

ИНДИКАЦИЯ СТАДИЙ / ФАЗ ЦИТОТОМИИ ПУТЕМ КАРТИРОВАНИЯ ИЗОФОТ СПЕКЛОГРАММ И ЦИФРОВОГО АНАЛИЗА БОРДАНТНОСТИ¹

Градов О.В. (ИНЭПХФ РАН), Нотченко А.В. (ИППИ РАН)

Базовая проблема биологии является топологической, так как топология есть та математическая дисциплина, которая позволяет переходить от частного к общему.

Thom R. "Structural Stability and Morphogenesis"

В настоящее время существует проблема автоматизированной морфологической идентификации фаз клеточного цикла без применения автоматического распознавания образов клеток, осуществляемого по маскам / шаблонам. Особенно остро эта проблема встает при морфометрии ассиметрично делящихся клеток (см., напр., [1]) и нестандартной сегрегации клеточных компартментов (см., напр., [2]), включая деформацию ядер, влияющую на ход кариотомии. Известные данные о биомеханике клеточного деления [3] позволяют подойти к этому с иных позиций, рассмотрев последовательность фаз цикла как стадии механической деформации и, следовательно, имея возможность исследования последней путем обработки цейтрафера спеклограмм (в частности, спеклы используются в том же качестве в методах ESPI). Поскольку морфологические характеристики клеток в таком случае будут различны на различных этапах регистрации, единственным возможным решением является анализ не морфологических характеристик, а топологии, изменяющейся во времени в ходе клеточного цикла. Критерием сравнения в таком случае будет связность-несвязность и топологическая эквивалентность (неэквивалентность) спеклов.

С топологических позиций, спеклограммы, получаемые при взаимодействии пучка с клеточной культурой, можно рассматривать как дискретные двумерные пространства, так как они образованы группами изолированных (в пиковом RMS) пятен. При оптимальном увеличении пятну на спекле соответствует клетка. Цейтраферные спеклограммы культур до начала деформаций гомеоморфны как пространства, имеющие одинаковую мощность - то есть одинаковое количество элементов (эквивалентного типа). Во времени происходит дрейф точек подмножеств, при котором точки перемещаются во времени и пространстве, но не меняют мощность множества в силу сохранения из количества, что эквивалентно

$$f : X \rightarrow Y.$$

Любой элемент имеет свой прообраз как во времени – предыдущее состояние подмножеств, так и в пространстве – расположение точек меняется в зависимости от состояния культуры

$$\forall y \in Y, \exists x \in X f(x) = y.$$

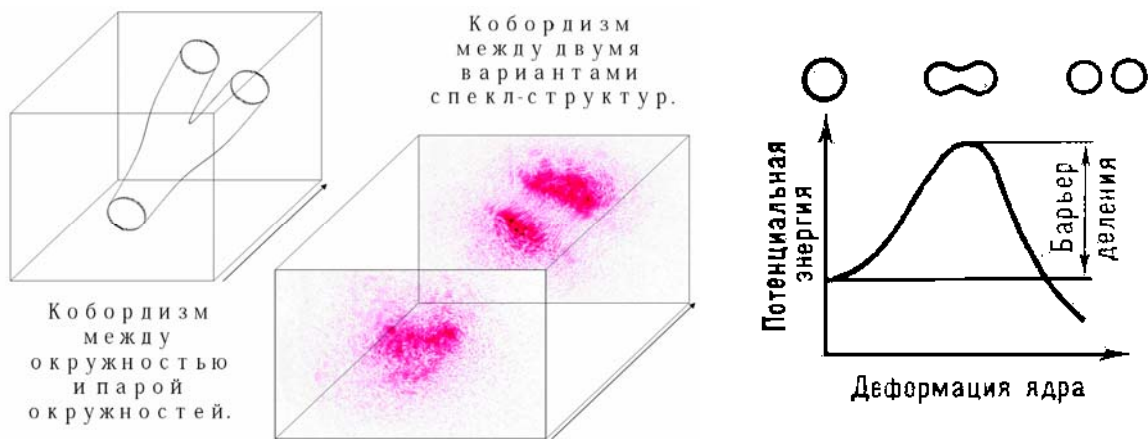
В результате этого меняются топологические характеристики структур спеклограмм, в частности, их связность как множеств. Спеклограммы могут иметь вид континуума, т.е. Хаусдорфова пространства. Это значит, что две точки x и y из X обладают непересекающимися окрестностями $U(x)$, $V(y)$ – зоной рассеяния. Это тождественно определению замкнутости диагонали в декартовом $X \times X$ - мерном квадрате:

$$\Delta = \{(x, x) \mid x \in X\}.$$

В сущности, перемещение точек (пятен) спеклограммы можно интерпретировать как перестановку элементов множества точек, то есть изоморфизм множества точек, отображающий модель на себя или, иными словами, его автоморфизм. Аналогичное существенно для соответствующих ему групп. Автоморфизмом групп в данном случае является изоморфизм группы на себя – совокупность автоморфизмов некоторой модели спеклов с операцией композиции и тождественным отображением. Композиция в данном случае следует в биективной форме, так как композиция инъекции и сюръекции на выходе дает биекцию, а тождественность отображения вытекает из статичности структуры во времени до деления.

