

Флуоресцентная микроскопия как источник автоматических аннотаций для обучения нейросетевых моделей сегментации клеток в светлопольной микроскопии

© А.И. Швецов¹, Н.А. Колотьева^{1,2}

¹ Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия

² ФГБНУ „Российский центр неврологии и нейронаук“, Москва, Россия

e-mail: shvetsov.anton@mail.ru

Поступила в редакцию .2026 г.

В окончательной редакции .2026 г.

Принята к публикации .2026 г.

Представлен программный подход к автоматизированной сегментации клеток церебрального эндотелия на светлопольных изображениях с использованием архитектуры глубокого обучения YOLOv11. Аннотация обучающего датасета формируется на основе флуоресцентных изображений, обработанных методами классического компьютерного зрения. Разработанный алгоритм обеспечивает выделение ядер эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга и исключение областей, соответствующих макрофагам, что уменьшает количество ложноположительных детекций. Сформированные бинарные маски используются для автоматической генерации аннотаций, необходимых для обучения нейросетевой модели. Предложенный метод потенциально применим ко всем типам клеток, поддающимся флуоресцентному окрашиванию, и позволяет автоматизировать процесс подготовки данных и анализа клеточных изображений, полученных методом светлопольной микроскопии, что расширяет возможности неинвазивных исследований в области оптической биофотоники.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, светлопольная микроскопия, машинное обучение, компьютерное зрение, сегментация изображений, эндотелиоциты, оптическая биофотоника.

DOI: 10.61011/OS.2026.05.63343.73-25

Введение

Клетки церебрального эндотелия представляют собой универсальную модель *in vitro* для изучения структурно-функциональных особенностей гематоэнцефалического барьера, механизмов трансэндотелиального транспорта, ангиогенеза, нейроваскулярного взаимодействия, а также патогенетических процессов, лежащих в основе нейродегенеративных и сосудистых заболеваний центральной нервной системы [1–4]. Благодаря своей способности формировать плотные межклеточные контакты и экспрессировать специфические транспортные и рецепторные системы, характерные для эндотелия церебральных сосудов, эти клетки позволяют воспроизводить ключевые свойства нейроваскулярной единицы в условиях контролируемой клеточной культуры, что делает их незаменимым инструментом как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных задачах, связанных с оценкой проницаемости лекарственных соединений через гематоэнцефалический барьер и разработкой терапевтических стратегий при патологиях головного мозга [3–5]. В контексте биомедицинских исследований особенно важна возможность непрерывного, бесконтактного и неинвазивного мониторинга морфофункциональных параметров эндотелиальных клеток в процессе их роста, миграции и взаимодействия с микросредой.

Традиционные флуоресцентные методы визуализации, несмотря на высокую специфичность, зачастую сопряжены с рядом ограничений, связанных с введением экзогенных красителей, которые могут инициировать клеточный стресс, фототоксичность, нарушение метаболизма, что искажает как морфологию, так и поведение клеток [6,7]. В современных исследованиях все большее значение приобретают флуоресцентные зонды, совмещающие высокую специфичность связывания и минимальную цитотоксичность. Одним из таких реагентов является Hoechst 33342, витальный ДНК-интеркалирующий краситель, содержащий этильную группу, обеспечивающую эффективное проникновение через плазматическую мембрану клеток. Благодаря своему строению Hoechst 33342 селективно накапливается в ядрах, не окрашивая цитоплазматические компоненты, что создает предпосылки для высокоточной сегментации ядер и анализа их морфодинамики в режиме реального времени. Однако даже витальные флуоресцентные красители предполагают экзогенное воздействие на клетку и требуют флуоресцентного облучения, что при длительных наблюдениях может оказывать влияние на физиологическое состояние клеток. По этой причине методы оптической визуализации, которые не нарушают жизнеспособность клеток, приобретают особую значимость. Светлопольная микроскопия позволяет получать изображения живых

клеток без введения меток, сохраняя их естественное состояние, что позволяет проводить продолжительное наблюдение за культурой клеток.

