

УДК 57.088.5 + 519.688

Использование моментов Цернике при анализе изображений*

Л.А. Бабкина¹, Ю.П. Гармай^{1,2}, Д.В. Лебедев^{1,2}, Р.А. Пантина^{1,2},
М.В. Филатов^{1,2}, В.В. Исаев-Иванов^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, РАН, Гатчина, Россия

²Научно-образовательная структура “Биофизика” СПбГПУ и ПИЯФ РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mails: lyubov_babkina@mail.ru (Бабкина Л.А.), yuri.from.spb@gmail.com (Гармай Ю.П.), dtry@omrb.pnpi.spb.ru (Лебедев Д.В.), filatov@omrb.pnpi.spb.ru (Филатов М.В.), isaev@omrb.pnpi.spb.ru (Исаев-Иванов В.В.)

Бабкина Л.А., Гармай Ю.П., Лебедев Д.В., Пантина Р.А., Филатов М.В., Исаев-Иванов В.В. Использование моментов Цернике при анализе изображений // Сиб. журн. вычисл. математики / РАН. Сиб. отд.-ние. — Новосибирск, 2013. — Т. 16, № 2. — С. 147–163.

В работе предложен метод анализа изображений АСМ ядер клеток высших путем разложения этих изображений по моментам Цернике. Предложенный метод позволяет осуществить разложение экспериментального изображения по моментам Цернике, пространственными гармониками которого являются полиномы Цернике. Показано, что обратная процедура восстановления изображения с помощью полиномов Цернике сходится к экспериментальному изображению, а амплитуды разложения являются количественной спектральной характеристикой при сравнении морфологических особенностей различных изображений. Показано, что амплитуды разложения могут быть использованы в качестве исходных векторов при кластерном анализе изображений методом РСА.

Ключевые слова: анализ изображений, моменты Цернике, атомная силовая микроскопия, ядра клеток высших, РСА.

Babkina L.A., Garmay Yu.P., Lebedev D.V., Pantina, R.A., Filatov M.V., Isaev-Ivanov V.V. Using Zernike moments for analysis of images // Siberian J. Num. Math. / Sib. Branch of Russ. Acad. of Sci. — Novosibirsk, 2013. — Vol. 16, № 2. — P. 147–163.

A method for analyzing AFM images of the cell nuclei of higher organisms by expanding these images by Zernike moments is proposed. This method allows for expanding the pilot image by Zernike moments whose spatial harmonics are Zernike polynomials. It is shown that the reverse procedure of image reconstruction using Zernike polynomials converges to the experimental image and the expansion amplitude is a quantitative spectral characteristic when comparing the morphological features of different images. It is shown that expansion amplitudes can be used as input vectors for cluster analysis of images by PCA.

Key words: image analysis, Zernike moments, atomic force microscopy, cell nuclei of higher organisms, PCA.

1. Введение

Современное представление о структуре хроматина в ядре интерфазной клетки сводится к иерархии структур [1], каждая из которых исследуется практически независимо

*Работа поддержана Программой РАН “Физика элементарных частиц”, подпрограммой “Нейтронная физика”, направлением “Исследование структуры, динамики и неординарных свойств вещества нейтронными методами” и грантом Федерального агентства по образованию № 2.2.1.1/1166 АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 гг.)”.

друг от друга как в структурном, так и в функциональном аспекте, хотя именно структура хроматина и определяет морфологические особенности целого ядра. Эта иерархия структур включает в себя двойную спираль Уотсона–Крика (~ 2 нм), нуклеосомный уровень организации хроматина (~ 10 нм) [2], фибрильную структуру (~ 30 нм) [3], петли (300 нм), хромосомы (~ 1000 нм) и целое ядро (~ 5 – 10 мкм). К сожалению, как правило, эти уровни организации хроматина исследуются не в структуре ядра, как целого, а путем их препаративной экстракции из общей структуры ядра [4].

Атомная силовая микроскопия (АСМ) за двадцать лет, прошедших с ее открытия [5], стала широко используемым методом визуализации изображений в различных областях науки, включая биологию и медицину [6]. В биологии ее возможности используются при визуализации отдельных молекул [7], комплексов [8], поверхности органелл, ядер и целых клеток [9].

Систематические исследования морфологических различий между ядрами клеток эукариот, выделенных из нативных клеток, и из клеток, подвергнутых различным воздействиям; между ядрами, выделенными из клеток, имеющих разное тканевое и организменное происхождение; между ядрами нормальных клеток и злокачественно трансформированных, на уровне разрешения, которое обеспечивает АСМ, в литературе отсутствуют.

Это обусловлено тем, что топография поверхности ядра клетки, которая обусловлена его внутренней иерархически сложной структурой хроматина, имеет иррегулярную поверхность, и получение количественной информации о таком объекте затруднено. Даже когда визуализованные объекты имеют зрительные отличия, эти отличия на таких объектах как клеточное ядро носят статистический характер и перевод этих отличий в количественные критерии требует применения подходов, характерных для анализа изображений.

Одной из причин отсутствия работ по систематическому исследованию морфологических различий ядер в норме и при патологии методом АСМ является отсутствие метода анализа получаемых в таком исследовании изображений. Учитывая иррегулярный и стохастический характер исследуемой поверхности, такой анализ должен содержать две стадии. Во-первых, необходимо разработать метод выбора информационных параметров, которые будут количественно характеризовать получаемые изображения. Во-вторых, используя эти информационные параметры, необходимо применить метод факторного или кластерного анализа, так как получаемые изображения ядер будут иметь стохастические различия. На первом этапе в качестве выбора информационных параметров можно применять, часто используемый в физике, метод разложения произвольной функции по подходящей системе ортогональных функций, и амплитуды гармоник разложения использовать как информационные параметры для дальнейшего анализа.

В последние десятилетия различные функции геометрических моментов, благодаря их возможностям представлять основные особенности изображений, предлагались для анализа последних. Ну [10] первый вывел ряд инвариантных моментов, которые не зависели от положения, размеров и ориентации изображения. Эти инвариантные моменты успешно использовались в различных областях для распознавания образов. Однако геометрические моменты не ортогональны, и, как следствие этого, реконструкция изображений с помощью этих моментов представляет собой трудную задачу. Основываясь на теории ортогональных полиномов, Теаге [11] показал, что изображения могут быть достаточно просто реконструированы рядом ортогональных моментов, таких как моменты Лежандра и Цернике. Теh и Chin [12] оценили различные типы моментов изображений в терминах чувствительности к шуму, информационной избыточности и возможности описания изображения. Они нашли, что псевдо-Цернике моменты имеют наилучшие харак-

теристики по этим критериям. Система ортогональных полиномов Цернике, из которых формируются псевдо-Цернике моменты, определена на единичном круге, и полиномы Цернике обладают цилиндрической симметрией, которой, как правило, обладают изображения АСМ ядер эукариот.

Принимая во внимание, что получаемые изображения ядер будут иметь стохастические различия, решение вопроса о различии объектов исследования и разбиение результатов эксперимента на статистически различимые группы можно осуществить, используя методы факторного и кластерного анализа. Одной из широко применяемых техник многофакторного анализа является метод главных компонент или Principal Component Analysis (PCA). Суть метода заключается в представлении исходных данных в новой системе координат меньшей размерности для их наиболее удобной интерпретации и анализа. Редукция пространства происходит без существенной потери информативности, так как в основе PCA лежит объединение скореллированных признаков в один. В основном процедура выделения главных компонент подобна вращению, максимизирующему дисперсию (варимакс) исходного пространства переменных.

В настоящей работе авторы предлагают метод анализа АСМ изображений ядер клеток высших, который состоит из двух этапов: на первом этапе используется разложение АСМ изображения по псевдомоментам Цернике, которые относятся к классу ортогональных геометрических моментов и представляют собой интегралы функции изображения по площади; на втором этапе модули разложения используются в качестве многомерных векторов (информационных признаков) для сравнения изображений разных ядер с помощью метода PCA.

