

## Анализ флуоресцентных изображений нервно-мышечного соединения методами компьютерного зрения

А.И. Мингазов<sup>1</sup>, Э.Ф. Хазиев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, Казань

<sup>2</sup>Казанский институт биохимии и биофизики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук, Казань

**Аннотация:** Работа описывает методику обработки флуоресцентных изображений, отображающих динамику входа кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ -транзистент) в терминалях нервно-мышечного соединения лягушки. Методика основана на применении методов компьютерного зрения.

**Ключевые слова:** синапс, нервно-мышечное соединение, компьютерное зрение, кальций, фотометрическая установка, флуоресцентный краситель.

### Введение

В химических синапсах выделение медиатора происходит в процессе секреции готовых к выбросу везикул. Роль триггера, запускающего машину экзоцитоза, играют ионы кальция [1 – 3]. Распространяющийся потенциал действия деполяризует мембрану пресинаптического окончания и открывает потенциал-чувствительные кальциевые каналы, после чего ионы кальция из внеклеточной среды устремляются внутрь клетки [4, 5]. Причем участие кальциевых каналов плазматической мембраны в процессе экзоцитоза не заканчивается на транспортировке ионов кальция.  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы связаны с белками синтаксином и SNAP-25, что обеспечивает локализацию и докирование синаптической везикулы в активной зоне и предотвращает возможность случайного выброса медиатора [6 – 8]. Таким образом, изучение входа кальция в НО является важным этапом в понимании механизмов передачи сигнала в нервно-мышечном соединении.

В последнее время для анализа метаболизма кальция в нервном окончании применяют оптический метод регистрации, основанный на использовании кальций чувствительных флуоресцентных красителей,

изменяющих уровень своего свечения при взаимодействии со свободными ионами кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Данный метод позволяет производить оценку входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нервное окончание ( $\text{Ca}^{2+}$ -транзиент) с помощью измерения интенсивности свечения  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного флуоресцентного красителя, взаимодействующего с кальцием, входящим в нервное окончание (НО) после развития пресинаптического потенциала действия [9 – 12]. Также используя эту методику, можно оценивать вклад различных модуляторов синаптической передачи в формирование уровня концентрации ионов кальция в нервных окончаниях. Для изучения роли изменения пресинаптического уровня кальция в процессе секреции квантов медиатора в нашей лаборатории была налажена методика регистрации кальциевого транзиента в нервно-мышечном синапсе. Данный метод предполагает регистрацию кальциевого сигнала с помощью фотометрической установки или серии изображений высокочастотной видеокамерой и последующей обработки полученных изображений с целью выделения сигнала. Методика обработки изображений, используемая в данный момент, предполагает принятие решений экспериментатором на основе своего опыта о выделении области регистрации полезного сигнала [13].

Имеющиеся на данный момент доступные инструменты для обработки изображений являются или достаточно универсальными (ImageJ) и, как следствие, требующими временных затрат на обработку конкретных экспериментальных изображений, или же, узкоспециализированными (CaImAn — для изображений ЦНС). Программное обеспечение, идея создания которого изложена в данном проекте, направлено на эффективную обработку и анализ экспериментальных данных, полученных на классических объектах по изучению нервно-мышечной сигнализации.

Идея данного метода основана на применении методов компьютерного зрения, а обеспечение корректного детектирования нервных окончаний на

экспериментальных флуоресцентных изображениях и поддержание области регистрации кальциевого сигнала в случае смещения препарата осуществляются с использованием библиотек NumPy и OpenCV языка программирования Python.

### **Цель работы**

Основной целью данной работы является создание усовершенствованного метода анализа экспериментальных изображений, характеризующих уровень содержания ионов кальция в нервных окончаниях. Предлагаемая методика основывается на применении инструментов компьютерного зрения, позволяющих с минимальным участием экспериментатора обеспечить выделение на изображении областей нервных окончаний, поддерживая выделенную область в зоне регистрации при смещениях препарата во временных интервалах между регистрациями изображений (например, во время действия исследуемого вещества).

