

АЛГОРИТМ ОТСЛЕЖИВАНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЫШИ

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

Белорусский государственный университет

Минск, Беларусь

E-mail: maxshitik@mail.ru

Компьютерная видеомикроскопия – перспективный метод 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 клеток могут ускорить и повысить эффективность анализа видеозаписей, снизить субъективность проводимых экспериментов.

Представлен полностью автоматический метод отслеживания клеток, с помощью которого удалось оценить изменение численного состава популяции эмбриональных клеток мыши, получить ряд данных о характере развития исследуемой популяции.

Ключевые слова: компьютерная видеомикроскопия, эмбриональные клетки, фибробласты, клеточное старение, рак, отслеживание, трэкинг.

Введение

Компьютерная видеомикроскопия живых клеточных культур – перспективный современный метод исследования таких фундаментальных 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 культивируемые клетки на основе круглосуточной компьютерной видеозаписи в течение ряда дней [2].

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

Однако подобное сравнение изменений, происходящих в клеточных популяциях, значительно усложняется в связи с большим объемом входных данных и является 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.

Проблемы отслеживания

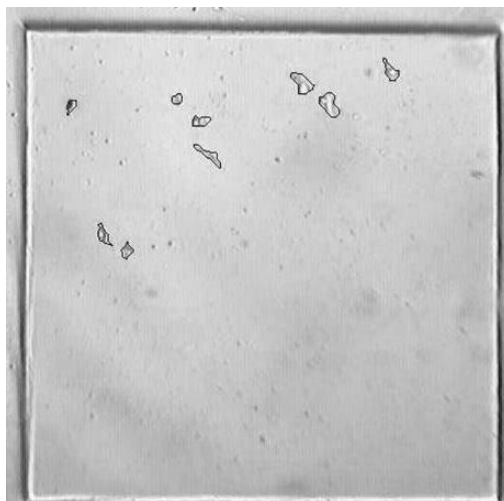
Среди наиболее характерных проблем при обработке видеозаписей живых клеточных популяций выделяются низкий уровень контрастности и неоднородное распределение интенсивности, в результате которого части клетки могут иметь ту же интенсивность, что и фон на изображении. Это приводит к тому, что клетки кажутся меньше по размерам или распадаются на несколько отдельных компонент [3–4].

Проблемой остается и огромное разнообразие форм клеток. Многие типы клеток способны изменять форму и размер со временем. Клетки не всегда двигаются только в области, фиксируемой камерой, могут также демонстрировать нестабильное поведение в зависимости от экспериментальной установки, настроек камеры (в случае видеомикроскопии с заданным интервалом получения изображений) или биологических процессов, протекающих в клетках. Так, перескакивания, резкие остановки и смены направлений движения – характерные проблемы для преодоления методами автоматического отслеживания клеточных популяций [2].

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

Алгоритм отслеживания

Предложенный метод основан на сегментации и предполагает последовательную индивидуальную обработку каждого кадра видеозаписи. Для каждой сегментированной в кадре клетки ищется ее предшествующее состояние в предыдущих кадрах и устанавливается соответствие между ними во времени [3–4]. Поиск клеток происходит в результате серии шагов предобработки изображения, представляющей собой совокупность фильтрации, определения перепадов интенсивности и морфологических операций. Начинается он с фильтрации типа «соль и перец», производимой при помощи двухмерного медианного фильтра [5]. Затем для получения контуров клеток применяется сегментация с помощью детектора Собела [5] и задания порогового уровня [5]. Завершается предобработка удалением любых оставшихся шумов во внутренней области клеток и сглаживанием полученных контуров посредством операции эрозии [5]. Каждая выделенная клетка описывается определенным набором параметров, которые вносятся в отдельную таблицу с выходными данными. Также фиксируется и отдельно записывается изображение каждого кадра с отсегментированными в нем клетками, как указано на рисунке.



