

Вычисление коэффициентов анизотропии и симметричности направленности нервов роговицы на основе автоматизированного распознавания цифровых конфокальных изображений*

Аннотация

Описана разработка нового принципа морфометрического описания нервов роговицы, который может быть использован в диагностике ряда системных нейропатий, а также как критерий локального состояния иннервации роговицы. Новый принцип удовлетворяет условиям: объективности, отсутствию зависимости от способа получения конфокального изображения нервной сети, толерантности к условиям локального освещения и прозрачности сред, а также минимальной зависимости от выбора точки получения конфокального изображения в пределах роговицы. Все измерения полностью автоматизированы. На их основе создано программное обеспечение Linc 1.1. Проведен анализ снимков, полученных при съемке аппаратами «Confoscan 4» (фирма «Nidec») и HRT III со специальным роговичным модулем, доказавший работоспособность методики. При этом определено, что несмотря на статистическую схожесть получаемых результатов и принципиальную возможность использовать для анализа изображения «Confoscan 4», HRT III обеспечивает лучшую разрешающую способность и большую полноту анализа.

Введение

Впервые идея конфокальной микроскопии была разработана в 1955 году аспирантом Гарвардского университета Марвином Мински (*Marvin Minsky*), впоследствии профессором Массачусетского технологического института, работающим в области физиологии нервной деятельности и искусственного интеллекта [1]-[3].

Относительно недавно метод конфокальной микроскопии стал использоваться в офтальмологической практике для анализа состояния структур глаза, в частности для детального изучения всех слоев роговицы с возможностью визуализации роговичных нервов [4]-[8].

Ученый из Австралии Натаном Эфроном (*Nathan Efron*) было выдвинуто предположение о возможности применения конфокального микроскопа для оценки состояния нервных волокон роговицы (НВР) у пациентов с сахарным диабетом (СД). Многолетний опыт использования конфокальной микроскопии в Медицинской школе Университета Манчестера доктором Малик (*R.A. Malik*) доказал, что данную методику можно использовать в качестве ранней диагностики изменений в НВР, появляющихся при развитии диабетической полинейропатии (ДПН) [7].

Существующие на сегодняшний день методы проведения конфокальной микроскопии роговицы с подсчетом НВР имеют ряд недостатков. Невозможность точного позиционирования при наблюдении определяет низкую воспроизводимость результатов, а большая глубина фокуса любой из применяемых конфокальных оптических систем в условиях многослойной нервной сети создает неопределенность при оценке плотности НВР и накоплении данных по их морфометрическим описаниям. При этом общая длина напрямую зависит от коэффициента извитости, что вносит дополнительные искажения. В последних версиях программного обеспечения (с 2014 года) этот недостаток частично был учтен в расчетах путем нормирования общей длины нервов роговицы к общему коэффициенту извитости [9]. Тем не менее подход к интерпретации снимков не изменился: требовалась ручная трассировка НВР, опиравшаяся на субъективное восприятие исследователя.

Цель: разработка нового принципа морфометрического описания нервов роговицы, численных показателей, характеризующих направленность НВР, и создание программного обеспечения, позволяющего объективно оценивать эти показатели при анализе конфокальных изображений любого типа.

Материал и методы

В качестве модели, позволяющей проиллюстрировать работоспособность нового принципа, были предложены две заведомо контрастные (по состоянию нервов роговицы) клини-

ческие группы: 20 клинически здоровых лиц (20 глаз, OD) и 19 лиц (19 глаз, OD) со стажем верифицированной системной нейропатии длительностью более 7 лет, развившейся на фоне сахарного диабета II типа. Системная нейропатия диабетического происхождения была диагностирована на основе электронейромиографического исследования, проведенного до включения пациентов в исследование. Все лица, вошедшие в исследование, – мужчины в возрасте от 47 до 57 лет.

Объектом для морфометрического анализа послужили изображения передних слоев эпителия роговицы и боуменовской мембраны, полученные прижизненно при помощи двух вариаций конфокальной биомикроскопии: оптической проекционной техники («Confoscan 4», фирма «Nidec») и лазерной растровой когерентной техники (ретиальный томограф HRT III с модулем «Rostock»).

Метод объективного описания направленности НВР и алгоритм вычисления коэффициента анизотропии направленности (K_{Δ}) и коэффициента симметричности направленности НВР (K_{sym})

В основе анализа лежит двухэтапная обработка изображения. На первом этапе для каждой точки (x, y) конфокального изображения определяется вероятность $P(x, y)$ наличия нервного волокна и угол $\alpha(x, y)$ его расположения. На втором этапе по всем точкам изображения суммируются вероятности для определения характеристик направленности нервов – анизотропии и симметричности.