Метод разрабатывался на АСМ изображениях ядер клеток эритроцитов кур (ЯЭК) и культивируемых клеток аденокарциномы шейки матки человека (HeLa).

2. Материалы и методы

Используемые клетки и получение ядер. Работа выполнена на ядрах клеток эритроцитов кур и культивируемых клеток аденокарциномы шейки матки человека HeLa.

Выделение ядер клеток эритроцитов курицы. Кровь кур получали, используя гепарин (50 единиц на мл) в качестве антикоагулянта. Эритроциты кур получали многократной отмывкой от белков плазмы крови с помощью центрифугирования в изотоническом фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 10 мМ ЭДТА. Ядра приготавливали путем лизиса мембран неионным детергентом Тритон X-100 (0.2% раствор в фосфатном буфере pH 7.4). В результате 5 минут обработки этим детергентом происходило растворение цитоплазматической и ядерной мембран. Выделенные ядра фиксировали обработкой 0.05% раствором глутарового альдегида в течение 10 минут, после чего фиксатор отмывали центрифугированием. Ядра хранились при 4°C в изотоничном фосфатном буфере, содержащем 50 мМ ЭДТА. Для оценки сохранности ядер их пробные образцы окрашивались бромистым этидием (50 мкг на мл) и анализировались с помощью проточного цитофлуориметра с аргоновым лазером в качестве источника света (длина волны возбуждающего света 488 нм). С целью выяснения, как влияет процедура фиксации ядер глутаровым альдегидом на структуру хроматина, нами были получены кривые рассеяния нейтронов для ядер, не обработанных и обработанных глутаровым альдегидом. Для концентрации глутарового альдегида (0.05%), которая использовалась в наших препаративных процедурах, кривые рассеяния, полученные на ядрах с фиксированной структурой, практически не отличались от аналогичных кривых для ядер, не обработанных глутаровым альдегидом [13]. В ряде экспериментов для фиксации ядер использовал-

ся 4% раствор формальдегида в изотоничном фосфатном буфере рН 7.4. Выделенные ядра обрабатывались фиксирующим раствором в течение 10 минут с последующим отмыванием фиксатора. При приготовлении образцов ядер без использования фиксатора нанесенные на стекло ядра просто интенсивно подсушивались, что приводило к их фиксации.

Выделение ядер клеток HeLa. Клетки HeLa выращивались в DMEM культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. После перевода в суспензию в изотоничном фосфатном буфере рН 7.4 клетки обрабатывались Тритоном X-100 и фиксировались глутаровым альдегидом так же, как это было описано для эритроцитов кур.

Нанесение на подложку. Перед нанесением на подложку клеточные ядра отмывались от фиксатора и взвешивались в дистиллированной воде. Полученную суспензию наносили на обезжиренное предметное стекло и высушивали на воздухе при комнатной температуре, что обеспечивало прочную адгезию ядер к подложке. Такой способ подготовки образцов дает возможность пользоваться воздушным режимом сканирования атомно-силовой микроскопии, позволяющим получить наилучшее разрешение.

Атомная силовая микроскопия. Измерения проводились на сканирующем зондовом микроскопе серии Solver Bio (NT-MDT, Зеленоград, Россия). Для получения изображения поверхности клеточных ядер использовался полуконтактный режим сканирования на воздухе с применением неконтактных кремниевых зондов типа NSG01 (NT-MDT), предназначенных для биологических объектов с характерной жесткостью 5.5 Н/м и радиусом кривизны острия зонда не более 10 нм. Начальная амплитуда колебаний кантилевера сканирования выбиралась (экспериментально) 16 нА в токовом эквиваленте, SetPoint устанавливался равным половине амплитуды модуляции. Сканирование проводилось при частоте развертки 1.0 Гц.

Псевдо-Цернике моменты вычислялись в полярных координатах при разложении исходной функции по комплексным полиномам, которые формируют полный ортонормированный базис. Полиномы определялись внутри единичного круга и имели вид [14]:

$$V_{pq} = R_{pq}(r)e^{iq\theta}, \quad (1)$$

$$r = \sqrt{x^2 + y^2}, \quad |r| \leq 1, \quad \theta = \arctan \frac{y}{x}. \quad (2)$$

Момент порядка $(p + q)$ определялся как

$$Z_{pq} = \frac{p+1}{\pi} \int_0^1 \int_{-\pi}^{\pi} V_{pq}^* f(r, \theta) r dr d\theta, \quad (3)$$

$$Z_{pq} = \frac{p+1}{\pi} \int_0^1 \int_{-\pi}^{\pi} R_{pq}(r) e^{-iq\theta} f(r, \theta) r dr d\theta, \quad (4)$$

где R_{pq} — радиальные полиномы Цернике, а p и q — радиальный и азимутальный порядки соответственно, причем $p \geq 0$, $|q| \leq p$,

$$R_{pq}(r) = \sum_{s=0}^{p-|q|} (-1)^s \frac{(2p+1-s)!}{s!(p+|q|-s)!(p-|q|-s)!} r^{p-s}. \quad (5)$$

При расчетах использовались вещественная и мнимая части моментов, а также и модули комплексных векторов, называемые амплитудами моментов Цернике:

$$C_{pq} = 2\text{Re}[Z_{pq}], \quad S_{pq} = -2\text{Im}[Z_{pq}], \quad |Z_{pq}| = \sqrt{C_{pq}^2 + S_{pq}^2}. \quad (6)$$

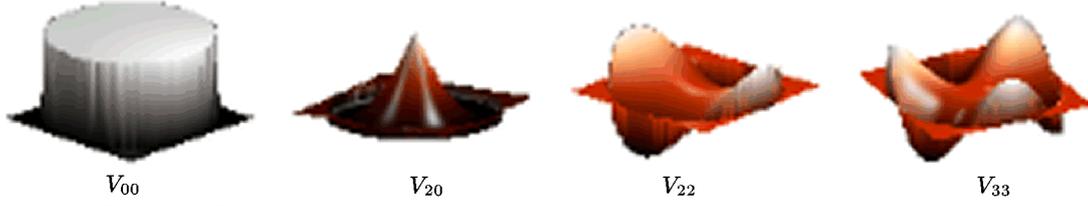


Рис. 1. Трехмерное представление полиномов Цернике первых порядков



Рис. 2. Блок-схема алгоритма анализа изображений на основе моментов Цернике

На рис. 1 приведены некоторые полиномы Цернике.

Алгоритм обработки экспериментальных изображений. Исходные АСМ-данные экспортировались в текстовый формат и представлялись в виде двумерной матрицы чисел размером 256×256 . Каждый элемент такой матрицы представлял собой пиксель полутоновой картинки, а значение элемента матрицы определяло высоту полученного изображения в нанометрах.

Структурная схема процедуры обработки изображения представлена на рис. 2.

Блок предварительной обработки. АСМ-изображения, как правило, содержат общую константу и общий наклон, которые не несут полезной информации об объекте, а отражают неточность установки образца относительно зонда. Для устранения данного недостатка проводилась операция вычитания аппроксимирующей плоскости из исходного изображения.

Инвариантность амплитуд моментов псевдо-Цернике к сдвигу достигалась путем совмещения центра круга разложения с центром массы ядра. Затем проводилась нормализация шкал изображения по следующему принципу:

$$\text{Picture}(x, y) : 0 \leq x \leq 255, 0 \leq y \leq 255 \rightarrow \text{Picture}(r, \theta) : 0 \leq r \leq 1, 0 \leq \theta \leq 2\pi. \quad (7)$$

Вычисление моментов псевдо-Цернике осуществлялось с использованием двухуровневого рекурсивного алгоритма, описанного в работе [14]. Максимальный радиальный порядок P_{\max} разложения был выбран равным 18, которому соответствует набор из 190 полиномов. Выбор такого P_{\max} обусловлен следующими причинами. Увеличение числа полиномов требует существенно более длительных вычислений, так как время вычисления нарастает как $((p_{\max}!) \times (\text{const})^{P_{\max}})$, и дальнейшее увеличение P_{\max} является неэффективным.