Несмотря на преимущества светлопольной микроскопии, автоматическая сегментация эндотелиальных клеток на полученных изображениях остается сложной задачей из-за низкого контраста и размытости границ клеток, неоднородности структуры клеточного слоя и наличия артефактов. Ручная разметка трудоемка и мало воспроизводима, что стимулирует активное применение методов глубокого обучения. Одним из ранних успешных решений является применение U-Net для сегментации коронального эндотелия, при котором модели удалось достичь достаточно высоких показателей качества при классификации пикселей и выделении клеточных границ [8]. В работе, посвященной оценке эффективности современных глубоких сверточных нейросетей для сегментации ядер клеток на светлопольных изображениях, проведено сравнение нескольких архитектур, включая U-Net++, DeepLabv3+, Tiramisu, а также новую облегченную сеть PPU-Net [9]. Авторы показали, что более глубокие и современные модели значительно превосходят базовый U-Net по точности выделения границ клеток, достигая пиксельной точности (F1 score, pixel-wise) порядка 86%. В работе [10] была предложена модификация U-Net с добавлением residual и attention блоков. Такая архитектура позволила значительно повысить качество семантической сегментации, достигнув mean-IoU около 0.95. Для разделения соприкасающихся клеток применялась постобработка методом водораздела (watershed), что обеспечило корректную сегментацию отдельных клеток. Архитектура Mobile-CellNet, предложенная в работе [11] и объединяющая несколько сегментационных подмоделей и алгоритмы постобработки, позволила добиться точности оценки плотности клеток с ошибкой менее 5% при существенно меньшей вычислительной стоимости по сравнению с классической U-Net. Авторы использовали 612 размеченных изображений разрешением 675×359 пикселей, что подчеркивает необходимость относительно большого объема аннотированных данных для эффективного обучения нейросетевых моделей сегментации.

Для решения проблемы ограниченности аннотированных данных и сокращения трудозатрат на разметку в последние годы применяются подходы активного обучения, например, в работе [12] была предложена система автоматизированной сегментации, комбинируемая с ручной коррекцией и дообучением моделей U-Net и DeepLabV3+. В данной работе сегментация, сгенерированная нейронной сетью, подвергалась ручной корректировке с использованием интерактивного графического интерфейса, позволяющего дополнять, удалять и уточнять контуры клеток. Исправленные маски использовались для повторного обучения нейросетей, что обеспечивало улучшение качества сегментации на новых изображениях и позволило сократить время разметки одного изображения с 15–30 min до примерно 5 min.

Несмотря на эффективность методов активного обучения с ручной корректировкой, процесс разметки остается зависимым от участия эксперта и требует значительных временных затрат. В связи с этим, в настоящей работе предлагается полностью автоматизированный подход к формированию обучающих данных и сегментации эндотелиальных клеток, заключающийся в аннотировании обучающего датасета на основе обработки флуоресцентных изображений алгоритмами классического компьютерного зрения. Представленный метод устраняет зависимость процесса подготовки данных от ручной разметки, а также обладает высокой степенью универсальности, поскольку может быть адаптирован для любого типа клеток, поддающихся специфическому окрашиванию, что делает его перспективным инструментом для автоматизации анализа светлопольных микроскопических изображений и способствует расширению возможностей неинвазивных исследований в области оптической биофотоники.

Материалы и методы

Получение и культивирование первичной культуры эндотелиоцитов

Первичные культуры клеток церебрального эндотелия получали от 14-дневных крыс линии Wistar согласно стандартной методике [13] с модификациями [14]. Животных предварительно анестезировали, после декапитации извлекали головной мозг, удаляли мозговые оболочки и магистральные сосуды, прокатывая препарат по фильтровальной бумаге. Отделяли корковое вещество, дополнительно очищая его от крупных сосудов в холодном сбалансированном солевом растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Кору измельчали механически и подвергали центрифугированию (1000 rpm, 3 min, комнатная температура). К полученному осадку добавляли двойной объем 25%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, США) и повторно диссоциировали суспензию с помощью пипетирования. Процедуру центрифугирования (2000 rpm, 10 min, комнатная температура) и последующее отделение нижнего клеточного слоя повторяли трижды. Затем осадок подвергали ферментативной обработке 0.1%-ным раствором коллагеназы II (ПанЭко, Россия) в течение 35 min при 37°C в роллере. Ферментативную реакцию останавливали добавлением предварительно подогретого раствора Хенкса, после чего образец центрифугировали (1000 rpm, 5 min). Полученный осадок ресуспендировали в модифицированной среде Игла DMEM/F12 (GIBCO Invitrogen Corporation, США), дополненной 20%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, Австрия), 2 mM глутамина (glutaMAX, Gibco, Великобритания) и 16.6 mM глюкозы. Клетки высаживали на пластиковые чашки Петри диаметром 40 mm (Медполимер,

