

09.6;14

## Разработка алгоритмов сегментации в голографической микроскопии и томографии для определения морфологических параметров клеток

© А.В. Белашов<sup>1</sup>, Д.А. Горбенко<sup>1,2</sup>, А.А. Жихорева<sup>1</sup>, Т.Н. Беляева<sup>3</sup>, Е.С. Корнилова<sup>3</sup>,  
И.В. Семенова<sup>1</sup>, О.С. Васютинский<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (Университет ИТМО), Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: belashov.andrey.93@gmail.com

Поступило в Редакцию 15 июля 2019 г.

В окончательной редакции 24 июля 2019 г.

Принято к публикации 24 июля 2019 г.

Разработаны алгоритмы сегментации клеток на двумерных фазовых изображениях и трехмерных распределениях показателя преломления, полученных соответственно методами цифровой голографической микроскопии и томографии. Алгоритмы оптимизированы для определения морфологических параметров клеток, в том числе объема, площади проекции, площади поверхности. Проведен сравнительный анализ погрешности определения объема клеток голографическими методами с использованием разработанных алгоритмов сегментации и эталонным методом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

**Ключевые слова:** голографическая микроскопия, голографическая томография, морфологические характеристики клеток, сегментация клеток.

DOI: 10.21883/PJTF.2019.22.48644.17980

На данный момент исследование многих внутриклеточных процессов проводится с помощью методов флуоресцентной микроскопии, позволяющих производить детектирование и определение области локализации многих органических соединений посредством иммунофлуоресцентного анализа [1]. Большое количество флуорофоров, специфичных к различным типам белков, участвующих в важных биологических процессах, и быстрое развитие технологий повышения пространственного разрешения во флуоресцентной микроскопии [2] делают такие методы анализа живых клеток незаменимыми при изучении многих биологических процессов. Вместе с тем подходы, основанные на анализе морфологических характеристик клеток, по-прежнему остаются актуальными и информативными как при использовании в клинической практике [3], так и в фундаментальных биологических исследованиях [4].

В настоящее время общепринятым и наиболее надежным методом определения объема, площади поверхности мембраны, индекса сферичности и некоторых других морфологических параметров клеток является конфокальная флуоресцентная микроскопия. Измерения обычно проводят с использованием флуоресцентного красителя акридинового оранжевого, который связывается с ДНК и РНК в живых клетках и интенсивно флуоресцирует при облучении в полосе 460–500 nm. Его накопление как в области мембраны, так и внутри клетки позволяет построить трехмерное внутриклеточное распределение молекул красителя и на его основе определить морфологические параметры клетки [5].

Однако необходимость введения флуорофоров в клетки и воздействие интенсивного лазерного излучения, используемого в конфокальной флуоресцентной микроскопии для их возбуждения, не позволяют проводить длительный мониторинг живых клеток [6]. В настоящей работе нами разработаны алгоритмы автоматической сегментации клеток на двумерных фазовых изображениях и трехмерных распределениях показателя преломления, полученных соответственно методами цифровой голографической микроскопии и томографии. Алгоритмы оптимизированы для определения морфологических параметров клеток.

Цифровая голографическая микроскопия позволяет восстанавливать фазовые изображения отдельных клеток и проводить их неинвазивный мониторинг в течение продолжительного времени. Определение морфологических характеристик клеток на основе их фазовых изображений может быть выполнено в предположении постоянства показателя преломления внутри клетки. Для прикрепленных клеток можно полагать, что нижняя часть поверхности мембраны клетки представляет собой плоскость с  $Z = 0$ , а верхняя часть может быть описана уравнением

$$Z(x, y) = \frac{\lambda}{2\pi} (n_{media} - n_{cell})\varphi(x, y), \quad (1)$$

где средний показатель преломления клетки  $n_{cell}$  считается постоянным (для фиксированных клеток  $n_{cell} = 1.478$  [7]), а  $n_{media}$  — показатель преломления среды. Исходя из полученных данных о распределении