Вычисление моментов псевдо-Цернике для дискретного изображения размером $M \times M$ проводилось по следующей формуле [15]:

$$\hat{Z}_{pq} = \frac{p+1}{\pi} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^M V_{pq}^*(r_{ij}) f(x_i, y_j), \quad (8)$$

где $f(x_i, y_j)$ — экспериментальное изображение, а r_{ij} — дискретные полярные координаты:

$$r_{ij} = \sqrt{x_i^2 + y_j^2}, \quad \theta_{ij} = \arctg \frac{y_j}{x_i}, \quad (9)$$

при условии $r_{ij} \leq 1$. Пиксели, не входящие в круг разложения, в вычислениях не участвовали.

Реконструкция изображения. По теореме о единственности разложения исходное изображение восстанавливается по моментам всех порядков, хотя на практике работают всегда с конечным числом моментов. Исходный образ реконструировался по моментам в соответствии с выражением, приведенным в [15]:

$$\hat{f}(r, \theta) = \sum_{p=0}^{p_{\max}} \sum_{q=0}^p (Z_{pq}^c \cos(q\theta) + Z_{pq}^s \sin(q\theta)) R_{pq}(r) + \frac{Z_{p0}^c}{2} R_{p0}(r). \quad (10)$$

Вычисление разностной функции. Вычисление разностной функции между изображениями экспериментальным и реконструированным по различному числу моментов проводилось для оценки сходимости восстановленного изображения к экспериментальному. Для оценки ошибки процедуры реконструкции вводилась следующая характеристика:

$$Er_{\text{rec}} = \frac{1}{Z_{00}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^M (f(x_i, y_j) - \hat{f}(x_i, y_j))^2}{n-1}}, \quad (11)$$

где n — общее число точек, по которым проходило суммирование. Параметр ошибки реконструкции нормировался на значение Z_{00} . Как видно из приведенного выражения, параметр ошибки реконструкции является по своему смыслу стандартной девиацией, отнесенной к средней интенсивности экспериментального изображения (средней высоте в случае АСМ).

Предложенный алгоритм анализа изображений был реализован на языке C++. Вычислительные эксперименты по обработке изображений проводились на компьютере Pentium 1.8 ГГц с 248 Мбайт ОЗУ. Программа, реализующая алгоритм РСА, написана на языке Python.

3. Результаты и обсуждение

Тестирование алгоритма. Для проверки процедуры вычисления моментов и реконструкции по ним оригинального изображения проводилось тестирование программного обеспечения на примере тестовых изображений.

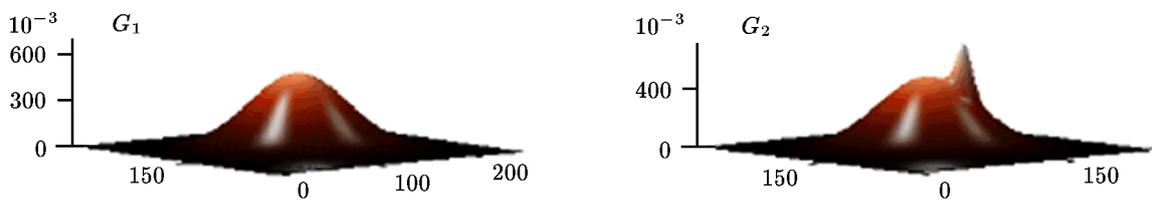


Рис. 3. Тестовые объекты G_1 и G_2

Тестовые изображения представляли собой трехмерные поверхности, синтезированные на основе одной (рис. 3, G_1) или суперпозиции двух функций Гаусса (рис. 3, G_2) с различными полуширинами. Тестовый объект G_1 — дискретное изображение 256×256 пикселей, синтезированное с использованием функции Гаусса по формуле

$$G_1(x_i, y_j) = A_1 \exp\{-[(x_i - x_{c1})^2 + (y_j - y_{c1})^2]/2\sigma_1^2\} \quad (12)$$

с параметрами $A_1 = 0.5 \times 10^{-3}$, $\sigma_1 = 40$, $x_{c1} = y_{c1} = 0$, $0 \leq i \leq 255$, $0 \leq j \leq 255$.

Тестовый объект G_2 синтезирован по формуле

$$G_2(x_i, y_j) = G_1(x_i, y_j) + A_2 \exp\{ -[(x_i - x_{c2})^2 + (y_j - y_{c2})^2] / 2\sigma_2^2 \} \quad (13)$$

с параметрами $A_2 = 0.7 \times 10^{-3}$, $\sigma_2 = 6$, $x_{c2} = y_{c2} = 20$ (узкий Гаусс смещен относительно центра изображения), $0 \leq i \leq 256$, $0 \leq j \leq 256$.

После вычисления моментов для каждого из случаев исходные изображения восстанавливали, используя разное число полиномов. Максимальный ранг используемого разложения был равным $p_{\max} = 18$. На серии рис. 4 проиллюстрирован процесс реконструкции, из которого видно, что моменты первых порядков несут в себе информацию об основной форме объекта, а моменты более высоких порядков позволяют описывать особенности изображения. Используя при восстановлении изображения большее количество моментов, исходный образ описывается наиболее подробно, и аппроксимация реконструкции к исходному образу наилучшая. Однако вычисление моментов дальних порядков требует больших вычислительных мощностей и на практике приходится ограничиваться определенным порядком разложения, время счета которого представляется разумным.

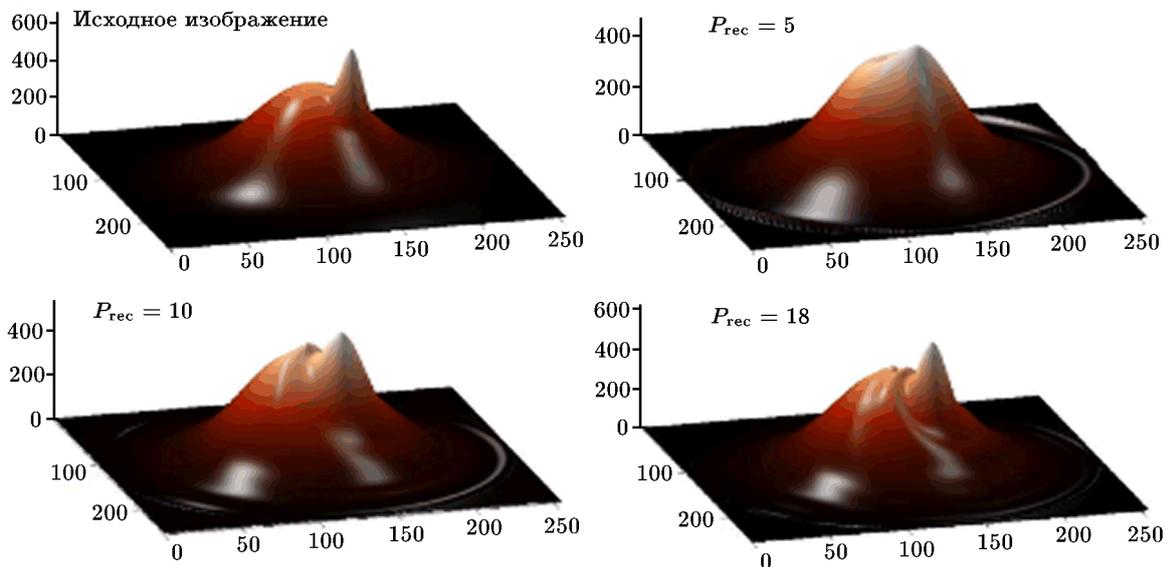


Рис. 4. Процесс восстановления исходного изображения тестового объекта G_2 с использованием моментов псевдо-Цернике

