

## Автоматическая обработка фотографий клеточного пласта

Некрасов К.

### Вступление

В биологии существует актуальная проблема - влияние механических факторов<sup>1</sup> (эластических, упругих свойств субстрата<sup>2</sup>, на котором растут клетки) на структуру ткани, формирование органов в зародыше и даже дифференцировку клеток.

Суть заключается в следующем. Есть такие клетки, которые живут, распластавшись на поверхности субстрата, обычно специально для них приготовленного. Таких клеток много, они важные - например, фибробласты<sup>3</sup> человека. Раньше никто не обращал внимания на структуру субстрата, а только на его химический состав. Около 30 лет назад<sup>4</sup> биологи выяснили, что клетки активно механически взаимодействуют с субстратом: тянут его, заимствуют его упругость, etc.

Кроме того, в процессе развития клетки не просто сидят на своих местах, а активно перемещаются, при чем целыми пластами, при этом:

- 1) клеточные движения имеют четкую пространственную организацию;
- 2) клеточные движения абсолютно необходимы для развития зародыша, формирования будущих тканей и органов;<sup>5</sup>

Для формирования органов необходимо создание определенной пространственной структуры (морфогенез - образование формы) и дифференцировка клеток ("выбор" клеточной специализации: мышечные ли это будут клетки, нервные или клетки крови и т.д.).

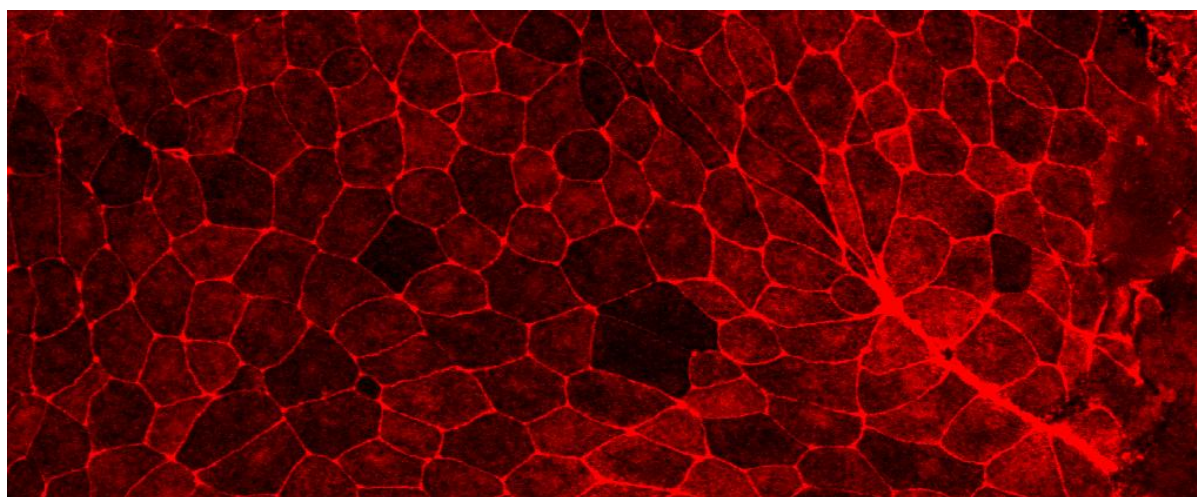
Общеизвестно, что клеточные движения - это механизм создания ФОРМЫ клеточного пласта. Однако есть еще одна удивительная особенность. Различные механические воздействия, как и механические свойства самого субстрата (упругость, жесткость), могут вызвать активацию специфических генов и определять направление ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ клеток.

Так, в опытах лаборатории<sup>6</sup> оказалось, что если зародыш растянуть в нужном направлении, то у него позвоночник и нервная система образуются в другом месте! Может даже случиться так, что образуется несколько позвоночников или нервных систем.

В другом опыте брали клетки, которые могут дифференцироваться в нервные, мышечные или клетки соединительной ткани (хрящи и т.д.). При абсолютно идентичном химическом составе среды, те клетки, которые "высаживали" на мягкий субстрат, дифференцировались

в нервные; те, которые - на потверже - в мышечные; а на твердом субстрате они же превращались в клетки соединительной ткани.

Традиционно, для того, чтобы направить дифференцировку клеток, в среду добавляют специальные химические факторы. Это сложно и не очень эффективно. Исследуемый же способ (изменение механических факторов субстрата) реализуется проще, и результат получается даже лучше.



Фрагмент фотографии подкрашенного клеточного пласта.

В рамках данного исследовательского проекта ставится задача автоматизированной обработки экспериментальных данных. Дается фотография клеточного пласта, на котором стенки клеток подкрашены специальной флуоресцентной краской. На таких снимках важно вычислить "вытянутость" каждой из клеток, направление этой вытянутости, кривизну клеточных стенок (мембран) (некоторые из стенок прямые, а некоторые идут по дуге), связность клетки (т.е. сколько у нее соседей) и связность узлов (т.е. сколько клеточных стенок сходится к одной вершине).

---

\*1 Механические свойства материалов - прочность, сопротивление разрушению, твердость, эластичность, упругость и др.

\*2 Субстрат — поверхность, на которой расположен предмет; питательная среда для растений и микроорганизмов.

\*3 Фибробласты — клетки соединительной ткани организма, синтезирующие внеклеточный матрикс. Они играют важную роль в заживлении ран.

