

Методы определения характеристик коагуляции и фибринолиза по последовательности изображений фибринового сгустка в плазме крови *in vitro*

Ю. Д. Бернштейн¹, О. С. Брусов², И. А. Матвеев³

juliebernshtein@gmail.com, oleg.brusow@yandex.ru, matveev@ccas.ru

¹Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

²ФГБНУ Научный центр психического здоровья, г. Москва, Москва, Каширское шоссе, 34

³ФИЦ «Информатика и управление» РАН, г. Москва, ул. Вавилова, 44/2

Решается задача количественного определения характеристик фибринового сгустка в методе тромбодинамики. Исходными данными являются последовательности цифровых снимков кюветы в регистраторе тромбодинамики, наполненной плазмой крови, в которой происходит рост и рассасывание сгустка фибрина от вставки-активатора, сделанных через равные интервалы времени. Определяются границы активатора, скорости роста и рассасывания фибринового сгустка, изменение его размеров и плотности во времени, а также момент отрыва сгустка от активатора. Для выделения сгустков на изображении применяются бинаризация, математическая морфология и метод проекций. Совокупность измеряемых параметров и их временная динамика могут быть использованы в целях медицинской диагностики потенциалов фибринолиза и коагуляции.

Ключевые слова: *тромбодинамика; математическая морфология; метод проекций изображения; алгоритм бинаризации с адаптивным порогом*

DOI: 10.21469/22233792.2.1.04

1 Введение

Важным методом медицинской диагностики является выявление нарушений в системе гемостаза [1,2]. Одним из новых подходов здесь является *метод тромбодинамики* — изучение роста фибринового сгустка в плазме крови, разработанный в лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН [3,4]. С помощью тромбодинамики можно выявить склонность свертывающей системы крови пациента к гипо- и гиперкоагуляции (кровоточивости и тромбообразованию) и осуществить персонализированный подбор антикоагулянтной терапии, необходимой при лечении и профилактике тромбозов [5].

Процесс тромбодинамики протекает в кювете (рис. 1, а), расположенной в передней части регистратора (рис. 1, б). В кювету помещается вставка, на торец которой нанесен *активатор свертывания* — тканевой фактор. Как только плазма крови соприкасается с активатором, стартует процесс свертывания, и от торца вставки в объем плазмы начинает расти фибриновый сгусток, так же как на поврежденной стенке сосуда в организме (*in vivo*). Очевидными характеристиками свертывания являются плотность сгустка (его средняя яркость на изображении) и скорость роста (распространения в пространстве). В перечисленных работах доказана связь этих параметров с состоянием системы тромбообразования. Однако не менее важным является тромболитис (фибринолиз) — процесс растворения сгустков фибрина [6], поэтому предлагается изучать не только процесс роста тромба, но и процесс его растворения. Для этого кювета разделена на два канала: в первом находится чистая плазма крови пациента, по которой изучается процесс коагуляции, в плазму во втором канале вводится *тканевой активатор плазминогена* (ТАП), запускающий процесс фибринолиза. В условиях эксперимента рост тромба в кювете начинается