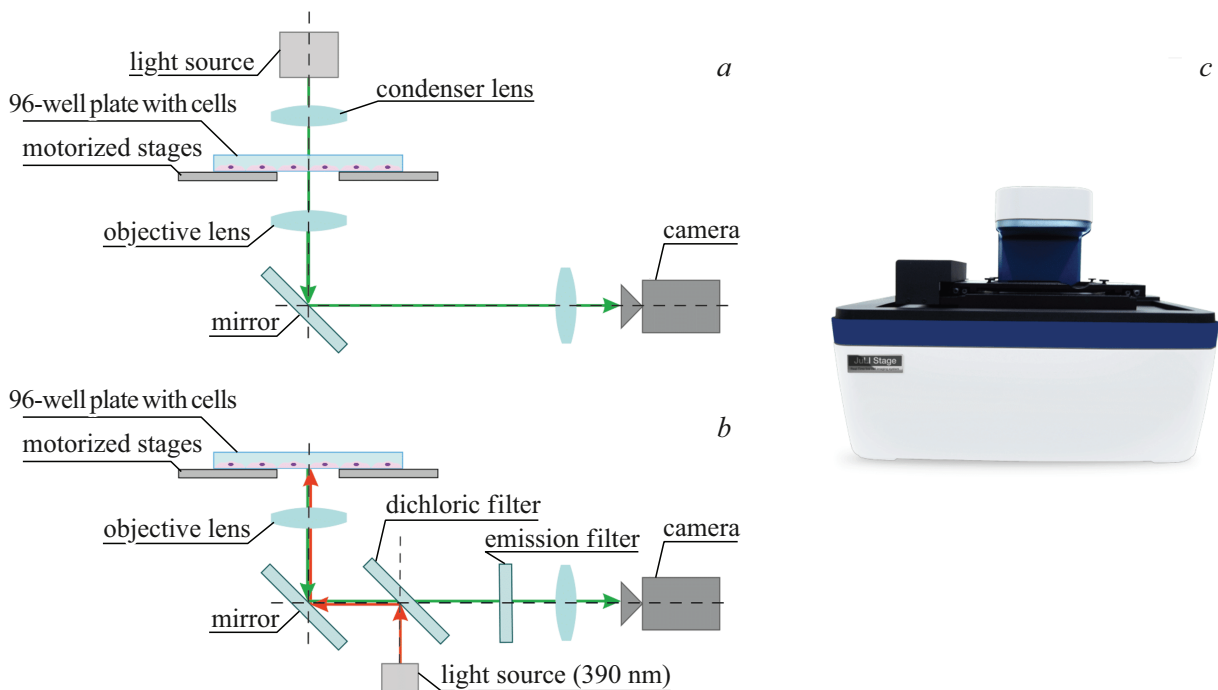


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для светлопольной и флуоресцентной микроскопии живых клеток: (а) принципиальная оптическая схема светлопольного микроскопа, (b) принципиальная оптическая схема флуоресцентного микроскопа, (с) внешний вид автоматического микроскопа JuLI Stage, использованного в работе.

Россия), предварительно покрытые матригелем, культивировали при 5% CO₂, температуре 37 °C и относительной влажности 98% (CO₂-инкубатор RWD Life Science, Китай). Среду заменяли дважды в неделю. После формирования конфлюэнтного монослоя клетки пересаживали в 96-луночные культуральные планшеты (Servicebio, Китай) по 100 μL на лунку, содержащую 2 · 10⁵ cells/mL. Оценку жизнеспособности и подсчет клеток осуществляли с использованием автоматического счетчика Countess (Invitrogen, США). Морфологический контроль состояния культур в процессе роста проводили методом фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Olympus CKX41 (Япония).

