

ПРЕПАРИРОВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ КОСТНОГО РЕГЕНЕРАТА ПРИ НАСТРОЙКЕ СКАНИРУЮЩИХ ЭЛЕКТРОННЫХ МИКРОСКОПОВ

С. И. Геращенко, С. М. Геращенко, С. Ю. Костенков,
Н. Н. Янкина, В. В. Карнаухов

В настоящее время актуальны исследования, способные повысить уровень биосовместимости имплантатов и протезов. Одним из наиболее эффективных методов решения этой проблемы является создание развитой поверхности. Особого внимания заслуживают технологии формирования развитой поверхности в виде микро- и макроаверн с отрицательными углами [1–3] и технологии электростимуляции [4], которые позволяют существенно увеличить допустимую нагрузку на имплант и протез, ускорить образование сети коллагеновых волокон и появление минеральных отложений на их поверхности (рис. 1).

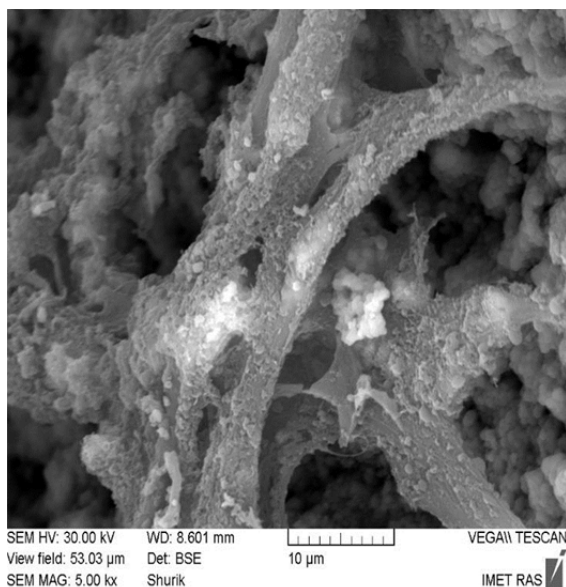


Рис. 1. Минеральные отложения на поверхности клеточных филаментов

Для объективной оценки процесса формирования костного регенерата необходимо производить оценку качественных характеристик процесса формирования костного регенерата. Для этих целей целесообразно использовать электронную микроскопию.

Представление информации с помощью электронной микроскопии в значительной степени зависит от настроек разрешающей способности. В этой связи для наблюдения за процессом формирования костного регенерата необходимы одинаковые условия для различных условий получения экспозиции. Для прецизионной настройки используются тестовые пластины (рис. 2).

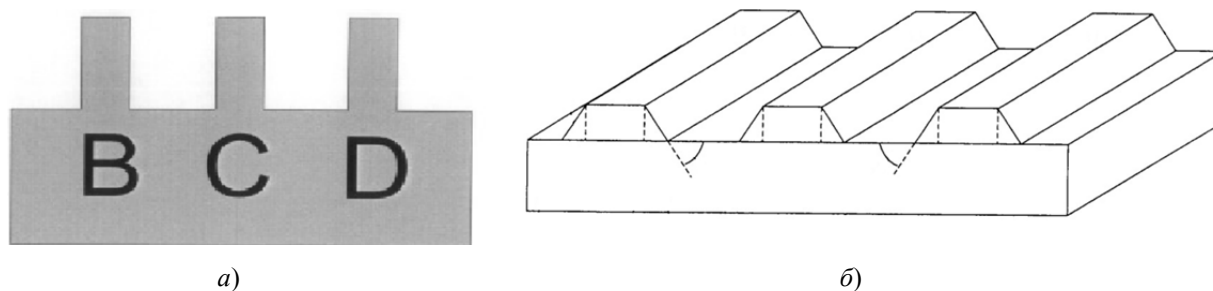


Рис. 2. Тестовые пластины для просвечивающих (а) и сканирующих (б) электронных микроскопов

Необходимыми этапами настройки и юстировки являются фокусировка и компенсации астигматизма. Эти процедуры выполняются поочередно до получения максимально четкого изображения.

Существующие тестовые пластины не в полной мере перекрывают весь диапазон возможных значений физических характеристик исследуемых объектов. Для того, чтобы восполнить пробел отсутствия тестовых систем, можно использовать электронные тесты, которые занимают промежуточную позицию. Вместо тестовых элементов используются тестовые изображения (рис. 3).