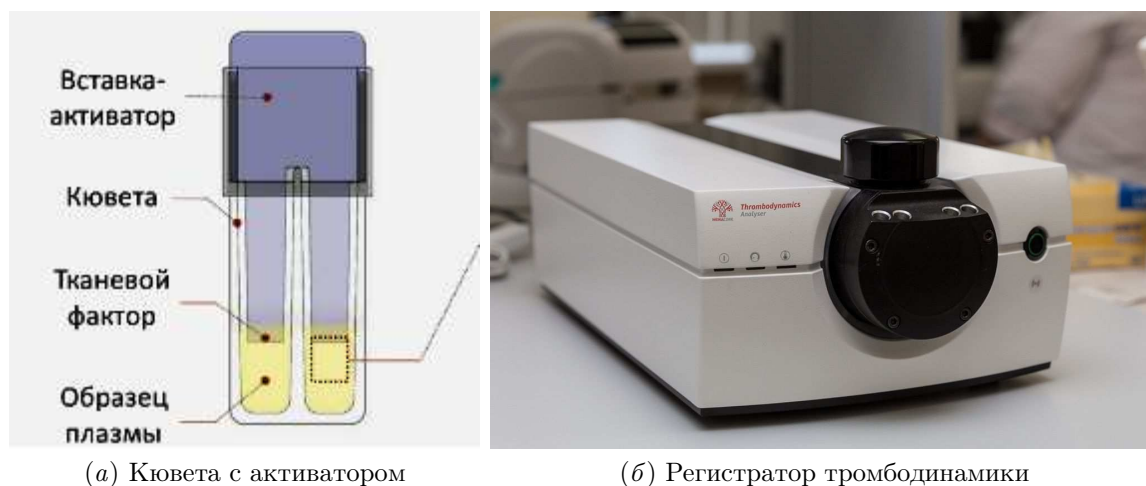


Рис. 1 Установка

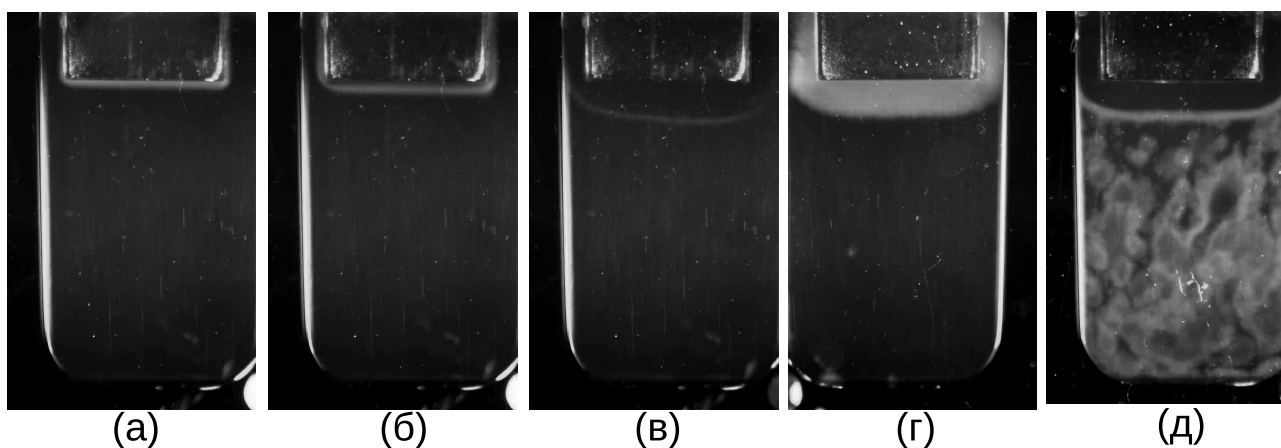


Рис. 2 Примеры изображений тромбов: (а) начало роста тромба (10-й кадр видеопоследовательности); (б) отрыв тромба от активатора в результате фибринолиза (70-й кадр); (в) движение тромба в виде слоя (400-й кадр); (г) изображение плазмы в первом канале (без ТАП, 400-й кадр); (д) возникновение спонтанных сгустков

от вставки-активатора (рис. 2, а). Растворение тромба начинается также от активатора (рис. 2, б). В результате в кювете формируется тромб в форме слоя некоторой толщины, с течением времени удаляющегося от активатора (рис. 2, в). В первом канале (без ТАП) процесс фибринолиза не запускается (рис. 2, г). Применение метода осложняется возникновением *спонтанных сгустков*, которые искажают и разрушают движение тромба (рис. 2, д).

Весь процесс тромбодинамики регистрируется цифровой камерой, делающей снимки через заданные (как правило, равные) интервалы времени. Камера и кювета неподвижны в течение всего эксперимента, который длится 30–60 мин. Таким образом, исходными данными являются последовательности изображений кюветы и находящегося в ней фибринового сгустка.