\*4 Параллельно работы Белоусова Льва Владимировича и американцев

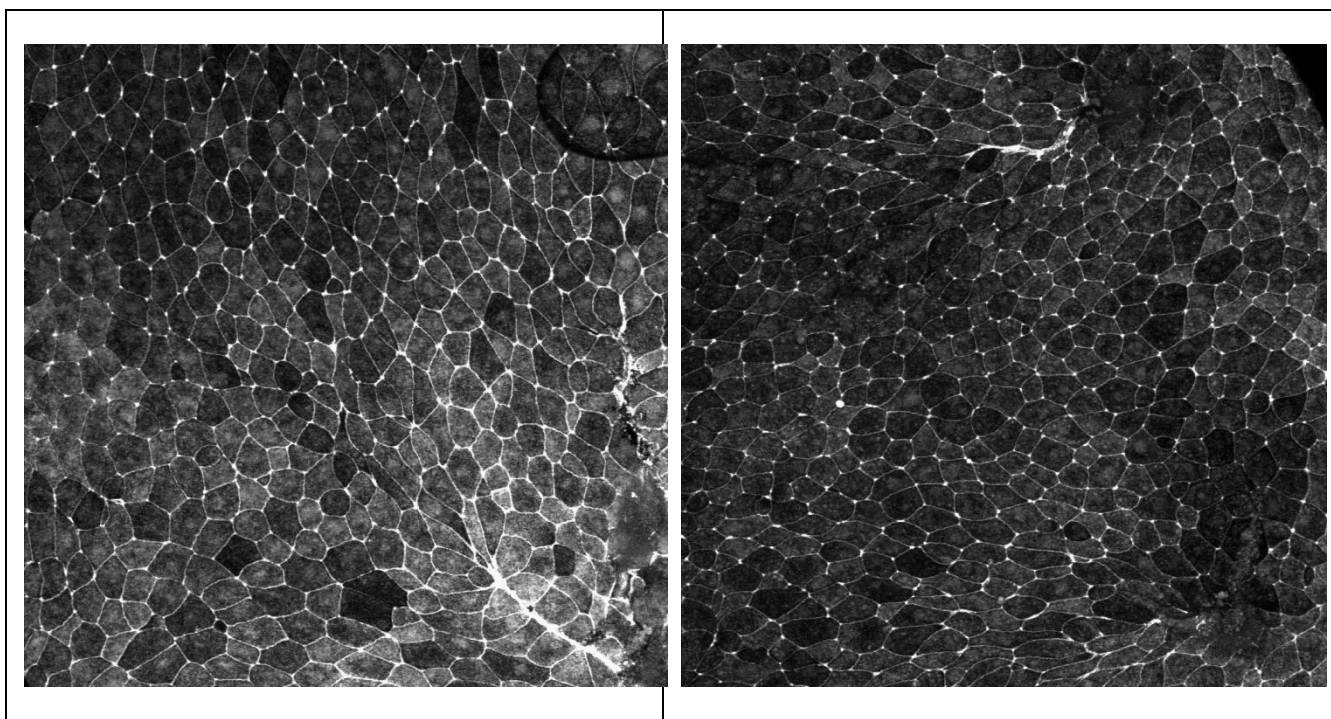
\*5 Это тоже работы, в частности Белоусова, только 40-50-летней давности

\*6 Кафедра эмбриологии Биологического фак-та МГУ

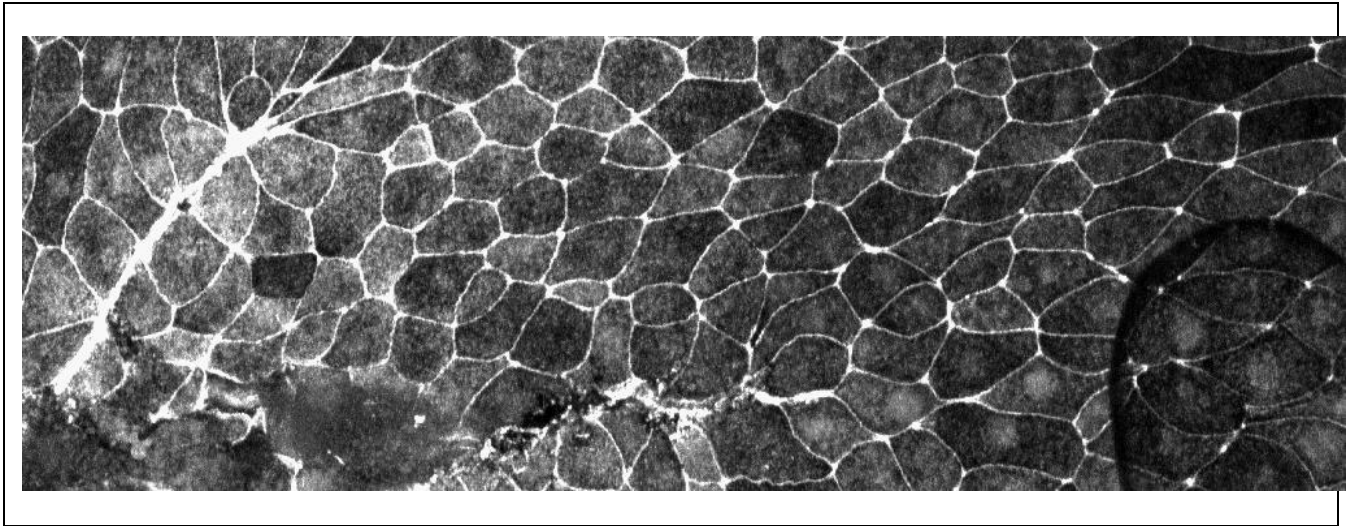
Тогда, в зависимости от тех или иных механических воздействий, можно будет наблюдать за динамикой указанных показателей во времени. Условно говоря - сильно потянул субстрат - клетки стали вытягиваться и поворачиваться; слабо, но долго - переползать. Соответственно, наблюдая за динамикой показателей, можно будет более точно исследовать влияние механических факторов на дальнейшее развитие клеточных структур и, возможно, научиться выращивать те или иные ткани или органы путем простого выбора субстратов с определенными механическими свойствами, или воздействуя на субстрат механическим путем из вне.

## Исходные данные

Для обработки предоставляются фотографии размера 1024x1024.