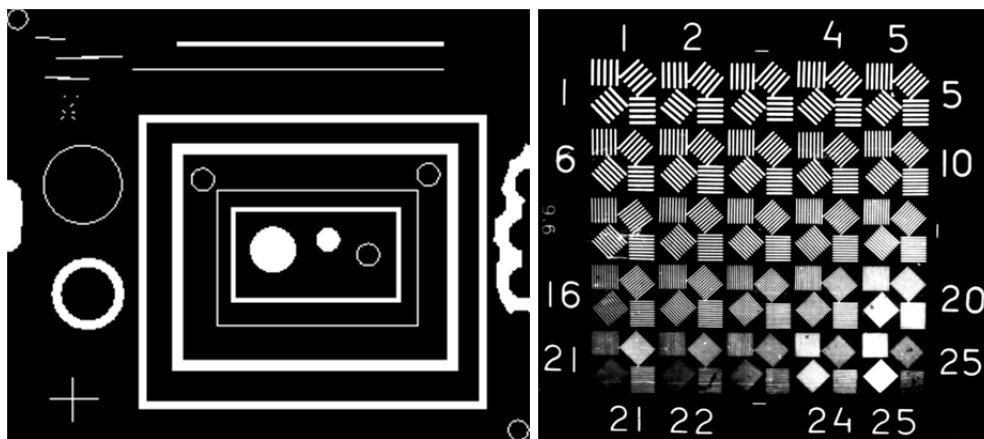


Рис. 3. Тестовые изображения калибровки сканирующих микроскопов

Яркость и контрастность являются важными параметрами изображения. При настройке этих параметров необходимо руководствоваться принципом максимальной информативности изображения. Избыточная контрастность и недостаточная яркость приводят к появлению на изображении черных и белых областей, детали которых становятся неразличимыми. Недостаточная контрастность и избыточная яркость приводят к уменьшению контраста, объекты сливаются друг с другом.

Помимо описанных способов юстировки сканирующих микроскопов и характеристик объектов и изображений, на которые делается акцент при проведении калибровочных работ, предлагается использовать препарирование получаемых изображений и выделение исследуемых объектов. Это позволит определить однотипные настройки сканирующего прибора при разных уровнях разрешающей способности и исключить их влияние на качество представления данных при контроле процесса формирования костного регенерата.

Процесс препарирования изображений состоит из минимизации визуальной информации и сегментирования сложных многосвязных плоских образов изображений.

Минимизация исходной информации может быть аппаратной или алгоритмической, но такое разделение минимизации условно. Устройства, осуществляющие аппаратную и алгоритмическую минимизацию, могут быть построены по различным принципам.

Устройство, реализующее аппаратный способ минимизации, работает по принципу сравнения яркости точек изображения с уровнем сигнала от фона изображения. При этом устройство позволяет осуществлять представление информации в адресном и безадресном режимах.

При адресном режиме ввода i -й элемент дискретизации изображения объекта представляется как точка с координатами x_i, y_i, B_i ; при безадресном режиме ввода i -му элементу дискретизации присваивается только код яркости B_i (формирование координат точек изображения при этом ведется программным путем). Для экономии объема памяти в системе считывания и ввода информации в машину целесообразно иметь оба режима работы.

Алгоритмическая минимизация изображения реализуется программным способом. При этом исключаются все внутренние точки односвязных контуров, составляющих изображение объекта. В результате остаются только точки (в данном случае пара контурных точек для каждого элемента дискретизации), которые относятся к контурным линиям.

Пусть в качестве исходной информации имеется пиктурное изображение, представляющее собой многосвязный контур, состоящий из четырех односвязных геометрических контуров. Поле

наблюдения условно разбито на строки и столбцы. На пересечении j -й строки и i -го столбца находится элемент дискретизации с яркостью B_{ij} . Чтобы определить, принадлежит он к контурной линии или нет, проводится сравнение его яркости с яркостями смежных элементов дискретного раstra. Условием принадлежности элемента раstra к контурной линии является выполнение следующего неравенства [5]:

$$G = |B_{i-1j} - B_{ij}| + |B_{ij-1} - B_{ij}| + |B_{ij+1} - B_{ij}| + |B_{i+1j} - B_{ij}| > 0 \quad (1)$$

при $B_{ij} \neq B_{\phi}$, где B_{ϕ} – код яркости фонового элемента. Если $G = 0$, то это означает, что элемент B_{ij} не лежит на границе односвязной области.

Для удобства последующей работы алгоритма распознавания часто, как это сделано в рассматриваемом случае, каждой точке внутренней контурной линии ставятся в соответствие две смежные по строке точки со своими яркостями. Координаты этих точек могут отличаться друг от друга на один элемент дискретизации раstra. Результатом работы этого алгоритма минимизации являются массивы точек контурных линий.

Следующим этапом обработки информации является также препарирование многосвязного контура на односвязные. В качестве исходной информации здесь предполагается массив контурных точек, полученных при минимизации информации. Наиболее простыми и эффективными при реализации сегментирования сложных изображений являются принципы формирования односвязных контуров, основанные на сравнении по ряду критериев элементов дискретизации, описывающих исходную многосвязную геометрическую систему.

