^{\text{eff}} = \frac{S_G}{\bar{S}_G[s_{\min} \dots s_{\max}]},$$

где  $N_R^{\text{eff}}$ ,  $N_G^{\text{eff}}$  – эффективные значения численности клеток;  $S_R$ ,  $S_G$  – суммарная площадь объектов, превысивших выбранные пороги;  $\bar{S}_R[s_{\min} \dots s_{\max}]$ ,  $\bar{S}_G[s_{\min} \dots s_{\max}]$  – эффективные средние значения площади одиночных клеток, лежащих в диапазоне от  $s_{\min}$  до  $s_{\max}$  в красном и зеленом каналах, соответственно. Двухпороговый алгоритм анализа на основе селекции одиночных клеток и последующего нормирования общей площади изображения, превысившего порог, к среднему размеру одиночной клетки, предложен в работах [5, 6].

Логика анализа изображения основана на предварительной настройке параметров алгоритма с использованием одного или нескольких изображений, которые исследователь находит более или менее репрезентативными для изученной группы в терминах условий изображения. По-

рог и диапазон размеров отдельных клеток взаимозависимы. Поскольку отдельные клетки представлены неоднородной интенсивностью цвета, при увеличении порога  $T$  типичные размеры изолированных объектов, представляющих отдельные клетки, уменьшаются из-за удаления не-

которых пикселей с меньшей интенсивностью. По этой причине важно сохранить правильный баланс между выбранным порогом  $T$  и диапазоном размеров отдельных клеток между  $s_{\min}$  и  $s_{\max}$ .