¹ Воспроизводится по публ.: Градов О. В., Нотченко А. В. Топологическое определение фаз клеточного цикла методом изолинейного 3D-картирования спеклограмм // Труды VIII Российско-Баварской конференции по биомедицинской инженерии. — 2012. — С. 206–210.

Ситуация кардинально меняется в случае деления клеток. Если ограничивать спекл клетки окружностью, то можно видеть, что между состояниями спекла клетки в ходе её цитотомии/цитокинеза наблюдается бордизм (бордантность между окружностью и парой окружностей, в роли которых выступают соответственно исходная и дочерние клетки). В ходе клеточного цикла происходят ультраструктурные перестройки клетки, в связи с чем изменяется также и тонкая структура спекла. Таким образом, имеет смысл исследование тонкой структуры спеклограмм на предмет бордизмов структур, находящихся на пределе разрешения оптической системы в ходе цитотомии. Пример бордизма между состояниями до удвоения и по окончании удвоения спекла приведен на илл. 1. Его энергетическая интерпретация, данная там же, состоит в преодолении барьера деления (критической удельной поверхности клетки) при получении двух дочерних клеточных структур, из чего следует изменение RMS сигнала спекла при изменении топологической связности в системе.



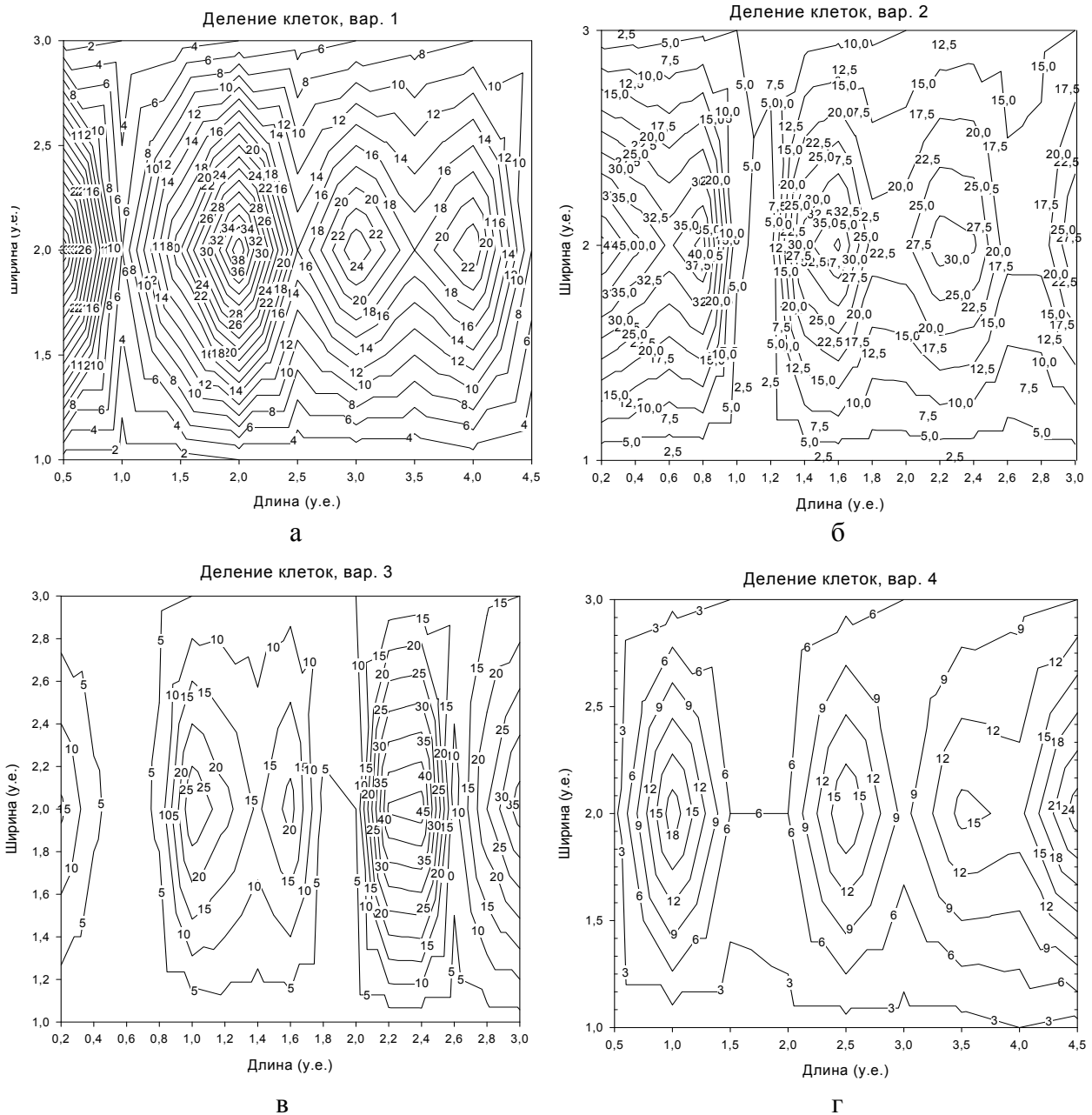
Илл. 1: Пример бордизма между спеклами в процессе деления и энергетическая модель деления (Френкеля) при достижении критической удельной поверхности (для аналогии).