Пусть имеется исходный массив контурных точек – поле поиска. При формировании любого односвязного контура можно выделить ячейку TH для записи начального элемента выделяемого контура и ячейку T для записи текущей опорной точки, по отношению к которой в поле поиска имеется ближайшая точка, принадлежащая этому контуру. В дальнейшем обозначения TH и T будут соответствовать начальной и текущей опорным точкам анализируемых контуров.

Процесс формирования односвязного контура состоит из трех этапов [2].

Этап 1. Выбор опорной точки T .

Этап 2. Нахождение точки в поле поиска, ближайшей к опорной.

Этап 3. Пересылка найденного в поле поиска элемента контура в массив точек формируемого односвязного контура.

Сначала из массива поля поиска выбирается произвольная точка, которая становится опорной. Условиями выбора ближайшей точки по отношению к опорной являются следующие:

а) точки должны иметь одинаковую яркость:

$$B_T = B_k, \quad (2)$$

где B_T и B_k – яркости соответственно опорной точки T и выбранной из массива поля поиска точки k ;

б) точки должны располагаться близко друг к другу. Это условие проверяется по неравенству [2]

$$(x_T - x_k)^2 + (y_T - y_k)^2 \leq 2. \quad (3)$$

Однако этих двух условий не всегда бывает достаточно для правильного выбора точки k , ближайшей к опорной точке. Поэтому для правильного выбора точки k необходимо дополнительное условие, характеризующее направление движения при формировании односвязных контуров. С этой целью вводится понятие элементарного вектора – вектора V_i , соединяющего два элемента дискретизации изображения (точки выделяемых контуров – точки T и k , параметры которых удовлетворяют условиям (2) и (3)) и направленного от точки T к точке k . Всего таких векторов V_i ($i = 1, 2, \dots, 8$) может быть восемь. Проекции этих векторов Vx_i и Vy_i на оси координат сведены в табл. 1.

Один из восьми векторов V_i указывает «направление входа» вектора V_8 в k_{j+1} -й элемент дискретизации и выходит из точки T_j , которая была опорной на предыдущем шаге препарирования. Угол, характеризующий направление этого вектора, отсчитывается от направления аналогичного вектора V_i , имевшего место на предыдущем шаге препарирования.

Таблица 1

Проекция векторов обхода матрицы изображения

Номер вектора V_i	Проекция вектора V_i		Номер вектора V_i	Проекция вектора V_i	
	Vx_i	Vy_i		Vx_i	Vy_i
1	-1	1	5	1	-1
2	0	1	6	0	-1
3	1	1	7	-1	-1
4	1	0	8	-1	0

Если в качестве единицы угла поворота элементарного вектора возьмем угол, равный 45° , то каждому из восьми векторов V_i можно поставить в соответствие некоторое число $u_i = Ent(4\alpha/\pi)$.

Следует учесть, что из всех точек, удовлетворяющих условиям (2) и (3), ближайшей будет считаться та, которой соответствует число

$$u_i = u_{i \min} = \min_{V_i} \left[Ent \left(\frac{4\alpha}{\pi} \right) \right]. \quad (4)$$

Это условие и берется в качестве дополнительного [2]. Исходными данными для его реализации являются две опорные точки T_{j-1} – предыдущего и T_j – текущего шага препарирования контуров и направление вектора V_i (по которому был осуществлен переход в опорную точку текущего шага выделения односвязного контура) в виде проекций Vx_i и Vy_i элементарного вектора на оси координат.

Процесс определения числа u_i состоит в последовательном повороте через 45° вектора V_i и вычислении всякий раз числа u_i при выполнении двух отмеченных ранее условий.

Для реализации поворота элементарного вектора можно воспользоваться на каждом шаге препарирования выражениями, позволяющими найти проекции повернутого вектора V_{i+1} через проекции исходного вектора V_i :

$$Vx_{i+1} = 0,5 (2 - Vx_i Vy_i) (Vy_i + Vx_i), Vy_{i+1} = 0,5 (2 + Vx_i Vy_i) (Vy_i - Vx_i). \quad (5)$$

В табл. 2 приведены восемь преобразований элементарных векторов. На каждом шаге препарирования сравниваются параметры начальной TH и текущей опорной T точек. При совпадении параметров этих точек выделение односвязного контура заканчивается. Затем из массива поля поиска выбирается новая начальная точка, и весь процесс повторяется до тех пор, пока не будет полностью использован исходный массив точек поля поиска.

