Метод автоматизированного отслеживания морфологии астроцитов *in vitro* на основе фазово-контрастной микроскопии и глубокого обучения

© И.В. Симкин [1], Т.Е. Щевелева [1], Н.А. Колотьева [1,2], С.В. Новикова [1,2], А.А. Симкина [1], Е.В. Яковлев [1], С.О. Юрченко [1], А.Б. Салмина [1,2], Н.П. Крючков [1]

[1] Московский государственный технический университет им. Н Э. Баумана,
Москва, Россия
[2] ФГБНУ Российский центр неврологии и нейронаук,
Москва, Россия

e-mail: vanyasimkin@gmail.com

Поступила в редакцию 14.11.2025 г.
В окончательной редакции 19.11.2025 г.
Принята к публикации 27.03.2026 г.

Представлен усовершенствованный метод автоматической сегментации и морфометрического анализа фазово-контрастных изображений астроцитов, основанный на архитектуре сверточной нейронной сети. Метод был оптимизирован с помощью автоматического подбора гиперпараметров и достигнут коэффициент Дайса 0.73 на тестовом наборе данных. Разработанный подход позволяет автоматически выделять тело астроцита и его отростки, а также проводить точные измерения ключевых морфологических параметров (площадь, длина и ветвление отростков) в динамике. Фазово-контрастная микроскопия как неинвазивный оптический метод лежит в основе разработанного подхода, обеспечивая возможность анализа морфологии астроцитов в реальном времени.

Ключевые слова: фазово-контрастная микроскопия, машинное обучение, сегментация изображений, YOLOv11, астроциты, морфометрический анализ, оптическая биофотоника.

DOI: 10.61011/OS.2026.05.63341.61-25

Введение

Астроциты представляют собой особый тип клеток с разветвленной структурой, которые играют важную роль в таких жизненно важных процессах, как поддержание структурно-функциональной целостности нейронов, нейропластичность, формирование синапсов, регуляция кровотока, энергообеспечения и метаболизма. Являясь гликолитически активными клетками в центральной нервной системы (ЦНС), они обеспечивают нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение, удовлетворяя метаболические потребности стимулированных нейронов, контролируют локальную микроциркуляцию [1]. Кроме того, астроциты являются эффекторными клетками при нейровоспалении. Во время воспалительных процессов астроциты активируются, что изменяет их функции. Это изменение связано с их способностью к иммунонаблюдению, включая презентацию антигенов и продукцию цитокинов, что позволяет им влиять на проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [2]. Взаимодействие астроцитов с белками внеклеточного матрикса критично для поддержания целостности ГЭБ [3]. Кроме того, морфология астроцитов отражает их метаболический статус. Нарушение метаболической пластичности астроцитов, изменение их структуры и функциональной активности наблюдаются при черепно-мозговых травмах, инсультах, нейродегенерации и нейровоспалении [4, 5]. Таким образом, анализ морфологии астроцитов in vitro крайне важен для лучшего понимания вклада астроглии в регуляцию функций мозга и патогенез заболеваний ЦНС.

Традиционные методы морфологического анализа, основанные на фиксации и иммуноцитохимическом окрашивании клеток, являются инвазивными и не позволяют проводить повторное наблюдение за одними и теми же живыми клетками в процессе их роста и функциональной активности. Более того, эти процедуры могут сами по себе влиять на тонкие морфологические признаки клеток [6]. Решение этой проблемы лежит в использовании неинвазивных методов оптической микроскопии, среди которых фазово-контрастная визуализация является одним из наиболее эффективных инструментов для наблюдения за живыми клетками в реальном времени без необходимости их окрашивания [7].

Фазово-контрастная микроскопия, несомненно, остаётся одним из наиболее доступных и широко применяемых неинвазивных методов визуализации живых клеток *in vitro*. Однако в последние десятилетия развитие оптических технологий и биофотоники привело к появлению ряда альтернативных подходов, которые используются для изучения морфологического и метаболического состояния клеток без необходимости их фиксации или окрашивания. Одним из таких методов является цифровая голографическая микроскопия (DHIM), относящаяся к количественной интерференционной микроскопии. Этот метод позволяет в режиме реального времени

получать данные об объёмном распределении показателя преломления объекта, отражающего не только его морфологические особенности, но и функциональное состояние [8–10].