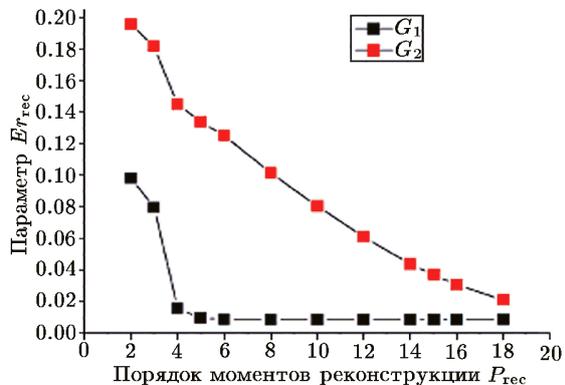


Рис. 5. Параметр ошибки реконструкции как функция максимального порядка моментов

Количественная оценка процесса сходимости представлена на рис. 5. Эта характеристика, с одной стороны, отражает способность заданного числа моментов псевдо-Цернике описать объект. С другой стороны, при описании конкретного объекта всегда используется конечное число полиномов, и, следовательно, точность описания изображения с помощью разложения конечна. Как видно из приведенного рисунка, при описании объекта G_1 , созданного на основе Гаусса с полушириной, равной примерно $1/3$ части радиуса круга разложения, разностная функция составляет

около 2% уже после использования первых 4-х порядков для ее описания. При описании же изображения G_2 , которое является суперпозицией двух функций Гаусса, одна из которых имеет полуширину, соответствующую $1/20$ части радиуса круга разложения, разностная функция спадает медленно и достигает величины 3% при использовании 18-ти порядков полиномов псевдо-Цернике. Такое представление исследуемого изображения полиномами псевдо-Цернике можно использовать и как сглаживающий фильтр.

Зависимость величины амплитуды вычисленного момента Цернике от номера полинома является аналогом функции спектральной плотности в разложении Фурье и также является количественной характеристикой экспериментального изображения. По аналогии с Фурье разложением каждому полиному Цернике V_{pq} был присвоен *порядковый номер* в соответствии с формулой

$$N = q + \sum_{i=0}^p (p - i). \quad (14)$$

При этом зависимость амплитуд вычисленных моментов пространственных гармоник V_{pq} разложения от их порядкового номера, в соответствии с (14), была определена как функция спектральной плотности разложения данного изображения по моментам Цернике. Кроме того, как показано в [11] и [16], последовательности Z_{p0} и $|Z_{pq}|$ являются инвариантами первого порядка к повороту изображения относительно оси единичного круга разложения.

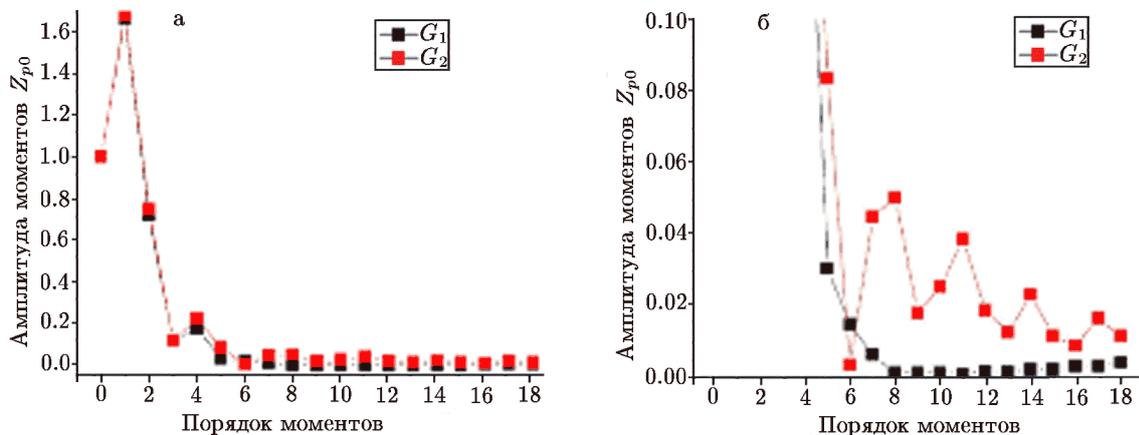


Рис. 6. Зависимость амплитуд псевдо-Цернике моментов Z_{p0} от порядка разложения P : а — изображение G_1 , б — изображение G_2

На рис. 6 приведены функции спектральной плотности разложения тестовых изображений G_1 и G_2 , представляющих собой последовательность инвариантов Z_{p0} , определенные в соответствии с выражениями (4), (6) и нормированные на амплитуду Z_{00} , для тестовых изображений G_1 и G_2 . Из этих рисунков видно, что для изображения одной функции Гаусса необходимо пять первых инвариантов Z_{p0} , в то время как для изображения G_2 необходимы все 18 используемых порядков. При этом следует отметить, что ряд моментов имеет большие спектральные амплитуды, необходимые для описания изображения функции Гаусса с узкой полушириной.

На рис. 7 приведены функции спектральной плотности разложения тестовых изображений G_1 и G_2 , представляющих собой последовательность инвариантов $|Z_{pq}|$ согласно [16]. При этом амплитуды Z_{pq} определены в соответствии с выражениями (4), (6) и нормированы на амплитуду Z_{00} . Из рис. 7а видно, что для описания этого изображе-

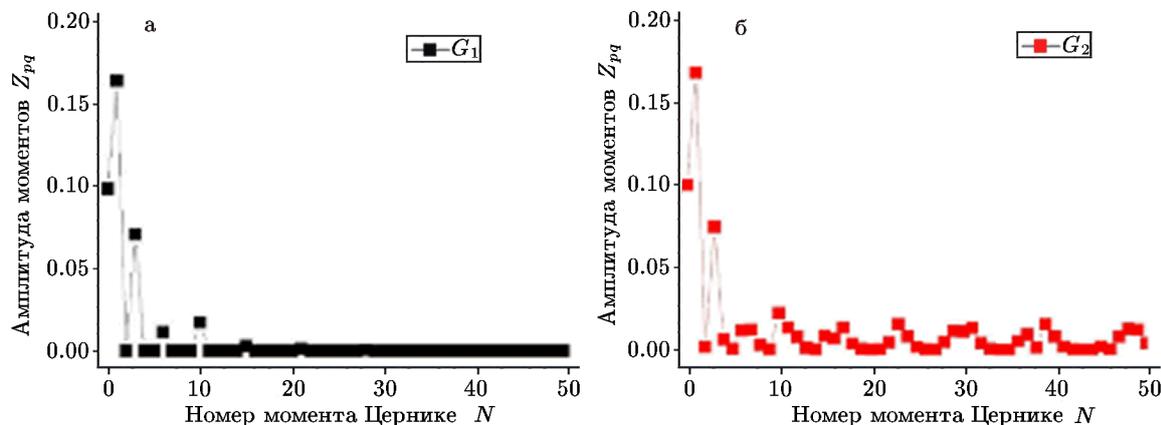


Рис. 7. Зависимость амплитуд псевдо-Цернике моментов Z_{pq} от номера N (в соответствии с выражением (14)): а — тестовый объект G_1 , б — тестовый объект G_2

ния необходимо несколько первых моментов разложения, причем только радиальных, не содержащих в себе зависимость от азимутального порядка q , моментов Z_{p0} . Моменты с $q \neq 0$, в силу аксиальной симметрии функции Гаусса относительно оси, проходящей через центр круга разложения, равны нулю. Картина спектральных амплитуд для изображения G_2 , представляющего собой суперпозицию двух функций Гаусса (рис. 7б), одна из которых смещена относительно центра изображения, показывает, что в этом случае уже необходимы все используемые в данном случае полиномы. Периодичность появления нулей в амплитудах гармоник с $q \neq 0$ остается, но имеет более сложный характер.

Подводя итог тестирующей процедуре, необходимо отметить, что предложенный алгоритм работает и позволяет представлять изображения в виде разложения по полиномам Цернике. При этом разложение сходится к исходному изображению. Спектральная плотность амплитуд разложения чувствительна как к общей симметрии объекта относительно круга разложения, так и к особенностям структуры.