Таблица 2

Преобразованные элементарные вектора

Положение вектора V_i	Новое положение вектора V_{i+1}	Проекция вектора V_i		Преобразование координаты вектора Vx_{i+1}	Преобразование координаты вектора Vy_{i+1}
		Vx_i	Vy_i		
→	↘	+1	0	$(2-1.0)(0+1):2 = +1$	$(2+1.0)(0-1):2 = -1$
↘	↓	+1	-1	$(2+1)(-1+1):2 = 0$	$(2-1.1)(-1-1):2 = -1$
↓	↙	0	-1	$(2-0.1)(-1+0):2 = -1$	$(2-1.0)(-1-0):2 = -1$
↙	←	-1	-1	$(2-1.1)(-1-1):2 = -1$	$(2+1.1)(-1+1):2 = 0$
←	↖	-1	0	$(2+1.0)(0-1):2 = -1$	$(2-1.0)(0+1):2 = +1$
↖	↑	-1	+1	$(2+1.1)(1-1):2 = 0$	$(2-1.1)(1+1):2 = +1$
↑	↗	0	+1	$(2-1.0)(1+0):2 = +1$	$(2+1.0)(1-0):2 = +1$
↗	→	+1	+1	$(2-1.1)(1+1):2 = +1$	$(2+1.1)(1-1):2 = 0$

Если на очередном j -м шаге поиска новой опорной точки ее не оказывается, то делается шаг «назад», т.е. за опорную принимается точка T_{j-1} предыдущего шага препарирования и т.д. В этом случае формирование односвязного контура заканчивается тогда, когда нужно сделать шаг «назад» за начальную точку TH .

Результат работы алгоритма препарирования – сформированные в памяти массивы точек (x_i, y_i, B_i) односвязных контуров, над которыми в дальнейшем проводится процедура их распознавания («binary gradient mask» рис. 4).

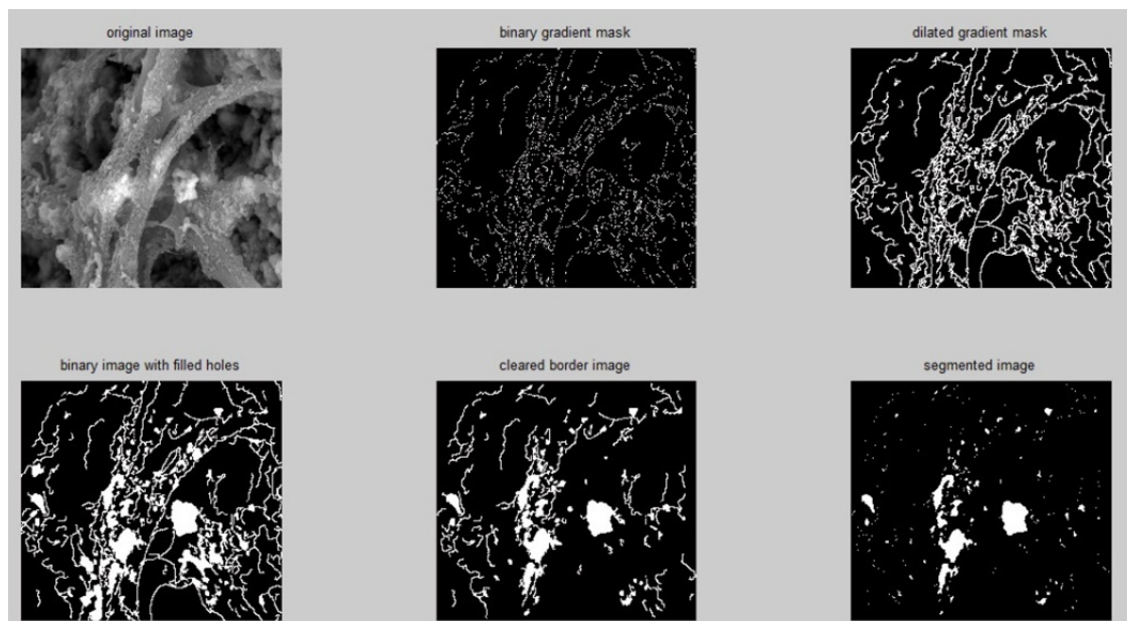


Рис. 4. Препарирование изображения имплантата

На рис. 4 представлен результат работы алгоритма, осуществляющего выделение контуров отдельных объектов многоградационного изображения в *MATLAB*.

Сегментирование изображения позволяет выделить объект исследования. Полученное изображение минеральных отложений на поверхности коллагеновых волокон (рис. 5) подвергается дальнейшей обработке в *Image Processing Toolbox* пакета *MATLAB*.