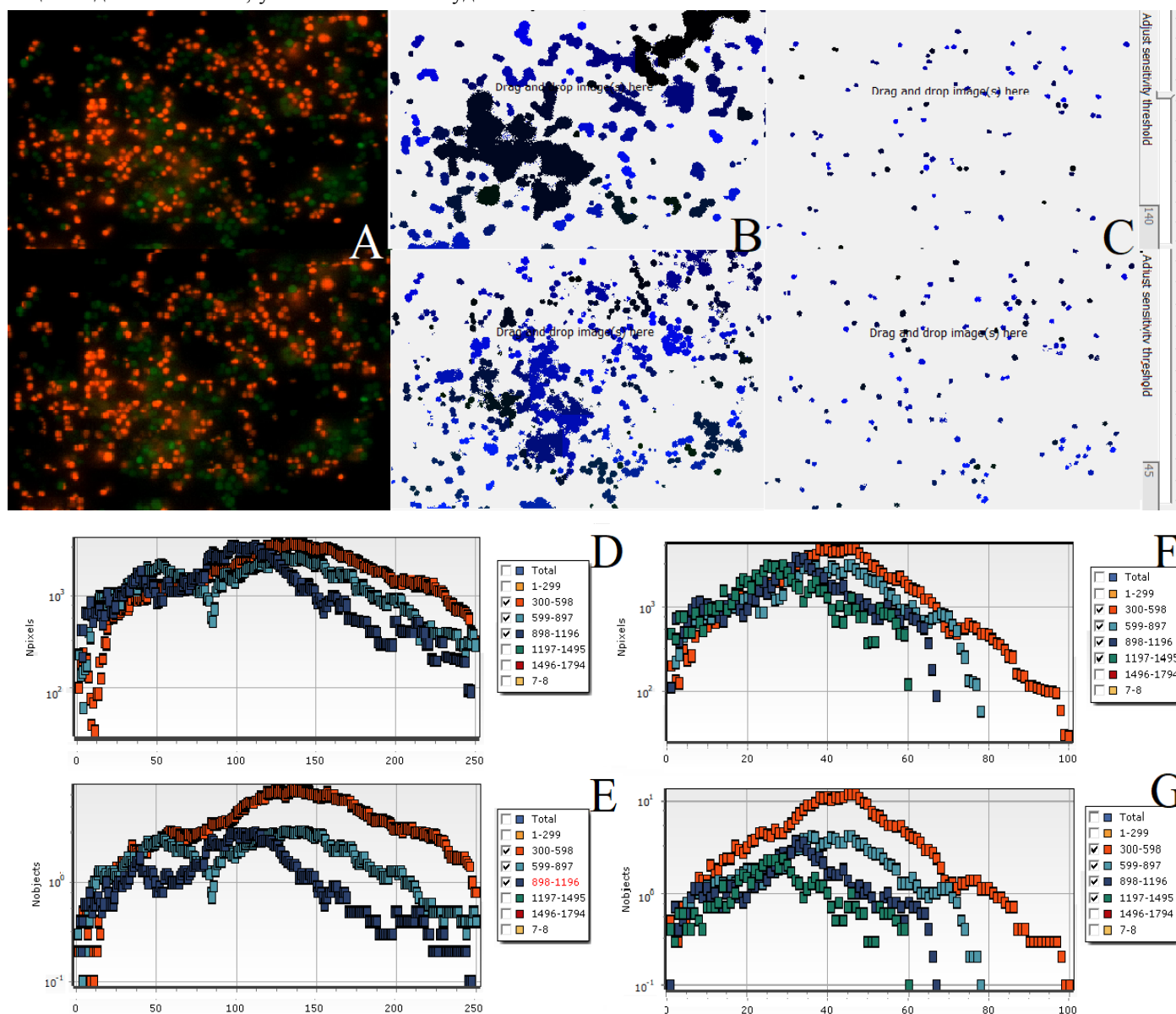


Рис. 1. Пример установки и корректировки баланса порога и размера отдельных бактериальных клеток для микроизображения с существенным дисбалансом уровней красного и зеленого каналов

### III. АЛГОРИТМ СЕЛЕКЦИИ ОБЪЕКТОВ НА ИЗОБРАЖЕНИИ

Мы предлагаем объективный критерий сохранения баланса порогового значения и размера отдельных клеток на основе анализа гистограмм размеров изолированных объектов, который реализован в программном инструменте и подтвержден многопороговым анализом.

Типичные размеры отдельных клеток изменяются для разных пороговых значений, и, следовательно, выбор этих параметров должен быть сбалансирован. Поэтому в общем

случае для каждого выбранного диапазона размеров отдельных клеток существует оптимальное пороговое значение и наоборот.

Умеренное пороговое расхождение влияет на общую статистику незначительно, особенно при усреднении по большим сериям изображений. Тем не менее, в некоторых случаях требуется регулировка порога, либо для преодоления значительного расхождения между различными цветовыми каналами, либо для сравнения между сериями изоб-

ражений, полученных при отличающихся условиях окрашивания и визуализации, которые неизбежны [6].

Для решения задачи селекции используется процедура адаптивного регулирования порога, которая позволяет легко выбирать пороговое значение для конкретных размеров. Эта процедура основана на многопороговой обработке, анализе и вычислении эмпирических гистограмм изолиро-

ванных объектов для каждого испытанного порогового значения [2, 3]. По пикам гистограмм определяется оптимальный порог, после установления которого можно наилучшим образом селектировать одиночные объекты, и определить их положение, размеры и площадь. Число объектов в конгломератах можно приблизительно вычислить, разделив площадь конгломерата на среднюю площадь одиночного объекта.