Методы цифровой обработки изображений активно и плодотворно применяются в медицине [7, 8] в различных областях диагностики. Задача автоматического определения плотности и скорости роста и рассасывания тромба по последовательности изображений

также является интересным приложением. Ранее в составе системы «Гемакор» [9] был разработан метод оценки величины коагуляционного потенциала, основанный на средней яркости изображения в первом канале. Это устойчивый к шумам, но недостаточно точный метод. Этим методом определяется лишь интегральная характеристика — масса тромба (как общая его яркость), в то время как более информативными представляются скорость роста и плотность. Кроме того, находятся лишь параметры коагуляции, но не фибринолиза. В данной работе предлагается метод автоматического определения перемещения переднего и заднего фронтов тромба, что позволяет получить раздельно сведения о скорости роста и плотности тромба, а также о скорости фибринолиза.

2 Постановка задачи

На вход поступает последовательность из $N + 1$ монохромных изображений одинакового размера $W \times H$ пикселей. Зададим начало координат в верхнем левом углу изображения, оси абсцисс Ox и ординат Oy направлены вправо и вниз соответственно. Изображение с номером n является функцией двух дискретных целочисленных аргументов $I_n = I_n(x, y)$, $x, y \in \mathbf{Z}$, $x \in \overline{0; W - 1}$, $y \in \overline{0; H - 1}$, т. е. матрицей. Значениями функции (элементами матрицы) являются целые положительные числа — яркости соответствующих пикселей изображения. Последовательность изображений можно рассматривать как функцию трех дискретных целочисленных аргументов $I(x, y, n)$, $n \in \mathbf{Z}$, $n \in \overline{0; N}$. Тромб на изображении растет от активатора вниз, т. е. в сторону увеличения ординаты.

Требуется определить следующие характеристики $I(x, y, n)$:

- положение переднего фронта тромба $y_F(n)$ (ординату) на каждом кадре последовательности;
- момент отрыва тромба от активатора, т. е. номер кадра n_d , на котором появляется зазор между активатором и тромбом;
- положение заднего фронта тромба $y_B(n)$ на каждом кадре последовательности начиная с момента отрыва, $n > n_d$;
- получить значения положений заднего и переднего фронтов на каждом кадре последовательности, выраженные в микронах и полученные умножением соответствующих ординат на изображениях на некий линейный коэффициент;
- среднее значение яркости $b(n)$ между передним и задним фронтами на каждом кадре.

Для точного решения этих задач также требуется определить положение активатора в кадре. На любой заданной последовательности активатор неподвижен, т. е. имеет одинаковые координаты на всех ее изображениях. Однако на разных последовательностях его положение может меняться, поэтому положение активатора определяется для каждой последовательности по ее первому кадру. Часть активатора, видимая на изображении, представляет собой прямоугольник в верхней его четверти со сторонами, приблизительно параллельными осям изображения. Обозначим координаты активатора как x_L и x_R — левая и правая стороны, y_{act} — нижняя сторона (рис. 3). Красными линиями на рисунке обозначены границы активатора, синей и зеленой — положения заднего и переднего фронтов роста сгустка соответственно.

Также на изображениях видна граница кюветы: правая — в первом канале (см. рис. 2, *г*) и левая — во втором канале (см. рис. 2, *а–2, в* и 2, *д*). Однако в отличие от активатора границу кюветы не требуется определять с высокой точностью, поэтому выбраны два фиксированных значения $x_{cuv}^{left} = 120$ и $x_{cuv}^{right} = 570$. Содержимое изображений первого канала с координатами больше x_{cuv}^{right} и второго канала с координатами меньше x_{cuv}^{left}



Рис. 3 Определяемые величины на кадре последовательности

игнорируется. Далее будем считать ширину изображений W и все операции с абсциссой для изображений, урезанных согласно этому правилу.

3 Метод решения

При обработке набора изображений выполняются следующие действия:

- поиск границ активатора на начальном изображении;
- определение момента отрыва;
- последовательное определение положений переднего и заднего фронтов сгустка на каждом изображении набора снимков, или детектирование ситуации появления спонтанных сгустков, приводящей к невозможности обработки оставшихся изображений набора;
- определение яркости сгустка.