Другим перспективным направлением является флуоресцентная микроскопия с измерением времени жизни флуоресценции (FLIM), которая позволяет судить о пространственном распределение эндогенной флуоресценции коферментов клеточного метаболизма — NAD(P)H и FAD. Соотношение свободной и белок-связанной форм NADH, оцениваемое по времени жизни флуоресценции, служит чувствительным индикатором метаболического статуса клетки, позволяя неинвазивно дифференцировать гликолитический и окислительный пути энергетического метаболизма без введения экзогенных зондов. Этот подход особенно актуален для анализа метаболической пластичности клеток нейроваскулярной единицы при нейровоспалении, гипоксии и нейродегенеративных состояниях [11,12].

Для оценки редокс-состояния митохондрий и функциональной активности дыхательной цепи применяется спектроскопия комбинационного рассеяния света с поверхностным усилением (SERS). Этот метод позволяет в реальном времени отслеживать окислительно-восстановительные переходы и конформационные изменения цитохромов в живых митохондриях, обеспечивая уникальную возможность изучения митохондриальной дисфункции при клеточном стрессе [11,13].

Рамановская микроскопия позволяет получать информацию о биохимическом составе клеток на основе неупругого рассеяния света. Благодаря высокой чувствительности этот метод позволяет выявлять тонкие изменения в липидном, белковом и нуклеиновом составе клеток, ассоциированные с окислительным стрессом, воспалением или дифференцировкой [14].

Несмотря на стремительное развитие перечисленных методов визуализации, для решения задач нашего исследования был выбран метод фазово-контрастной микроскопии. Это решение обусловлено его простотой, доступностью и минимальным воздействием на живые клетки, что является критически важным для поставленных экспериментальных целей. Тем не менее автоматический количественный анализ фазово-контрастных изображений представляет собой серьезную вычислительную задачу. Сложная и низкоконтрастная морфология астроцитов делает неприменимыми многие стандартные алгоритмы обработки изображений. В связи с этим перспективным направлением является применение методов машинного обучения, в частности сверточных нейронных сетей (CNN), которые показали высокую эффективность в задачах семантической сегментации биологических объектов [15,16]. В работе [17] был представлен подход к сегментации астроцитов на основе архитектуры Mask R-CNN (Region-Based Convolutional Neural Network) и продемонстрирована принципиальная возможность использования CNN для автоматического выделения тел клеток и их отростков на фазово-контрастных изображениях с точностью 0.72 по коэффициенту Дайса. В настоящем исследовании данный подход был существенно усовершенствован за счет применения более современной архитектуры YOLOv11 (You Only Look Once version 11) [18] и оптимизации гиперпараметров, что позволило повысить точность сегментации и эффективность метода. В настоящей работе представлен усовершенствованный метод автоматической сегментации для морфологического анализа астроцитов, основанный на современной архитектуре YOLOv11. Значение коэффициента Дайса на тестовой выборке составило 0.73. Разработанный подход обеспечивает автоматическое выделение тела клетки и ее отростков, а также точное измерение ключевых морфологических параметров, что открывает новые возможности для анализа клеточных культур с помощью неразрушающей технологии.

Материалы и методы

Получение и культивирование первичной культуры астроцитов

Культуру астроцитов получали из крыс линии Wistar (PD 1-2) методом ферментно-механической диссоциации [19]. Выделенные структуры промывали фосфатным буфером (PBS pH 7.4, Gibco Life Technologies, США), лишенным ионов кальция и магния, инкубировали 15 min при 37°C в растворе трипсина концентрацией 0.05% и растворе ЭДТА концентрацией 0.02% (Gibco Life Technologies, США), инактивировали средой. Диссоциировали механическим ступенчатым пипетированием в среде культивирования. Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла (MEM, Gibco, Великобритания), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Великобритания), 2 mM GlutaMAX (Gibco, Великобритания), 10 mM буфера HEPES (Sigma, США), pH 7.2–7.4. Суспензию клеток высаживали в два культуральных флакона T-25. Культуры развивались в CO_2-инкубаторе (RWD Life Science, КНР) при 37°C, 5% CO_2 и относительной влажности 98%. После образования монослоя астроцитарные культуры пересаживали в 96-луночные пластиковые планшеты (Servicebio, КНР) по 100 μL суспензии, содержащей $2 \cdot 10^6$ cells/mL. Подсчет клеток и определение жизнеспособности проводили на автоматическом счетчике Countess automated cell counter (Invitrogen).