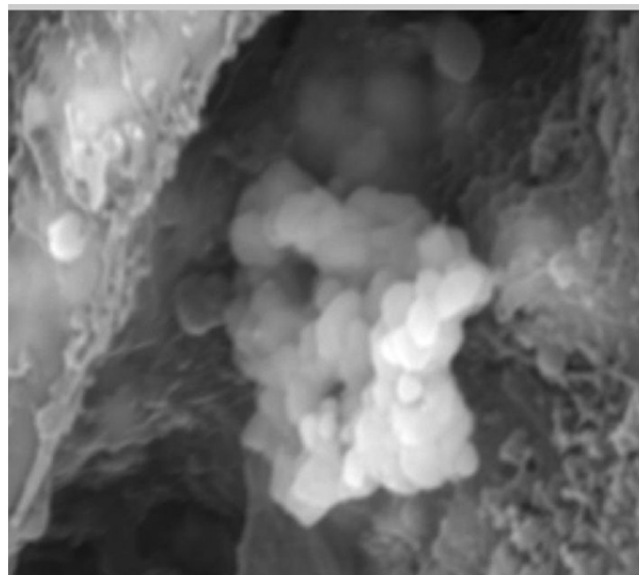


Рис. 5. Минеральные отложения на поверхности коллагеновых волокон

Для контрастирования изображения с последующей гамма-коррекцией (рис. 6) используется функция *imadjust*. Чтобы изображение было полным (охвачен весь динамический диапазон), указывается интервал $[0,1]$.

Далее производится обнаружение полного объекта (рис. 7).

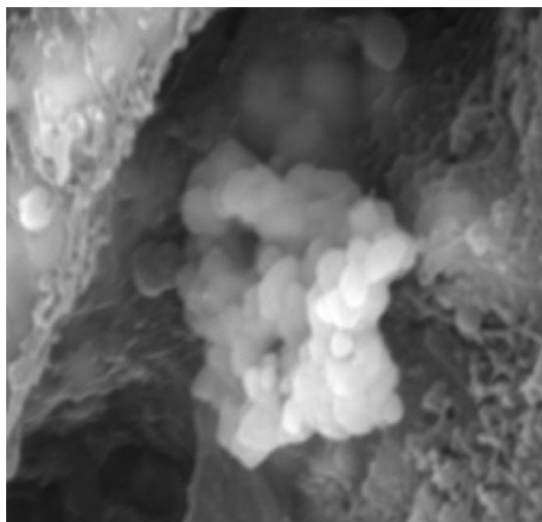


Рис. 6. Контрастированное изображение

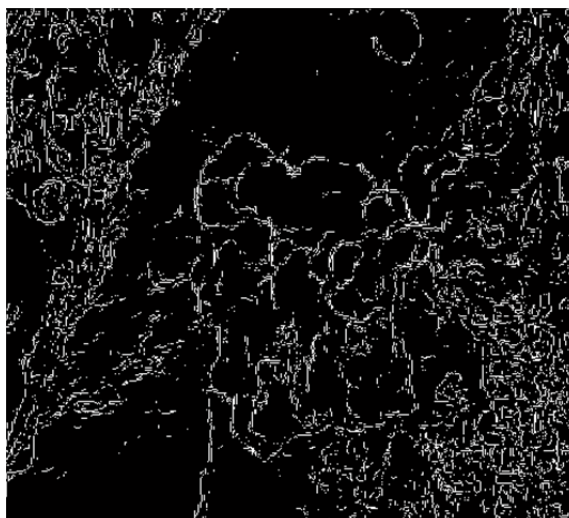


Рис. 7. Бинарная маска градиента изображения

Оригинальное изображение, представленное на рис. 5, содержит минеральные отложения, но некоторые из них граничат с краем изображения. Нужно обнаружить и исключить неполные объекты. Одним из способов обнаружения только целого и полого объекта будет сегментация. Объект, который будет сегментирован, сильно отличается по контрасту от фонового изображения. Отличия в контрасте могут быть обнаружены операторами, которые вычисляют градиент изображения. Например, оператор «Sobel» создает бинарную маску, используя точное пороговое значение, установленное пользователем. Можно определить пороговое значение, используя функцию *graythresh*. Чтобы создать двоичную (бинарную) маску градиента, была использована функция *edge*.

Двоичный градиент маскирует в изображении показ линий высокого контраста. Эти линии совсем не очерчивают схему интересующих объектов. По сравнению с первоначальным изображением в маске градиента можно увидеть на линиях промежутки, окружающих объект. Эти линейные промежутки исчезнут, если изображение маски градиента расширить, используя линейные элементы структурирования, которые создаются функцией *strel*.

Бинарная маска градиента расширена использованием вертикально- и горизонтально-структурирующими элементами. А функция *imdilate* расширяет изображение (рис. 8).