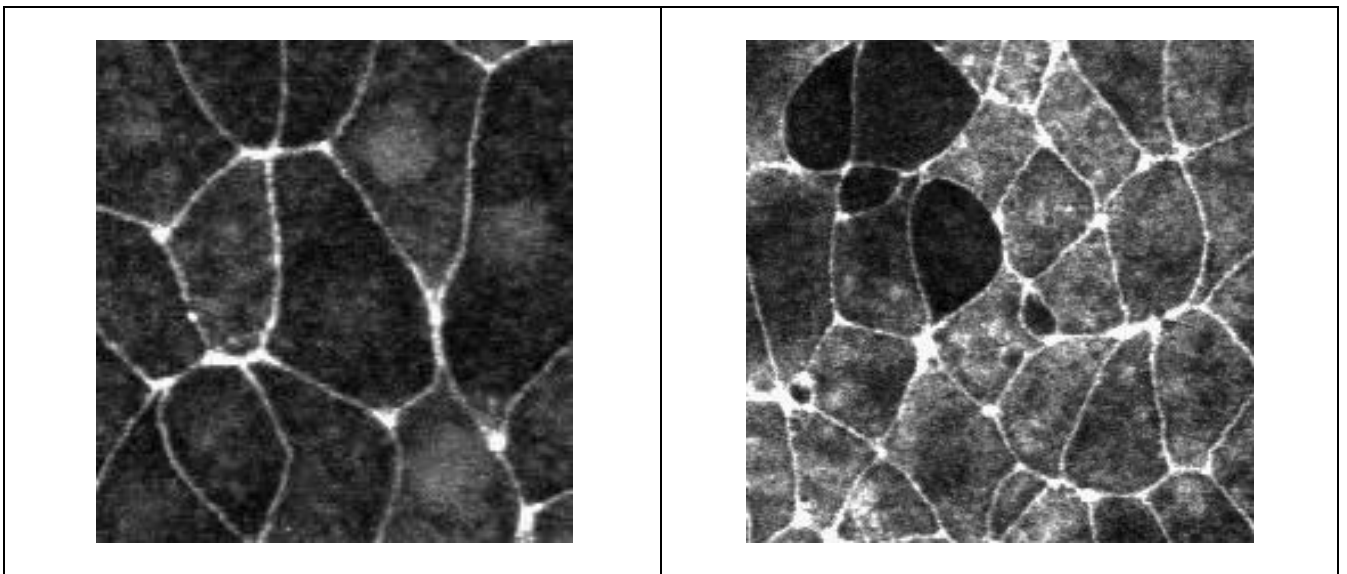


На снимках изображены подкрашенные мембраны клеток. В некоторых местах изображение может быть размыто, смазано или испорчено. Освещение клеточного пласта может быть не равномерным, с одним источником света.



Внутренности клеток, не зависимо от расположения источника освещения, могут резко менять свою яркость от темного цвета к ярко светлому. При этом, в пределах одной клетки светлые пиксели равномерно смешиваются с тёмными и располагаются сгустками или равномерным туманом по всей замкнутой мембранами области.

Узлы, к которым сходятся границы клеток, являются самыми яркими участками на изображении. Представляют собой область с высокой постоянной яркостью. Разные узлы могут обладать разной яркостью, но в пределах области одного узла яркость не меняется.



Границы клеток представляют собой узкие полосы из пикселей с высокой яркостью, значительно превосходящей среднюю яркость внутренностей клетки, или резко отличающейся по яркости от ближайшей окрестности одной из двух прилегающих к границе клеток. Каждая такая полоса проходит ровно через два узла на изображении. При этом множество светлых пикселей на границе смешано с темными, резко отличающимися

по яркости пикселями, что создаёт рваную линию. Тем не менее, ярких пикселей оказывается достаточно много, и кучкуются они так плотно друг к другу, что каждая из границ легко различима на глаз.