Микроскопия и сбор данных

Изучение клеток церебрального эндотелия проводилось с помощью светлопольной (рис. 1, а) и флуоресцентной (рис. 1, b) микроскопии. Для визуализации ядер клетки церебрального эндотелия инкубировали с флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (ПанЭко, Россия). Для долгосрочного наблюдения за динамикой роста использовалась автоматизированная система визуализации клеточных культур JuLI Stage (рис. 1, c) (NanoEntek, Южная Корея), обеспечивающая одновременную съемку в светлопольном и флуоресцентном режимах. Флуоресцентные изображения регистрировались с использованием оптического канала с длинами волн возбуждения 390/40 nm и излучения 452/45 nm. В каждой лунке

планшета фиксировалась область съемки размером 5 × 5 кадров с двадцатикратным увеличением. Разрешение одного кадра составляло 1936 × 1456 пикселей, что соответствовало области наблюдения 440 × 330 μm.

Результаты

В рамках экспериментальных исследований клеточным биологом была проведена предварительная морфологическая оценка конфлюэнтного монослоя клеток первичной культуры церебрального эндотелия, в которой присутствуют иммунные клетки макрофаги. В физиологических условиях в процессе ангиогенеза эндотелиальные клетки взаимодействуют с резидентными иммунными клетками центральной нервной системы, в частности, с микроглией, выполняющей функции тканевых макрофагов [15]. Учет данного гетерогенного клеточного состава является критически важным при разработке алгоритмов автоматизированной сегментации.

Для решения задачи автоматизированной разметки флуоресцентных изображений был разработан программный пакет на основе классических методов компьютерного зрения. Предложенный алгоритм выполняет сегментацию ядер эндотелиальных клеток с последующим исключением объектов, локализованных в непосредственной близости от макрофагов, что позволяет снизить количество ложноположительных объектов, обусловленных высокой флуоресцентной интенсивностью.

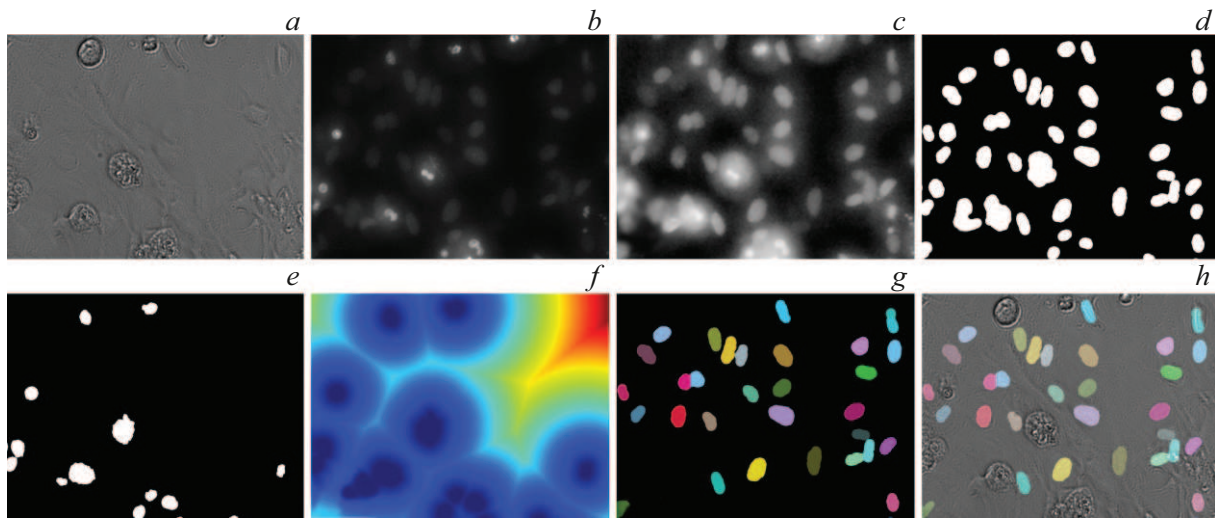


Рис. 2. Пример обработки флуоресцентного изображения: (а) исходное светлопольное изображение ядер эндотелиальных клеток, (б) исходное флуоресцентное изображение ядер эндотелиальных клеток, (с) предобработанное флуоресцентное изображение ядер эндотелиальных клеток, (d) бинарная маска всех клеток, (e) бинарная маска сторонних клеток, (f) карта дистанций от сторонних клеток, (g) маска ядер эндотелиальных клеток, (h) светлопольное изображение с наложенной маской ядер эндотелиальных клеток.