Экспериментальные АСМ изображения ядер клеток. Для сравнительного анализа, как отмечалось в п. 2, использовались изображения, полученные на АСМ для ядер клеток эритроцитов кур (ЯЭК) и культивируемых клеток аденокарциномы шейки матки человека (HeLa). Измерения включали получение изображений для обоих типов ядер, фиксированных глутаровым альдегидом в нативном состоянии (контрольные ядра). Для ядер из эритроцитов кур были получены изображения при фиксации формальдегидом и без фиксации после выделения. Во всех перечисленных условиях получены серии из нескольких изображений. Перечисленные типы измерений сведены в табл. 1.

Таблица 1

Фиксатор, обработка	Глутаровый альдегид	Формальдегид	Без фиксатора
Тип ядер	Контроль	Контроль	Контроль
Эритроциты кур	5	5	5
HeLa	5		

На рис. 8 приведены АСМ изображения ЯЭК и ядер клеток HeLa соответственно, фиксированных глутаровым альдегидом. Как видно из рис. 8а, ЯЭК представляют собой относительно жесткие, при данном способе фиксации, малодеформирующиеся при приготовлении образования, имеющие глобулярную структуру, у которых, по-видимому, исследованию с помощью АСМ доступны лишь особенности общей формы этих органелл

и некоторые неровности поверхности. Они представляют собой объемные образования эллипсоидной формы, линейные размеры которых варьируют от 5 мкм до 6 мкм в длину и составляют около 2 мкм в ширину (*поперечном сечении*).

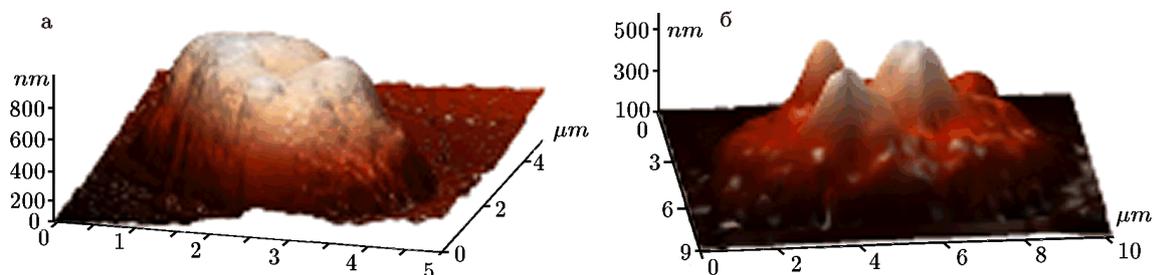


Рис. 8. АСМ изображения ядер, фиксированных глутаровым альдегидом; а — ЯЭК, б — ядра клеток HeLa

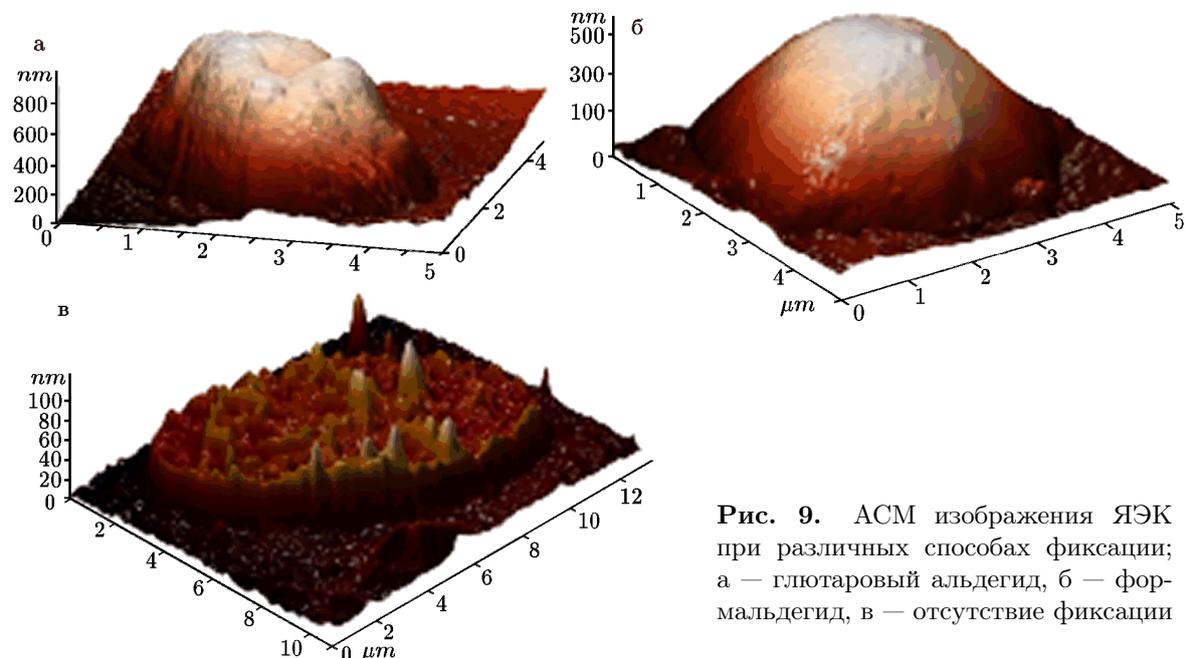


Рис. 9. АСМ изображения ЯЭК при различных способах фиксации; а — глутаровый альдегид, б — формальдегид, в — отсутствие фиксации

В случае клеток HeLa консистенция ядер оказывается достаточно текучей. Это приводит к тому, что при помещении на поверхность и подсушивании такие ядра уплощаются и принимают форму плоского блиноподобного образования (рис. 8б). При этом все более жесткие внутриядерные структуры, к которым относятся ядрышки и скопления более плотных хроматиновых структур, возвышаются над плоским основанием.

Получившиеся образования вполне доступны для детального исследования с помощью атомного силового микроскопа. Приведенные изображения являются примером, когда качественная разница в изображении исследуемых объектов видна визуально, а количественная оценка этих различий затруднена. Особенно, если принять во внимание еще и статистический разброс в изображениях исследуемых ядер.

На рис. 9, на примере ЯЭК, показано влияние способа фиксации на топографию поверхности исследуемых ядер. Как видно из рисунка, если фиксация глутаровым альдегидом сохраняет влияние внутренней структуры ядра на топографию поверхности ЯЭК, то формальдегидная фиксация приводит к сглаживанию исследуемой поверхности. Отсутствие же фиксации делает измеряемую топографию поверхности ЯЭК чрезвычайно сложной, визуально напоминающей двумерный шум.

Приведенные экспериментальные изображения ядер показывают широкий спектр визуальных различий в исследуемых объектах, которые, тем или иным методом, необходимо перевести в различия количественные. Одним из таких методов может быть метод разложения экспериментальных изображений по моментам Цернике.

Анализ экспериментальных изображений. Все экспериментальные изображения, в соответствии с алгоритмом, приведенным на рис. 2, подвергались предварительной обработке. На следующем этапе обработки проводилось разложение изображений ядер клеток по полиномам псевдо-Цернике до максимального радиального порядка 18, чему соответствует набор из 190 полиномов. Затем исходное изображение реконструировалось по вычисленным моментам, в соответствии с выражением (10), приведенным в п. 2.