## Поиск границ

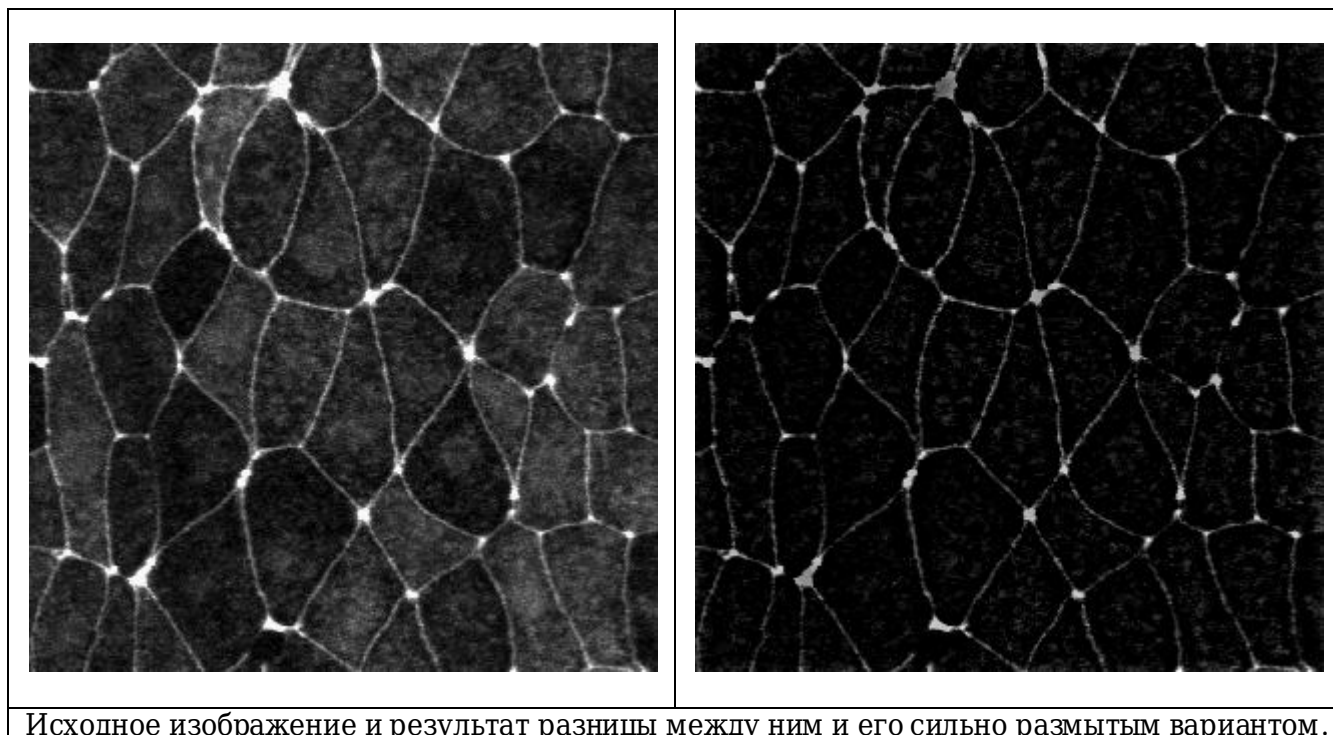
### Простое отсечение по порогу

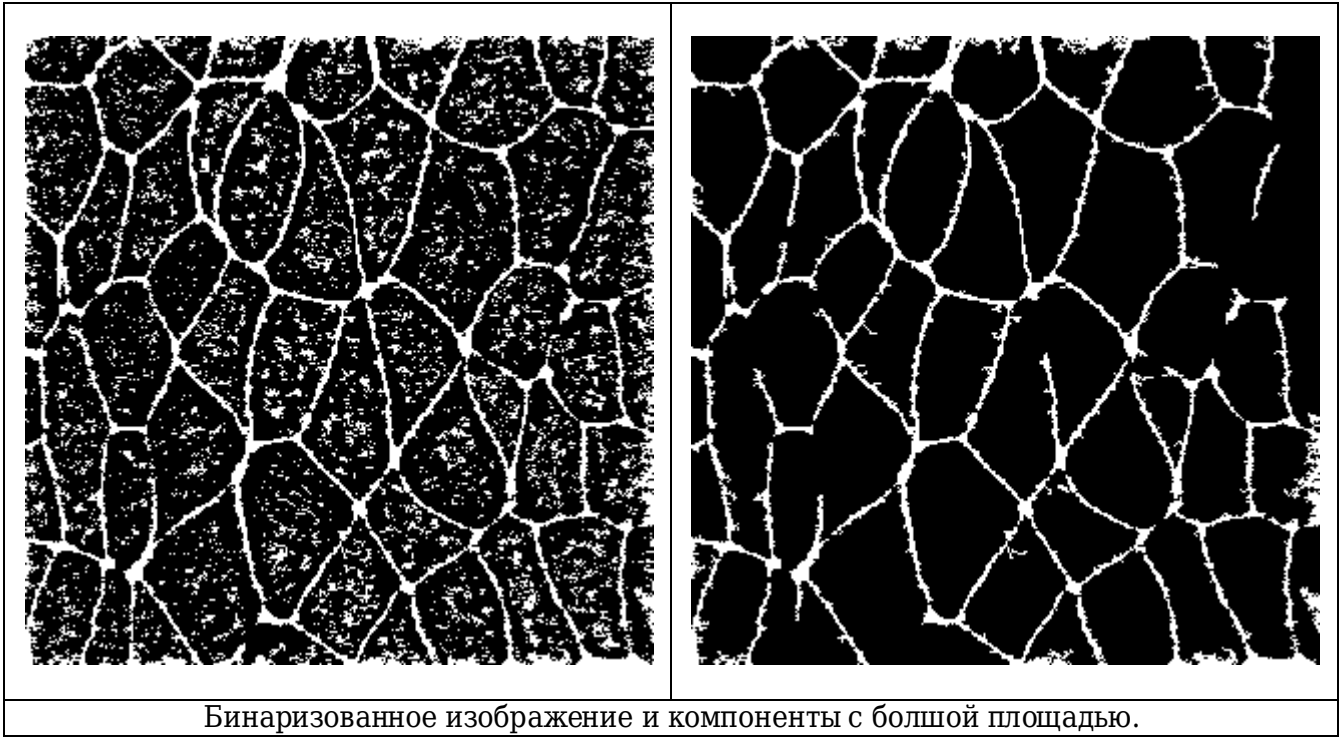
Воспользуемся простым отсечением границ по порогу. Переведем исходное изображение в серые тона, так что  $I \in [0,1]$ , и вычтем из него размытое изображение, полученное, например, с помощью усредняющего фильтра с ядром размера  $15 * 15$ . Результатом разницы между исходным изображением и его размытым будет изображение с яркими границами без внутренностей. Нормализуем полученную разницу так, чтобы максимальным элементом была единица, минимальным - нуль. После этого можно получить бинарное изображение, простым отсечением по постоянному порогу.

$$M(x,y) = I(x,y) - \text{blurring} I(x,y), \quad I(x,y) \in [0,1]$$

$$\frac{M(x,y)}{\max_{x,y} M(x,y)} > C$$

Здесь порог  $C = 0.057$  мы подобрали вручную. С помощью указанного порога обрабатывались все предоставленные изображения.

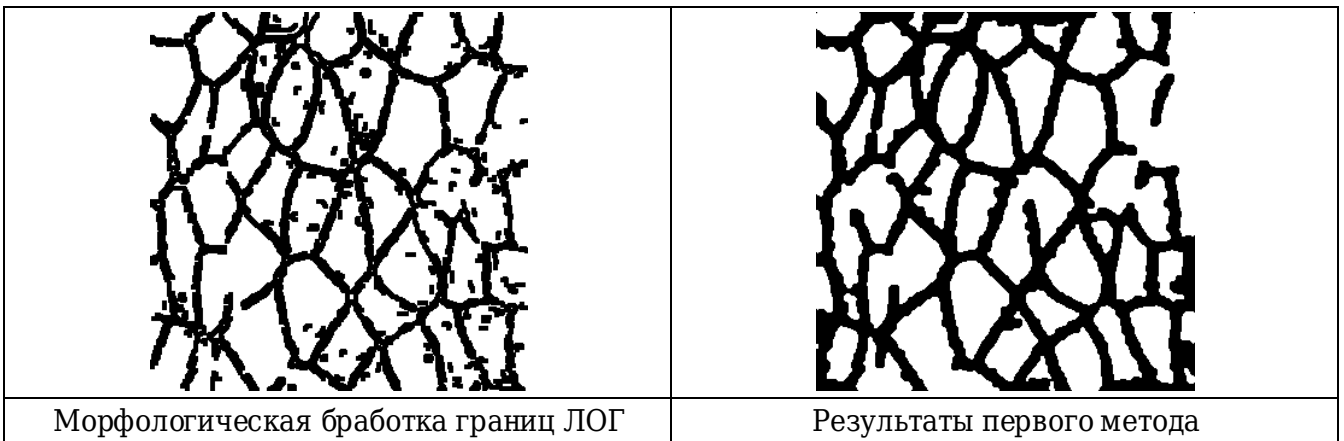




После этого достаточно выделить каждую связную область и оставить только области с достаточно большой площадью – таким образом мы получим связную сетку. Таким способом можно правильно выделить около половины клеток на изображении. Такое качество не приемлемо.

### Детекторы границ

Стандартные детекторы границ (Кэнни, Лапласиан Гауссиана, Прюитт, Собель) оказались не эффективными на исходных изображениях, в основном из-за разорванности границ и точечными перепадами яркостей внутри клеток. Лучше всего сработал ЛОГ, однако по качеству он практически совпадает с самым первым методом.



## Retinex

Для дальнейшей работы нам понадобится выровнять яркость на изображении. Для этой цели мы использовали стандартный алгоритм «Retinex». Исходное полутоновое изображение  $I$  разбивается на две компоненты:  $R$  - компоненту, представляющую собой изображение с равномерной яркостью, и  $M$  - компоненту, которая отвечает за освещение.

$$I(x, y) = R(x, y) \cdot M(x, y), \quad M(x, y) \in [0, 1]$$

При этом компонента  $M$ , отвечающая за освещение, фактически представляет собой размытое исходное изображение.