Теоретически возможно смоделировать различные топологии симметричного и асимметричного деления, спрогнозировав тем самым топологию соответствующих спеклограмм. На илл. 2 приведены примеры подобного прогноза. В сущности, полученные распределения с изолинейной визуализацией можно рассматривать как прогноз изофот этих спеклограмм. Рассмотрим изменения характера лазерного излучения при взаимодействии с культуральной средой и находящимися в ней репродуцирующимися клетками на примере простой модели. Распространяющийся в воздушной среде лазерный луч, не искаженный взаимодействием с конденсированной средой, когерентен и при проекции даёт спекл, соответствующий своей направленности. Этот случай представлен на илл. 3 а. При рассеянии в диффузном матриксе луч декогерирует и спекл представляет собой стохастическую интерференционную картину с практически гауссовым распределением, что изображено на илл. 3 б. При взаимодействии с клеточной культурой характер распределения в локальных областях принципиально меняется в зависимости от клеточного строения в той или иной области культуры. Так, в случае симметричной цитотомии и бордантный спекл будет иметь симметричную структуру, что показано на илл. 3 в. Подобные структуры, прогнозируемые по топологии клеток, можно наблюдать на илл. 2 а (после 2.5 по абсциссе), 2 б. В случае несколько асимметричной его формы, прогнозируемой в модели на илл. 2 в, спекл будет выглядеть подобно расщеплению, изображенному на илл. 3 г. На илл. 3 г также распознается смоделированный цитокинез, предсказанный для симметричного случая на илл. 2 г.

Подчеркнем, что на илл. 2 приведены теоретические модели, а на илл. 3 - результаты непосредственного модельного эксперимента.

В ряде случаев условия регистрации и фоновая облученность матрикса (см. илл. 4 а) не дают возможности четко отделить спекл клетки от фона, что мешает качественному распознаванию деления клеток или клеточных взаимодействий в культуре по её топологии, как

