

# СЕГМЕНТАЦИЯ КОНФОКАЛЬНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ КЛЕТОК

Антоненко М. В., Лисица Е. В.

Кафедра системного анализа и компьютерного моделирования, факультет радиофизики и компьютерных технологий, Белорусский государственный университет

Минск, Республика Беларусь

E-mail: {misha.antonenko.minsk, ylisitsa}@gmail.com

В данной работе представлены алгоритмы сегментации клетки и области обесцвечивания фокального контакта в эксперименте люминесцентной спектроскопии, результаты которой необходимы для последующего анализа данных методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания.

## ВВЕДЕНИЕ

Методы люминесцентной микроскопии нашли широкое применение при анализе динамических процессов, происходящих в клетках, одним из которых является метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP от Fluorescence Recovery After Photobleaching)[1]. Этот метод позволяет получить качественное и количественное описание белок-белковых взаимодействий, выполняющих регуляторную функцию в клетках; также с помощью метода FRAP исследуются различные химические взаимодействия в так называемых кластерах-комплексах, образуемых белками в клетке[2].

В качестве входного набора данных для количественного описания процессов с помощью метода FRAP используются средние интенсивности нескольких областей люминесцентного изображения: области всей клетки, области вне клетки (фон), а также области засветки исследуемой белковой нити. Таким образом, важной задачей для последующего анализа данных с FRAP эксперимента является автоматическая сегментация указанных областей.

Цель данной работы – автоматическая сегментация как всей клетки, так и сегментация исследуемой области засвеченного объекта в изображениях люминесцентной микроскопии.

## I. ИСХОДНЫЕ ДАННЫЕ

Исходные данные представляют собой трек в формате ".lsm", полученный конфокальным микроскопом для образца, предварительно окрашенного флуоресцирующим красителем GFP (Green Fluorescence Protein). Таким образом, имеется набор метаданных и стек полутоновых изображений. Размер изображений 512\*128 пикселей, используется 256 оттенков. (Рис.2А) В метаданных хранятся временные отсчеты изображений, а также номер изображения, после которого происходит засветка белковой нити.

## II. СЕГМЕНТАЦИЯ ОБЛАСТИ ВСЕЙ КЛЕТКИ

Алгоритм сегментации области всей клетки представлен на рисунке 1.

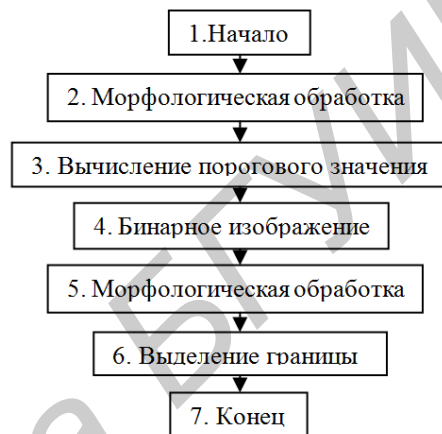


Рис. 1 – Схема алгоритма сегментации области всей клетки.

На первом этапе (блок 2) изображение подвергается предварительной морфологической обработке, которая заключается в последовательном применении к изображению операции полутонного размыкания и замыкания[3]. В качестве структурного элемента выбирается крест длиной 3 пикселя. Таким образом, изображение становится более «гладким», исчезают небольшие флуктуации. (Рис. 2Б).

Так как задача явно предполагает наличие двух классов пикселей (клетки и фона), на следующем этапе (блоки 3,4) с помощью порогового преобразования получается бинарное изображение. Оптимальный порог вычисляется по методу Отцу[4], минимизирующего внутриклассовую дисперсию:  $\sigma_w^2(t) = \omega_1(t)\sigma_1^2(t) + \omega_2(t)\sigma_2^2(t)$ , где  $t$  – пороговое значение,  $\omega_1, \omega_2$  – вероятности двух классов при текущем  $t$ ;  $\sigma_1^2(t), \sigma_2^2(t)$  – дисперсии соответствующих классов. (Рис.2В)

Далее полученное бинарное изображение вновь подвергается морфологической обработке (блок 5), последовательно применяется бинарное размыкание и замыкание[3] с примитивом в виде диска радиуса 2. Таким образом, заполнятся пустоты небольшого размера как в области клетки, так и в области фона. (Рис. 2Г) Для заполнения пустот большого размера используется алгоритм на основе морфологической реконструкции[5]. (Рис. 2Д)

Для выделения границ бинарного изображения существует множество классов методов (градиентные, морфологические). В данной работе граница выделялась следующим способом:  $\beta(A) = A \setminus (A \ominus B)$ , где  $A$  – бинарное изображение;  $B$  – квадратный примитив со стороной 3 пикселя; операция « $\setminus$ » – разность множеств; « $\ominus$ » – операция бинарной эрозии.