Фазово-контрастная микроскопия и сбор данных

Морфология живых астроцитов в нативном состоянии изучалась с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 1, *a*). Для долгосрочного наблюдения за динамикой роста использовалась система визуализации EVOS M7000 (рис. 1, *b*) (TermoFisher Scientific, США) со встроенным инкубатором, поддерживающим

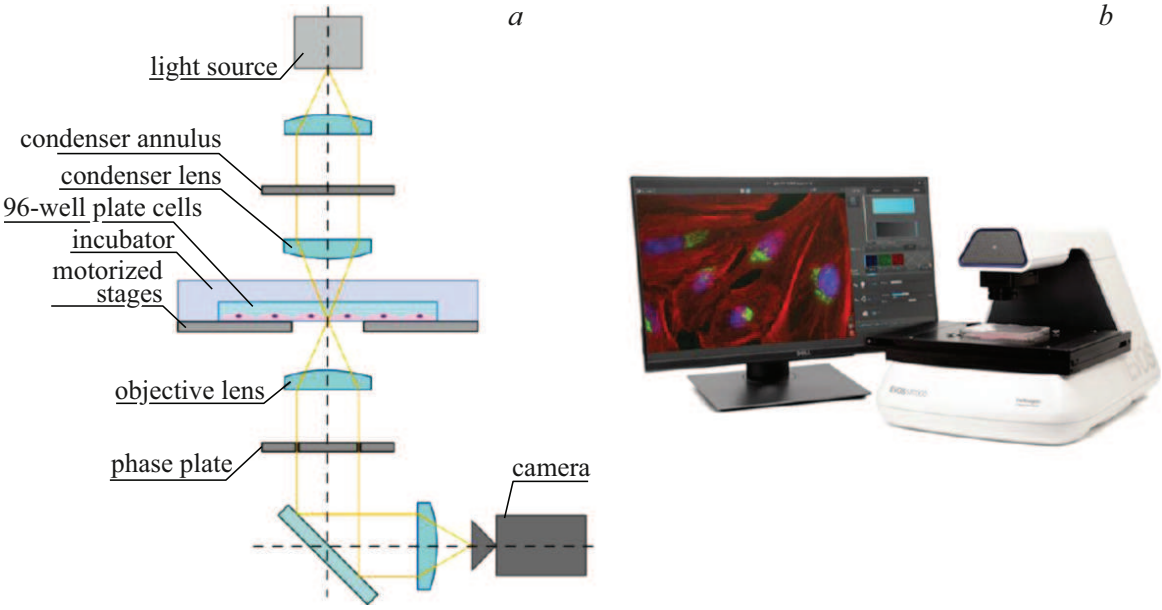

Рис. 1. Схема экспериментальной установки для фазово-контрастной микроскопии живых клеток. (*a*) Принципиальная оптическая схема фазово-контрастного микроскопа: свет от источника проходит через конденсорное кольцо и линзу конденсора, освещает клетки в 96-луночном планшете, после чего собирается объективом. (*b*) Внешний вид автоматического микроскопа EVOS M7000, использованного в работе.

условия, необходимые для жизнедеятельности клеток (температура 37°C, содержание CO_2 5.0%, влажность выше 80%). В каждой лунке планшета случайным образом выбиралась область съемки размером 5×5 кадров с увеличением $40\times$. Разрешение одного кадра составляло 2048×1536 pix, что соответствовало области наблюдения $320 \times 240\,\mu$m. Серия экспериментов включала ежедневную съемку культур в течение 10 дней.

Подготовка и разметка данных для обучения

Процесс разметки астроцитов без применения окрашивания осложняется тем, что на изображении могут присутствовать другие типы нейроглиальных клеток. Для решения этой проблемы были собраны репрезентативные примеры клеток, классифицированных как астроциты и не астроциты. Из всех изображений, отобранных для обучения нейронной сети, размечались только те клетки, которые классифицировались как астроциты. Для обучения были использованы изображения астроцитов, на которых их тело целиком присутствует в кадре без объектов, перекрывающих его. Разметка была проведена в программном обеспечении LabelMe [20]. Все размеченные изображения (357 снимков) были разделены на три набора данных: 75% (268 изображений) включены в набор данных для обучения, 15% (54 изображения) — в набор данных для валидации и 10% (35 изображений) — в набор тестовых данных.