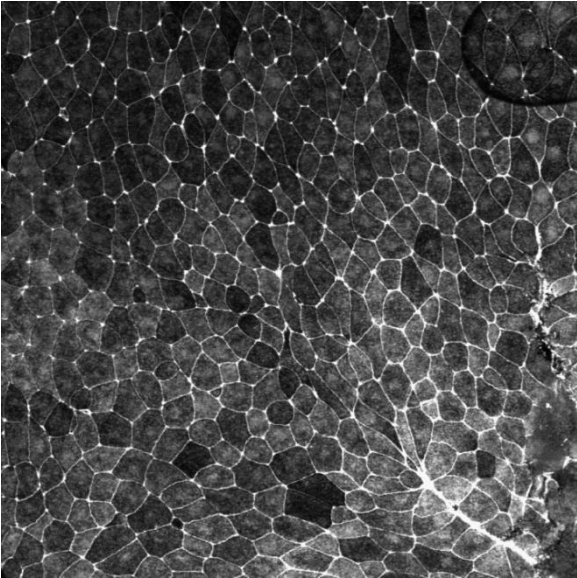
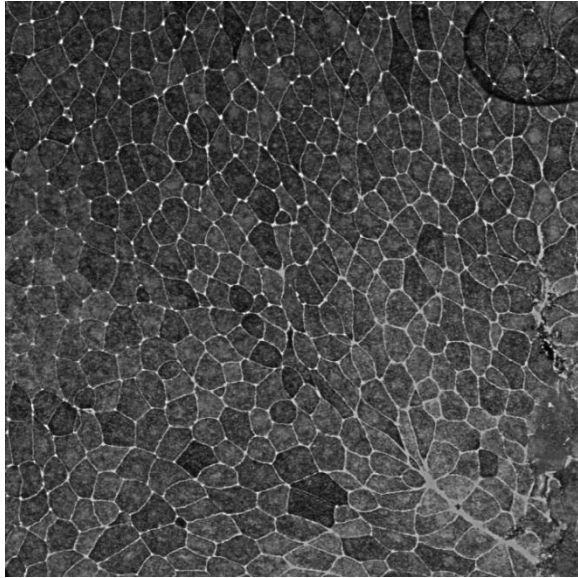
$$M = \text{blurring} I(x, y)$$

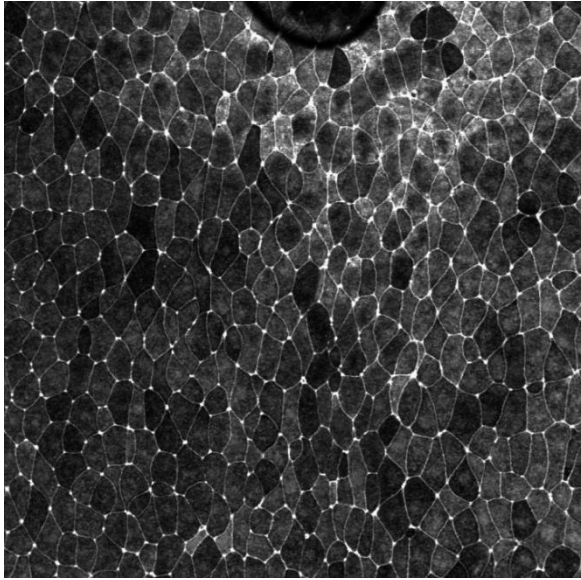
$$R(x, y) = \exp(\log I(x, y) - k \cdot \log M(x, y))$$

Здесь  $k$  - параметр, отвечающий за силу действия алгоритма.

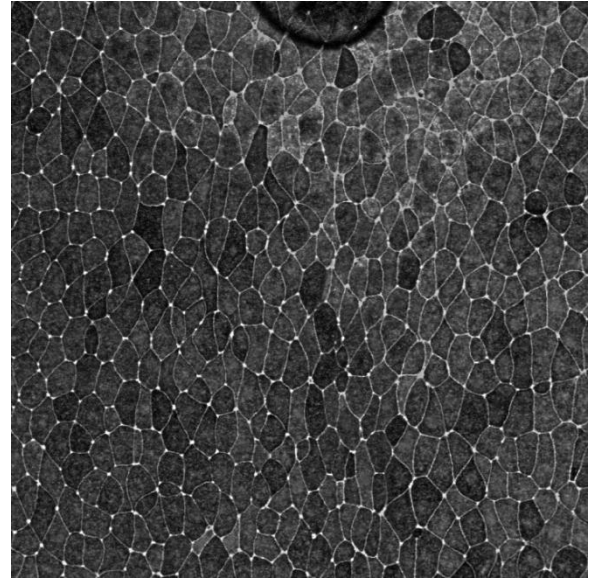
Для размытия изображения мы использовали ядро гауссиан размера  $19 * 19$ , с дисперсией 12. Сила действия  $k = 0.5$ .

На изображениях с выравненной яркостью детекторы границ работают значительно лучше, но всё равно не достаточно для проведения статистик - слишком много клеток слипаются.