### **Результаты**

После преобразования изображений (80\*80 пикселей) в массивы чисел (numpy.ndarray) осуществляется шумоподавление изображения, поскольку экспериментальные изображения часто содержат засвеченные области, не имеющие отношения к области интереса. Причем данная процедура применяется для выделения области интереса (маски), включающей нервное окончание. Последующая оценка интенсивности свечения терминали осуществляется с использованием исходного изображения.

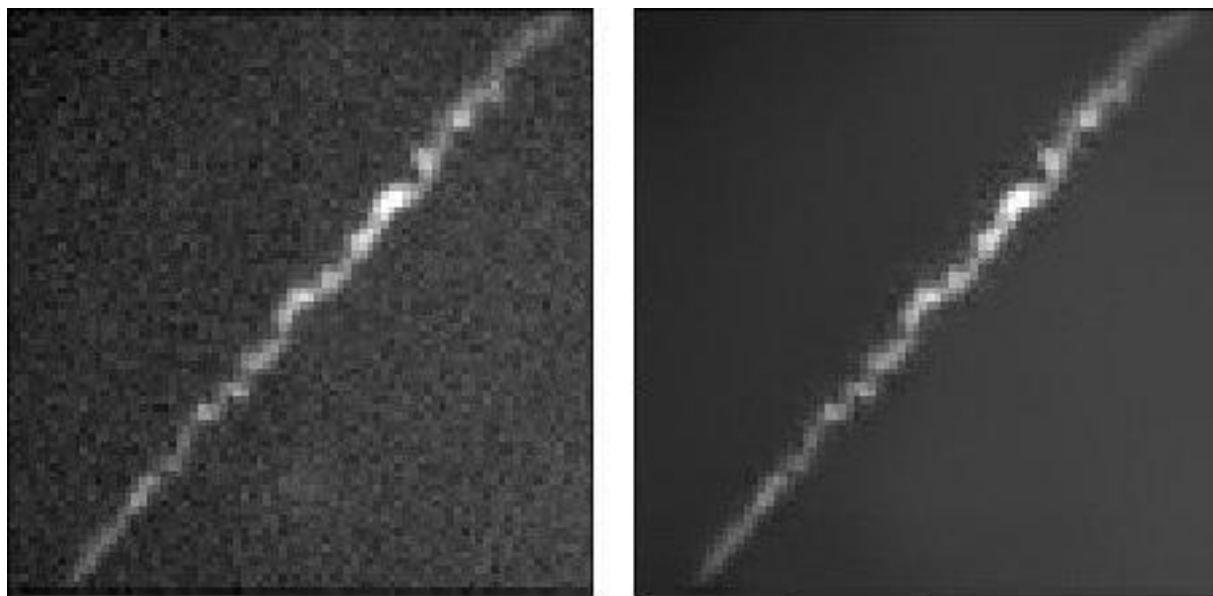


Рис. 1 – Изображение до (слева) и после (справа) шумоподавления

Далее для подготовки изображения к определению области регистрации сигнала применялись морфологические преобразования эрозия и дилатация — это простые операции, основанные на форме изображения. Основная идея эрозии заключается в том, что она размывает границы объекта переднего плана (свертка с заданным ядром). Пиксель в исходном изображении (1 или 0) будет считаться 1, только если все пиксели под ядром равны 1, в противном случае он размыт (обнуляется). Таким образом, толщина или размер объекта переднего плана уменьшается. Это полезно для удаления небольших белых шумов. Дилатация - противоположность эрозии, т.е. пиксельный элемент равен 1, если хотя бы один пиксель под ядром равен 1. Таким образом, увеличивается размер объекта переднего плана. Обычно в таких случаях, как удаление шума, за эрозией следует расширение. Это обусловлено тем, что эрозия удаляет белые шумы, но также уменьшает объект. Процедура выделения маски для терминали состояла из этапов составления набора масок для разных временных точек и последующего их объединения. Необходимость определения масок для разных временных

