

Автоматизированный метод трёхмерного количественного анализа клеточных популяций

С.А. Шуваев¹, А.А. Лазуткин^{1,2}, А.В. Кедров^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина

Флуоресцентное маркирование и трёхмерная флуоресцентная микроскопия являются широко распространёнными технологиями. Однако в большинстве случаев анализ получаемых снимков до сих пор производится вручную. Помимо высоких трудозатрат такой анализ имеет ряд недостатков, основным из которых является существенное различие между подходами разных экспериментаторов, приводящее к несопоставимости результатов. Автоматический анализ позволил бы решить эти проблемы. Существующие решения испытывают трудности с детектированием определённых типов клеток, в частности соприкасающихся клеток, которые важны в исследованиях делящихся клеток.

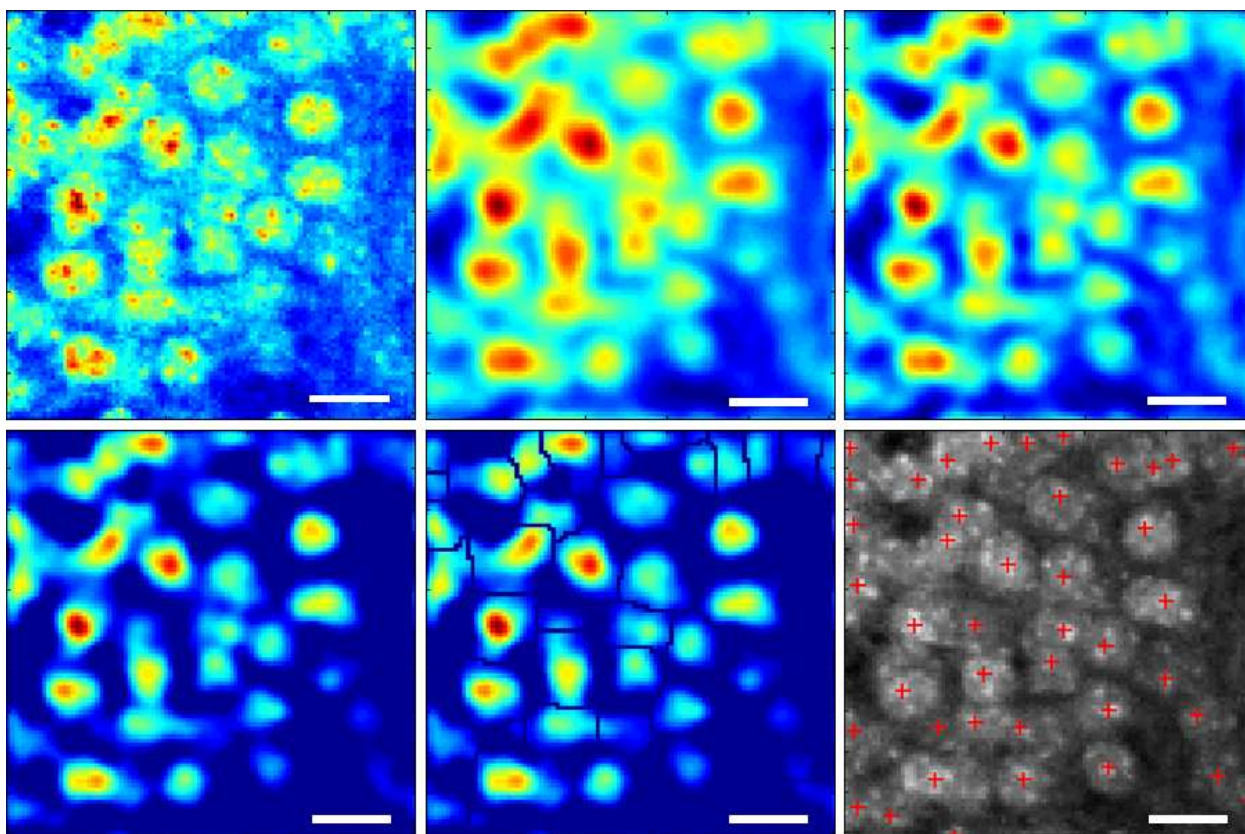


Рисунок 1. Центральная z-плоскость гистологической секции с ядрами клеток, маркированными DAPI. Последовательные шаги обработки: исходное изображение (a), после низкочастотного (b) и высокочастотного (c) гауссовых фильтров, после установки порога интенсивности (d), клетки, разделённые преобразованием водораздела (e) и детектированные клетки (f). Размер шкалы 10 мкм.

Целью данной работы была разработка и проверка метода трёхмерного количественного анализа клеточных популяций, который бы решил эти проблемы. Образцы с флуоресцентно маркированными клетками (маркеры EdU, BrdU, Nestin-GFP и NeuN) снимались на конфокальных микроскопах Olympus FluoView 1000 и Andor Revolution WD. Процедуры анализа разрабатывались в среде компьютерной алгебры Matlab. Высокочастотный и низкочастотный трёхмерные гауссовы фильтры использовались для удаления эффектов шума фотодетектора, неоднородной окраски и фона. Фильтры были реализованы в пространстве Фурье для увеличения скорости работы. Установка порогового значения интенсивности использовалась для удаления остаточного шума. Трёхмерный алгоритм водораздела был применён для разделения максимумов интенсивности. Процедура определения статистической значимости максимумов применялась для определения того, какие максимумы соответствуют клеткам. Была реализована возможность колокализации найденных клеток в разных каналах. На основе межклеточных расстояний найденных клеток был реализован алгоритм кластеризации в субпопуляции. Результаты работы программы валидированы сравнением с экспертными оценками. Показано, что разработанный метод решает установленные проблемы автоматического анализа. Метод готов к использованию в экспериментах. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-29-01305, а также гранта 11.G34.31.0071 Министерства Образования и Науки РФ под руководством А.А. Кулакова и Г.Н. Ениколопова.