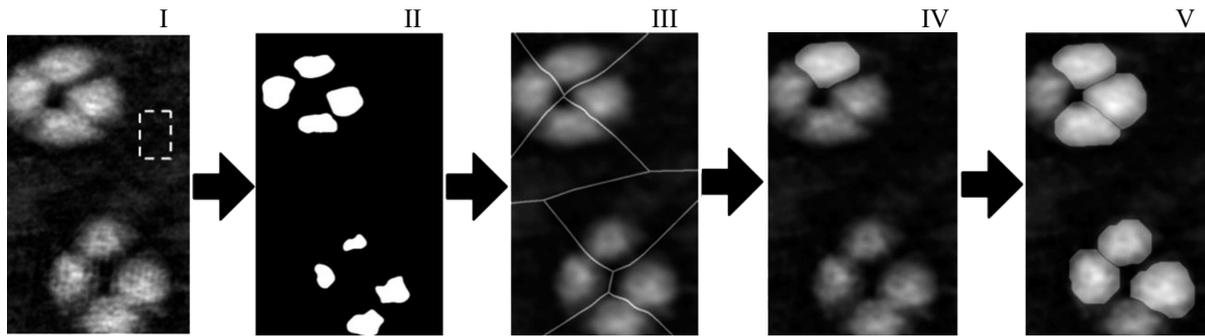


Рис. 1. Схема процесса сегментации клеток на фазовых изображениях.

фазового запаздывания  $\varphi(x, y)$ , внесенного клеткой в волновой фронт, могут быть определены основные морфологические параметры клетки, в том числе ее объем

$$V_{cell} = \int_{cell} \frac{\lambda}{2\pi} (n_{media} - n_{cell}) \varphi(x, y) dx dy \quad (2)$$

и полная площадь поверхности мембраны

$$S_{membrane} = \int_{cell} \sqrt{1 + \frac{\partial Z(x, y)^2}{\partial x^2} + \frac{\partial Z(x, y)^2}{\partial y^2}} dx dy + \int_{cell} dx dy. \quad (3)$$

Первое слагаемое в уравнении (3) представляет собой площадь верхней части поверхности мембраны, а второе слагаемое — площадь нижней, прикрепленной ее части.

Для осуществления автоматизированной сегментации клеток на фазовых изображениях, полученных в голографическом микроскопе, нами была разработана процедура, включающая пять этапов (рис. 1). Вначале (I) последовательным сканированием всего фазового изображения производится поиск области с наименьшим градиентом фазового набега, соответствующей области без клеток. Затем (II) определяется положение локальных максимумов, вокруг которых формируются маски, обозначающие примерное положение клеток. После этого (III) с использованием преобразований, описанных в работе [8], строятся разграничительные линии, разделяющие близкорасположенные клетки. Далее (IV) для определения точных границ клеток локальный максимум каждой из них расширяется с учетом разделяющих линий до тех пор, пока средний фазовый набег приращенной области не будет сравним с набегом области нормировки, найденной на первом шаге алгоритма. На последнем этапе (V) выполняется удаление клеток, соприкасающихся с границей фазового изображения.