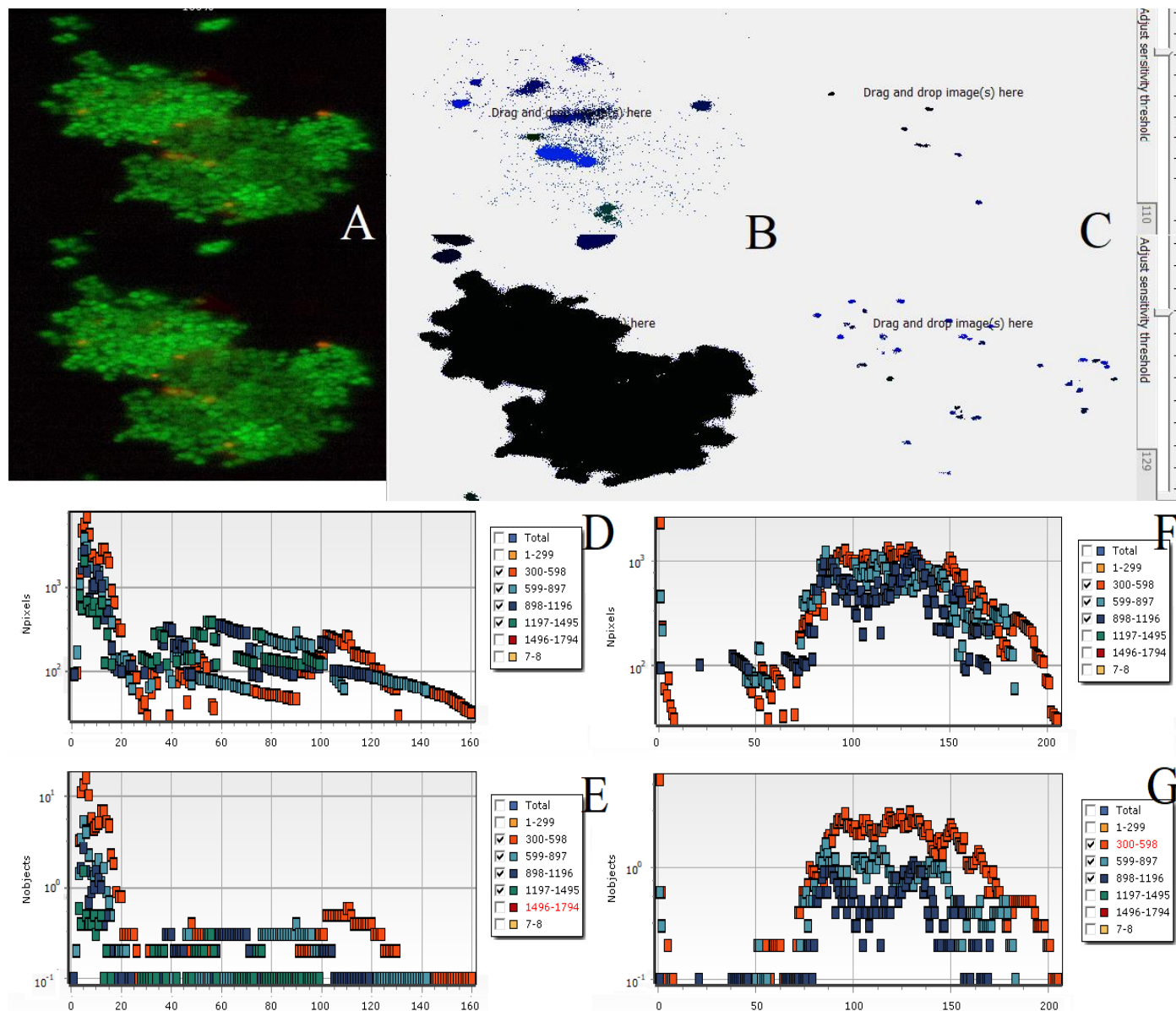


Рис. 2. Пример установки и корректировки баланса порога и размера отдельных бактериальных клеток для типичного микроизображения биопленки, представляющей собой конгломерат клеток, адгезированных между собой и к поверхности

#### IV. ОПИСАНИЕ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

Предложенный алгоритм реализован в виде программного средства *BioFilmAnalyzer*, ориентированного на решение задачи подсчета любых флуоресцентно окрашенных клеток из двумерных фотографий, представленных либо в виде одиночных изображений, либо в виде серии изображений, полученных в аналогичных условиях. Этот соб-

ственный алгоритм реализован на языке программирования C++ и совместим с Windows 32bit архитектуры (версии 2000 / XP и выше) [13].