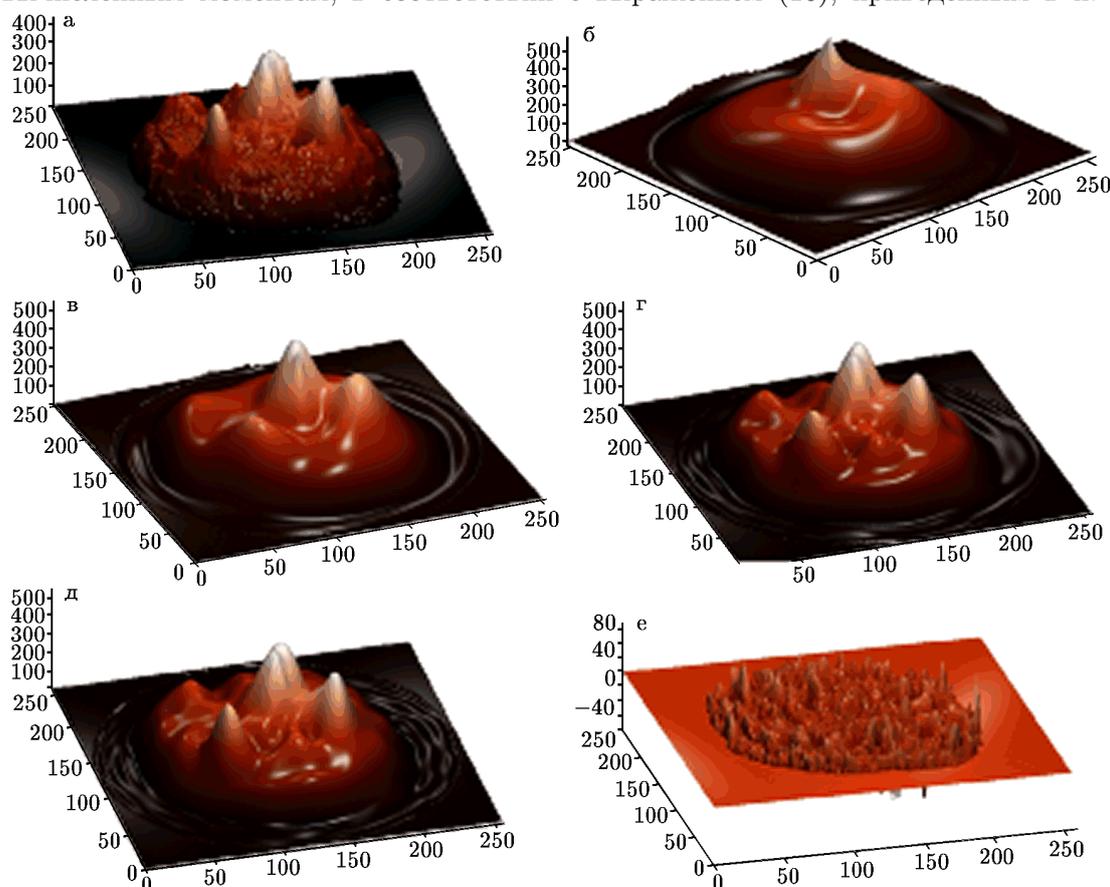


Рис. 10. Пример процесса реконструкции экспериментального АСМ изображения ядра клетки HeLa с использованием моментов Цернике различных порядков; а — экспериментальное изображение, б — реконструкция изображения с $P = 5$, в — $P = 10$, г — $P = 15$, д — $P = 18$, е — разница между экспериментальным изображением и реконструированным при $P = 18$

В качестве примера на рис. 10 приведен процесс построения одного из экспериментальных изображений ядра клеточной линии HeLa с использованием моментов псевдо-Цернике различных радиальных порядков. Процесс восстановления изображения представляет собой аддитивную операцию, где каждое последовательное добавление вклада моментов следующего порядка позволяет подчеркнуть определенные структурные особенности, информацию о которых содержат в себе моменты.

Из серии рис. 10 видно, что “сборка” изображения по моментам происходит последовательным добавлением в восстанавливаемый образ структур все более малого масштаба по сравнению с целым ядром. Изображение, полученное с помощью моментов с $P_{\text{rec}} = 5$,

лишь грубо описывает основную форму ядра, а трехмерная поверхность, синтезированная по моментам с $P_{\text{rec}} = 18$, наиболее близка к исходному изображению, хотя не содержит высокочастотных деталей, которые могут быть описаны моментами более высоких порядков. Такое последовательное приближение реконструированного изображения к исходному изображению дает возможность использовать восстановленную поверхность в качестве так называемого морфологического фильтра. Операция вычитания реконструкции из оригинального образа сводится к удалению крупномасштабных неровностей (низкочастотных составляющих) и позволяет подчеркнуть тонкую структуру поверхности. Изменяя значение P_{rec} при сборке изображения процедурой вычитания, можно последовательно вычленять из исходного изображения его крупномасштабные составляющие части. Такой подход может быть также полезен для выделения объектов, находящихся на поверхности со сложной морфологией. Обычно морфологические фильтры используются для повышения общей визуальной четкости изображения, для выделения границ областей объектов, имеющих разную высоту, а также для контрастирования локальных неоднородностей.

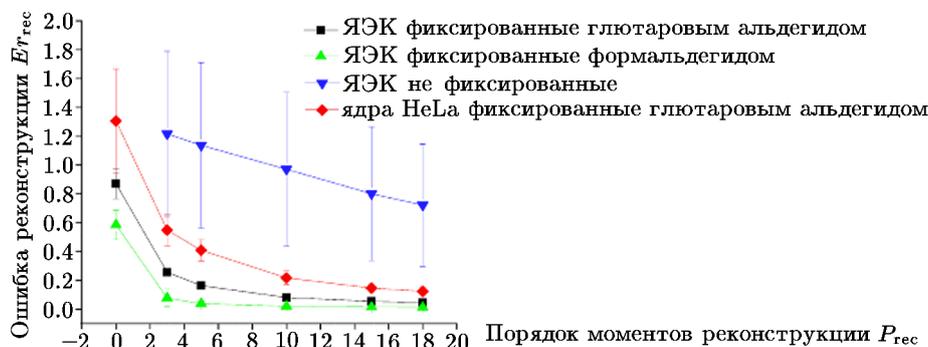


Рис. 11. Разностная функция $Er_{\text{rec}}(P_{\text{rec}})$ (11) в зависимости от порядка разложения

Для количественной оценки соответствия восстановленного изображения и исходного, как упоминалось выше, вводилась разностная функция $Er_{\text{rec}}(P_{\text{rec}})$, определяемая выражением (11). Такая характеристика рассчитывалась для каждого из экспериментальных изображений и усреднялась по выборке. На рис. 11 приведены зависимости $Er_{\text{rec}}(P_{\text{rec}})$ для ЯЭК при различных способах фиксации и ядер клеток HeLa, фиксированных глутаровым альдегидом. “Усы” на графиках есть дисперсия среднего значения по выборке, состоящей из пяти изображений. Значение P_{rec} на оси x соответствует максимальному рангу разложения, который использовался при реконструкции изображения. Такая реконструкция включает все полиномы от нулевого до P_{rec} .

Характер сходимости кривых разностных функций для ядер ЯЭК при фиксации их глутаровым альдегидом и формальдегидом схож. Ядра при такой обработке представляют собой достаточно гладкие образования и их морфология должна описываться несколькими первыми порядками разложения. Кривые разностных функций для этих ядер, как и следовало ожидать, сходятся достаточно быстро, подобно тестовому объекту G_1 . Из графиков видно, что для хорошего представления этих ядер достаточно 10 первых порядков разложения, после чего кривая выходит на плато.

Из рисунка видно, что разностная функция для ядер клеток HeLa сходится медленнее, чем для ЯЭК при фиксации последних глутаровым альдегидом и формальдегидом. Более медленная сходимость реконструированного изображения к изображению оригинальному есть количественное отражение того факта, что в морфологии изображения ядер клеток HeLa присутствуют более высокочастотные пространственные гармоники, чем в ЯЭК при аналогичной фиксации (рис. 10).

Приведенная на рис. 11 кривая разностной функции при реконструкции ЯЭК, в отсутствие фиксирующих агентов, показывает плохую сходимость реконструированных с помощью моментов Цернике изображений к изображениям экспериментальным. Является ли это недостатком метода или недостаточной величиной максимального ранга разложения, требует дополнительных исследований.