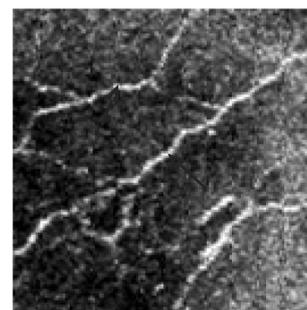


Рис. 1. Нервные волокна на конфокальном снимке

Для автоматизации распознавания НВР было сделано следующее допущение: нервное волокно на конфокальном изображении представляет собой относительно более светлую полосу определенной ширины на более темном фоне (рис. 1). Это позволяет для каждой точки (x, y) конфокального снимка определить вероятность присутствия нервного волокна. Для этого небольшая квадратная область $B(x, y)$ изображения вокруг этой точки сравнивается с модельной функцией (рис. 2). Модельная функция M представляет собой квадрат, через се-

* Рис. 3-8 размещены на третьей полосе обложки журнала.

рдину которого проходит белая линия, что соответствует изображению отрезка нервного волокна. Размер модельной функции в пикселах соответствует размеру области $B(x, y)$. Если область $B(x, y)$ похожа на модельную функцию M , то с высокой вероятностью в точке (x, y) присутствует нервное волокно.

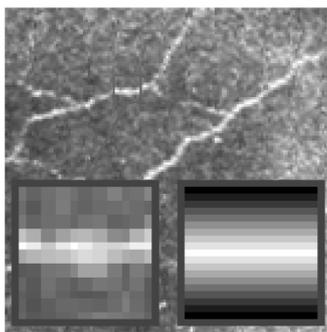


Рис. 2. Сравнение области $B(x, y)$ и модельной функции M

При этом нервное волокно, проходящее через точку (x, y) , может быть расположено под любым углом, поэтому область $B(x, y)$ нужно сравнить с серией модельных изображений, каждое из которых повернуто на некоторый угол α относительно исходного (рис. 3).

Проиллюстрированный выше принцип может быть описан математически и использован как универсальный аппаратно-независимый алгоритм распознавания образов в части решения задачи распознавания нервов роговицы.

Конфокальное изображение является двумерным массивом значений яркости пикселей. В числовом выражении нервное волокно на участке снимка, соизмеримом с шириной нерва, является системой линейных максимумов. Модельная функция $M(\alpha)$ является двумерным массивом $(A \times B)$, значения которого равны 1 при $y = B/2$ и линейно уменьшаются до 0 при $y \rightarrow 0$ и $y \rightarrow B$.

Для объективного сравнения области $B(x, y)$ и модельной функции M был использован коэффициент корреляции R :

$$R[B(x, y, \alpha); M(a)] = \frac{\sum (B_{x_i, y_i, \alpha} - \bar{B})(M_{x_i, y_i, \alpha} - \bar{M})}{\sqrt{\sum (B_{x_i, y_i, \alpha} - \bar{B})^2 \sum (M_{x_i, y_i, \alpha} - \bar{M})^2}}, \quad (1)$$

где \bar{B} – среднее значение яркости изображения в пределах области $B(x, y)$; \bar{M} – среднее значение модельной функции; $B_{x_i, y_i, \alpha}$ – значение яркости изображения в определенной точке в пределах области $B(x, y)$, соответствующей углу α ; $M_{x_i, y_i, \alpha}$ – значение модельной функции для угла α в точке, аналогичной $B_{x_i, y_i, \alpha}$.

Коэффициент корреляции $R[B(x, y, \alpha); M(a)]$ может принимать значения от -1 до 1 . Чем более похожи два изображения, тем большее значение принимает коэффициент корреляции. После сравнения области $B(x, y)$ с серией модельных функций мы получаем набор различных коэффициентов корреляции, соответствующих различным углам α . Отрицательные значения коэффициента корреляции отбрасываются. Угол $\alpha(x, y)$, при котором коэффициент корреляции максимальный, является наиболее вероятным углом расположения нерва в данной точке изображения, а значение этой вероятности равно квадрату коэффициента корреляции:

$$P(x, y) = \max[R(x, y, \alpha)]^2. \quad (2)$$

Возведение в квадрат коэффициента корреляции позволяет усилить влияние точек, где велика вероятность присутствия нервного волокна, а также ослабить результаты ложного распознавания паттерна шумов.

Реализованный в программе Liner 1.1 шаг поворота модельной функции составляет 1° , что позволяет без потери данных проводить анализ с применением окна модельной функции размером до 80×80 пикселей.