Для предотвращения переобучения модели применялась автоматическая аугментация данных, включающая следующие преобразования: случайные повороты изображений (до $\pm 15°$), смещение по осям x и y (до $\pm 10\%$ размера изображения), масштабирование ($0.5-2.0\times$), добавление шума, случайное изменение яркости и контрастности, а также горизонтальное отражение. Эти преобразования применялись случайным образом во время каждой эпохи обучения, что позволило значительно расширить вариативность обучающего набора данных без необходимости ручной разметки дополнительных изображений.

Результаты

Для решения задачи сегментации нативных астроцитов на фазово-контрастных изображениях изначально была использована предобученная модель Mask R-CNN [21] с архитектурой Inception ResNet v2 [22]. Mask R-CNN является классическим и хорошо зарекомендовавшим себя двухэтапным детектором. Основное преимущество Mask R-CNN — высокое качество сегментации, особенно для объектов со сложной и изменчивой морфологией. Однако существенным недостатком данной архитектуры является ее вычислительная сложность и относительно низкая скорость предсказания, обусловленная двухэтапным процессом. После обучения и подбора гиперпараметров данная модель показала точность сегментации, оцениваемую по коэффициенту Дайса, на уровне 0.72 [18].

С целью повышения точности и эффективности алгоритма был применен альтернативный подход на основе архитектуры YOLOv11 (конфигурация YOLOv11s-seg).

Рис. 2. Сравнение результатов сегментации. (*a*) Исходное фазово-контрастное изображение астроцита. (*b*) Результат сегментации с помощью Mask R-CNN. (*c*) Результат сегментации с помощью YOLOv11.

Сравнение метрик сегментации (коэффициент Дайса) и классификации (доля верных предсказаний, точность и полнота) для моделей Mask R-CNN и YOLOv11

Метрика	Mask R-CNN	YOLOv11 (текущая модель)
Коэффициент Дайса	0.72	0.73
Доля верных предсказаний	0.29	0.60
Точность	0.71	0.76
Полнота	0.33	0.73

YOLOv11, в свою очередь, представляет собой более современный по сравнению с Mask R-CNN одноэтапный детектор. Архитектура YOLO выполняет детекцию и сегментацию „за один проход“. Ключевыми преимуществами YOLOv11 являются значительно более высокая скорость обработки и меньшие требования к вычислительным ресурсам при сопоставимом с Mask-RCNN качестве.

Обучение модели проводилось на том же наборе данных, что и обучение модели Mask R-CNN. После оптимизации гиперпараметров с помощью библиотеки Optuna и проведения 150 эпох обучения итоговая модель продемонстрировала значительное улучшение качества сегментации. Значение коэффициента Дайса на тестовой выборке составило 0.73. Сравнительные метрики моделей представлены в таблице.

Для наглядной демонстрации сравнения предложенного метода на рис. 2 представлены примеры сегментации одних и тех же участков культуры астроцитов с использованием Mask R-CNN и YOLOv11. Разработанный на основе YOLOv11 метод демонстрирует существенное преимущество в детекции астроцитов при сопоставимом качестве сегментации: при незначительном изменении коэффициента Дайса (характеризующего точность контуров) полнота детекции возросла более чем в два раза. Такая характеристика эффективна для обобщенной количественной оценки культур астроцитов, где пропуск детекции приводит к систематическому смещению оценки морфологических характеристик астроцитов.

