

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ В БИОИЗОБРАЖЕНИЯХ

И. А. Качук

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, kachuk.irina@mail.ru
Научный руководитель – И. С. Эйсмонт, старший преподаватель*

Работа посвящена изучению основных подходов к локализации одиночных молекул в биоизображениях, основанных на флуоресцентной микроскопии, классических алгоритмах и машинном обучении, а также рассмотрению разработанного программного кода с реализацией алгоритма, позволяющего определять положение одиночных молекул в биоизображениях.

Ключевые слова: суперразрешающая флуоресцентная микроскопия; одиночные молекулы; биоизображения; локализация; фильтр Гаусса; анализ Фурье.

В связи с быстрым развитием технологий в областях биологии и медицины, важным направлением исследований является изучение структуры и функционирования биомолекул. Традиционные методы, такие как электронная микроскопия или рентгеноструктурный анализ, имеют свои ограничения и не всегда позволяют получить необходимую информацию о молекулах. Однако развитие суперразрешающей флуоресцентной микроскопии (SRM), преодолевающей дифракционный предел световой микроскопии, позволило получать изображения с нанометровой точностью и на их основе использовать различные подходы к локализации одиночных молекул.

К наиболее распространенным методам SRM относятся стохастическая оптическая реконструкция (STORM) и фотоаквационная локализационная микроскопия (PALM). Они используют последовательную активацию и деактивацию флуорофоров – молекул, поглощающих и испускающих свет на разных длинах волн; с дальнейшим определением их координат классическими алгоритмами [1, 2].

Классические алгоритмы локализации одиночных молекул включают различные математические и численные методы. Координаты молекул можно вычислить как с помощью гауссовой функции или центроидного метода, так и с помощью метода k-ближайших соседей или анализа Фурье [3]. Каждый из этих методов обеспечивает надежные способы изучения биоизображений и остаётся актуальным в биомедицинских исследованиях.

Кроме того, методы машинного обучения, особенно нейронные сети, такие как U-Net, становятся все более актуальными в задачах локализации

одиноким молекулам благодаря своей способности обучаться на больших наборах данных и выявлять сложные закономерности [4].

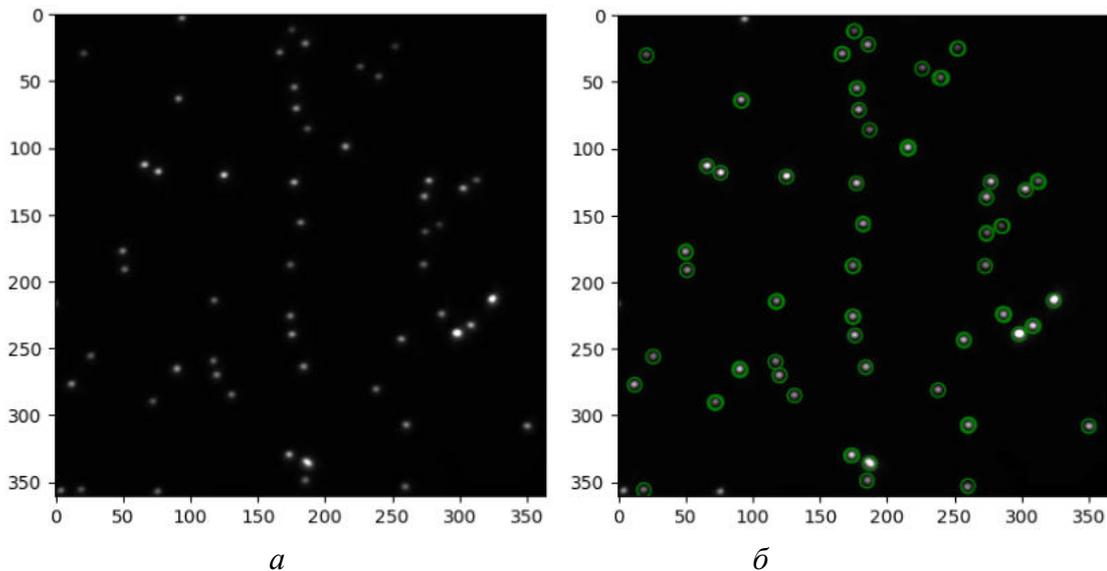
Знания о подходах к локализации одиночных молекул позволяют создать программный код, способный определять точное положение и координаты молекул на основе изображений, полученных методом флуоресцентной микроскопии. Для этого используется язык программирования Python и набор библиотек для работы с изображениями и численными данными.

Первым шагом в работе с биоизображениями является их обработка. Для выделения особенностей изображения применяется разностный фильтр Гаусса. Он основан на идее вычитания одного размытого изображения из другого с более широким размытием. Размытие применяется для сглаживания изображения и уменьшения шума с использованием двумерной функции Гаусса:

Применение фильтра Гаусса к изображению с помощью встроенной функции `gaussian_filter` из модуля `scipy.ndimage` заключается в свертке изображения с Гауссовым ядром. Размер ядра определяется эмпирически и обычно выбирается так, чтобы оно покрывало большинство значений функции. Для двух размытых изображений $G_1(x, y)$ и $G_2(x, y)$ с разными значениями параметров размытия, разностный фильтр Гаусса определяется как разность $G_1(x, y) - G_2(x, y)$.