На рисунке 2Е окончательный результат сегментации клетки накладывается на первоначальное изображение.

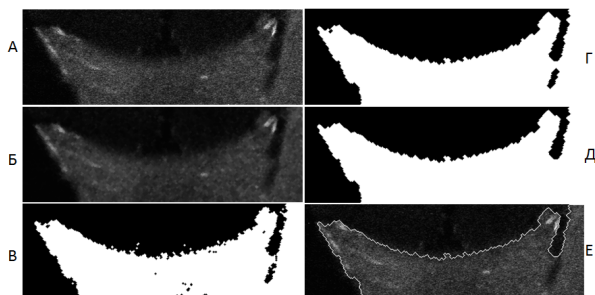


Рис. 2 – А) исходное изображение; Б) после обработки полутонового изображения В) бинарное изображение; Г) после применения бинарного размыкания и замыкания; Д) после применения алгоритма заполнения пустот; Е) результат сегментации

### III. СЕГМЕНТАЦИЯ ОБЛАСТИ ЗАСВЕТКИ ФОКАЛЬНОГО КОНТАКТА

Алгоритм сегментации области засветки фокального контакта основывается на вычитании из изображения до обесцвечивания фокального контакта изображения после обесцвечивания. Для более успешного выполнения дальнейших операций, на данном этапе желательно минимизировать влияние случайных флуктуаций. Это можно достичь усреднением изображений в разных временных отсчетах. Однако также стоит учитывать, что с течением времени клетка может двигаться относительно своего первоначального положения, поэтому число усредняемых изображений не следует выбирать слишком большим. В данной работе усредненные изображения до обесцвечивания (рис.3Б) и после (рис.3В) получались по  $N = 5$  временным отсчетам непосредственно до засветки и сразу после нее.

Полученное полутоновое изображение (рис.3Г), представляющее собой разность усредненного изображения до и после обесцвечивания, далее обрабатывается в соответствии со схемой, изображенной на рисунке 1. Выполняется морфологическая обработка, идентичная блоку 2, вычисляется пороговое значение (блок 3) и строится бинарное изображение (блок 4, рис.3Д).

Единственное отличие состоит на этапе морфологической обработки бинарного изображения (блок 5). В данном случае требуется лишь убрать небольшие «островки» с фоновой части изображения, которые возникают вследствие влияния шума. Поэтому на этом этапе применяется операция бинарного размыкания с примитивом в виде креста длиной 3 пикселя.

Результат сегментации области засветки белковой нити представлен на рисунке 3Е. Оценка качества сегментации в разделах II и III осуществлялась с помощью визуального анализа для набора клеток из реального эксперимента.

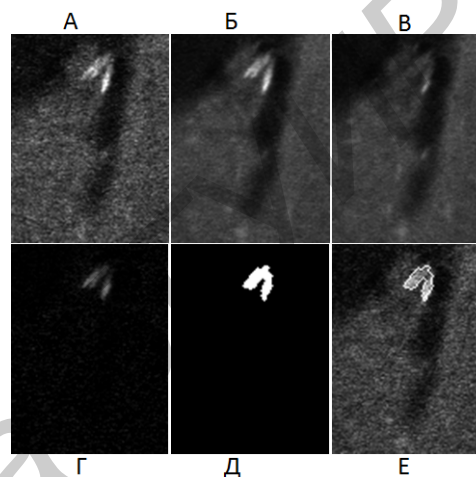


Рис. 3 – А) исходное изображение; Б) усредненное изображение до засветки и В) – после; Г) разность изображений Б) и В); Д) бинарное изображение; Е) результат сегментации

### ВЫВОДЫ

Таким образом, представлены алгоритмы сегментации клетки и области обесцвечивания фокального контакта в эксперименте восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания, которые показывают визуально хороший результат на наборе клеток из реального эксперимента.

1. Xiong, R. FRAP for measuring diffusion with a laser scanning microscope / R. Xiong, H. Deschout // Fluorescence spectroscopy and microscopy: methods and protocols. NY, USA. 2013.
2. Sprague, B. L. FRAP analysis of binding: proper and fitting / B. L. Sprague, J. G. McNally // vol. 15, no. 2, 2005.
3. Гонсалес, Р. Цифровая обработка изображений / Р. Гонсалес, Р. Вудс // Техносфера. Москва. 2005.
4. Otsu, N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms/ N. Otsu // IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Vol. 9, No. 1, 1979, pp. 62-66.
5. Soille, P. Morphological Image Analysis: Principles and Applications / P. Soille // Springer-Verlag, 1999, pp. 173-174.