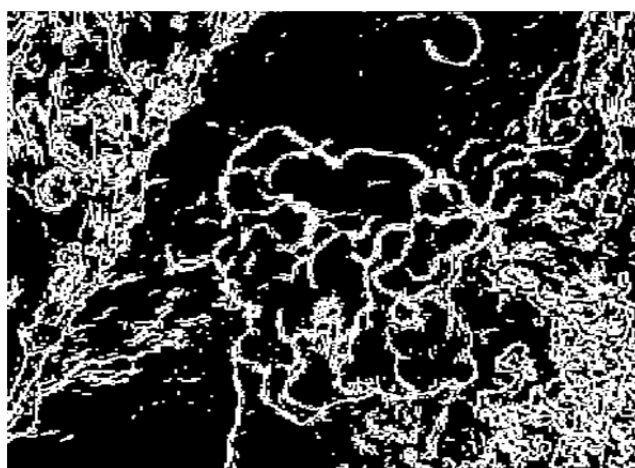


Рис. 8. Расширенная бинарная маска изображения

Расширенная маска градиента показывает схему бесшумности (неразрывности) внешних границ объектов, но есть все еще отверстия или зашумленность внутри объектов. Для заполнения этих отверстий используется функция *imfill* (рис. 9).

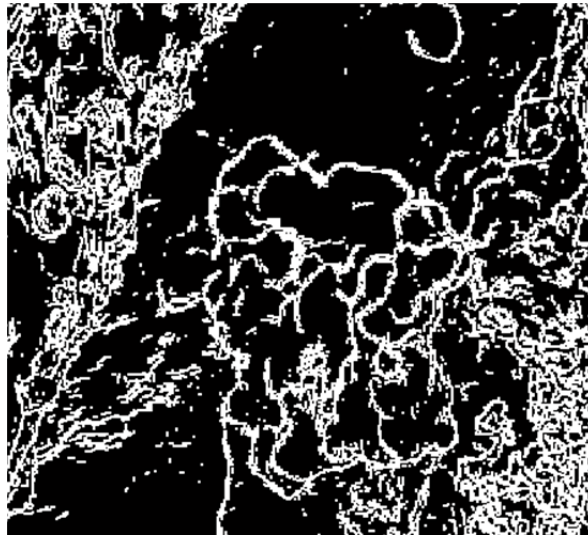


Рис. 9. Заполненная бинарная маска изображения

Интересующие объекты были успешно сегментированы, но найдены они не единственные. Все объекты, связанные с границей изображения, могут быть удалены с помощью функции *imclearborder* (рис. 10). Чтобы удалить диагональные соединения, для функции *imclearborder* был задан параметр равный четырем.

Наконец, чтобы сегментированные объекты выглядели естественными, нужно выровнять их границы. Для этого необходимо дважды разрушить изображение с помощью ромбового структурирующего элемента (рис. 11). Создается ромбовый структурирующий элемент использованием функции *strel*.

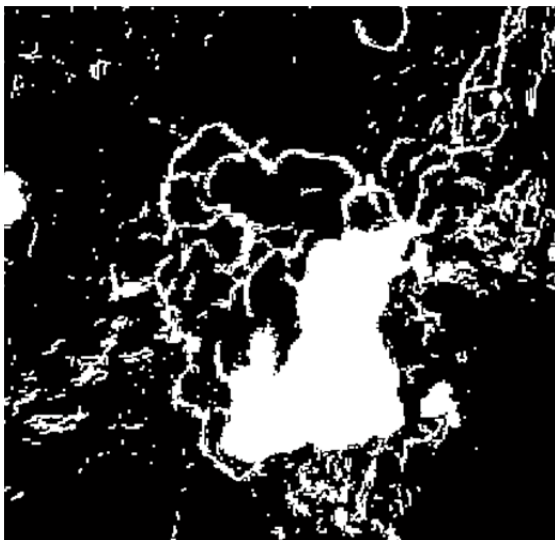


Рис. 10. Удаление граничных элементов

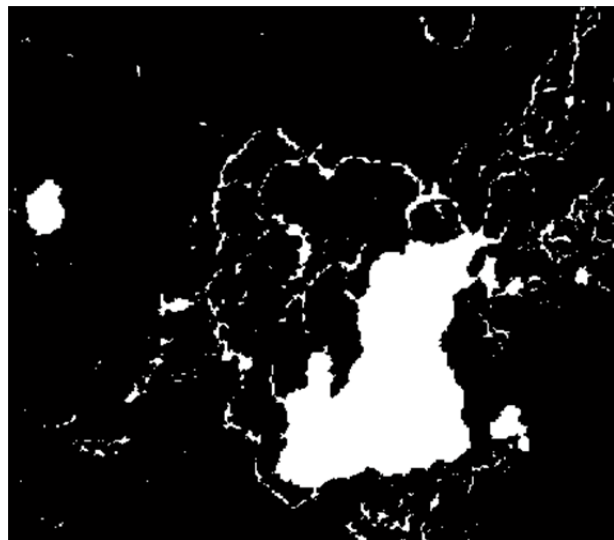


Рис. 11. Выравнивание границ

В дополнение, чтобы показать сегментированный объект, выделенные контуры маски изображения накладываются на оригинальное изображение. Такое наложение реализовано функцией *bwperim* и представлено на рис. 12.