Результат сегментации эмбриональных клеток мыши

Метод использует поиск соответствующих клеток на соседних кадрах по принципу «ближайшего соседа». Согласно этому принципу, клетка в i -м кадре будет находиться на наименьшем расстоянии от той же переместившейся клетки среди всех клеток на $(i + 1)$ -м кадре. Проблема отслеживания в данном случае ограничивается только поиском ближайших пар клеток в двух соседних кадрах, что является классической задачей согласования клеток. Если количество клеток в $(i + 1)$ -м кадре превышает их значение в i -ом кадре, то это может означать, что в области наблюдения появились новые, ранее не отмеченные клетки. Если же количество клеток в i -м кадре больше, чем в $(i + 1)$ -м 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 значение расстояния, что не позволяет отмечать несвязанные клетки как соответствующие, 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.

Улучшение качества отслеживания

Исходная функциональность алгоритма без адаптации исчерпывает себя довольно рано. Так, не решена проблема недостаточной сегментации при слабой контрастности, когда клетки, присутствующие на реальной видеозаписи, не находят отражения при сегментации. Это приводит к пропуску некоторых существующих клеток. Данная трудность может быть вызвана изменением размеров живой клетки и возможностью выхода за пределы заранее заданного диапазона фильтрации. В данном случае такие небольшие области воспринимаются как шум и могут не учитываться. К аналогичному эффекту может привести операция эрозии, которая вместо сглаживания контуров сегментированной клетки может разбить ее на несколько впоследствии фильтруемых частей. Решить эту проблему можно путем поиска соответствующей клетки на предыдущих кадрах, увеличивая пороговое расстояние между согласуемыми клетками с ростом глубины поиска.

Другая проблема – учет слияний и разделений клеток при сегментации. При контакте двух клеток, который происходит довольно часто в живых клеточных популяциях, если не учитывать данный эффект, то одна или более из входящих в контакт клеток будет теряться в итоговой статистике, а после разделения клеток, наоборот, будет фиксироваться появление абсолютно новой клетки. 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, это наиболее вероятный сигнал о слиянии или разделении клеток.

Наконец, в итоговой статистике присутствуют объекты, ошибочно распознанные как клетки. Это возможно, если область исследования недостаточно очищена от различного «мусора», который к тому же может обладать высокой контрастностью на уровне фона. В таком случае предложена дополнительная фильтрация объектов по изменению их положения со временем. Для фиксируемых объектов реализовано вычисление среднеквадратичного отклонения по обеим координатам, и если их изменение незначительно, то для объекта будет проведена фильтрация.

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

Программная реализация

Алгоритм был реализован в виде отдельного модуля MatLab.

В программной реализации разработанного алгоритма реализована возможность отслеживания клеток. При сравнении с другими пакетами, в том числе с популярным приложением Celltrack [6], работающем на методе активных контуров, пакет показал лучшие результаты при сегментации. Программная реализация алгоритма позволяет легко отображать получаемые при отслеживании данные, оставаясь при этом довольно простым и мощным инструментом.

Результаты

В ходе выполнения работы было проведено полностью автоматическое отслеживание эмбриональных клеток мыши. Один из наиболее важных параметров, характеризующих изменение фенотипа популяции, – 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 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.

Библиографические ссылки

1. *Дромашко С. Е.* Компьютерная видеомикроскопия живых клеток : учеб.-метод. пособие. Минск : ИПНК, 2010.
2. Интернет-портал группы изучения процессов клеточного старения [Электронный ресурс] / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси Минск, 2013. Режим доступа : <http://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 // *Bioinformatics* 2009. V. 25. № 18. P. 2383–2388.
4. *Meijering E., Dzyubachyk O., Smal I.* Methods for cell and particle tracking // Elsevier 2012. V. 504. Ch. 9. P. 183–200.
5. *Гонсалес Р., Вудс Р., Эддингс С.* Цифровая обработка изображений в среде MATLAB. М. : Техносфера, 2006.
6. *Sacan A., Ferhatosmanoglu H., Coskun H.* CellTrack: an open-source software for cell tracking and motility analysis // *Bioinformatics* 2008. V. 24. № 4. P. 20–33.