3.1 Поиск границ активатора

Для определения границ активатора используется поиск максимума проекций бинаризованного изображения. Бинаризация осуществляется с порогом, выбранным по гистограмме яркостей. На начальном изображении последовательности $I_0(x, y)$ выделяется область — верхняя четверть, в которой находится активатор: $y \in [0; H/4]$. В этой области собирается интегральная гистограмма яркости:

$$H(b) = |\{(x, y) : I_0(x, y) \leq b\}|.$$

Порог устанавливается как величина, отсекающая 10% самых ярких точек верхней четверти изображения:

$$\theta : H(\theta) = 0,9 \frac{WH}{4} = 0,9H(L),$$

где L — максимальная яркость изображения. Также можно использовать порог, вычисляемый методом Оцу [10]. Бинаризация изображения по порогу θ :

$$I_0^{\text{Bin}}(x, y) = \begin{cases} 1, & \text{если } I_0(x, y) \geq \theta; \\ 0, & \text{если } I_0(x, y) < \theta. \end{cases} \quad (1)$$

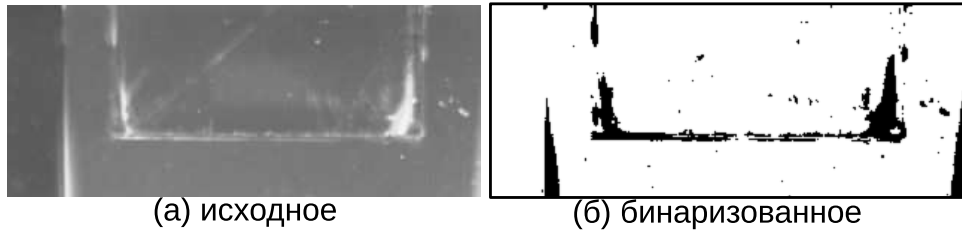


Рис. 4 Бинаризация с порогом $\theta = 15000$ для изображения, значения интенсивности которого лежат в промежутке $[0; 65535]$

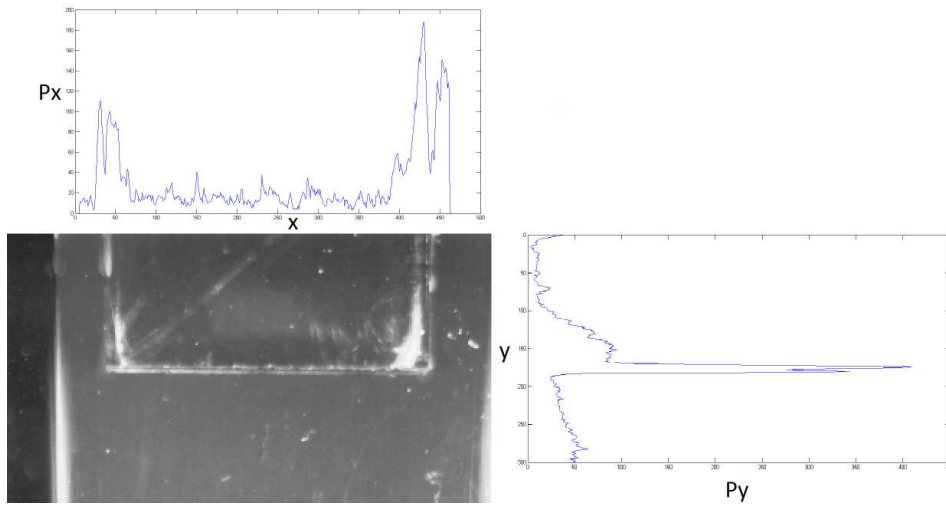


Рис. 5 Фрагмент изображения I_0 и его проекции

Пример преобразования с помощью бинаризации показан на рис. 4, на бинаризованном изображении здесь и далее для наглядности белый цвет соответствует нулевым элементам, черный — единичным.

Для бинаризованного изображения строим горизонтальную проекцию (на ось ординат)

$$P_x(x) = \sum_{y=0}^{H/4-1} I_0^{\text{Bin}}(x, y)$$

и вертикальную проекцию (на ось абсцисс)

$$P_y(y) = \sum_{x=0}^{W-1} I_0^{\text{Bin}}(x, y). \tag{2}$$

Пример изображения и построенных проекций дан на рис. 5.