Как в случае нормальных, так и аномально пролиферирующих ядер, разностная функция может быть использована как результат морфологической фильтрации при любом ранге реконструкции для характеристики средних размеров локальных неоднородностей, присутствующих на поверхности ядер. Основная форма ядра, как отмечалось ранее, при вычислении $Er_{гес}$ вычитается и уже не вносит своего вклада в данную характеристику. Значения $Er_{гес}$, приведенные на графиках, даны в относительных единицах, так как производится нормирование параметра на нулевой коэффициент разложения (или среднюю высоту объекта). Однако приведенная величина может быть также выражена в единицах длины. Оценка на среднеквадратичные линейные размеры неоднородностей, остающихся на изображении, представляющем результат такой морфологической фильтрации, для различных типов ядер приведена в табл. 2. Как видно из приведенной таблицы, относительные значения величины $Er_{гес}$ более информативны, чем ее абсолютные значения. В трех из четырех случаев, приведенных в таблице, абсолютные значения величины $Er_{гес}$ практически одинаковы, при этом относительные значения $Er_{гес}$ для ЯЭК при фиксации глутаровым альдегидом и при отсутствии фиксации отличаются в 15 раз. Кроме того, видно, что в случае отсутствия фиксации для ЯЭК, процесс описания объектов путем разложения по моментам Цернике затруднителен, по крайней мере при $P_{max} = 18$.

Таблица 2. Средние значения разностной функции ($Er_{гес}$) при радиальном порядке $P_{max}=18$

Тип ядер	ЯЭК			HeLa
	Глутаровый альдегид $Z_{00}(cp) = 220$	Формальдегид $Z_{00}(cp) = 200$	Отсутствие фиксации $Z_{00}(cp) = 13.2$	Глутаровый альдегид $Z_{00}(cp) = 90$
$Er_{гес}, \%$	4.6	1.2	72	12.4
$Er_{гес}, \text{нм}$	10.1	2.4	9.5	11.2

Инварианты первого порядка моментов Цернике как функции спектральных плотностей разложения экспериментальных изображений ядер клеток. Как упоминалось выше, последовательности Z_{p0} и $|Z_{pq}|$ разложения изображения по моментам Цернике являются инвариантами первого порядка к повороту изображения относительно оси круга разложения [16] и могут быть представлены как функции спектральной плотности разложения изображений по моментам Цернике от номера полинома (14). Первые гармоники разложения по полиномам Цернике дают информацию об общих морфологических признаках объекта, так, например, нулевой момент псевдо-Цернике позволил оценить объемы ядер, величины которых приведены в табл. 3.

Таблица 3. Объемы ядер, полученные с помощью нулевого момента

Тип ядер	ЯЭК			HeLa
	Глутаровый альдегид $Z_{00}(cp) = 220$	Формальдегид $Z_{00}(cp) = 200$	Отсутствие фиксации $Z_{00}(cp) = 13.2$	Глутаровый альдегид $Z_{00}(cp) = 90$
Объем, $V(\mu m^3)$	4.2	3.6	1.5	7.0
Ошибка (μm^3)	± 0.4	± 0.3	± 0.2	± 0.6

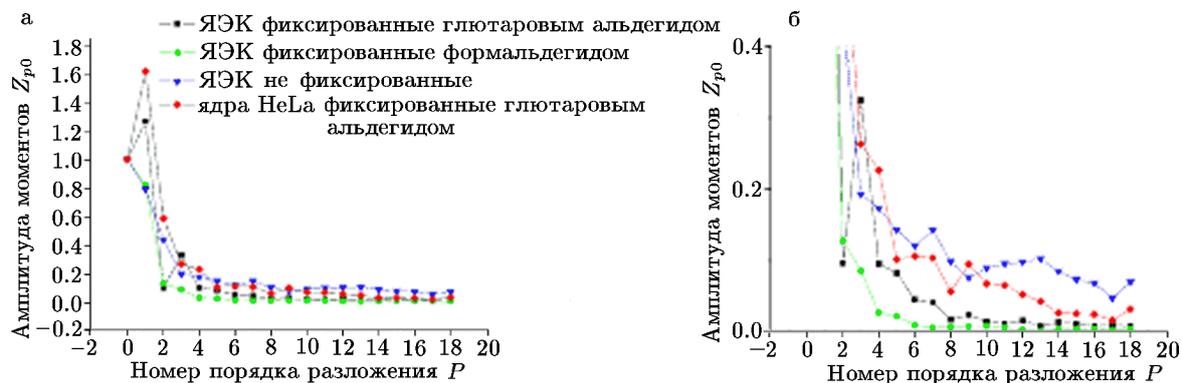


Рис. 12. Зависимости инвариантов первого порядка Z_{p0} разложения по моментам Цернике изображений ЯЭК и ядер клеток HeLa от номера пространственной гармоники N , определяемой выражением (14) (спектральные плотности разложения по моментам Цернике); а — полный спектр, б — спектр в увеличенном масштабе

На рис. 12 приведены зависимости, состоящие только из моментов Z_{p0} , несут информацию о линейных, радиальных параметрах в структуре экспериментального изображения ядер, в них отсутствует ориентационная составляющая разложения. Приведенные величины амплитуд моментов Цернике являются средними величинами, которые были получены из разложений серии изображений, указанных в табл. 1, и нормированы на Z_{00} . Из рисунка видно, что приведенные зависимости являются спадающими функциями. При этом важно отметить, что зависимости Z_{p0} , полученные для ЯЭК, подвергнутых различной фиксации, существенно отличаются друг от друга, что особенно отчетливо видно на рис. 12б. Это обстоятельство свидетельствует в пользу того, что приведенные зависимости могут действительно служить количественным морфологическим критерием при оценке различных изображений.



Рис. 13. Зависимости инвариантов первого порядка $|Z_{pq}|$ разложения по моментам Цернике изображений ЯЭК и ядер клеток HeLa от номера пространственной гармоники N , определяемой выражением (14) (спектральные плотности разложения по моментам Цернике); а — полный спектр, б — начальная часть спектра

На рис. 13 слева приведен полный спектр амплитуд для порядка разложения $P_{\max} = 18$ для 190 пространственных гармоник, а справа — начальная часть этого же спектра. Приведенные величины амплитуд моментов Цернике, как и на рис. 12, являются средними величинами, которые были получены из разложений серии изображений, указанных в табл. 1, и нормированы на Z_{00} . Как видно из рис. 13а, зависимости $|Z_{pq}|$ от номера пространственной гармоники для ЯЭК при фиксации их глютаровым альдегидом и формальдегидом, а также для ядер клеток HeLa являются спадающими функциями.

При этом быстрее всего, как и на рис. 12, спадает функция спектральной плотности, полученная для ЯЭК, фиксированных формальдегидом, более медленно спадает функция ЯЭК, фиксированных глютаровым альдегидом, и еще медленнее спадает спектральная функция, полученная для ядер клеток HeLa, также фиксированная глютаровым альдегидом. Функция спектральной плотности ЯЭК спадает быстрее, чем аналогичная функция ядер клеток HeLa, количественно характеризуя морфологические отличия ядер нормальных и аномально пролиферирующих клеток, которые видны визуально. Близкая к глобулярной форме структура ЯЭК требует для описания меньшего количества пространственных гармоник, чем более сложная морфология ядер клеток HeLa. Функция спектральной плотности, полученная для серии нефиксированных ЯЭК, приведенная на рис. 13а, демонстрирует случай постоянной спектральной плотности почти во всем представленном диапазоне пространственных гармоник. Это еще раз показывает, что разложение этих экспериментальных изображений по моментам Цернике, по крайней мере для $P_{\max} = 18$, неудовлетворительно и требует дальнейших исследований. На рис. 13б приведена начальная часть рис. 13а в более крупном масштабе. Здесь обращает на себя внимание синхронное во всех кривых подчеркивание 3, 5 и 8 гармоник в функциях спектральной плотности для ЯЭК и ядер клеток HeLa, что соответствует увеличению спектральной плотности моментов Z_{20} , Z_{22} и Z_{32} . Последние два момента имеют ненулевое значение q . Это может быть связано с тем, что в морфологии таких разных ядер присутствуют ориентационные особенности, одинаково требующие присутствия в первых гармониках разложения именно этих полиномов Цернике. Чтобы соотнести вклад этих гармоник с реальной структурой исследуемых ядер, необходимо дополнительное моделирование.