Этот фильтр может быть полезен для медицинских изображений в качестве обнаружения опухолей разных размеров, благодаря способности выявления деталей на разных уровнях разрешения.

Следующим шагом в обработке изображения является поиск локальных максимумов с помощью функции `peak_local_max` из библиотеки `skimage.feature` и их частичное удаление на краях изображений во избежание ошибок и артефактов, связанных с обработкой граничных областей. В качестве порогового значения используется параметр, кратный стандартному отклонению отфильтрованного изображения. Функция отбрасывает все пиксели, значения которых ниже заданного порога. Процесс поиска максимума сводится к анализу локальной окрестности для каждой точки. Если значение в данной точке превышает значения всех ее соседей и превышает установленное пороговое значение, то она считается локальным максимумом. В результате получается массив координат найденных одиночных молекул. Визуализация полученных результатов представлена на рисунке.



Результаты локализации одиночных молекул:
a – исходное изображение; *б* – отображение найденных локальных максимумов

Для получения более точных координат можно использовать субпиксельную локализацию с анализом Фурье для преобразования изображения в частотную область. Важным этапом является выделение областей интереса для каждого локального максимума с заданным значением окна, что позволяет сосредоточиться на местах, в которых находятся необходимые для исследования объекты.

Над каждой областью интереса выполняется двумерное быстрое преобразование Фурье с помощью функции `fft.fft2` из библиотеки `numpy`. В результате применения функции получается комплексный массив того же размера, что массив области интереса, где каждый элемент содержит амплитуду и фазу соответствующей частотной компоненты. Для субпиксельных значений x и y вычисляется фазовый угол как арктангенс отношения мнимой части к действительной. Правильный результат достигается с помощью корректировки на π и 2π дополнительных углов, выходящих за пределы диапазона $[-\pi; \pi]$. Субпиксельное смещение вычисляется как отношение абсолютного значения фазового угла к размеру шага дискретизации частотного пространства, который равен $\frac{2\pi}{N}$, где N – размер окна области интереса. А окончательные субпиксельные координаты вычисляются путем добавления субпиксельных смещений к центру области интереса [5].

В таблице приведены численные значения как пиксельных, так и субпиксельных координат найденных одиночных молекул в количестве 10 образцов из 51.

Координаты молекул

№	Пиксельные координаты	Субпиксельные координаты
1	(239; 298)	(239,4158; 298,6532)
2	(213; 324)	(213,9696; 324,8074)
3	(336; 187)	(336,2918; 187, 4396)
4	(121; 126)	(121,2700; 125,7616)
5	(113; 66)	(113,5238; 66,5708)
6	(118; 76)	(118,6688; 76,8099)
7	(330; 173)	(330,4426; 174,1017)
8	(233; 309)	(233,3703; 308,7814)
9	(99; 215)	(100,0004; 215,9166)
10	(131; 302)	(131,1914; 303,1351)

Результат работы показывает, что алгоритм, реализованный в рамках программного кода на языке Python, эффективно решает задачу локализации одиночных молекул в биоизображениях. Выделение областей интереса вокруг локальных максимумов позволяет детально исследовать снимок, а использование разностного фильтра Гаусса и субпиксельной локализации молекул на основе анализа Фурье предоставляет возможность выделять и точно определять положение молекул. Рассмотренная реализация алгоритма может способствовать повышению качества анализа биоизображений, подтверждая свою актуальность в рамках биомедицинских исследований.

Библиографические ссылки

1. *Small A., Stahlheber S.* Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy / A. Small, S. Stahlheber // *Nature Methods*. 2014. Vol. 11. P. 267-279. DOI: 10.1038/nmeth.2844.
2. *Herbert S.* Single-Molecule Localization Super-Resolution Microscopy: Deeper and Faster / S. Herbert, H. Soares, C. Zimmer, R. Henriques // *Microscopy and Microanalysis*. 2012. Vol. 18, № 6. P. 419-429. DOI: 10.1017/S1431927612013347.
3. *Balzer B.N., Hugel T.* Single-Molecule Detection and Manipulation / B.N. Balzer, T. Hugel // *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. 2012. Vol. 2. P. 629-645. DOI: 10.1016/B978-0-12-803581-8.01334-5.
4. *Ronneberger O.* U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation / O. Ronneberger, P. Fischer, T. Brox // *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015: materials of 18th International Conference, München, October 5-9, 2015 : Part III / Lecture Notes in Computer Science, Volume 9351; eds.: N. Navab, J. Hornegger, W. M. Wells, A. F. Frangi*. Springer, 2015. P. 234-241.
5. *Martens K. J. A.* Phasor based single-molecule localization microscopy in 3D (pSMLM-3D): An algorithm for MHz localization rates using standard CPUs / K. J. A. Martens, A. N. Bader, S. Baas, B. Rieger, J. Hohlbein // *The Journal of Chemical Physics*. 2018. Vol. 148, iss. 12, № 123311. P. 1-6. DOI: 10.1063/1.5005899.