Проекция сглаживаются усреднением в скользящем окне с полушириной $w = 5$:

$$P^{\text{Blur}}(x) = \frac{1}{2w+1} \sum_{\xi=-w}^w P(x+\xi) I(x+\xi \geq 0) I(x+\xi \leq W-1). \tag{3}$$

Координаты левой и правой границ активатора определяются как положения максимумов в левой и правой половинах сглаженной горизонтальной проекции:

$$x_L = \arg \max_{x \in [0; W/2]} P_x^{\text{Blur}}(x); \quad x_R = \arg \max_{x \in (W/2; W]} P_x^{\text{Blur}}(x),$$

координата нижней границы — как положение максимума сглаженной аналогичным образом вертикальной проекции:

$$y_{\text{act}} = \arg \max_{y \in (0; H/4)} P_y^{\text{Blur}}(y). \quad (4)$$

3.2 Определение момента отрыва

При анализе исходных данных было отмечено, что отрыв сгустка совпадает по времени со значительным уменьшением его яркости. При этом все время до отрыва яркость (как средняя, так и общая) сгустка нарастает. Используя эту особенность, удалось построить следующий простой способ определения момента отрыва. В прямоугольной области изображения, ограниченной сверху нижней границей активатора y_{act} , справа и слева — положениями его краев x_L и x_R и имеющей некоторую заданную (эмпирически выбранную) высоту $h = 10$, вычисляется средняя яркость:

$$b(n) = \frac{1}{(h+1)(x_R - x_L + 1)} \sum_{y=y_{\text{act}}}^{y_{\text{act}}+h} \sum_{x=x_L}^{x_R} I_n(x, y).$$

Значение $b(n)$ монотонно возрастает с ростом n вплоть до момента отрыва. В момент отрыва n_d это значение падает: $b(n_d) < b(n_d - 1)$.

3.3 Определение положений фронтов

В течение эксперимента условия съемки остаются постоянными, поэтому все изменения изображений последовательности обусловлены ростом и растворением тромбов, появлением спонтанных сгустков, а также шумами. В начальный момент времени (на первом в последовательности изображении) тромба нет, и это изображение можно использовать как фоновое, т. е. получать изображение тромба, вычитая его из всех последующих (рис. 6, а):

$$\tilde{I}_n(x, y) = I_n(x, y) - I_0(x, y). \quad (5)$$

Бинаризуя (5) согласно (1), получаем новую последовательность изображений $\tilde{I}_n^{\text{Bin}}(x, y)$, область тромба, а также малые шумовые области (рис. 6, б).

К каждому изображению из полученной последовательности применяется морфологическая операция размыкания (opening) по примитиву SE, являющимся квадратом размерами 11×11 , заполненный единицами. Морфологическое размыкание состоит из двух базовых операций: дилатации и эрозии.

Определение 1. Для множеств \tilde{I}_n^{Bin} и SE эрозия \tilde{I}_n^{Bin} по SE определяется как

$$\tilde{I}_n^{\text{Bin}} \ominus \text{SE} = \min_{i \in [-k, k]} \tilde{I}_n^{\text{Bin}}(x+i, y+i).$$

Определение 2. Для множеств \tilde{I}_n^{Bin} и SE дилатация \tilde{I}_n^{Bin} по SE определяется как

$$\tilde{I}_n^{\text{Bin}} \oplus \text{SE} = \max_{i \in [-k, k]} \tilde{I}_n^{\text{Bin}}(x+i, y+i).$$

Определение 3. Размыкание множества \tilde{I}_n^{Bin} по SE определяется как

$$\tilde{I}_n^{\text{Open}} = \tilde{I}_n^{\text{Bin}} \circ \text{SE} = (\tilde{I}_n^{\text{Bin}} \ominus \text{SE}) \oplus \text{SE}.$$