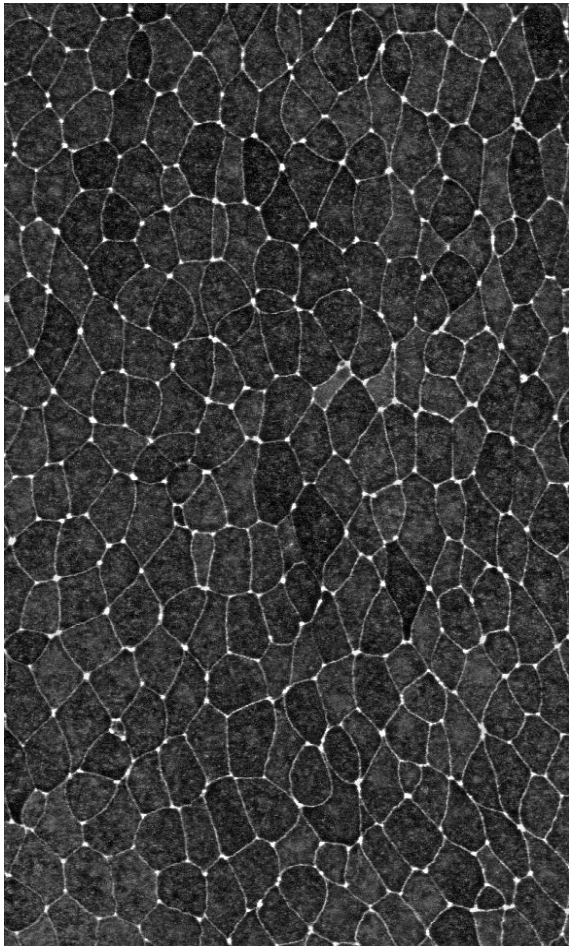
	
Исходное изображение	После обработки Ретинекс



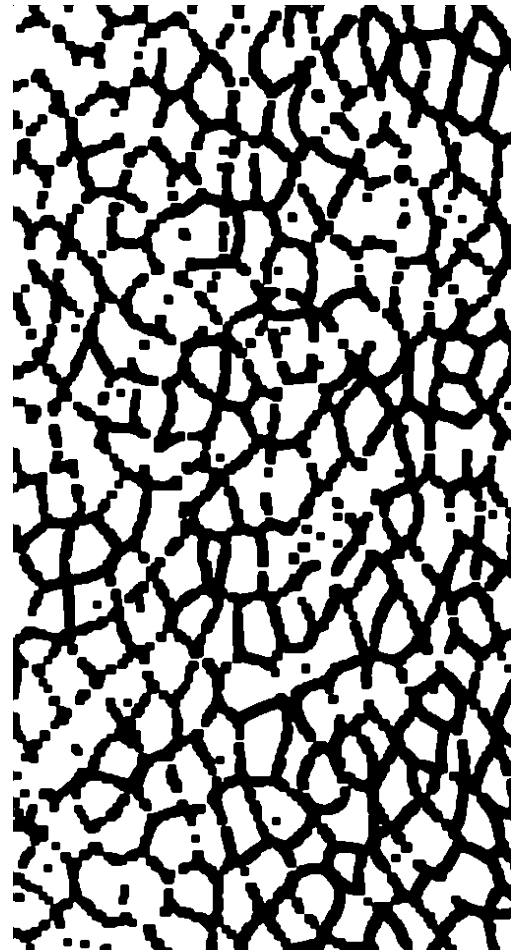
Исходное



Ретинекс



Исходное изображение



Детектор границ ЛОГ

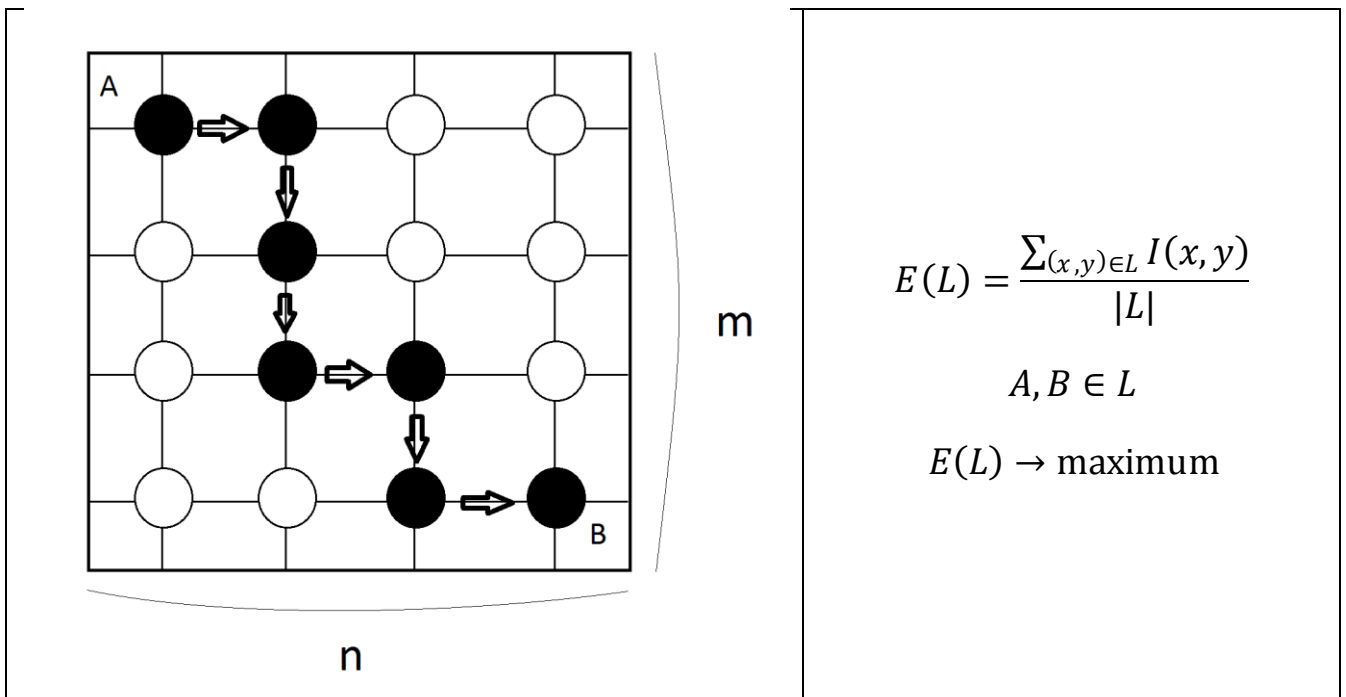


## Динамическое программирование

Подойдем к задаче выделения границ с другой стороны. Нам известно, что узлы представляют собой области с постоянной и высокой яркостью, которые мы можем отсечь по порогу выделить даже на исходном, не обработанном изображении.

Найдем наилучшую прямую, соединяющую два некоторых узла на изображении. Для этого мы будем максимизировать функционал качества  $E(L)$ , который определяется как отношение суммы яркостей пикселей, принадлежащих прямой  $L$ , к длине этой прямой.

Прямая  $L$  должна проходить ровно через два узла, и соблюдать определенную форму - почти все мембраны на изображении немного выпуклы в какую-нибудь сторону.



Если рассмотреть два узла  $A$  и  $B$ , то все линии с небольшой выпуклостью вероятнее всего будут находиться в прямоугольнике, построенном на этих двух точках. При этом путь из точки  $A$  в точку  $B$ , собирающий максимальную сумму яркостей, можно легко найти с помощью динамического программирования (задача о черепашке).

Пусть есть матрица чисел  $W$  и черепашка находится в левом верхнем углу. Перемещаясь только вправо или вниз, черепашка должна пройти путь до правого нижнего угла, собрав при этом максимальную сумму чисел, записанных в клетках матрицы  $W$ .

