

## Оценка заживления кожных ран методом цифровой обработки изображений

### Аннотация

Рассматриваются вопросы применения методов цифровой обработки изображений при экспериментальном исследовании процессов заживления кожных ран. Предложен новый подход к автоматизации анализа микрообъектов в процессе морфометрического исследования.

### Введение

Ускорение процесса восстановления кожного покрова и сокращение общего срока заживления ран являются актуальными задачами клинической морфологии и хирургии. Ни один из способов лечения ран не удовлетворяет потребностей практической медицины полностью [1]. В связи с этим возникает необходимость оценки состояния регенерирующих тканей с целью выбора оптимального метода стимуляции репаративного процесса. Морфологическое исследование регенерата является весьма трудоемким и требует длительных манипуляций и измерений. На анализ одного образца затрачивается время порядка нескольких часов. Эта проблема является общей при проведении количественных морфологических исследований, и путем ее решения является автоматизация анализа микрообъектов [2].

### Материалы и методы

Для сравнительной оценки классических гистологических подходов и автоматизированного анализа микрообъектов было проведено морфологическое изучение репаративных процессов при заживлении экспериментальных кожных ран под действием раствора ангиоактивного препарата [3]. Исследование процессов регенерации экспериментальных кожных ран проводили на 30 крысах-самках массой 200...230 г. Животные были разделены на две группы: первая – контрольная – включала в себя крыс, которым ежедневно паравульнарно вводили 1,0 мл физиологического раствора; вторая – опытная – включала в себя крыс, которым аналогичным образом вводили водный раствор ангиоактивного препарата, представляющего собой пептидный комплекс, содержащий аминокислоты: лизин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту [4], [5]. Животным под эфирным наркозом на дорсальной поверхности тела наносили стандартные полнослойные кожные раны площадью 225 мм<sup>2</sup>. Забор биоптатов из краев ран производили на 5, 10 и 15 сутки после операции. На их основе изготавливали гистологические препараты (шаг – 4 мк).

Для оценки регенерата путем микроскопической морфометрии использовались микроскопические показатели заживления [2], [6]. На гистологических препаратах подсчитывалось количество фибробластов грануляционной ткани в 10 полях зрения микроскопа (при увеличении 630). Оценка состояния микроциркуляторного русла в зоне дефекта проводилась путем подсчета количества сосудов в поле зрения микроскопа (при увеличении 600). Определялись размеры новообразованных структур регенерата: высота струпа, лейкоцитарного вала, грануляционной ткани, пограничной зоны эпителия и протяженность эпителиального клина, количество фибробластов грануляционной ткани.

Анализ гистологических препаратов биоптатов кожи животных опытной группы, получавших пептидный раствор паравульнарно, подтвердил более высокую скорость репаративных процессов в этой группе. Полная эпителизация в опытной серии произошла на 2 дня раньше, чем в контроле. Использование ангиоактивного раствора уменьшало развитие отека и эритемы пораженного участка кожи, способствовало

ускоренному образованию грануляционной ткани и ее трансформации в соединительную.

Проведение морфологического исследования отличалось существенной трудоемкостью и большими временными затратами. Для решения данной проблемы были использованы методы цифровой обработки изображений, позволяющие автоматизировать процесс анализа микрообъектов.

### Оценка состояния биоткани на основе методов цифровой обработки изображений

Разработка систем автоматизации морфологических исследований предполагает преобразование информации о строении биологических объектов в цифровую форму. В результате сканирования изображения биологического объекта создается цифровая матрица, соответствующая оптической плотности изображения, которая является основой для дальнейшей математической обработки и анализа изображения.