точек обусловлена возможностью сдвига препарата во время регистрации экспериментальных изображений. Небольшой сдвиг может происходить под воздействием различных исследуемых физиологических веществ. Непосредственное выделение области интереса осуществлялось с помощью бинаризации изображения методом Оцу. В компьютерном зрении и обработке изображений метод Оцу используется для автоматического определения порогов изображения [14]. В простейшей форме алгоритм возвращает один порог интенсивности, который разделяет пиксели на два класса, передний план и фон. Этот порог определяется путем минимизации дисперсии интенсивности внутри класса или, что эквивалентно, путем максимизации дисперсии между классами. Метод Оцу является одномерным дискретным аналогом дискриминантного анализа Фишера, связан с методом оптимизации Дженкса и эквивалентен глобально оптимальному значению  $k$ -средних [15], основанному на гистограмме интенсивности.

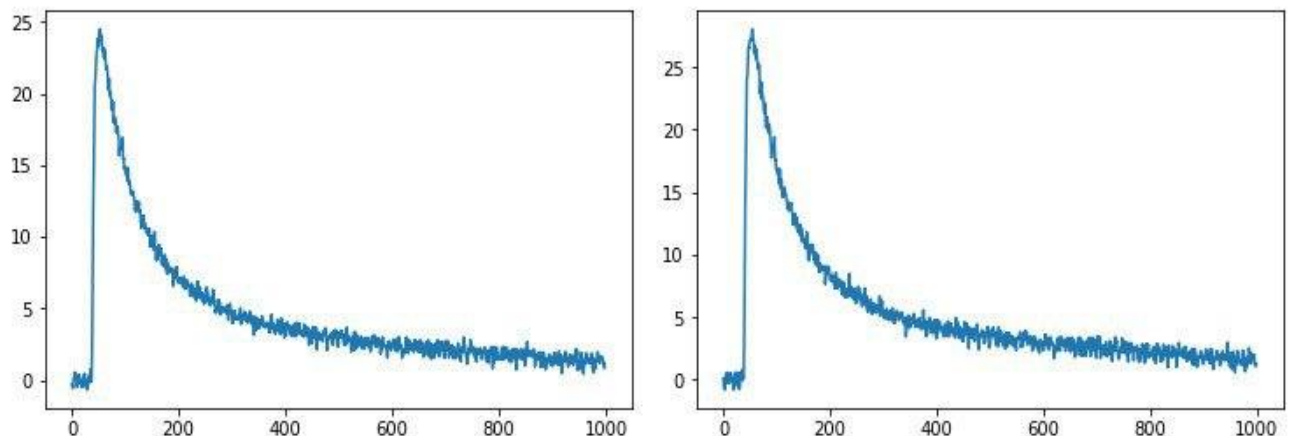


Рис. 2 – Кальциевый сигнал, полученный «ручным» методом обработки экспериментального изображения (слева) и описанным методом с использованием инструментов компьютерного зрения (справа)

На рис. 2 представлены сигналы, полученные «традиционным» методом обработки с использованием программы ImageJ и методом,

описанным в данной работе. Абсолютные значения амплитуд несколько отличаются для двух способов обработки, однако, основным параметром, отражающим результат эксперимента, является не абсолютное значение амплитуды, а ее относительное изменение между различными сериями изображений, зарегистрированными в контроле и под действием вещества. Соответственно, для получения корректного результата обработки необходимо обеспечить строго определенную воспроизводимую процедуру, лишенную неточности, вносимой экспериментатором в процессе ручной обработки изображений. В таблице 1 представлены усредненные параметры 5 сигналов после обработки ручным методом и описанным в данной статье. Значения параметров сигнала несколько различны для двух способов обработки изображений, что обусловлено разными подходами к определению маски для области регистрации сигнала.