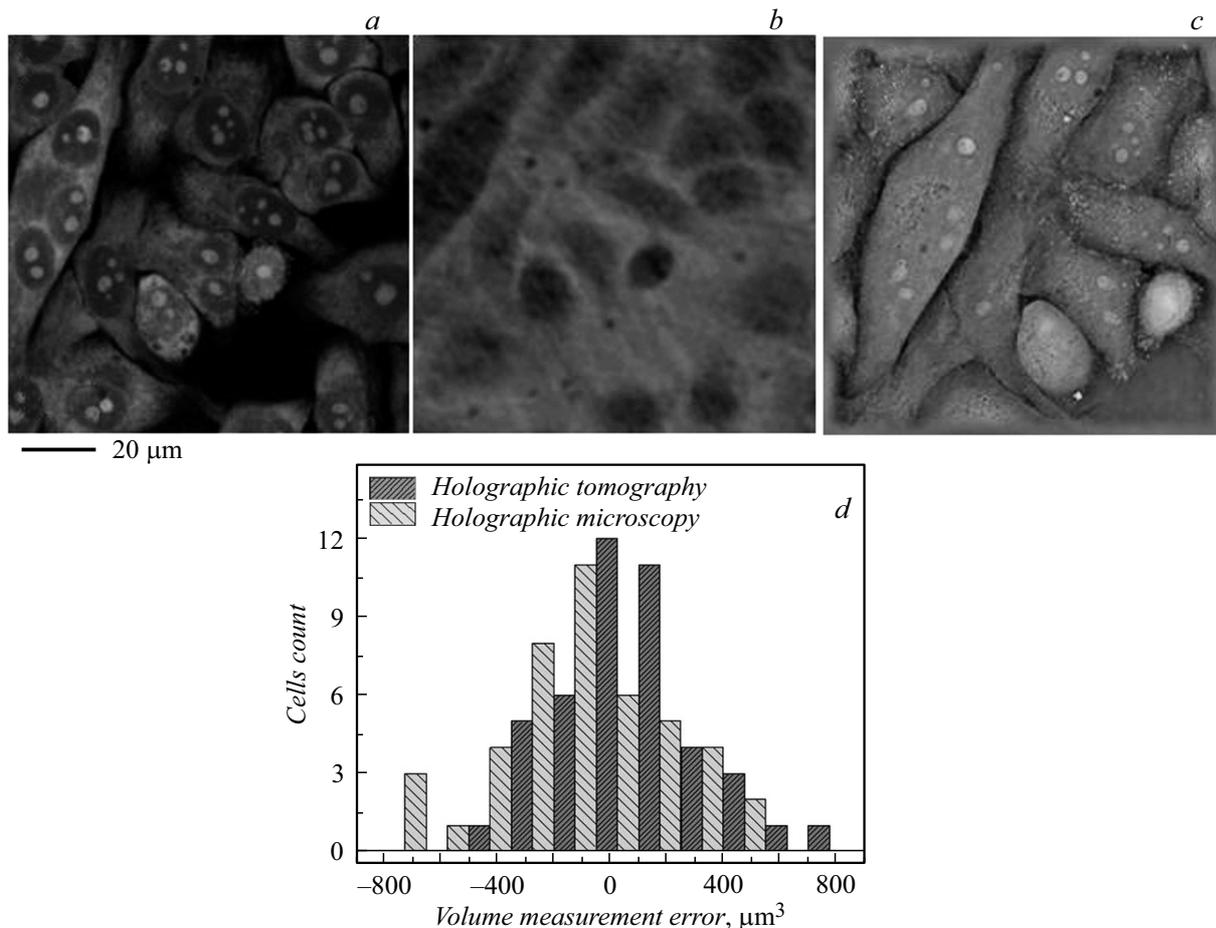
При реализации метода голографической томографии, основанного на регистрации и восстановлении набора из нескольких десятков цифровых голограмм, зарегистрированных при различных углах падения предметной

волны на исследуемый объект, может быть получен массив данных о трехмерном распределении показателя преломления в образце [9,10]. Важным отличием цифровой голографической томографии от традиционного метода конфокальной флуоресцентной микроскопии является то, что первый подход требует регистрации нескольких десятков цифровых голограмм, в то время как полное сканирование образца клеточных культур флуоресцентным методом требует большого числа отдельных измерений. В результате время регистрации необходимого набора данных в голографической томографии не превышает нескольких секунд, а время регистрации трехмерного распределения флуорофора в образце составляет порядка нескольких минут. Однако использование методов голографической томографии требует численной обработки полученных данных и решения обратной задачи восстановления трехмерного массива данных из набора двумерных проекций, в то время как пространственное распределение флуорофора может быть получено напрямую без дополнительных вычислений. Это приводит к значительно более простой процедуре сегментации клеток при обработке данных, полученных с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии [5]. Кроме того, численная обработка томографических данных зачастую приводит к искажениям в наблюдаемых массивах данных, особенно при построении изображений в сечениях XZ и YZ. Для повышения точности сегментации клеток на трехмерных распределениях показателя преломления нами было предложено использовать сегментацию, основанную не на показателе преломления, а на его градиенте.

Предлагаемый алгоритм работает следующим образом.

1. Исследуемая клетка приблизительно выделяется на сечениях XY и XZ, при этом точное определение границ клетки основывается на градиенте ее показателя преломления, что особенно важно при определении краев клетки по оси Z.

2. Затем включаются также те пиксели сегментируемой области, которые имеют достаточно большой показатель преломления, заведомо присущий лишь клеточным структурам.



**Рис. 2.** Примеры изображений одной и той же группы клеток, полученных с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (*a*), цифровой голографической микроскопии (*b*), голографической томографии (*c*). *d* — статистическое распределение ошибок определения объема клеток линии HeLa при их измерении методами голографической микроскопии и томографии.