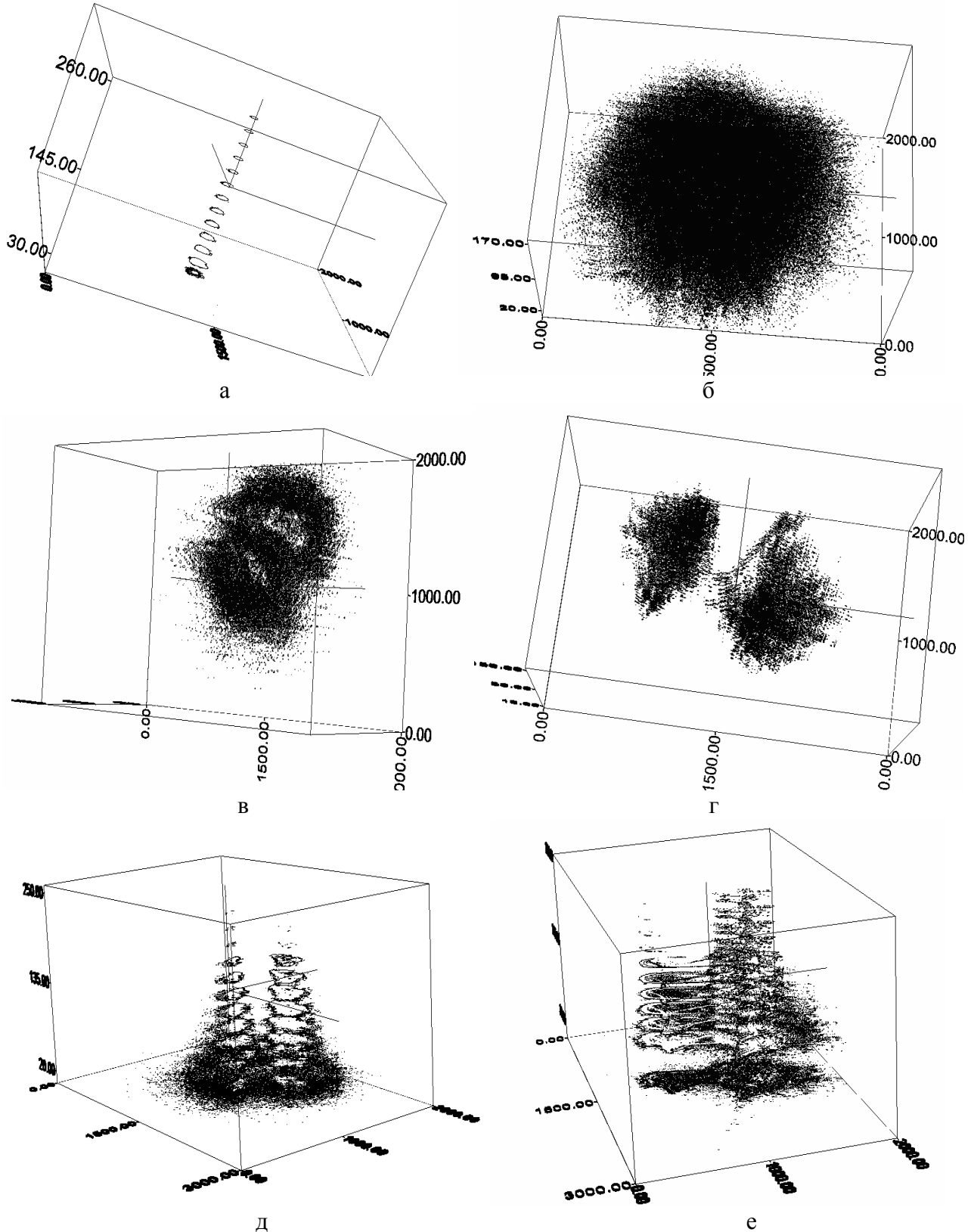
это видно на илл. 3 д, где фон настолько зашумлен, что топологическая различимость клеток становится возможной только на четвертой снизу изолинии (изофоте). В таких случаях следует применять операцию бинаризации, но она может приводить к неправильным результатам при субъективном определении уровня (следует отметить, что в таких случаях требуется выбирать между визуализацией изофот поглощения или пропускания в зависимости от оптической плотности и проницаемости клетки). Другим источником ошибок могут являться интерференционные артефакты, подобные изображенному на илл. 3 е, топологически неэквивалентные клеткам, однако наряду с ними визуализируемые на спеклах и их 3D-реконструкциях. Требуется автоматически исключать их из числа распознаваемых как клетки или процессы деления объектов на спеклограмме. Таким образом, из приведенных данных можно заключить, что существует объективная необходимость в создании программно-аппаратного комплекса для получения и топологического анализа спеклограмм.