Математически изображение [7] определяется в виде двумерной функции  $f(x, y)$ , где  $x$  и  $y$  – его пространственные координаты. Для каждой пары координат функция  $f(x, y)$  определяет яркость изображения в этой точке. Перевод изображения в цифровую форму требует дискретизации значений  $x$  и  $y$  и квантования уровня яркости  $f$ . Для цифрового изображения значения координат  $x$  и  $y$ , а также величины  $f$  выбираются из фиксированного конечного набора элементов. Результатом дискретизации и квантования является матрица  $[f(i, j)]$ , где  $i$  – целочисленные координаты строк, а  $j$  – целочисленные координаты столбцов матрицы. Матрица  $[f(i, j)]$ , состоящая из  $M$  строк и  $N$  столбцов содержит  $M \times N$  элементов (пикселей) изображения  $f$ . Число квантованных уровней яркости  $f$  равно  $L$ .

Биологические ткани являются оптически неоднородными средами [8], [9] со средним значением показателя преломления большим, чем у воздуха. При распространении излучения в них существенную роль играют процессы светорассеяния. Основным источником рассеяния света в биологических тканях является различие в значениях показателей преломления различных компонентов, входящих в их состав. Рассеянное излучение несет информацию о формирующих биологическую ткань структурных компонентах, таких как размеры и форма клеточных элементов, их ориентация, оптические постоянные и другие параметры.

Поскольку оптические свойства биологической ткани определяются ее структурой и состоянием, то любые изменения в них, вызванные различными причинами, приводят к изменениям биохимического состава, морфологии, электрических, реологических и других физико-химических параметров и свойств, что, в свою очередь, ведет к изменению характера рассеяния ткани, изменению ее оптической плотности [9], [10].

Для оценки скорости и характера изменения регенеративных процессов был использован сравнительный анализ оптической плотности цифровых изображений исследуемых биологических объектов, сделанных в группах сравнения в разные моменты времени. Обобщенной характеристикой оптической плотности объекта является ее гистограмма. Под гистограммой цифрового изображения  $f$  с числом возможных

яркостей  $L$ , лежащих в диапазоне  $[0, L - 1]$ , понимают [11] дискретную функцию

$$h(f_k) = n_k,$$

где индекс  $k$  относится к номеру уровня яркости, а  $n_k$  – это число пикселей изображения, уровень яркости которых равен  $f_k$ . Нормированные гистограммы получаются путем преобразования вида

$$p(f_k) = \frac{h(f_k)}{n} = \frac{n_k}{n},$$

где  $n$  – число пикселей изображения. Таким образом, число  $p(f_k)$  – это вероятность (частота) появления уровня яркости  $f_k$  в анализируемом изображении. Саму гистограмму будем рассматривать как эмпирическую оценку функции плотности вероятности, являющуюся исчерпывающей оценкой случайной величины. На основании гистограммы можно вычислить структурные характеристики распределения случайной величины, такие как среднее значение, выборочная дисперсия, выборочное стандартное отклонение, выборочные значения моды и медианы, показатель асимметрии, и использовать их для оценки изменений оптической плотности исследуемых биологических объектов [11].

Для этой цели была разработана компьютерная программа «Гистограмма», предназначенная для анализа изображений и вычисления структурных показателей. Интерфейс программы «Гистограмма» можно видеть на *рис. 1*, на котором представлен результат морфологического исследования микропрепаратов полнослойных кожных ран через 5 дней после операции для контрольной группы. Интерфейс содержит поле вы-

вода изображения (Image), поле вывода гистограммы (Histogram) и поле формирования «Области интереса». Использование инструментов последнего поля позволяет выделить часть изображения для дальнейшего анализа. Значения выборочного стандартного отклонения (Standard Deviation) и среднего значения (Mean) вычисляются автоматически после загрузки изображения и указания «Области интереса».

Результат морфологического исследования микропрепаратов полнослойных кожных ран через 5 дней после операции для группы животных, получавших пептидный раствор, представлен на *рис. 2*.

Визуально наблюдалось увеличение количества фибробластов, миофибробластов, гистиоцитов в периваскулярных отделах. Появлялись вновь образованные сосуды и сосудистые почки. Изменение строения ткани привело к изменению оптической плотности изображения. Изменился характер распределения, тогда как среднее значение яркости практически не изменилось, но уменьшился разброс значений яркости, что свидетельствует о более однородном составе биологического объекта.