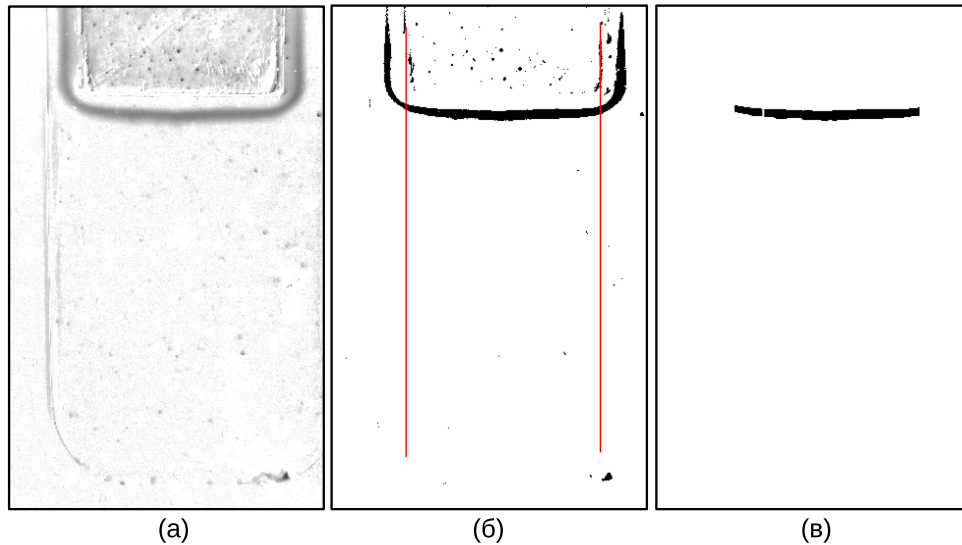


Рис. 6 Пример применения морфологических операций: (а) разность текущего изображения (60-й кадр) и начального; (б) бинаризованное разностное изображение и границы x_L и x_R ; (в) морфологическая фильтрация, вырезание области внутри границ

При помощи морфологической операции размывания шумы на изображениях удаляются. Таким образом, получили последовательность изображений $\tilde{I}_n^{\text{Open}}$. Также необходимо отметить, что движение тромба представляет интерес в центральной части кюветы, а именно: в прямоугольнике, ограниченном с боков размерами активатора, поэтому на изображении вырезается область $\Omega = \{(x, y) : x \in [x_L; x_R]\}$. Результат этих операций показан на рис. 6, в. Применив вертикальную проекцию (2), сглаживание (3) и поиск максимума, аналогичный (4), получаем приближенно абсциссу центра тромба y_0 .

На рис. 6 видно, что тромб, даже ограниченный областью Ω , слегка изогнут, поэтому непосредственным применением метода проекций затруднительно получить точные положения переднего и заднего фронтов. С целью получить точные значения сделана следующая модификация метода проекций. Анализ исходных данных показал, что в начале развития тромба его границы являются практически прямыми линиями, повторяя прямую линию нижней стороны активатора. Однако с удалением тромба от начального положения он все больше изгибается. Точная модель этой деформации не построена (это одно из направлений дальнейшей работы). В данной работе принята приближенная модель параболической формы изгиба. Предполагается, что центральная линия тромба имеет форму:

$$y = y_0 - a(y_0) \left(x - \frac{x_R + x_L}{2} \right)^2. \tag{6}$$

Вершина параболы находится в точке $((x_L + x_R)/2, y_0)$, расположенной на оси симметрии активатора. Коэффициент уравнения параболы $a(y_0) = 0,5 \cdot 10^{-4}(y_0 - y_{\text{act}})$ линейно зависит от расстояния тромба от активатора, коэффициент пропорциональности подобран эмпирически. Применив вертикальную проекцию (2), где значение y в правой части берется из (6), к изображению вертикальных градиентов $V(x, y) = I(x, y + 1) - I(x, y - 1)$, получим в окрестности y_0 локальный минимум на месте переднего фронта (концентрация отрицательных вертикальных градиентов на переходе от яркого тромба к темному фону) и локальный максимум на месте заднего фронта.