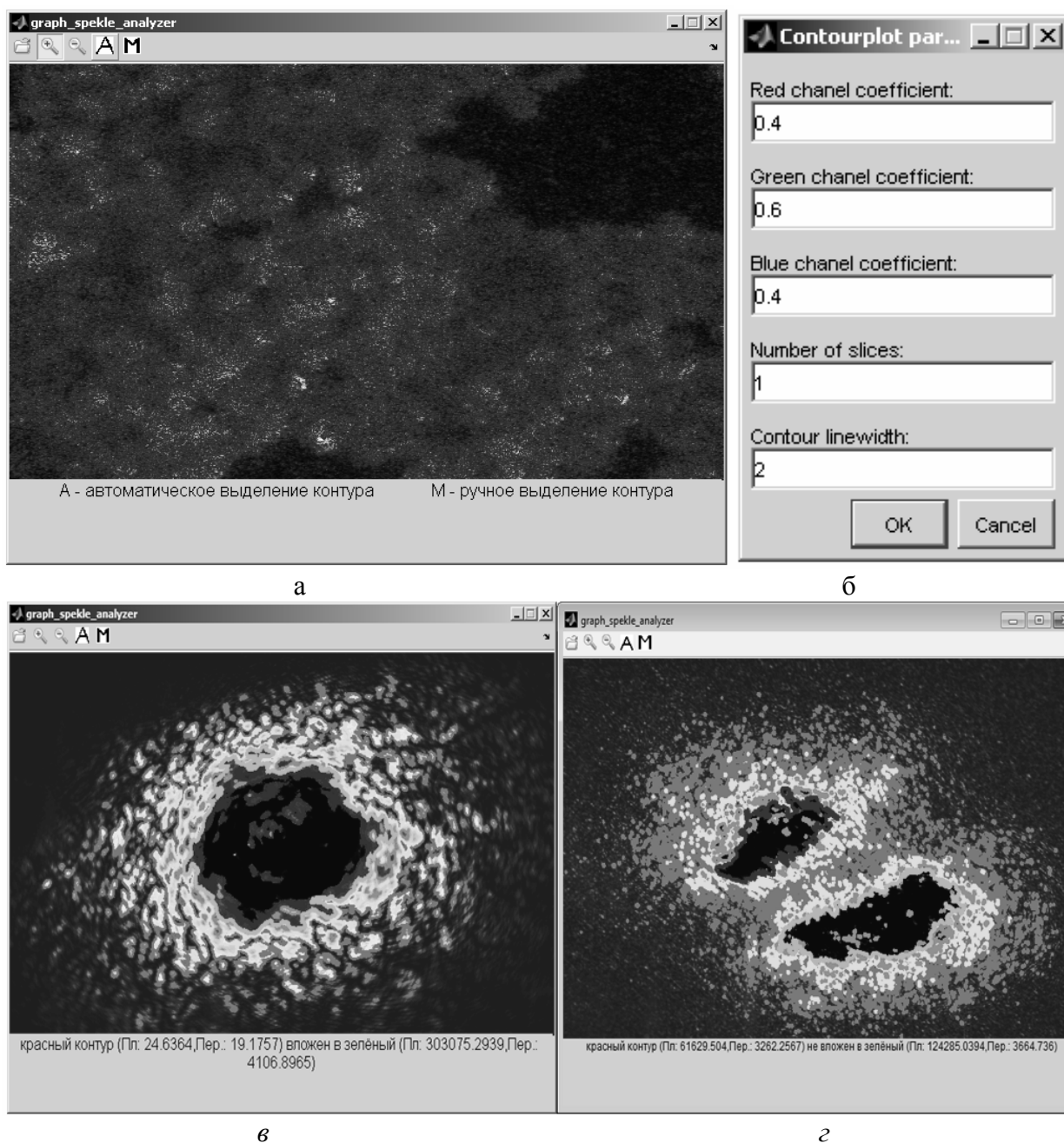
Илл. 2: Моделирование топологии делящихся структур - прогноз карт изофот спеклограмм.

Нами предлагается элементарная технология, позволяющая прогнозировать формы деления клеток (топологии) и их спеклограммы, адекватно распознающая контуры по данным цифровой центрифужной регистрации спеклограмм, и топологически определяющая вложенность контуров клеток и их морфологические отношения друг к другу как множеств

(диаграммы Венна). Она состоит из лазерной установки для получения спеклограмм [4] и постоянной совершенствующейся программы Graph_Speckle_Analyzer (автор А.Нотченко), позволяющей производить автоматическое определение вложенности контуров в различных спектральных каналах и при различном их соотношении (см. илл. 4 а, б). Программное обеспечение имеет как версию GUI для MATLAB, так и автономно функционирующую от последнего версию. Его применимость проверена на разных лазерах и тест-микрообъектах.



Илл. 3: Трёхмерные картины спеклов различной формы.



Илл. 4: а - пример спекл-микрофотографии культуры клеток, б - окно канальной установки, в, г - топологический анализ одиночного и удваивающегося спеклов.

Литература:

1. Asymmetric Cell Division (Ed. by A. Macieira-Coelho), Springer, 260 p., 2010.
2. Division and Segregation of Organelles (Ed. by S.A. Boffey, D. Lloyd). Cambridge University Press, 272 p., 1989.
3. Biomechanics of Active Movement and Division of Cells (Ed. by N. Akkas), Springer, 578 p., 1994
4. Notchenko A.V., Gradov O.V. Five-axis robotic laser system and digital processing algorithm for registration and morphotopological identification of cellular structures in tissue histomorphogenesis. Visualization, Image Processing and Computation in Biomedicine. — 2013. — Vol. 2, no. 1. — P. 1–33.
5. Membranes and Circadian Rhythms (Ed. by J.-L. Guisset, G.M. Petiau-de Vries, T. V. Driesche), Springer, 226 p., 1996.