Выводы

В настоящей работе был разработан и валидирован усовершенствованный подход для автоматической сегментации и морфологического анализа снимков астроцитов, полученных с помощью фазово-контрастной микроскопии. Ключевым результатом является демонстрация того, что переход с архитектуры Mask R-CNN на современную одноэтапную архитектуру YOLOv11 с последующей оптимизацией гиперпараметров позволил достичь значительного улучшения всех ключевых метрик детекции и сегментации астроцитов. Как показано в таблице, прирост наблюдается в метриках, характеризующих полноту обнаружения клеток: доля верных предсказаний увеличилась с 0.29 до 0.60, а полнота — с 0.33 до 0.73. Одновременно с этим повысилась и точность сегментации (коэффициент Дайса с 0.72 до 0.73) и точность детекции (с 0.71 до 0.76). Такой равномерный рост всех метрик свидетельствует о том, что разработанная модель не только лучше обнаруживает астроциты на изображениях, но и обеспечивает более точное выделение их контуров (рис. 3), что особенно важно для последующего морфометрического анализа. Таким образом, разработанный метод решает фундаментальную проблему биофотоники и клеточной биологии — необходимость неинвазивного наблюдения в режиме реального времени и объективного количественного анализа с помощью неразрушающей технологии. Как было показано в наших экспериментах [18], метод обладает достаточной чувствительностью для детекции статистически значимых изменений морфологии (площадь, суммарная длина и количество ветвлений отростков), индуцированных модулятором продукции и каталитической конверсии НАД+, в частности никотинамидом [23]. Это доказывает его применимость для скрининга биоактивных веществ и изучения клеточного ответа на различные стимулы. Таким образом, предложенный программный подход представляет собой эффективный инструмент для задач оптической биофотоники, позволяющий автоматизировать обработку больших массивов изображений, получаемых с помощью фазово-контрастной микроскопии.