Результат морфологического исследования микропрепаратов полнослойных кожных ран через 10 дней после операции для контрольной группы представлен на *рис. 3*.

Визуально на 10-е сутки эксперимента у крыс контрольной группы зона некроза уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком. В краях раны в дерме обнаруживается хорошо развитая грануляционная ткань (*рис. 3*) с большим количеством соединительнотканых клеток: фибробластов и гистиоцитов, а также небольшие скопления малых лимфоцитов; сохраняется инфильтрация нейтрофилами. Характер гистограммы прак-

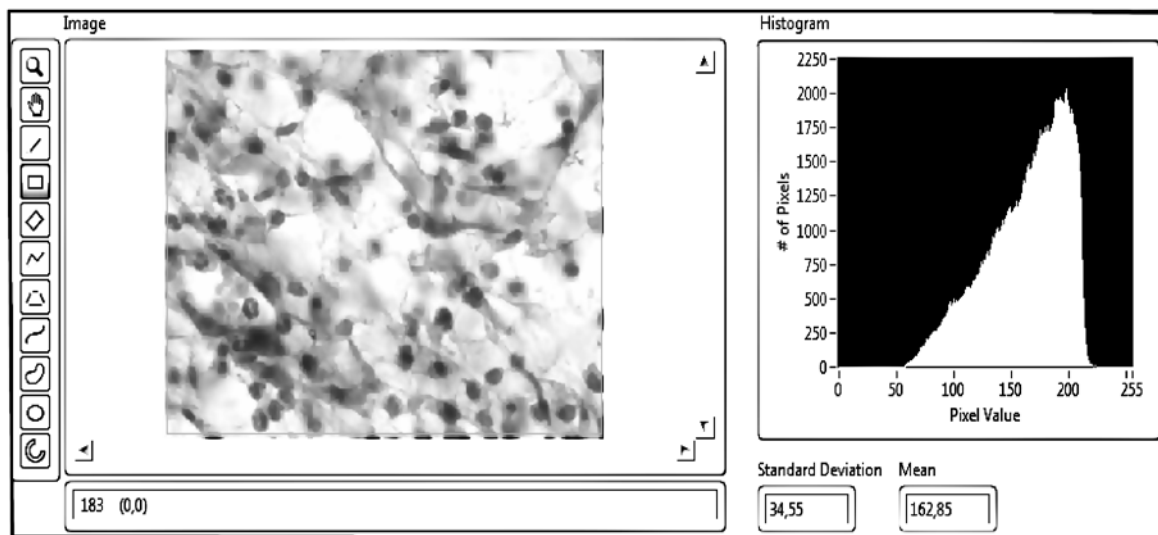


Рис. 1. Морфология грануляционной ткани: 5 дней, контрольная группа

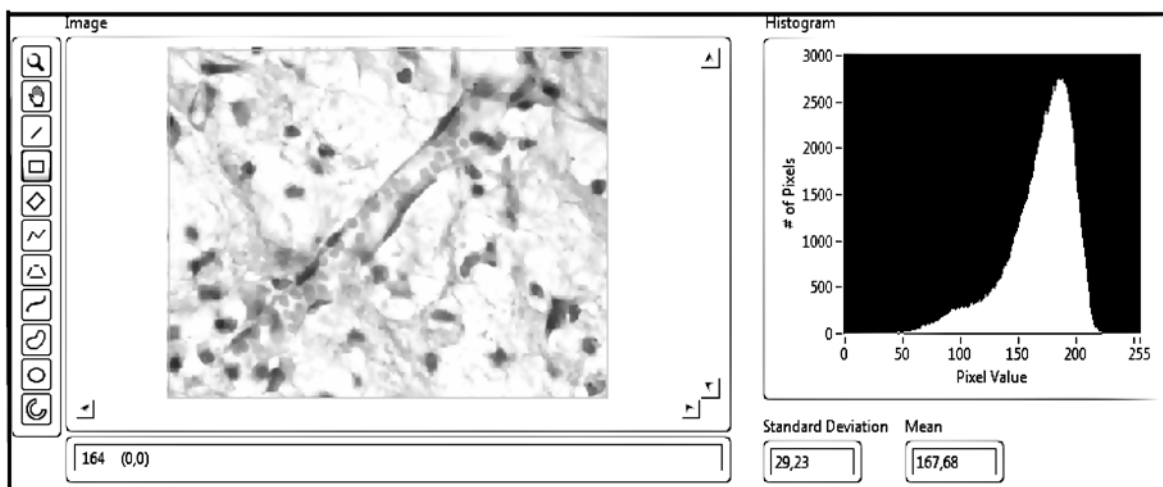


Рис. 2. Морфология грануляционной ткани: 5 дней, опытная группа

**Изменение количества фибробластов грануляционной ткани при заживлении ран кожи через 5 и 10 дней после операции**

Период	Группа	Количество фибробластов (среднее значение)	
		Поверхность раны	Дно раны
5 дней	Контрольная	7,5	14,3
	Опытная	17,3	27,4
10 дней	Контрольная	18,4	28,7
	Опытная	49,9	62,0

тически не изменился, но увеличилась оптическая плотность, о чем свидетельствует снижение среднего значения яркости изображения.

Результаты морфологического исследования микропрепаратов полнослойных кожных ран через 10 дней после операции для группы животных, получавших ангиоактивный препарат, представлены на рис. 4.