Пусть  $F(x, y)$  - максимальная сумма чисел, которую черепашка может набрать переместившись по матрице  $W$  из левого верхнего угла в точку  $(x, y)$ .

$$F(x, y) = \max\{F(x, y - 1), F(x - 1, y)\} + W(x, y)$$

$$F(0, y) = F(x, 0) = 0$$

С помощью таких простых формул, мы можем полностью определить значения функции  $F$ . Тогда максимальная сумма, которую черепашка может набрать на матрице  $W$ , равна  $F(n, m)$ . Что бы определить последовательность клеток, на которых побывала черепашка, достаточно по матрице  $F$  проверять, какая из клеток больше - верхняя или левая: пусть черепашка находится в точке  $(n, m)$ , тогда если  $F(n - 1, m) > F(n, m - 1)$  - то перейти в клетку  $(n - 1, m)$ , иначе в  $(n, m - 1)$ , и т. д.

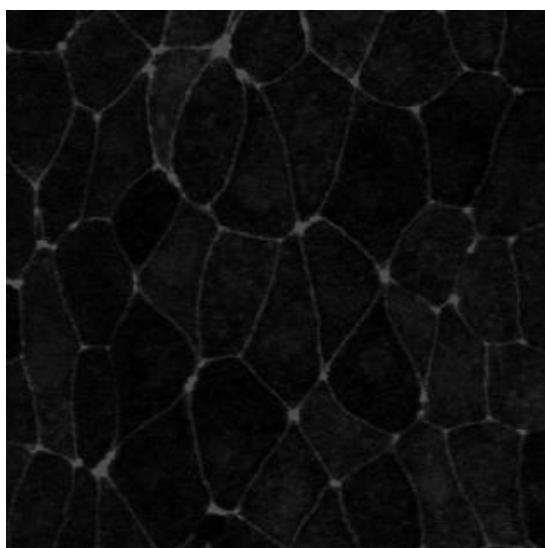
В дальнейшем нам потребуется знать максимальное расстояние  $R_{max}$  между двумя узлами, которые могут быть соединены линией. Порог задаётся вручную и нами было выбрано расстояние в сто пикселей.

Рассмотрим два произвольных узла, расстояние между которыми меньше либо равно  $R_{max}$ . С помощью алгоритма про черепашку построим наилучшую кривую  $L$  соединяющую эти два узла и посчитаем функционал  $E(L)$ . Если изображение  $I$ , участвующее в определении функционала, выравнено по яркости, то мы можем задать постоянный порог  $E_{min}$ , по которому будем отсекают линии снизкой средней яркостью. Таким образом, кривая  $L$  является границей тогда и только тогда, когда она проходит ровно через два узла и  $E(L) \geq E_{min}$ .

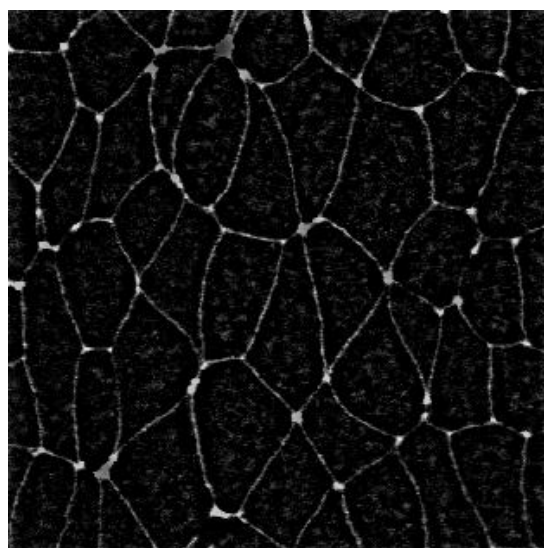
Пусть  $R$  - снимок клеточного пласта с выравненной яркостью. Возьмем изображение в функционале качества, как разность  $R$  и его размытого варианта, полученного с помощью усредняющего фильтра с ядром  $15 * 15$ .

$$I(x, y) = R(x, y) - \text{averaging } R(x, y)$$

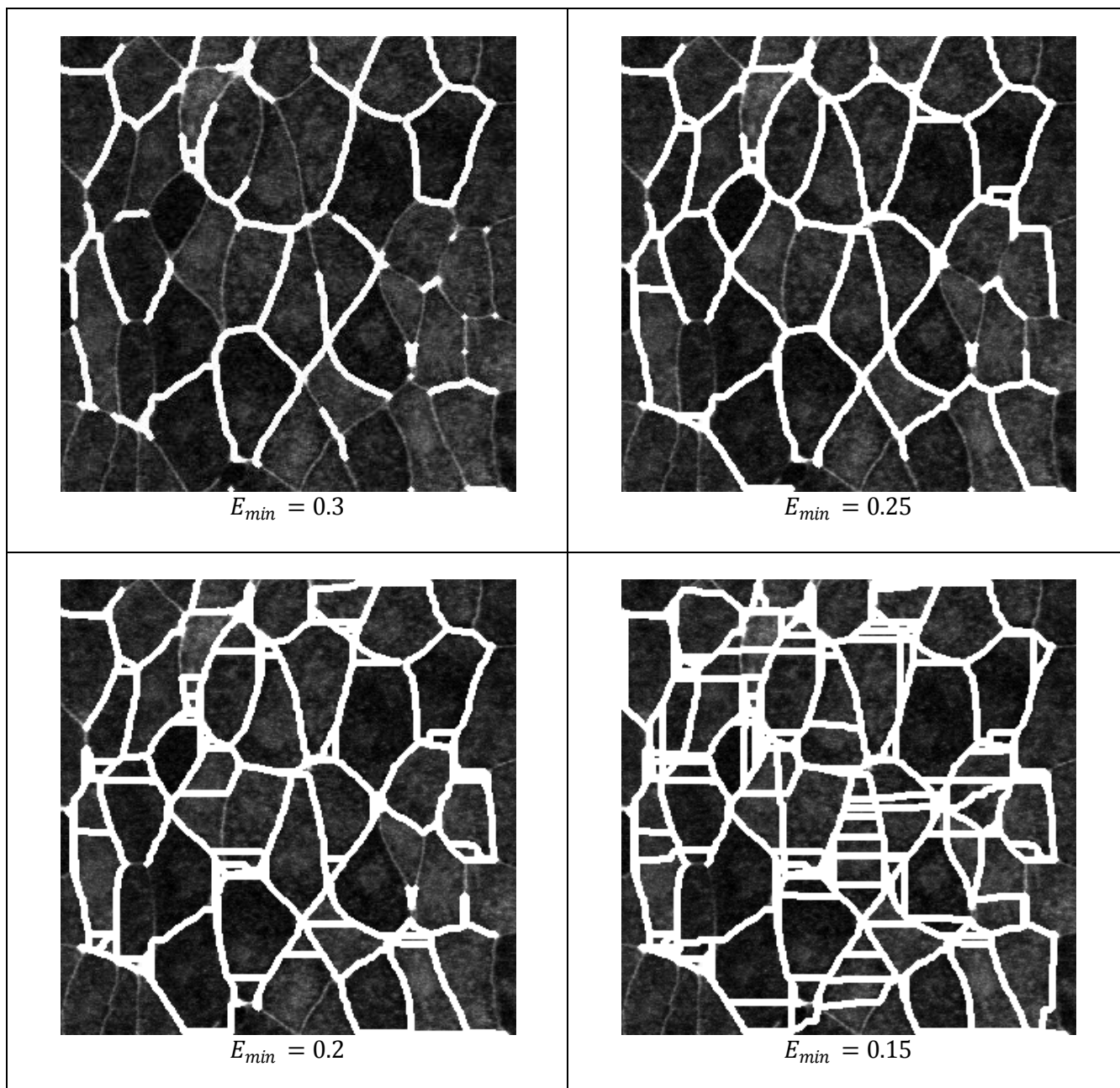
На полученно изображении  $I$  будут хорошо видны границы, при этом внутренности клеток превратятся в малые скопления точек.