Как видно из рис. 12, по результатам препарирования изображения, полученного сканирующей электронной микроскопией коллагеновых волокон, выделен объект минеральных отложений на них.

Процесс препарирования изображений автоматизируется приведенным методом в программное приложение и позволяет оценить возможность выделения объекта исследования на исходном изображении.

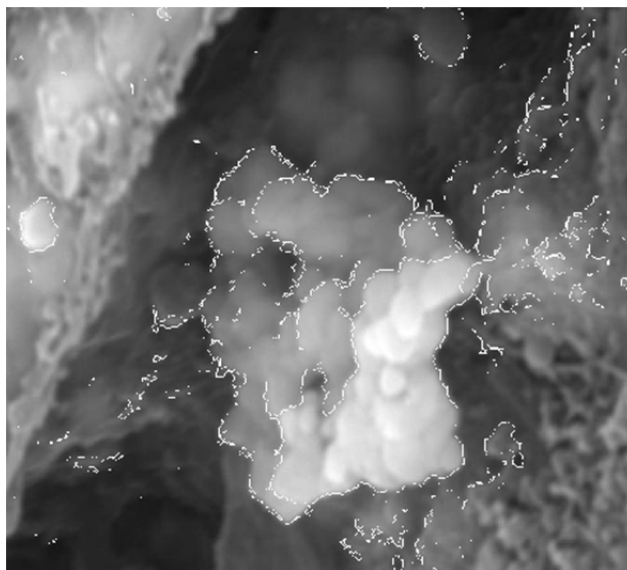


Рис. 12. Наложение сегментированного объекта на исходное изображение

Заключение

При сканирующей электронной микроскопии получение качественных изображений очень малых объектов существенно зависит от настроек микроскопа и физических свойств исследуемого объекта. При разных физических свойствах и размерах требуются тестирование и настройка электронного микроскопа для проведения исследований. Существуют тестовые пластины, которые позволяют проводить настройку, но они имеют существенный недостаток, их свойства не в полной мере перекрывают весь диапазон возможных значений физических характеристик исследуемых объектов. Для качественной оценки процесса формирования костного регенерата необходимо дополнительно применять электронные тесты, производить юстировку сканирующих электронных микроскопов с препарированием получаемых изображений и выделением исследуемых объектов.

Список литературы

1. Пат. 127617 Российская Федерация, МПК А 61 С8/00. Зубной имплантат / Геращенко С. И., Евдокимов С. В., Митрошин А. Н., Фандеев В. П. – № 2012156743/14 ; заявл. 25.12.2012; опубл. 10.05.2013, Бюл. № 13.
2. Formation of the porous structure of material surface using the method of laser processing / A. N. Mitroshin, S. I. Gerashchenko, S. M. Gerashchenko, N. N. Yankina, A. V. Vertaev // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – Т. 6, № 1. – С. 1869–1874.
3. Experimental evaluation of the modes of laser processing of the surface of implants and prostheses / A. N. Mitroshin, S. I. Gerashchenko, S. M. Gerashchenko, N. N. Yankina, I. E. Talianskii // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – Т. 6, № 1. – С. 1862–1868.
4. Разработка методики электрохимического лизиса злокачественных новообразований / М. А. Сыскова, С. И. Геращенко // Труды Международного симпозиума Надежность и качество. – 2014. – Т. 2. – С. 366–368.
5. Анисимов, Б. В. Распознавание и цифровая обработка изображений : учеб. пособие для студентов / Б. В. Анисимов, В. Д. Курганов, В. К. Злобин. – М. : Высш. шк., 1983. – 295 с.