## V. УСТАНОВКА И КОРРЕКТИРОВКА ПОРОГОВОГО УРОВНЯ И РАЗМЕРА ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК И РЕЗУЛЬТАТЫ СЕЛЕКЦИИ

Установка и корректировка порога и баланса отдельных бактериальных клеток для двух различных примеров микроизображений проиллюстрирована на рис. 1 и 2. На панели А приведены исходные необработанные изображения, на панели В – изолированные объекты, возникающие при превышении порога (сверху красный, снизу зеленый канал), цветом кодируется номер объекта; С – изолированные однородные объекты, лежащие в выбранном диапазоне размеров от  $s_{\min}$  до  $s_{\max}$  для выбранного порога  $T$  (справа показаны значения порога, при которых проводилась обработка); D, F – верхняя (оранжевая) кривая показывает количество пикселей, приходящихся на изолированные объекты размером от  $s_{\min}$  до  $s_{\max}$  в зависимости от значения порога, где на ее пик приходится оптимальное значение порога, при котором наблюдается наибольшее число изолированных объектов для красного (D) и зеленого (F) каналов, соответственно; E, G – аналогично D, F, но для числа объектов размером от  $s_{\min}$  до  $s_{\max}$ .

По результатам анализа рис. 1 и 2 можно отметить, что гистограммы имеют похожие формы, что указывает на то, что их отношение относительно стабильно, и это еще раз подтверждает надежность предлагаемого алгоритма для умеренного порогового расхождения. Более того, для серии изображений достаточно, чтобы это условие выполнялось для всех проанализированных изображений в среднем. Полученные количественные результаты также показывают, что подавляющее большинство изолированных объектов представляют собой небольшие объекты. В отличие от гистограммы для малых объектов, гистограммы больших объектов демонстрируют характерные максимумы, наиболее выраженные в оранжевой кривой для объектов размером от 300 до 600 пикселей. Предполагая, что наиболее распространенные объекты одинакового размера на изображении, кроме небольших шумовых всплесков, являются одиночными клетками, мы можем выбрать оптимизированный порог из максимума гистограммы, который составляет около  $T = 140$  для красного канала. Для больших размеров голубая гистограмма разделяется на две характеристики с локальными максимумами около  $T = 50$  и  $140$  соответственно. Это показывает сильную неоднородность объектов, принадлежащих этому размеру, которые нетипичны для одиночных клеток, что указывает на то, что они являются вероятными клеточными кластерами. Для больших размеров гистограммы подсчетов объектов значительно ниже оранжевой кривой, что указывает на то, что объекты этих размеров менее распространены, чем типичные отдельные клетки, и значительно колеблются из-за отсутствия статистики.

По итогам анализа устанавливается порог  $T = 140$  и диапазон размеров клеток 301 ... 600, в результате получают изображения одиночных клеток, показанные на панели С. После этого аналогичная процедура повторяется для зеленого канала. Как видно из панелей F и G, в то время как оранжевая кривая снова выше кривых для больших размеров, из-за значительно меньшей интенсивности зеле-

ного канала, оптимальные пороговые значения теперь составляют около  $T = 45$ . После соответствующей пороговой настройки, мы получаем типичные примеры одиночных клеток, изображенных на рис. С.

Предлагаемый подход позволяет эффективно обрабатывать изображения со значительным цветовым дисбалансом, а также выделять отдельные клетки на фоне конгломератов клеток, составляющих биопленки. Поскольку весь дальнейший анализ основан на анализе эффективного количества клеток, которое определяется независимо для каждого цветного канала с его собственными оптимизированными пороговыми значениями и значениями размера одной клетки, неоднородность свойств изображений в разных каналах также не вызывает затруднений.