3.4 Определение яркости сгустка

Яркость тромба определяется как средняя яркость пикселей области, ограниченной вертикальными прямыми, проходящими по левому и правому краям активатора и параболическими приближениями переднего и заднего фронтов, т. е. удовлетворяющих условиям:

$$\begin{cases} x \geq x_L; \\ x \leq x_R; \\ y \geq y_B + a(y_B) \left(x - \frac{x_R + x_L}{2} \right)^2; \\ y \leq y_F + a(y_F) \left(x - \frac{x_R + x_L}{2} \right)^2. \end{cases}$$

4 Заключение

Разработаны алгоритмы автоматического определения характеристик тромба по его изображениям. Определяются такие характеристики, как положения фронтов сгустка, средняя яркость сгустка, моменты начала фибринолиза и появления спонтанных сгустков. Разработан алгоритм определения границы активатора. Автоматическая обработка данных тромбодинамики позволит заменить ручную оценку на количественную автоматизированную, основанную на вычисляемых характеристиках. Задача выделения обоих фронтов сгустка в эксперименте с ТАП поставлена и решена впервые. Расчеты произведены для 69 последовательностей изображений тромбодинамики, в последовательностях от 300 до 450 изображений. Ручная проверка правильности автоматического определения изучаемых характеристик не выявила расхождений с мнением человека-эксперта.

Пример проведенных вычислений для последовательности из 450 снимков показан на рис. 7.

Момент отрыва сгустка от активатора $n_d = 54$.

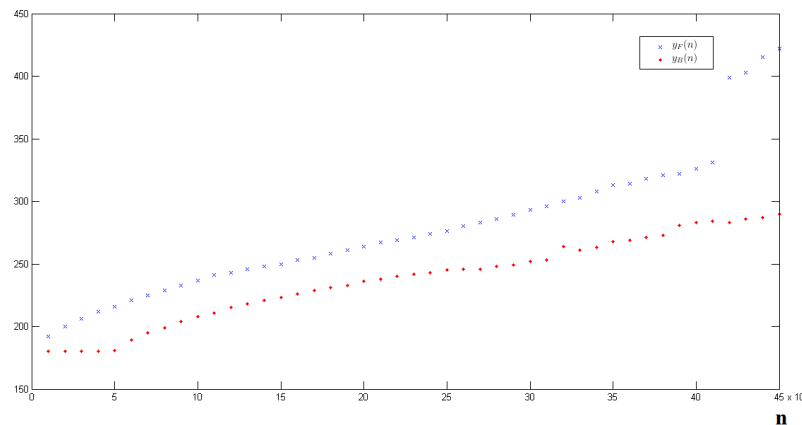


Рис. 7 График зависимости положений фронтов сгустка (а) и яркости снимков (б) от номера кадра

Литература

- [1] He S., Antovic M., Blomback M. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostatic potential in plasma. Modification for use in routine laboratories and research work // *Thromb. Res.*, 2001. Vol. 103. No. 5. P. 255–361.
- [2] Curnow J., Morel-Kopp M.-C., Roddie C., Aboud M., Ward C. M. Reduced fibrinolytic and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay // *J. Thromb. Haemost.*, 2007. Vol. 5. No. 3. P. 528–534.
- [3] Hemker H., Ataullakhanov F. Good mathematical practice: Simulation of the hemostatic-thrombotic mechanism, a powerful tool but one that must be used with circumspection // *Pathophysiol. Haemo. Thromb.*, 2005. Vol. 43. No. 2-3. P. 55–57.
- [4] Soshitova N., Karamzin S., Balandina A., et al. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics // *Blood Coagul. Fibrin.*, 2012. Vol. 23. No. 6. P. 498–507.
- [5] Pantelev M., Balandina A., Lipets E. Taskoriented modular decomposition of biological networks: Trigger mechanism in blood coagulation // *Biophys. J.*, 2010. Vol. 98. P. 1751–1761.
- [6] Antovic A. Screening haemostasis — looking for global assays: The overall haemostasis potential (ohp) method — a possible tool for laboratory investigation of global haemostasis in both hypo- and hypercoagulable conditions // *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2008. Vol. 6. No. 3. P. 173–185.
- [7] Gonzalez R. C., Woods R. E. Digital image processing. — 2nd Ed. — Prentice Hall, 2002. URL: http://www.imageprocessingplace.com/DIP/dip_book_description/book_description.htm.
- [8] Angenat S., Pichon E., Tannenbaum A. Mathematical methods in medical image processing // *Bull. Amer. Math. Soc.*, 2006. No. 43. P. 365–396.
- [9] Hemacore. <http://www.hemacore.com/>.
- [10] Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms // *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, 1979. Vol. 9. No. 1. P. 62–66. doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076.