Исходное изображение



Полученная разность

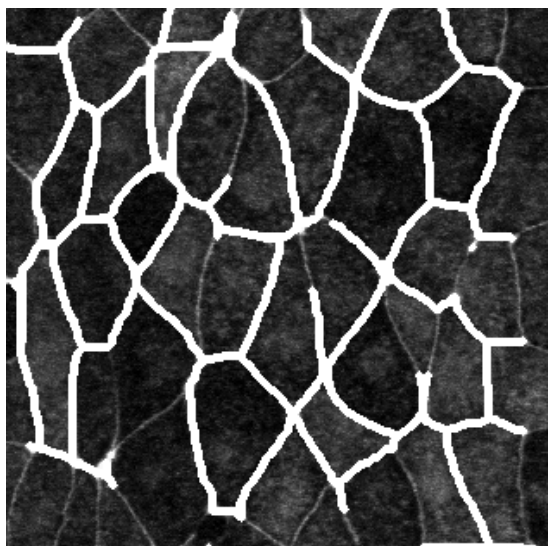


При высоком пороге  $E_{min}$  на функционал качества  $E(L)$ , результаты работы алгоритма не уходят далеко от первого варианта решения задачи методом простой обработки изображения. При понижении порога алгоритм находит все границы между клетками, но, к сожалению, он также добавляет огромное множество прямых линий, что не позволяет нам работать с полученной сеткой.

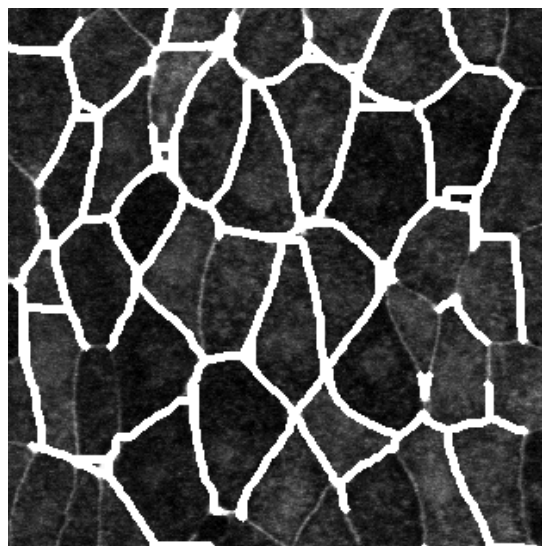
Можно попробовать проверять прямые участки границ на среднюю интенсивность. Функционал качества тогда можно не отсекал по порогу. Мы делали следующим образом - на полученной с помощью черепашки линии  $L$  мы ищем все прямые участки длиной более 5, и если отношение количества пикселей с яркостью менее 0.1 к общей длине интервала больше 45% то мы исключали всю линию  $L$  из рассмотрения.

Далее можно попробовать использовать вариант работы программы с порогом, но проверять форму линии, так что бы одна линия не содержала одновременно длинных вертикальных и горизонтальных участков.

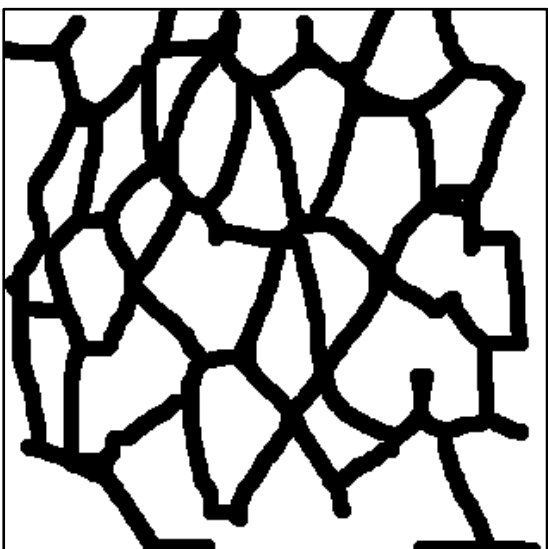
Можно попробовать использовать вариант работы алгоритма без использования порога, просто проверяя форму линии, так что бы одна линия была приблизительно выпукла в одну сторону или имела небольшое значение кривизны, чтобы небыло резких углов или поворотов.



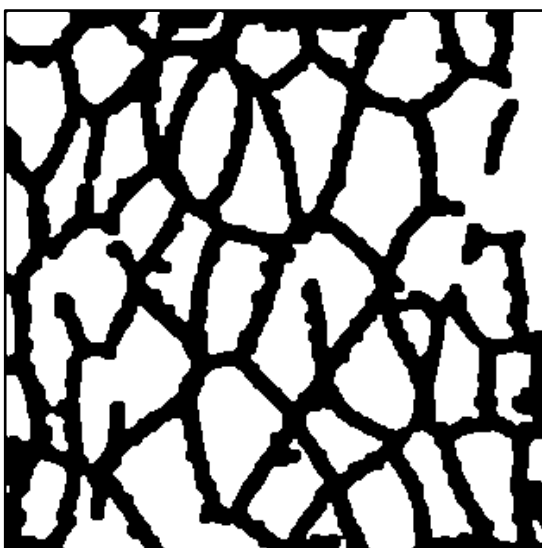
Проверка интенсивности прямых участков границ



$E_{min} = 0.25$



Проверка интенсивности прямых участков границ вместе порогом  $E_{min} = 0.25$



Первый метод