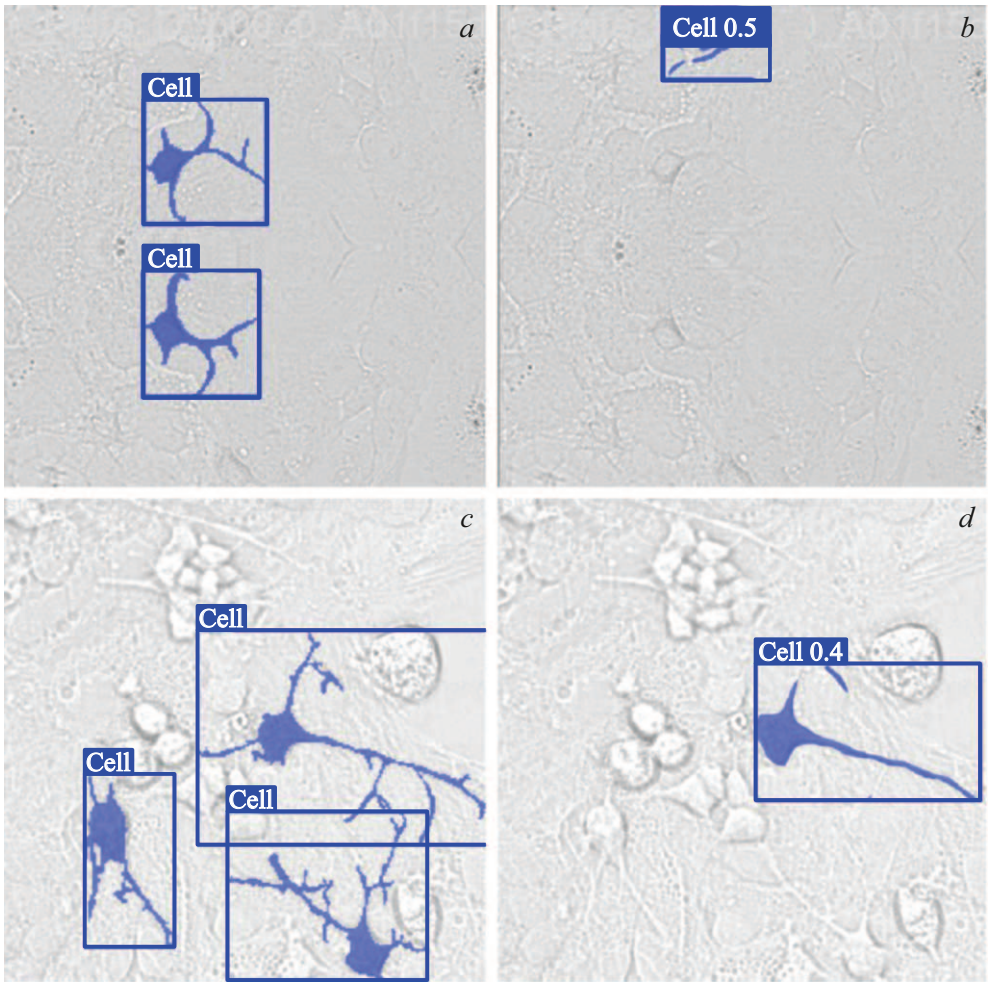

Рис. 3. Визуальные примеры ошибок сегментации астроцитов: (*a*) разметка (ручное выделение клеток на изображении), (*b*) ложноположительное предсказание (модель выделяет объекты, отсутствующие в разметке (*a*)), (*c*) разметка (ручное выделение клеток на изображении), (*d*) ложноотрицательное предсказание (модель не выделяет объекты, присутствующие в разметке (*c*)).

Предложенный метод машинного обучения на основе архитектуры YOLOv11 является перспективным для исследования живых клеточных культур. В автоматическом режиме возможно проводить морфометрический анализ без фиксации и окрашивания клеток, что делает возможным непрерывное наблюдение за динамикой морфологических изменений в клетках в течение длительного времени. Кроме того, метод подходит для высокопроизводительного скрининга биоактивных веществ, оценки клеточного ответа на динамическое изменение микроокружения, в частности при редокс-дисбалансе, возникающем в результате восстановительного или окислительного стресса, при моделировании нейровоспаления и нейродегенерации. Высокая скорость и эффективность одноэтапной архитектуры YOLOv11 делают метод пригодным для анализа больших объемов данных в автоматическом режиме. Настоящий подход может быть адаптирован для анализа других типов клеток нейроваскулярной единицы головного мозга, что открывает новые возможности в нейробиологии, фармакологии и биомедицинских исследованиях. Интеграция фазово-контрастной микроскопии с другими неинвазивными оптическими методами открывает возможности для комплексного анализа клеточной функции. В этом контексте разработка высокоточных алгоритмов машинного обучения, таких как предложенный в настоящей работе метод на основе YOLOv11, приобретает особую значимость, так как они могут стать универсальной платформой для автоматизации анализа данных, получаемых из различных оптических модальностей.

Соблюдение этических стандартов

Все эксперименты с использованием лабораторных животных проведены в соответствии с этическими нормами, установленными законодательством Российской Федерации, принципами Базельской декларации, одобрены локальным этическим комитетом ФГБНУ РЦНН (протокол № 10-9/23 от 20.12.2023 г.).

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования в рамках государственного задания „Аберрантная метаболическая пластичность клеток нейроваскулярной единицы при патологии головного мозга“, № 1023101100004-9-3.1.8;3.1.4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] Y.V. Gorina, A.B. Salmina, A.I. Erofeeva, C. Zhao, A.V. Bolshakova, P.M. Balaban, I.B. Bezprozvanny, O.L. Vlasova. J. Evol. Biochem. Physiol., **57**, 453 (2021). DOI: 10.31857/S0044452921060036

[2] H. Kadry, B. Noorani, L. Cucullo. Fluids Barriers CNS, **17**, 69 (2020). DOI: 10.1186/s12987-020-00230-3

[3] E.G. Knox, M.R. Aburto, G. Clarke, J.F. Cryan, C.M. O'Driscoll. Mol. Psychiatry, **27**, 2659 (2022). DOI: 10.1038/s41380-022-01511-z

[4] R. Siracusa, R. Fusco, S. Cuzzocrea. Front. Pharmacol., **10**, 1114 (2019). DOI: 10.3389/fphar.2019.01114

[5] Y. Zhou, A. Shao, Y. Yao, S. Tu, Y. Deng, J. Zhang. Cell Commun. Signal., **18**, 62 (2020). DOI: 10.1186/s12964-020-00549-2

[6] A.Y. Verisokin, D.V. Verveyko, D.E. Postnov, A.R. Brazhe. Front. Cell. Neurosci., **15**, 645068 (2021). DOI: 10.3389/fncel.2021.645068

[7] S. Aknoun, M. Yonnet, Z. Djabari, F. Graslin, M. Taylor, T. Pourcher, B. Wattellier, P. Pognonec. Sci. Rep., **11**, 4409 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-83537-x

