

ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМА ОТСЛЕЖИВАНИЯ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ВИДЕОПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЫШИ

Шитик М. М., Лисица Е. В., Апанасович В. В.

Кафедра системного анализа и компьютерного моделирования, Белорусский государственный университет
Минск, Республика Беларусь
E-mail: maxshitik@mail.ru

Компьютерная видеомикроскопия является перспективным методом изучения процессов клеточного старения и раковой трансформации. Изменения фенотипа отдельных эмбриональных клеток позволяют получать новые сведения о таких процессах, однако анализ данных проводится вручную. Автоматические методы отслеживания могут ускорить и повысить эффективность анализа видеозаписей, снизить субъективность экспериментов. В данной работе представлен полностью автоматический метод отслеживания клеток, с помощью которого удалось оценить изменение численного состава популяции эмбриональных клеток мыши, а также получить ряд других данных о характере развития популяции.

ВВЕДЕНИЕ

Компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур является перспективным современным методом исследования таких биологических процессов, как клеточное старение и раковая трансформация. Большинство работ по видеомикроскопии живых клеток связано с конфокальной микроскопией, однако используемые в ней люминесцентные красители не позволяют проводить длительное исследование клеточных культур [1]. Для отслеживания всей последовательности изменений в отдельных клетках популяции в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси был разработан метод витального анализа эффектов внешних факторов на клеточные культуры на основе круглосуточной компьютерной видеозаписи в течение ряда дней [2].

В качестве объектов исследования были использованы эмбриональные фибробласты человека и мыши – видов, резко контрастных по продолжительности жизни и частоте возникновения онкологических заболеваний. Сравнение изменений фенотипа отдельных клеток предоставляет новые данные о генетических процессах, ведущих к старению и раковой трансформации [2].

Однако подобное сравнение значительно усложняется большим объемом входных данных и является весьма субъективным при ручном анализе. В данной ситуации автоматические методы отслеживания и фиксирования характеристик клеток позволяют повысить эффективность анализа видеозаписей клеточных популяций, а также заметно ускорить данный процесс.

I. ПРОБЛЕМЫ ОТСЛЕЖИВАНИЯ

Среди наиболее характерных проблем при обработке видеозаписей живых клеточных культур выделяются низкая контрастность и неоднородное распределение интенсивности, в результате чего части клетки могут иметь ту же интенсивность, что и фон на изображении. Это ведет

к тому, что клетки кажутся меньше по размерам или распадаются на несколько компонент [3–4].

Проблемой остается огромное разнообразие форм клеток. Многие типы клеток способны изменять форму и размер со временем. Клетки не всегда двигаются только в рабочей области камеры, могут вести себя нестабильно в зависимости от экспериментальной установки, настроек камеры или протекающих биологических процессов.

Взаимодействие клеток друг с другом приводит к их частичному перекрытию, слипанию или чрезмерному расхождению. Эта проблема для методов автоматического отслеживания состоит в фиксировании всех клеток до и после их контактов. Значительно усложняется данный вопрос с ростом количества участвующих в контакте клеток [3–4]. Похожая проблема состоит и в фиксировании клеточных делений и слияний, что весьма распространено в биологии клеток.

II. АЛГОРИТМ ОТСЛЕЖИВАНИЯ

Предложенный метод основан на сегментации и предполагает последовательную обработку каждого кадра видеозаписи. Для каждой выделенной в кадре клетки ищется ее состояние в предыдущих кадрах и устанавливается соответствие между ними во времени [3–4]. Поиск клеток есть результат серии шагов предобработки изображения, представляющей совокупность фильтрации, определения перепадов интенсивности и морфологических операций. Начинается он с фильтрации типа «соль и перец» на основе двухмерного медианного фильтра [5]. Для получения контуров клеток применяется сегментация с помощью детектора Собела [5] и задания порогового уровня [5]. Завершается предобработка удалением оставшихся шумов во внутренней области клеток и сглаживанием контуров посредством операции эрозии [5]. Выделенные клетки описываются определенным регистрируемым набором параметров, отдельно записываются кадры с отсегментированными в них клетками.

Метод использует поиск соответствующих клеток на соседних кадрах по принципу «ближайшего соседа». Согласно нему, клетка в i -ом кадре находится на наименьшем расстоянии от самой себя среди всех клеток на $(i+1)$ -ом кадре. Проблема отслеживания в данном случае ограничивается только поиском ближайших пар клеток в соседних кадрах, что является классической задачей согласования клеток. Если количество клеток в $(i+1)$ -ом кадре больше, чем в i -ом кадре, то это может означать, что в области наблюдения появились новые, ранее не отмеченные клетки. Если же количество клеток в i -ом кадре больше, чем в $(i+1)$ -ом кадре, значит, неотмеченные клетки покинули область исследования [3].