На этапе предварительной обработки выполняется адаптивное выравнивание гистограммы методом CLAHE для нормализации яркостного распределения, медианная фильтрация (ядро 3×3) для подавления зернистого шума, а также сглаживание методом полной вариации с коэффициентом регуляризации 0.1 для сохранения границ объектов при устранении высокочастотных артефактов. Далее осуществляется локальная пороговая бинаризация с адаптацией к неоднородному фону (окно 71×71 , пороговый коэффициент 1.05), а также морфологическая очистка бинарной маски с удалением мелких шумовых компонентов (менее 1000 пикселей).

Различия в характере накопления красителя в ядрах клеток церебрального эндотелия и макрофагов обуславливают вариации диапазонов их пиксельных интенсивностей. Макрофаги характеризуются более компактной морфологией ядра, и как следствие, повышенной локальной концентрацией флуоресцентного зонда, что приводит к более высокой интенсивности флуоресцентного сигнала в два раза по сравнению с эндотелиальными клетками. При обнаружении макрофагов вокруг них формируются зоны исключения радиусом 5 пикселей. На последующем этапе сохраняются лишь объекты, расположенные на расстоянии более 15 пикселей от зон исключения, что обеспечивает корректное разделение клеточных культур.

На заключительном этапе применяется морфологическая фильтрация по площади, предназначенная для удаления артефактов и агрегатов, а также разделение соприкасающихся ядер методом водораздела с минимальным расстоянием между пиками 20 пикселей, обеспечивающее формирование топологически корректных масок изолированных клеток. Используемые значения параметров обработки были подобраны с помощью по-

иска по сетке на основе экспертной визуальной оценки результатов сегментации.

Полученные сегментационные маски могут быть использованы для обучения нейросетевых моделей, построенных на архитектуре U-Net. Для формирования аннотаций, совместимых с форматами разметки, применяемыми в моделях семейства YOLO, маски дополнительно преобразуются в соответствующее представление (полигональные контуры объектов). Данное преобразование осуществляется посредством операции выделения границ (поиска контуров) и последующего сглаживания полученных контуров с целью повышения корректности и устойчивости аннотаций. Пример визуализации процесса обработки флуоресцентного изображения представлен на рис. 2.

Для решения задачи автоматизированной сегментации ядер эндотелиальных клеток на светлопольных изображениях была выбрана архитектура глубокого обучения YOLOv11 (Ultralytics) [16], представляющая собой современную модель детекции и сегментации объектов в реальном времени, реализующую объединение задач локализации и построения масок в рамках единой нейросетевой архитектуры. Применение данной архитектуры обусловлено её высокой вычислительной эффективностью, устойчивостью к вариациям масштаба объектов и способностью обрабатывать изображения высокого разрешения без существенной потери производительности.

Обучение проводилось на 5600 аннотированных изображениях (80% выборки) с исходным разрешением 1936×1456 пикселей; валидация осуществлялась на оставшихся 20% данных, а тестирование — на независимом наборе из 50 изображений, размеченных экспертами. В процессе обучения применялись стандартные методы аугментации данных, направленные на