На 10-е сутки эксперимента у крыс второй серии слой тканевого детрита полностью замещен зрелой грануляционной тканью. В краях раны обнаруживается хорошо развитая молодая соединительная ткань (рис. 4) с большим количеством фибробластов и широкими полями коллагеновых волокон. Характер гистограммы существенно изменился: значение средней яркости практически не отличается от предыдущего изображения, но значительно изменился разброс яркостей, что свидетельствует о более однородном составе биологической ткани.

### Анализ полученных результатов

Результаты морфологического исследования препаратов, проводившегося традиционным способом (подсчет велся в 10 полях зрения микроскопа при увеличении 600), приведены в табл. 1. Для проверки значимости различий между средними значениями четырех выборок была использована модель двухфакторного дисперсионного анализа без повторений. Результаты расчетов на основании выборочных данных подтвердили статистическую значимость различий средних величин при вероятности ошибки 1-го рода  $\alpha = 0,01$ .

Данные классической морфометрии свидетельствуют о более активном выселении клеточных элементов в область регенерата крыс опытной группы, что изменяет скорость и характер репаративных процессов.

Результаты компьютерного анализа изображений, на основе которых проводилось выборочное обследование, приведены в табл. 2. Средние значения структурных показателей были получены путем усреднения средних значений яркостей и стандартных отклонений в исследуемых группах.

Для проверки значимости различий между средними значениями структурных показателей была использована модель двухфакторного дисперсионного анализа без повторений. Различия между средними значениями яркости внутри одного пе-