Существует и третий вариант, когда клетки одновременно и покидают, и входят в область наблюдения. В таком случае применяется пороговое расстояние, что не позволяет согласовывать несвязанные клетки, если они слишком далеко друг от друга. Пакет также предполагает фильтрацию объектов по их размеру, что позволяет нейтрализовать негативное влияние потенциального шума и загрязнения рабочей области исследования, искажающие итоговую статистику.

III. УЛУЧШЕНИЕ КАЧЕСТВА ОТСЛЕЖИВАНИЯ

Исходная функциональность алгоритма без адаптации исчерпывает себя довольно рано. Так, не решена проблема недостаточной сегментации при слабой контрастности, когда клетки на реальной видеозаписи не находят отражения при сегментации. Данная трудность вызвана изменением размеров живой клетки и возможностью выхода за пределы заданного диапазона фильтрации, а также операцией эрозии, которая вместо сглаживания контуров клетки может разбить ее на несколько позднее фильтруемых частей. Решить эту проблему можно путем поиска соответствующей клетки на предыдущих кадрах, увеличивая пороговое расстояние между согласуемыми клетками с ростом глубины поиска.

Другой проблемой является учет при сегментации слияний и разделений клеток, что происходит довольно часто в живых клеточных популяциях. Для преодоления последствий потери или появления новых клеток в таком случае необходимо фиксирование момента слияния клеток, а также участников данного слияния. Отработка подобного сценария происходит при резком увеличении или уменьшении площади той или иной клетки, что является наиболее вероятным сигналом о слиянии или разделении клеток.

Наконец, в итоговой статистике есть объекты, ошибочно распознанные как клетки. Это возможно, если область исследования недостаточно очищена от различных загрязнений, которые также могут обладать высокой контрастностью на уровне фона. В таком случае предложена дополнительная фильтрация по изменению положения объектов со временем. Для объектов ре-

ализовано вычисление среднеквадратичного отклонения по обеим координатам, и если это изменение незначительно, то объект фильтруется.

Предложенные поправки позволили дополнить и усовершенствовать работу исходного пакета, а также значительно повысить качество отслеживания клеток в популяции.

IV. ПРОГРАММНАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ

Алгоритм представляет собой отдельный модуль MatLab. В программной реализации разработанного алгоритма представлена возможность отслеживания клеток. При сравнении с другими пакетами, в том числе с популярным приложением Celltrack, работающим на методе активных контуров, пакет показал лучшие результаты при сегментации. Программная реализация алгоритма позволяет легко отображать получаемые при отслеживании данные, оставаясь довольно простым и мощным инструментом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы было проведено полностью автоматическое отслеживание эмбриональных клеток мыши. Одним из наиболее важных параметров, характеризующих изменение фенотипа популяции, является изменение ее численного состава с течением времени, которое и было получено в результате использования предложенного метода. Также были получены такие характеристики, как средние значения скоростей и направлений движения клеток, их траектории, площади и эквивалентные радиусы, которые также могут быть использованы при изучении свойств живых клеточных популяций.

Разработанный метод отслеживания позволяет собирать информацию для получения представления о характере развития исследуемой популяции эмбриональных клеток мыши. В дальнейшем при поддержке Института генетики и цитологии НАН Беларуси [2] эти сведения будут использованы при разработке математической модели поведения и непосредственном моделировании данной клеточной популяции.

1. Дромашко, С. Е. Компьютерная видеомикроскопия живых клеток : учеб.-метод. пособие / С. Е. Дромашко – Минск : ИПНК, 2010. – 37 с.
2. Интернет-портал группы изучения процессов клеточного старения [Электронный ресурс] / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2013. – Режим доступа: <http://www.labmcp.at.tut.by>. – Дата доступа: 01.05.2013.
3. Yaeger S., Song Q., Chen S.-S. DYNAMIK: a software for cell DYNAMics, Motility, and Information tracking, with an application on Ras pathways / S. Yaeger, Q. Song, S.-S. Chen // Bioinformatics – 2009. – Vol. 25, № 18. – P. 2383–2388.
4. Meijering E., Dzyubachyk O., Smal I. Methods for cell and particle tracking / E. Meijering, O. Dzyubachyk, I. Smal // Elsevier – 2012. – Vol. 504, Ch. 9. – P. 183–200.
5. Гонсалес Р., Вудс Р., Эддинс С. цифровая обработка изображений в среде MATLAB / Р. Гонсалес, Р. Вудс, С. Эддинс – Москва : Техносфера, 2006. – 616 с.