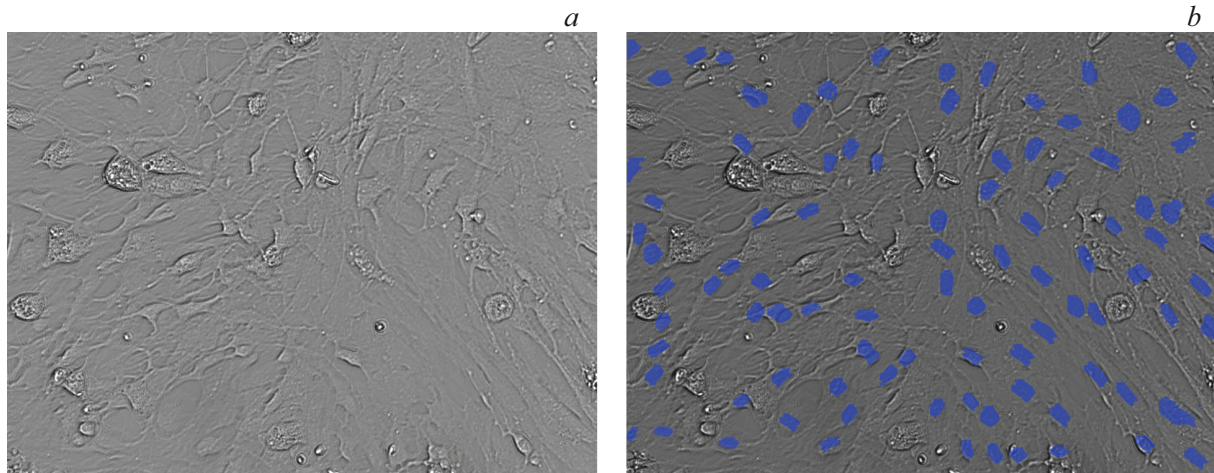


Рис. 3. Пример сегментации эндотелиальных клеток: (а) исходное светлопольное изображение ядер эндотелиальных клеток, (b) обработанное светлопольное изображение (предсказанные маски ядер эндотелиальных клеток выделены синим цветом).

улучшение обобщающей способности модели, включая случайные повороты, масштабирование, отражения и вариации яркости и контрастности. Данные преобразования способствовали повышению устойчивости модели к изменению условий освещения и морфологическим вариациям клеток. Пример результата сегментации ядер эндотелиальных клеток приведен на рис. 3.

Выводы

Комбинированное использование флуоресцентной микроскопии и методов классического компьютерного зрения позволило автоматизировать процесс разметки светлопольных изображений и сформировать расширенный датасет объемом 7000 аннотированных изображений, что значительно превосходит возможности ручной разметки и обеспечивает высокую воспроизводимость данных. Полученный датасет обеспечил обучение модели способной выполнять сегментацию клеток непосредственно на светлопольных изображениях в полностью неинвазивном режиме, без необходимости применения флуоресцентной визуализации на этапе анализа.

Благодаря различиям в накоплении красителя в ядрах клеток различных типов и, как следствие, разнице в диапазонах интенсивности флуоресцентного сигнала, разработанный подход может быть адаптирован не только для эндотелиальных клеток, но и для любых клеточных культур, поддающихся флуоресцентному окрашиванию, что существенно расширяет область применения метода и делает его практически универсальным инструментом для анализа гомогенных и гетерогенных клеточных культур. Вместе с тем метод имеет ряд ограничений, обусловленных морфологической и функциональной гетерогенностью клеточных популяций. В первую очередь он ориентирован на клетки для которых ядро представляет собой доминирующую и структурно стабильную

морфологическую особенность. Кроме того, в гетерогенных культурах, где разные типы клеток накапливают флуоресцентный зонд с близкой эффективностью, что приводит к схожей интенсивности сигнала, алгоритм не способен провести надёжную дифференциацию и классифицирует их как единый кластер.

Таким образом, предложенный метод формирует основу для масштабируемого и полностью неинвазивного анализа клеточных структур, являясь значимым технологическим вкладом в развитие оптической биофотоники. Автоматическая генерация аннотаций и последующая детекция клеток на светлопольных изображениях существенно расширяют возможности современных методов количественного клеточного анализа. На основе полученных сегментационных масок становятся доступны различные морфометрические показатели, включая площадь и периметр клеток, степень округлости и удлиненности, плотность расположения клеток, распределение размеров, а также метрики топологии клеточных мозаик, такие как количество соседей и вариабельность формы многоугольных структур. Определение этих характеристик имеет высокую практическую значимость для количественной оценки функционального состояния клеточных культур и их реакции на изменение микроокружения или возникновение патологического состояния. В частности, площадь клетки служит чувствительным индикатором её метаболической активности, цитоскелетной организации и дифференцировки. Плотность клеточного монослоя отражает пролиферативную активность, межклеточные взаимодействия и целостность барьерных структур, что особенно критично при работе с моделями гематоэнцефалического барьера, где нарушение конфлюэнтности напрямую коррелирует с увеличением проницаемости. Такой подход не только повышает воспроизводимость и объективность биологических экспериментов, но и создаёт основу для разра-

ботки label-free методов ранней диагностики клеточной дисфункции.