## VI. ВЫВОДЫ

В работе предложен алгоритм селекции объектов на изображении, описана его программная реализация.

Приведены результаты селекции клеток при анализе микроизображений бактериальных клеток на примерах с существенным дисбалансом уровней красного и зеленого каналов, а также биопленки, представляющей собой конгломерат клеток, адгезированных к поверхности.

Многопороговый алгоритм, реализованный в программном инструменте *BioFilmAnalyzer*, основан на нормировании площади окрашенного изображения, превышающего заданный порог, к среднему эффективному размеру одиночной клетки, что позволяет анализировать биопленки, составляющие конгломераты клеток. Предложен объективный критерий, обеспечивающий баланс между выбором значения порога и размера одиночных клеток, что дает приемлемые результаты также при анализе адгезированных клеток. Предложенный подход не требует предварительной обработки изображений, т.к. эффективно работает в условиях дисбаланса цветовых каналов.

Таким образом, предложенный алгоритм и программное обеспечение направлены на минимизацию времени анализа, и усилий, затрачиваемых на количественное определение популяции клеток по данным флуоресцентной микроскопии, востребованное в биомедицинских, биотехнологических и фармакологических исследованиях, в особенности для анализа биопленок, для которых эффективность альтернативных методов, основанных на ручном подсчете клеток или проточной цитометрии, сильно ограничена.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Lempitsky V, Rother C, Roth S, Blake A. Fusion Moves for Markov Random Field Optimization // IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence. 2010. Vol. 32(8). P. 1392–405.
- [2] Volkov V.Yu. Extraction of extended small-scale objects in digital images. // Int. Arch. Photogramm. Remote Sens. Spatial Inf. Sci. 2015. Vol. XL-5/ W6. P. 87–93.
- [3] Волков В.Ю. Адаптивное выделение мелких объектов на цифровых изображениях // Изв. вузов России. Радиоэлектроника. 2017. № 1. С. 17–28.
- [4] Klinger-Strobel M, Suesse H, Fischer D, Pletz M.W., Makarewicz O. A Novel Computerized Cell Count Algorithm for Biofilm Analysis. PLoS One. 2016. Vol. 11(5). P. e0154937.

- [5] Markelov O.A. et al. Two-step algorithm for the automated analysis of fluorescent microscopy data in biomedical applications //Control in Technical Systems (CTS), 2017 IEEE II International Conference on. IEEE, 2017. P. 118–121.
- [6] Bogachev M.I., Volkov V.Yu., Markelov O. A. et al. Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images. PLoS One. Vol. 13(3). P. e0192022.
- [7] Kayumov A.R. et al. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones // The Journal of antibiotics. 2015. Vol. 68. №. 5. P. 297.
- [8] Kayumov A.R. et al. New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm-embedded staphylococcus cells // BioMed research international. 2015. Vol. 2015. P. 890968.
- [9] Trizna E.Y. et al. Thio derivatives of 2 (5H)-furanone as inhibitors against *Bacillus subtilis* biofilms //Acta Naturae. 2015. Vol. 7. №. 2 (25).
- [10] Trizna E.Y. et al. 2 (5H)-Furanone derivatives as inhibitors of staphylococcal biofilms // BioNanoScience. 2016. Vol. 6. №. 4. P. 423-426.
- [11] Baidamshina D.R. et al. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease //Scientific reports. 2017. Vol. 7. P. 46068.
- [12] Sharafutdinov I.S. et al. Antimicrobial Effects of Sulfonyl Derivative of 2 (5H)-Furanone against Planktonic and Biofilm Associated Methicillin-Resistant and-Susceptible *Staphylococcus aureus* // Frontiers in microbiology. 2017. Vol. 8. P. 2246.
- [13] <http://kpfu.ru/rus/strau/laboratories/molecular-genetics-of-microorganisms-lab/software/biofilmanalyzer-v10>