Геращенко Сергей Иванович

доктор технических наук, профессор,
заведующий кафедрой медицинской кибернетики
и информатики,
Пензенский государственный университет
(440026, Россия, г. Пенза, Красная, 40)
E-mail: mpo@list.ru

Gerashchenko Sergey Ivanovich

doctor of technical sciences, professor,
head of sub-department of medical cybernetics
and informatics,
Penza State University
(440026, 40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Геращенко Сергей Михайлович

доктор технических наук, профессор,
кафедра медицинской кибернетики и информатики,
Пензенский государственный университет
(440026, Россия, г. Пенза, Красная, 40)
E-mail: gsm@pnzgu.ru

Костенков Сергей Юрьевич

аспирант,
Пензенский государственный университет
(440026, Россия, г. Пенза, Красная, 40)
E-mail: panthfinder@mail.ru

Янкина Наталья Николаевна

кандидат технических наук, доцент,
кафедра медицинской кибернетики и информатики,
Пензенский государственный университет
(440026, Россия, г. Пенза, Красная, 40)
E-mail: prisend@yandex.ru

Карнаухов Виктор Вячеславович

студент,
Пензенский государственный университет
(440026, Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)
E-mail: mpo@list.ru

Аннотация. *Актуальность и цели.* Представление информации о процессе остеоинтеграции с помощью сканирующей электронной микроскопии в значительной степени зависит от настроек разрешающей способности микроскопа. Для качественной оценки процесса формирования костного регенерата необходимо обеспечивать объективность процедур применяемых измерительных информационных технологий. Использование компьютерной техники, обеспечивающей обработку исходной информации, требует гарантированной точности и метрологической надежности представления данных. В этой связи задача обеспечения однотипных настроек для различных условий получения экспозиции становится неотъемлемой частью измерительных процедур и является актуальной. *Материалы и методы.* Для настройки на однотипные режимы предлагается использовать электронные тесты. Они позволяют менять яркость и контрастность изображения по принципу максимальной информативности изображения. Также предлагается при юстировке сканирующих электронных микроскопов использовать препарирование получаемых изображений и выделение исследуемых объектов. Это позволяет установить однотипные настройки сканирующего микроскопа при разных уровнях разрешающей способности и исключить их влияние на качество представления данных при контроле процесса формирования костного регенерата. *Результаты.* Предложенная методика препарирования изображений процесса формирования костного регенерата при настройке сканирующих электронных микроскопов позволяет существенно повысить точность представления качественных характеристик процесса остеоинтеграции. Адекватность и надежность пред-

Gerashchenko Sergey Mihailovich

doctor of technical sciences, professor,
sub-department of medical cybernetics and informatics,
Penza State University
(440026, 40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Kostenkov Sergey Yur'evich

postgraduate student,
Penza State University
(440026, 40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Yankina Natal'ya Nikolaevna

candidate of technical sciences, associate professor,
sub-department of medical cybernetics and informatics,
Penza State University
(440026, 40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Karnaikhov Viktor Vyacheslavovich

student,
Penza State University
(440026, 40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Abstract. *Background.* Presentation of the process osteo-integration using scanning electron microscopy, is largely dependent on the settings of the resolution of the microscope. For the qualitative assessment of the formation of bone regeneration is necessary to ensure the objectivity of the measurement procedures used information technology. Using computer technology, providing the initial information processing requires guaranteed accuracy and metrological reliability of data. In this context, the task of providing the same type of settings for different conditions obtaining exposure, it becomes an integral part of the measurement procedure and is up to date. *Materials and methods.* To tune in to the same type modes are encouraged to use electronic tests. They allow you to change the brightness and contrast on the principle of maximum information content of the image. Also available during adjustment of scanning electron microscopes use a preparation of the images and the selection of the objects. This allows you to install the same type of configuration scanning microscope at different levels of resolution and eliminate their impact on the quality of reporting under the control of the formation of bone regeneration. *Results.* The proposed method of preparation of the formation of the image of the bone regenerate when configuring scanning electron microscopes can significantly improve the precision of the qualitative characteristics of osseointegration. Adequacy and reliability of the proposed measurement model is confirmed by experimental data. *Conclusions.* For the qualitative assessment of the formation of bone regenerate need to further use of electronic tests, to make the adjustment of scanning electron microscope images obtained from dissection and isolation of the objects.

ложенной измерительной модели подтверждена экспериментальными данными. *Выводы.* Для качественной оценки процесса формирования костного регенерата необходимо дополнительно применять электронные тесты, производить юстировку сканирующих электронных микроскопов с препарированием получаемых изображений и выделением исследуемых объектов.

Ключевые слова: остеоинтеграция, сканирующая микроскопия, тестовые объекты, настройка микроскопа, препарирование изображений.

Key words: ostiointegratsiya, the scanning microscopy, test objects, tuning microscope, the preparation of the images.

УДК 53.086

Препарирование изображений процесса формирования костного регенерата при настройке сканирующих электронных микроскопов / С. И. Геращенко, С. М. Геращенко, С. Ю. Костенков, Н. Н. Янкина, В. В. Карнаухов // Надежность и качество сложных систем. – 2016. – № 4 (16). – С. 82–91. DOI 10.21685/2307-4205-2016-4-12.