* Авторы предполагают, что некоторые артефакты все-таки являются распознанными нервными волокнами, признаки которых объективно присутствуют на изображении, но не воспринимаются исследователем.

В результате работы программы на первом этапе для каждой точки изображения определяются вероятность присутствия нервного волокна $P(x, y)$ и угол его расположения $\alpha(x, y)$.

Далее суммируются все вероятности $P(x, y)$ для тех точек, где нервное волокно расположено под одинаковым углом $\alpha(x, y)$:

$$L_\alpha = \sum P(x, y, \alpha). \quad (3)$$

В результате мы получаем сумму вероятностей L_α для каждого угла α . Эту информацию можно наглядно представить в виде розы-диаграммы (рис. 4). Из центра диаграммы под разными углами расходятся лучи. Длина каждого луча равна суммарной вероятности L_α для угла α . В процессе работы программы значения L_α определяются для углов от 0 до 180° , однако для удобства восприятия направленности углы от 180 до 360° также представлены на диаграмме.

Если на конфокальном изображении нервные волокна расположены в основном под одинаковым углом, то на розе-диаграмме лучи, отражающие это направление, будут существенно длиннее остальных. Это делает диаграмму вытянутой и характеризующей высокую анизотропию направленности, что легко выразить коэффициентом анизотропии $K_{\Delta L}$. Он может быть вычислен как отношение самого длинного луча на розе-диаграмме к самому короткому (рис. 5):

$$K_{\Delta L} = L_{\max} / L_{\min}. \quad (4)$$

Таким образом, коэффициент анизотропии направленности нервов $K_{\Delta L}$ в числовом виде описывает наличие общего (генерального) направления нервов на конфокальном снимке. Если же таких направлений два или более, то форма диаграммы искажается и становится несимметричной относительно генерального направления. Степень искажения можно выразить как отношение площадей диаграммы от направления самого длинного луча α_{\max} по часовой и против часовой стрелки (рис. 6). Нами был введен коэффициент симметричности направленности нервов K_{sym} как отношение большей из площадей S_c и S_u к меньшей:

$$K_{sym} = \frac{\max(S_c, S_u)}{\min(S_c, S_u)}, \quad (5)$$

где

$$S_c = \sum_{\alpha=\alpha_{\max}}^{\alpha_{\max}+90^\circ} L_\alpha$$

– площадь сектора диаграммы от направления максимального удлинения на 90° по часовой стрелке;

$$S_u = \sum_{\alpha=\alpha_{\max}-90^\circ}^{\alpha_{\max}} L_\alpha$$

– то же, но против часовой стрелки; α_{\max} – направление максимального удлинения.

Очевидно, что коэффициенты анизотропии и симметричности направленности нервов – величины безразмерные, не зависящие от физической площади кадра и разрешения анализируемого изображения.

Результаты и обсуждение

На всех изображениях удалось автоматически распознать нервы. При анализе 20 конфокальных изображений, полученных с использованием роговичного модуля к HRT III, длина невыявленных участков нервов (но распознанных экспертом) не превысила 6% , а количество ложно-распознанных артефактов колебалось около 15% * (рис. 7).

При анализе 20 конфокальных изображений, полученных на «Confoscan 4», программе не удавалось автоматически распознать около 7% нервов на каждом снимке, а количество ложно-распознанных артефактов доходило до 22% .

Интегральные розы-диаграммы направленности нервов, построенные для произвольной пары изображений из двух клинических групп, демонстрируют заметное различие в сте-

пени изометричности (рис. 8). В группе пациентов с диабетической нейропатией значение коэффициента $K_{\Delta L}$ составило $2,33 \pm 0,92$. Нервные волокна условно здоровых лиц продемонстрировали существенно большую анизотропию направленности $K_{\Delta L} = 3,71 \pm 1,40$, что достоверно отличается (по Стьюденту, $R^2 = 0,84$; $p < 0,05$) от патологических значений. Значение коэффициента K_{sym} составило $0,82 \pm 0,12$ для группы пациентов с СД и $0,9 \pm 0,15$ для группы здоровых добровольцев ($R^2 = 0,74$; $p = 0,005$).

Предлагаемый для распознавания конфокальных изображений принцип вероятностного картирования прохождения нервов, в отличие от существующих «ручных» (субъективных) методов трассировки нервных волокон, дает возможность объективного выявления в конкретной точке изображения отрезка нерва заданной длины и заданного направления. При этом с одинаковой вероятностью может быть распознано нервное волокно в различных ситуациях: при нормальной экспозиции, недоэкспонированное, «пересвеченное», наблюдаемое через рассеивающие среды, в диапазоне глубины фокуса оптической системы и ввне его.