3. Кроме того, в класс объектов, принадлежащих клетке, необходимо включить также полости, полностью или частично (на 70–80%) окруженные сегментированными структурами. Это связано с тем, что в нормальном состоянии мембрана клетки представляет собой выпуклую оболочку.

Последний (третий) этап алгоритма может быть исключен из процесса сегментации, если проводится обработка фазовых изображений клеток с существенно искаженной морфологией, например в ходе процессов деления или некроза.

Описанные выше алгоритмы сегментации и определения объема клеток были апробированы в эксперименте, в рамках которого производилось исследование одних и тех же групп клеток в фиксированном образце клеток HeLa методами голографической микроскопии, томографии и конфокальной флуоресцентной микроскопии (рис. 2, *a–c*). Измерения проводились на лабораторной установке голографического микроскопа (см. [4,7]), голографическом томографическом микроскопе 3D Cell Explorer (Nanolive) и конфокальном флуоресцентном микроскопе Leica TCS SP5.

Результаты определения объема клеток голографическими методами сравнивались с данными, полученными с помощью метода конфокальной флуоресцентной микроскопии, ошибка определения объема которым не превышает 5% [5]. Полученное статистическое распределение отклонения объема клеток, измеренного голографическими методами, от результатов измерений флуоресцентным методом представлено на рис. 2, *d*. Сравнительный анализ полученных результатов дает погрешность измерения объема методом голографической микроскопии  $\sigma_{\text{ДНМ}} = 278 \mu\text{m}^3$  и томографии  $\sigma_{\text{ДНТ}} = 321 \mu\text{m}^3$  при относительных погрешностях  $\delta_{\text{ДНМ}} = 12.8\%$  и  $\delta_{\text{ДНТ}} = 14.3\%$ . Несколько большее значение погрешности в методе голографической томографии, вероятно, обусловлено более сложными процессами сегментации клеток в трехмерном пространстве. С другой стороны, для точного определения морфологических параметров в случае использования голографической микроскопии требуется знание среднего показателя преломления клеток, что несколько ограничивает сферу применимости данного метода.

Таким образом, нами разработаны алгоритмы автоматической сегментации отдельных клеток на фазовых изображениях и трехмерных распределениях показателя преломления. Ошибки измерения объема клеток линии HeLa не превышали 15%, что свидетельствует о том, что цифровая голографическая микроскопия и томография могут быть успешно использованы для определения морфологических характеристик клеток. Существенными достоинствами голографических методов являются неинвазивность и возможность длительного наблюдения изменений живых клеток в динамике.

### Финансирование работы

А.В. Белашов благодарит Совет по грантам Президента РФ за финансовую поддержку (проект СП-2349.2019.4).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Список литературы

- [1] *Hu Y., Murphy R.F.* // *J. Immunolog. Meth.* 2004. V. 290. N 1-2. P. 93–105.
- [2] *Huang B., Bates M., Zhuang X.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2009. V. 8. N 1. P. 993–1016.
- [3] *Sherwin T., Brookes N.H.* // *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2004. V. 32. N 2. P. 211–217.
- [4] *Zhikhoreva A.A., Belashov A.V., Bepalov V.G., Semenov A.L., Semenova I.V., Tochilnikov G.V., Zhilinskaya N.T., Vasyutinskii O.S.* // *Biomed. Opt. Express.* 2018. V. 9. N 11. P. 5817–5827.
- [5] *Blatter L.A.* // *Meth. Enzymology.* 1999. V. 307. P. 274–295.
- [6] *Icha J., Weber M., Waters J.C., Norden C.* // *BioEssays.* 2017. V. 39. N 8. P. 1700003.
- [7] *Belashov A.V., Zhikhoreva A.A., Bepalov V.G., Novik V.I., Zhilinskaya N.T., Semenova I.V., Vasyutinskii O.S.* // *J. Opt. Soc. Am. B.* 2017. V. 34. N 12. P. 2538–2543.
- [8] *Meyer F.* // *Signal Process.* 1994. V. 38. P. 113–125.
- [9] *Belashov A.V., Petrov N.V., Semenova I.V.* // *Appl. Opt.* 2016. V. 55. N 1. P. 81–88.
- [10] *Kujawińska M., Krauze W., Baczevska M., Kuś A., Ziemczonok M.* // *Quantitative Phase Imaging V.* 2019. V. 10887. P. 1088708.