

Информационные технологии в медицине

ID: 2019-04-25-A-18740

Краткое сообщение

Кустодов С.В., Тяпкина Д.А., Куртукова М.О., Забенков И.В.

Методика автоматизированного расчёта площади хрящевой ткани на микрофотографиях области имплантации в бедренную кость крыс скаффолдов

ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

В данной работе проводилась имплантация матрицы из поликапролактона, минерализованной ватеритом с целью стимуляции регенерации костной ткани. Для оценки интенсивности восстановления ткани, а именно образования костных балок был разработан алгоритм автоматизированного анализа микрофотографий. Данный алгоритм был реализован средствами библиотеки искусственного зрения OpenCV в виде программы расчёта площади хрящевой ткани в области имплантации скаффолда.

Ключевые слова: скаффолды, крысы, регенерация, костная ткань, цифровая микроскопия

Введение

В современное время одной из наиболее актуальных проблем медицины является стимуляция регенерации различных тканей при повреждении с помощью применения инновационных технологий тканевой инженерии, связанных с имплантацией специальных матриц или скаффолдов в очаг повреждения [1].

Данные пронизанные порами имплантаты при внедрении в область дефекта играют роль внеклеточных каркасов, в толще и по периферии которых происходит регенерация ткани. Для возможности данного процесса скаффолды должны обладать биосовместимостью, то есть они должны быть способны к клеточному заселению и васкуляризации. Так же, для оптимального использования, сроки биодеградации матриц должны быть сопоставимы со сроками восстановления участка ткани, а продукты их биологического разложения не должны оказывать токсического воздействия на организм.

При создании скаффолдов возможно использование различных материалов, имеющих как природное, так и искусственное происхождение, однако большее предпочтение отдаётся синтетическим веществам, например, поликапролактону. Матрицы из данных веществ соответствуют необходимым требованиям, а так же клетки на данных имплантатах обладают высокой пролиферацией и адгезией [2]. Для повышения остеокондуктивных и остеоиндуктивных характеристик матриц, что очень важно при стимуляции регенерации именно костной ткани, скаффолды модифицируют различными минеральными веществами, например, ватеритом, который способен участвовать в адресной доставке предварительно адсорбированных веществ при переходе в кальцит [3].

Применение данных скаффолдов для восстановления костной ткани является инновационным направлением в тканевой инженерии и имеет перспективы клинической апробации у пациентов травматологического и ортопедического профиля. Однако для внедрения данной методики в практическую медицину необходимо проведение тщательных доклинических исследований, в частности имплантационных тестов. Критерием данных исследований является интенсивность образования костных балок, что может оцениваться с помощью расчёта их площадей на микрофотографиях.

Цель: оценка процесса регенерации костной ткани при имплантации в область дефекта бедренной кости у белых крыс скаффолдов из поликапролактона, минерализованных ватеритом с помощью подсчета площади костных балок.

Материал и методы

Эксперимент проводился на 10 белых крысах-самцах массой 200-260 грамм. Данным животным производилась имплантация скаффолдов из поликапролактона, минерализованных ватеритом. После введения препаратов для анестезирования крысам, острым и тупым способом выполнялся доступ к бедренной кости. Производился продольный пропил длиной 5-7 мм, шириной 1-2 мм и глубиной до костномозговой полости. В данный дефект имплантировалась матрица на основе поликапролактона, минерализованных ватеритом. Рана послойно ушивалась. На 28 сутки эксперимента производился вывод животных путём передозировки препаратов для наркоза и забор материала.

Для морфологического исследования приготавливались срезы диафиза бедренной кости в области имплантации толщиной 5-7 мкм, окрашивались гематоксилином. Анализ препаратов проводили с помощью микровизора проходящего света mVizo-103.

Результаты

Для разработки алгоритма подсчёта площади хрящевой ткани использовалась микрофотография (с x20 объектива) среза диафиза бедренной кости в области имплантации скаффолда из поликапролактона, минерализованного ватеритом. При создании программы, использующей библиотеку искусственного зрения OpenCV, учитывалось несколько факторов: определение ядер клеток хрящевой ткани, данные о максимальном и минимальном расстоянии между этими ядрами и ограничение минимально возможного числа соседствующих клеток.

Для начала изображение преобразовывалось из цветного формата в чёрно-белое, проводилось гауссово сглаживание. В результате ядра клеток имели тёмный цвет, а белый – межклеточное и внутриклеточное вещество, окружающее ядра. Затем проводилась инверсная бинаризация ($V_{\text{порог}}=150$) полученного изображения.

Из-за того, что анализу подвергались именно белые объекты (ядра клеток хрящевой ткани), необходимо было избавиться от чёрных артефактов размером в несколько пикселей с помощью использования морфологического закрывающего фильтра с маской круглой формы (5x5 пикселей).

Затем находились контуры ядер клеток хрящевой ткани с помощью алгоритма описанного в работе [4]. Однако, вместе с этими контурами, распознанными оказались и контуры клеточных мембран, сплюснутые и сложной формы, а так же белые артефакты. Фильтрация их проводилась согласно следующим признакам: площадь контура клеточного ядра (20-1500 пикселей), степень округлости контура $M \leq 60$ (где P – длина контура, а S – его площадь), средняя яркость внутри данных контуров (не больше 140). Так же проводилась фильтрация контуров, которые находились на расстоянии меньшем, чем минимально возможное межклеточное расстояние $d < 20$ пикселей. Производилась группировка оставшихся контуров по данным условиям: расстояние между ядрами клеток хрящевой ткани в группе не должно превышать 120 пикселей, а минимальное число контуров в группе должно быть больше, либо равняться 7.

После проведения фильтрации всех контуров и белых артефактов находилась площадь фигуры по следующим действиям:

- 1) На чёрном холсте программно были изображены белые линии между центрами ядер соседних клеток хрящевой ткани.
- 2) При помощи использования процедуры распознавания контуров [4] находились все контуры, где максимальный из них охватывал все распознанные клеточные ядра.

В большинстве случаев площади хрящевой ткани, найденные программно, были меньше, чем площади найденные вручную.

Заключение

Разработанный алгоритм может использоваться для оценки интенсивности образования костных балок, однако требует дальнейших улучшений, например, возможность распознавания клеточных мембран.

Литература

1. Новочадов В.В. Проблема управления клеточным заселением и ремоделированием тканеинженерных матриц для восстановления суставного хряща. Вестник Волгоград.гос. ун-та. 2013; 1(5): 19-28.
2. Mkhabela V, Ray SS. Biodegradation and bioresorption of poly (ε-caprolactone) nanocomposite scaffolds. International Journal of Biological Macromolecules 2015;79: 186–192.
3. Saveleva M.S, Ivanov AN, Kurtukova MO, et al. Hybrid PCL/CaCO₃scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: synthesis, loading and in vivo applications. MaterialsScience&Engineering C-Materialsforbiologicalapplications 2018; 85: 57–67.
4. Satoshi Suzuki and others. Topological structural analysis of digitized binary images by border following. Computer Vision, Graphics, and Image Processing, 30(1):32-46, 1985.