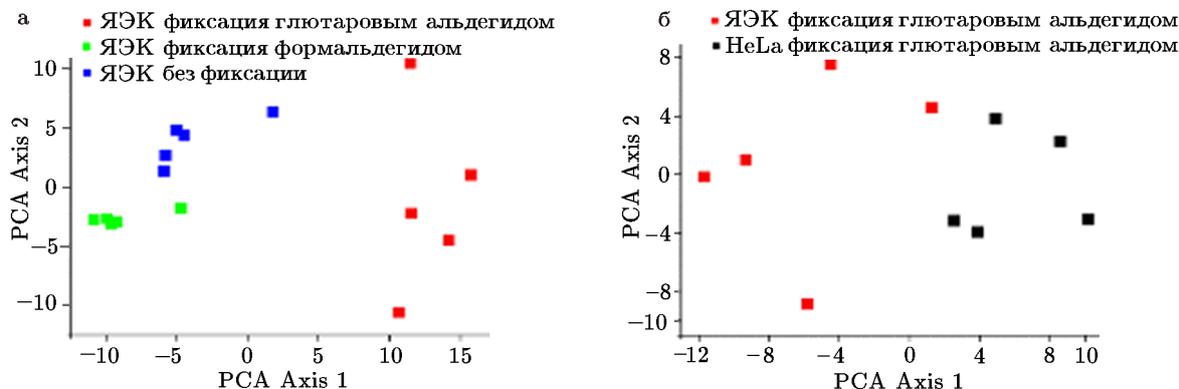


Рис. 14. Кластерный анализ методом PCA изображений АСМ ядер клеток путем использования в качестве исходных векторов для анализа амплитуд разложения изображений по моментам Цернике; а — анализ изображений ЯЭК в зависимости от способа фиксации ядер, б — сравнительный анализ изображений ЯЭК и HeLa

При проведении морфологических исследований поверхности ядер высших, получаемых методом АСМ, необходимо использовать методы факторного или кластерного анализа получаемых изображений с целью разбиения результатов измерения на статистически различимые группы. Мы использовали метод PCA (Principal Component Analysis). В качестве исходных данных для анализа мы использовали амплитуды разложения изображений по моментам Цернике $|Z_{pq}|$. Результаты этого анализа приведены на рис. 14. На рис. 14а приведены результаты кластерного анализа изображений ЯЭК в зависимости от способа фиксации ядер после выделения. Из рисунка видно, что проекция результатов PCA анализа на плоскость первых двух главных компонент дает три разнесенных в плоскости группы точек. Это означает, что применение амплитуд разложения экспе-

риментальных изображений ЯЭК по моментам Цернике позволяет количественно и статистически значимо характеризовать отличия в морфологии исследуемых ядер в зависимости от способа их фиксации. На рис. 146 приведены результаты PCA анализа ЯЭК и ядер клеток HeLa, подвергнутых одинаковой обработке после выделения (фиксация глютаровым альдегидом). Здесь также проекция точек из многомерного пространства главных компонент на плоскость первых двух главных осей дает две разнесенных в плоскости группы точек, принадлежащих изображениям ядер клеток из разных организмов. Таким образом, и для ядер клеток из разных организмов амплитуды разложения изображений по моментам Цернике количественно характеризуют статистически значимые различия в морфологии этих изображений.

4. Заключение

В работе предложен метод анализа изображений АСМ ядер клеток высших путем разложения этих изображений по моментам Цернике. Предложенный метод позволяет осуществить разложение экспериментального АСМ изображения по моментам Цернике, пространственными гармониками которого являются полиномы Цернике. Алгоритм апробирован на двух типах ядер. Один тип ядер выделен из неделящихся клеток эритроцитов кур, которые находятся в фазе G0 клеточного цикла. Другой тип ядер выделен из аномально делящихся клеток HeLa, представляющих собой лабораторную линию клеток карциномы шейки матки человека. Показано, что обратная процедура восстановления изображения с помощью полиномов Цернике сходится к экспериментальным АСМ изображениям указанных ядер. Параметр ошибки реконструкции, отнесенный к средней интенсивности экспериментального изображения (амплитуде Z_{00}), составляет для ЯЭК 1.2% и 4.6% при фиксации формальдегидом и глютаровым альдегидом соответственно, а для ядер клеток HeLa 12.6% при фиксации глютаровым альдегидом, используемый при этом радиальный ранг разложения $P_{\max} = 18$. Амплитуды разложения изображений по моментам Цернике являются количественной спектральной характеристикой при сравнении морфологических особенностей различных изображений. Амплитуды разложения АСМ изображений указанных ядер по моментам Цернике были использованы в качестве исходных векторов для кластерного анализа серий экспериментальных изображений методом PCA. Показано, что проекция результатов PCA на плоскость первых двух главных компонент дает три разнесенных в плоскости группы точек для ЯЭК. Это означает, что применение амплитуд разложения экспериментальных изображений ЯЭК по моментам Цернике позволяет количественно и статистически значимо характеризовать отличия в морфологии исследуемых ядер в зависимости от способа их фиксации.

Литература

1. Molecular Cell Biology. 4th ed.—Harvey Lodish, USA: W.H. Freeman & Company, 2000.
2. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., and Richmond T.J. X-ray structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // Nature. — 1997. — Vol. 389. — P. 251–259.
3. Robinson P.J.J., Fairall L., Huynh V.A.T., and Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure // PNAS. — 2006. — Vol. 103. — P. 6506–6511.
4. Zlatanova J., Leuba S.H., and van Holde K. Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions // Biophys. J. — 1998. — Vol. 74, № 5. — P. 2554–2566.

5. **Binnig G., Quatr C.F., and Gerber Ch.** Atomic force microscope // Phys. Rev. Lett. — 1986. — Vol. 56. — P. 930–933.
6. Methods in molecular biology. Vol. 242. Atomic force microscopy. Biomedical methods and application / eds. Pier Carlo Braga, Davide Ricci. — Humana Press, 2004.
7. **Marszalek Piotr E., Li Hongbin, Oberhauser Andres F., and Fernandez Julio M.** Chair-boat transitions in single polysaccharide molecules observed with force-ramp AFM // PNAS. — 2002. — Vol. 99, № 7. — P. 4278–4283.
8. **Galletto Roberto, Amitani Ichiro, Baskin Ronald J., and Kowalczykowski Stephen C.** Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules // Nature. — 2006. — Vol. 443. — P. 875–878.
9. **Santos Nuno C., Castanho Miguel A.R.B.** An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy // Biophys. Chem. — 2004. — Vol. 107, № 8. — P. 133–149.
10. **Hu M.K.** Visual pattern recognition by moment invariants // IRE Trans. Inf. Theory. — 1962. — Vol. 8, № 2. — P. 179–187.
11. **Teague Michael Reed.** Image analysis via the general theory of moments // J. Opt. Soc. Am. — 1980. — Vol. 70, № 8. — P. 920–930.
12. **Teh C.H., Chin R.T.** On image analysis by the methods of moments // IEEE Trans Pattern Anal. Mach. Intell. — 1988. — № 10. — P. 496–513.
13. **Lebedev D.V., Filatov M.V., Kuklin A.I., Islamov A.Kh., Kentzinger E., Pantina R., Toperverg B.P., and Isaev-Ivanov V.V.** Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei: DNA structure exhibits biphasic fractal properties // FEBS Lett. — 2005, Feb. 28. — Vol. 579, № 6. — P. 1465–8.
14. **Chong Chee-Way, Raveendran P., and Mukundan R.** An efficient algorithm for fast computation of pseudo-Zernike moments // Int. Conf. on Image and Vision Computing — IVCNZ'01. — Dunedin, NewZealand, 2001. — P. 237–242.
15. **Khotanzad A., Hong Y.H.** Rotation invariant image recognition using features selected via a systematic methods // Pattern recognition. — 1990. — Vol. 23, № 10. — P. 1089–1101.
16. **Belcasim S.O., Shridhar M., and Ahmadi M.** Pattern recognition with moment invariants: a comparative study and new results // Pattern recognition. — 1991. — Vol. 24, № 12. — P. 1117–1138.

*Поступила в редакцию 10 февраля 2011 г.,
в окончательном варианте 28 декабря 2011 г.*