[8] S.A. Savonin, P.V. Ryabukho, D.V. Lyakin, V.P. Ryabukho. Izv. Sarat. Univ. Phys., **16** (2), 67 (2016). DOI: 10.18500/1817-3020-2016-16-2-67-80

[9] J. Kim, S.J. Lee. Military Med. Res., **11**, 38 (2024). DOI: 10.1186/s40779-024-00541-8

[10] A.V. Deryugina, A.A. Belov, M.N. Ivashchenko, P.S. Ignatiev, V.B. Metelin. Cell Tissue Biol., **15** (4), 388 (2021). DOI: 10.1134/S1990519X21040035

[11] N.A. Brazhe, A.B. Evlyukhin, E.A. Goodilin, A.A. Semenova, S.M. Novikov, S.I. Bozhevolnyi, B.N. Chichkov, A.S. Sarycheva, A.A. Baizhumanov, E.I. Nikelshparg, L.I. Deev, E.G. Maksimov, G.V. Maksimov, O. Sosnovtseva. Sci. Rep., **5**, 13793 (2015). DOI: 10.1038/srep13793

[12] V.I. Makarov, A.S. Skobeltsin, A.S. Averchuk, A.K. Berdnikov, M.V. Chinenkova, A.B. Salmina, V.B. Loschenov. Photonics, **11** (4), 316 (2024). DOI: 10.3390/photonics11040316

[13] N.A. Brazhe, E.I. Nikelshparg, A.A. Baizhumanov, V.G. Grivennikova, A.A. Semenova, S.M. Novikov, V.S. Volkov, A.V. Arsenin, D.I. Yakubovsky, A.B. Evlyukhin, Z.V. Bochkova, E.A. Goodilin, G.V. Maksimov, O. Sosnovtseva, A.B. Rubin. Free Radic. Biol. Med., **196**, 133 (2023). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.01.013

[14] A.I. Kostyuk, D.D. Rapota, K.I. Morozova, A.A. Fedotova, D. Jappy, A.V. Semyanov, V.V. Belousov, N.A. Brazhe, D.S. Bilan. Free Radic. Biol. Med., **217**, 108 (2024). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.03.010

[15] I. Suleymanova, T. Balassa, S. Tripathi, C. Molnar, M. Saarma, Y. Sidorova, P. Horvath. Sci. Rep., **8**, 12878 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-31284-x

[16] Y. Jiang, M. Yang, S. Wang, X. Li, Y. Sun. Cancer Commun., **40** (4), 154 (2020). DOI: 10.1002/cac2.12012

[17] E.V. Yakovlev, I.V. Simkin, A.A. Shirokova, N.A. Kolotieva, S.V. Novikova, A.D. Nasyrov, I.R. Denisenko, K.D. Gursky, I.N. Shishkov, D.E. Narzaeva, A.B. Salmina, S.O. Yurchenko, N.P. Kryuchkov. Sci. Rep., **14**, 9846 (2024). DOI: 10.1038/s41598-024-59773-2

[18] Ultralytics. YOLOv11 Documentation [Электронный ресурс]. URL: https://docs.ultralytics.com/models/yolov11/

[19] E.V. Stelmashuk, M.R. Kapkaeva, N.A. Rozanova, O.P. Alexandrova, E.E. Genrikhs, V.V. Obmolov, S.V. Novikova, N.K. Isaev. Ross. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova, **108** (5), 686 (2022). DOI: 10.31857/S0869813922050107

[20] B.C. Russell, A. Torralba, K.P. Murphy, W.T. Freeman. Int. J. Comput. Vis., **77**, 157 (2008). DOI: 10.1007/s11263-007-0090-8

[21] K. He, G. Gkioxari, P. Doll?r, R. Girshick. In: Proc. of the IEEE Int. Conf. on Computer Vision (ICCV) (IEEE, Venice, 2017), p. 2980. DOI: 10.1109/ICCV.2017.322

[22] W. Abdulla. Mask R-CNN for object detection and instance segmentation on Keras and TensorFlow [Электронный ресурс]. URL: https://github.com/matterport/Mask_RCNN

[23] Z.Z. Chong, S.H. Lin, F. Li, K. Maiese. Curr. Neurovasc. Res., **2** (4), 271 (2005). DOI: 10.2174/156720205774322584