Поступила в редакцию 05.08.2015

Methods for *in vitro* determination of coagulation and fibrinolysis characteristics using the blood plasma images sequence

J. D. Bernshtein¹, O. S. Brusov², and I. A. Matveev³

juliebernshtein@gmail.com, oleg.brusow@yandex.ru, matveev@ccas.ru

¹Moscow Institute of Physics and Technology, 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow, Russia

²Mental Health Research Center, 34 Kashirskoye shosse, Moscow, Russia

³Federal Research Center “Computer Science and Control” of RAS, 44/2 Vavilova st., Moscow, Russia

The problem of quantifying the characteristics of a fibrin clot in the thrombodynamics method is being solved. The initial data of the method are the sequences of digital images of the cell filled with blood plasma and located in the thrombodynamics registrar, in which the clot is growing and resorbing from the activator, made at regular intervals. Activator’s boundaries, speed of growth and resorption of the fibrin clot, time changes of its size and density, and the moment of the clot’s separation from the activator are determined. Methods of binarization, mathematical morphology, and image projections are used to select clots in the image. The set of measured parameters and their temporal dynamics may be used for medical diagnostic potential of fibrinolysis and coagulation.

Keywords: *thrombus dynamics; mathematical morphology; image projection method; binarization algorithm with adaptive threshold*

DOI: 10.21469/22233792.2.1.04

References

- [1] He, S., M. Antovic, and M. Blomback. 2001. A simple and rapid laboratory method for determination of haemostatic potential in plasma. Modification for use in routine laboratories and research work. *Thromb. Res.* 103(5):255–361.
- [2] Curnow, J., M.-C. Morel-Kopp, C. Roddie, M. Aboud, and C. M. Ward. 2007. Reduced fibrinolytic and increased fibrin generation can be detected in hypercoagulable patients using the overall hemostatic potential assay. *J. Thromb. Haemost.* 5(3):528–534.
- [3] Hemker, H., and F. Ataullakhanov. 2005. Good mathematical practice: Simulation of the hemostatic-thrombotic mechanism, a powerful tool but one that must be used with circumspection. *Pathophysiol. Haemo. Thromb.* 34(2-3):55–57.
- [4] Soshitova, N., S. Karamzin, A. Balandina, *et al.* 2012. Predicting prothrombotic tendencies in sepsis using spatial clot growth dynamics. *Blood Coagul. Fibrin.* 23(6):498–507.
- [5] Pantelev, M., A. Balandina, and E. Lipets. 2010. Taskoriented modular decomposition of biological networks: Trigger mechanism in blood coagulation. *Biophys. J.* 98:1751–1761.
- [6] Antovic, A. 2008. Screening haemostasis — looking for global assays: The overall haemostasis potential (ohp) method — a possible tool for laboratory investigation of global haemostasis in both hypo- and hypercoagulable conditions. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 6(3):173–185.
- [7] Gonzalez, R. C., and R.E. Woods. 2002. *Digital image processing*. 2nd ed. Prentice Hall. Available at: http://www.imageprocessingplace.com/DIP/dip_book_description/book_description.htm (accessed May 19, 2016).
- [8] Angeneat, S., E. Pichon, and A. Tannenbaum. 2006. Mathematical methods in medical image processing. *Bull. Amer. Math. Soc.* 43:365–396.
- [9] Hemacore. Available at: <http://www.hemacore.com/> (accessed May 19, 2016).
- [10] Otsu, N. 1979. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cyb.* 9(1):62–66. doi: 10.1109/TSMC.1979.4310076.

Received August 5, 2015