В исследовании мы не стали опираться на многочисленные алгоритмы собственно «трассировки» линейных биологических объектов [10]. Общее представление о направленности нервов в пределах оцениваемого изображения было получено с использованием упрощенного оригинального алгоритма и программного обеспечения на его основе.

Выводы

1. Доказано, что морфометрическое описание нервов роговицы может быть дополнено объективной характеристикой их статической извитости – коэффициентами анизотропии и симметричности направленности.

2. Для вычисления коэффициентов анизотропии и симметричности направленности нервов роговицы предложен метод автоматизированного распознавания нервных волокон на конфокальных цифровых изображениях роговицы и создано опытное программное обеспечение на его основе.

3. Доказана работоспособность предлагаемого метода автоматизированного вычисления коэффициентов анизотропии и симметричности направленности нервов роговицы на контрастных клинических группах.

4. Предлагаемая морфометрическая оценка может быть рекомендована производителям биомикроскопов различных типов для реализации в программном обеспечении.

Список литературы:

1. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии. – СПб.: ИНЦ РАН, 2007. С. 6-10.

2. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope // Scanning. 1998. Vol. 10. PP. 128-138.
3. Tavakoli M., Hossain P., Malik R. Clinical applications of corneal confocal microscopy // Clinical Ophth. 2008. № 2. PP. 435-445.
4. Аветисов С.Э., Егорова Г.Б., Федоров А.А. и др. Конфокальная микроскопия роговицы. Сообщение 1. Особенности нормальной морфологической картины // Вестник офтальмологии. 2008. № 3. С. 3-5.
5. Ткаченко Н.В., Астахов Ю.С. Диагностические возможности конфокальной микроскопии при исследовании поверхностных структур глазного яблока // Офтальмологические ведомости. 2009. Т. 2. № 1. С. 82-89.
6. Jalbert I., Stapleton F., Papas E. et al. In vivo confocal microscopy of human cornea // Br. J. Ophthalm. 2003. Vol. 87. № 2. PP. 225-236.
7. Malik R., Kallinikos P., Abbott C. et al. Corneal confocal microscopy: A noninvasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients // Diabetologia. 2003. Vol. 46. PP. 683-688.
8. Oliveira-Soto L., Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy // Cornea. 2010. № 20. PP. 374-384.
9. Edwards K., Pritchard N., Vagenas D., Russell A., Malik R.A., Efron N. Standardizing corneal nerve fibre length for nerve tortuosity increases its association with measures of diabetic neuropathy // Diabetic Medicine. 2014. Vol. 31. № 10. PP. 1205-1209.
10. Ильясова Н.Ю. Методы цифрового анализа сосудистой системы человека. Обзор литературы // Компьютерная оптика. 2013. Т. 37. № 4. С. 511-535.

Сергей Эдуардович Аветисов,
академик РАН, профессор,
директор ФГБНУ «НИИГБ»,
зав. кафедрой глазных болезней,
ПМГМУ им. И.М. Сеченова,
Иван Александрович Новиков,
ст. научный сотрудник,
Сергей Сергеевич Махотин,
ведущий программист,
ФГБНУ «НИИГБ»,
Зоя Васильевна Сурнина,
аспирант,
ФГБНУ «НИИГБ»,
ст. врач-лаборант кафедры глазных болезней,
ПМГМУ им. И.М. Сеченова,
г. Москва,
e-mail: s.avetisov@niigb.ru

С.А. Останин, А.М. Шайдук

Прибор для неинвазивного измерения частоты следования потенциалов действия отдельных двигательных единиц

Аннотация

Описан прибор для неинвазивного измерения частоты следования потенциалов действия отдельных двигательных единиц мышц. Прибор построен с использованием виртуальных приборов LabVIEW. Изложены математические основы метода измерения и результаты измерения.

Введение

Сокращение мышц сопровождается электрической активностью клеток мышечных волокон (двигательных единиц). Двигательные единицы, иннервируемые одним мотонейроном, генерируют квазипериодические электрические импульсы потенциалов действия отдельных двигательных единиц (single-

motor-unit action potential, SMUAP) [1], [2]. Последовательность электрических импульсов регистрируют инвазивно, с помощью введенных в мышцу игольчатых электродов. Частота следования импульсов определяется величиной усилия мышцы, совершающей механическую работу. Среднее значение частоты следования является важной характеристикой состояния нервной и мышечной систем [3].