Соблюдение этических стандартов

Все экспериментальные процедуры с использованием лабораторных животных выполнены в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации, международными принципами Базельской декларации, соблюдением правил гуманного обращения с лабораторными животными. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения „Российский центр неврологии и нейронаук“ (протокол № 10-9/23 от 20.12.2023).

Благодарности

Авторы выражают благодарность Розановой Наталье Александровне и Новиковой Светлане Викторовне за проведение работ по культивированию эндотелиальных клеток.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования в рамках государственного задания „Управляемый ангиогенез: коллективная клеточная динамика и новые физические методы воздействия“, № 0705-2025-0010, МГТУ им. Н.Э. Баумана.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] E. Trimm, K. Red-Horse. *Nat. Rev. Cardiol.*, **20**, 197–210 (2023). DOI: 10.1038/s41569-022-00770-1
- [2] H.G. Augustin, G.Y. Koh. *Cell*, **187** (18), 4833–4858 (2024). DOI: 10.1016/j.cell.2024.07.012
- [3] M.J. Workman, C.N. Svendsen. *Fluids Barriers CNS*, **17** (1), 30 (2020). DOI: 10.1186/s12987-020-00191-7
- [4] J.J. Jamieson, P.C. Searson, S. Gerecht. *J. Biol. Eng.*, **11** (1), 37 (2017). DOI: 10.1186/s13036-017-0076-1
- [5] P. Carmeliet, R.K. Jain. *Nature*, **473**, 298–307 (2011). DOI: 10.1038/nature10144
- [6] J. Icha, M. Weber, J.C. Waters, C. Norden. *BioEssays*, **39** (8) (2017). DOI: 10.1002/bies.201700003
- [7] M.K. Daddysman, M.A. Tycon, C.J. Fecko. *Methods Mol. Biol.*, **1148**, 1–17 (2014). DOI: 10.1007/978-1-4939-0470-9_1
- [8] K. Nurzyńska. *Symmetry*, **10** (3), 60 (2018). DOI: 10.3390/sym10030060
- [9] M.A.S. Ali, O. Misko, S.-O. Salumaa, M. Papkov, K. Palo, D. Fishman, L. Parts. *SLAS Discov.*, **26** (9), 1125–1137 (2021). DOI: 10.1177/24725552211023214
- [10] A. Ghaznavi, R. Rychtáriková, M. Saberioon, D. Štys. *Comput. Biol. Med.*, **147**, 105805 (2022). DOI: 10.1016/j.compbiomed.2022.105805
- [11] R. Karmakar, S.V. Nooshabadi, A.O. Eghrari. *Cornea*, **42** (4), 456–463 (2023). DOI: 10.1097/ICO.0000000000003186
- [12] N. Joseph, I. Marshall, E. Fitzpatrick, H.J. Menegay, J.H. Lass, B.A.M. Benetz, D.L. Wilson. *J. Med. Imaging*, **11** (1), 014006 (2024). DOI: 10.1117/1.JMI.11.1.014006
- [13] Y. Liu, Q. Xue, Q. Tang, M. Hou, H. Qi, G. Chen, W. Chen, J. Zhang, Y. Chen, X. Xu. *Microvasc. Res.*, **90**, 199–205 (2013). DOI: 10.1016/j.mvr.2013.08.004
- [14] М.Р. Капкаева, А.Б. Салмина, Е.Д. Хиляжева, Д.Н. Воронков. Способ выделения эндотелия микрососудов мозга крысы. Патент RU 2774603 С1 (2022).
- [15] Ю.А. Успенская, А.В. Моргун, Е.Д. Осипова и др. *Успехи физиол. наук*, **52** (2), 39–50 (2021). DOI: 10.31857/S0301179821020090
- [16] Ultralytics. YOLOv11 Documentation [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.ultralytics.com/models/yolov11/>