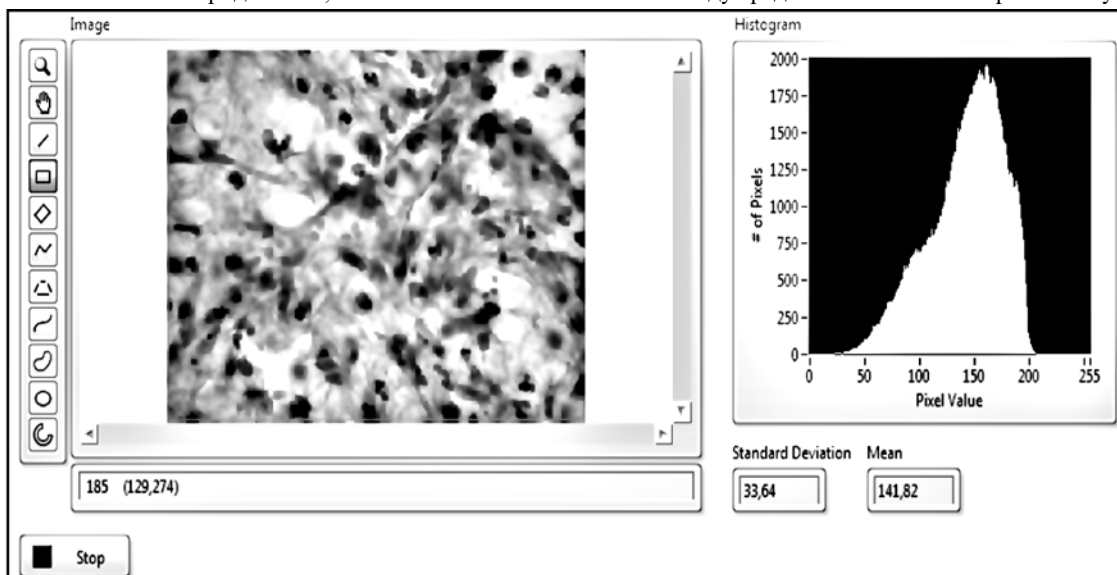


Рис. 3. Морфология грануляционной ткани: 10 дней, контрольная группа

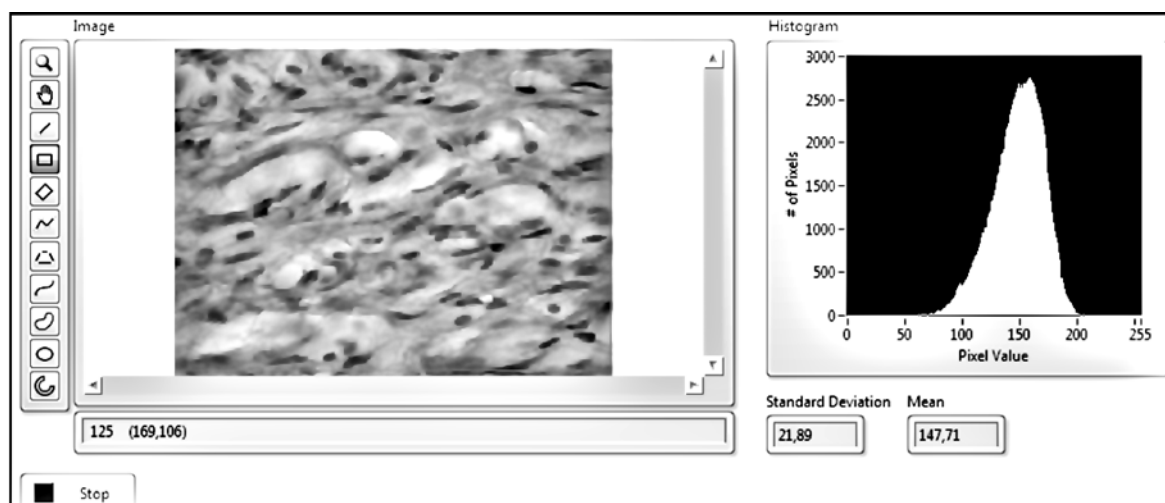


Рис. 4. Морфология грануляционной ткани: 10 дней, опытная группа

риода статистически незначимы, а различия между средними значениями яркости между периодами статистически значимы. Различия средних значений стандартного отклонения яркости статистически значимы внутри каждого периода. Таким образом, можно сделать вывод, что показатели, полученные при классической трудоемкой морфометрии, коррелируют с данными автоматизированного анализа. Более яркие изображения в опытной группе объясняются интенсивным коллагеногенезом, который осуществляют клеточные элементы фибробластического ряда.

Таблица 2

**Изменение яркости изображения биологической ткани при заживлении ран кожи через 5 и 10 дней после операции**

Срок исследования	Группа	Средние значения структурных показателей распределения яркости изображения	
		Среднее значение	Стандартное отклонение
5 дней	Контрольная	164,80	36,50
	Опытная	167,68	28,40
10 дней	Контрольная	141,83	33,64
	Опытная	147,71	21,89

**Заключение**

Проведенное на примере применения ангиоактивного пептидного препарата исследование показало возможность использования методов цифровой обработки изображений для оценки состояния биологической ткани в процессе заживления кожных ран. Применение предложенного подхода для оценки состояния биологической ткани позволит автоматизировать процедуру морфологического исследования, существенно сократит сроки проведения исследования.

*Список литературы:*

1. Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б., Ключкова С.В. Аналитическая морфология репаративной регенерации в коже под действием различных региональных факторов // Журнал анатомии и гистопатологии. 2015. Т. 4. № 1. С. 26-38.

2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Руководство. – М.: Медицина, 1990. 384 с.  
 3. Шестакова В.Г., Баженов Д.В. Корреляция процессов ангиогенеза и эпителизации при репаративной регенерации послойной хирургической раны кожи / Сб. статей под ред. А.А. Стадникова и др. Материалы международной научной конференции, посвященной памяти члена-кор. АМН СССР, профессора Ф.М. Лазаренко «Актуальные проблемы морфологии, адаптогенеза и репаративных гистогенезов». Оренбургская гос. мед. академия. – Оренбург: Ред.-изд. центр Оренб. мед. акад., 2013. С. 44-45.  
 4. Цитогены. Биологически активные добавки к пище / Методические рекомендации. – СПб.: Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2011. 40 с.  
 5. Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н. Пептидные биорегуляторы и старение. – СПб.: Наука, 2003. 223 с.  
 6. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. Руководство. – М.: Медицина, 1996. 544 с.  
 7. Gonsales R., Woods R., Eddins S. Digital image processing using MATLAB. – NJ Prentis Hall, 2004.  
 8. Тучин В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. // Известия Саратовского университета. Сер. «Физика». 2005. Т. 5.  
 9. Симоненко Г.В., Тучин В.В. Оптические свойства биологических тканей / Учебно-методическое пособие. 2007. С. 48.  
 10. Chance B. Optical method // Arm. Rev. Biophys. Chem. 1991. Vol. 20. PP. 1-28.  
 11. Красильников Н.Н. Цифровая обработка 2D- и 3D-изображений / Учеб. пособие. – СПб: БХВ-Петербург, 2011. 608 с.

*Валерия Геннадьевна Шестакова,  
канд. биолог. наук, доцент,  
зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии,  
Тверской государственной медицинской университет,  
Александр Николаевич Ветров,  
канд. техн. наук, доцент,  
Геннадий Андреевич Дмитриев,  
д-р техн. наук, профессор,  
Тверской государственной технической университет,  
г. Тверь,  
e-mail: vetrov\_48@mail.ru*

*М.Х. Ашуров, С.В. Белов, С.В. Гудков, Ю.К. Данилейко,  
А.Б. Егоров, В.В. Савранский, А.А. Темнов*

**Влияние низкотемпературной плазмы тлеющего разряда на пролиферативную активность клеток и репаративные функции тканей живых организмов и растений**

**Аннотация**

Представлены результаты исследования воздействия низкотемпературной плазмы на пролиферативную активность клеток и репаративные функции биотканей живых организмов и растений. Рассмотрено влияние низкотемпературной плазмы на жизнеспособность и пролиферативную активность стволовых клеток человека. Показано, что в зависимости от локализации зоны воздействия и времени наблюдения возможны как апоптоз, так и пролиферация стволовых клеток человека. Обработка растений активированным низкотемпературной плазмой препаратом Плазмолит с высокой концентрацией разведения вызывает угнетение роста и развития, в то время как малые концентрации вызывают активацию роста. По результатам исследований делается вывод о едином механизме процессов воздействия низкотемпературной плазмы на пролиферативную активность клеток и репаративные функции биотканей животных и растений.

**Введение**

Достижения современной медикаментозной терапии, несмотря на постоянное стремление к получению безопасных и высокоселективных лекарственных средств, омрачены нарастающим масштабом разнообразных побочных явлений. Созда-

ние высокоселективных лекарственных препаратов для таргетной терапии, синтез новых форм стимулирующих препаратов сопровождаются появлением сопутствующих негативных эффектов [1], [2]. В медицине такими эффектами являются побочные реакции организма, включающие в себя гиперреакции иммунной системы, индивидуальную непереносимость и ини-