Таблица № 1

Амплитуда, время нарастания и время спада кальциевого транзientа, полученные усреднением параметров 5 сигналов

|                  | Амплитуда | Время нарастания сигнала, мс | Время спадания сигнала, мс |
|------------------|-----------|------------------------------|----------------------------|
| Ручная обработка | 26,16742  | 3,6358                       | 225,0875                   |
| Авто обработка   | 19,05178  | 3,778                        | 194,664                    |

### Заключение

В результате выполнения данной работы:

- был разработан код на языке программирования Python для создания маски, позволяющей автоматически выделять область нервного окончания, окрашенного флуоресцентным красителем;
- разработан и реализован алгоритм создания маски, учитывающий возможный сдвиг препарата в ходе выполнения эксперимента;

- реализован алгоритм применения маски к ряду изображений для выявления средних значений интенсивности свечения флуоресцентного кальциевого красителя и построения временной развертки сигнала.

Основными преимуществами разработанной методики являются быстрота применения и воспроизводимость обработки изображения, которую сложно обеспечить при ручном методе. Таким образом, обработка одного изображения всегда будет приводить к одному результату, что не может быть обеспечено при выборе области регистрации экспериментатором.

*Экспериментальная часть работы выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-04-00490, разработка метода анализа флуоресцентных изображений выполнена при финансировании в рамках гос. задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

### Литература

1. Katz B, Miledi R. The Effect Of Calcium On Acetylcholine Release From Motor Nerve Terminals // Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1965a. №161. pp. 496-503.
2. Katz B, Miledi R. The Role Of Calcium In Neuromuscular Facilitation // J Physiol. 1968. №2. pp. 481-492.
3. DUNCAN ID. The Neuropathy Resulting From Muscle Nerve Translocation // Neuropathol Appl Neurobiol. 1983. №2. pp. 195-206.
4. Zimmerman B. Self-Regulated Learning and Academic Achievement: An Overview // Educational Psychologist. 1990. №1. pp. 3-17.
5. Зефирова А.Л. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе // Усп. физиол. наук. 2000. №3. С. 3-22.
6. Mehta et al. Efficacy and economics of fungicidal management of white rust and downy mildew complex in mustard // Indian J. Mycol. Pl Pathol. 1996. №28. pp. 243-247.

7. Балезина, О. П. Роль внутриклеточных кальциевых запасов в нервных терминалях в регуляции секреции медиатора // Успехи физиологических наук. 2002. №3. С. 38-56.
  8. Зефиоров, А. Л. Ионные каналы нервного окончания // Успехи физиол. наук. 2002. №4. С. 3-33.
  9. Tsien RY Fluorescent probes of cell signaling // Annu Rev Neurosci. 1989. №12. pp. 227-253.
  10. Samigullin D., Khaziev E, Zhilyakov N, Bukharaeva E., Nikolsky E. Loading a Calcium Dye into Frog Nerve Endings Through the Nerve Stump: Calcium Transient Registration in the Frog Neuromuscular Junction // Journal of Visualized Experiments. 2017. №125. pp. 1-8.
  11. Khaziev E, Golovyahina A., Bukharaeva E, Nikolsky E, Samigullin D. Action of ATP on Ca<sup>2+</sup>-transient in different parts of the frog motor nerve ending // BioNanoScience. 2017. №1. pp. 254-257.
  12. Khaziev E, Bukharaeva E, Nikolsky E, Samigullin D. Contribution of Ryanodine Receptors in Forming Presynaptic Ca<sup>2+</sup> Level and Cholinergic Modulation in Response to Single Potential in Frog Neuromuscular Junction // BioNanoScience. 2017. №1. pp. 106-108.
  13. Khaziev E, Samigullin D, Zhilyakov N, Fatikhov N, Bukharaeva E, Verkhatsky A and Nikolsky E Acetylcholine-induced inhibition of presynaptic calcium signals and transmitter release in the frog neuromuscular junction // Front. Physiol. 2016. №621. pp. 1-10.
  14. Nobuyuki O. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms // IEEE. 1979. №1. pp. 62-66.
  15. Jun Zh., Jinglu H. Image Segmentation Based on 2D Otsu Method with Histogram Analysis // 2008 International Conference on Computer Science and Software Engineering. China, 2008, pp. 105-108.
-



## References

1. Katz B, Miledi R. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1965a. №161. pp. 496-503.
2. Katz B, Miledi R. J Physiol. 1968. №2. pp. 481-492.
3. DUNCAN ID. Neuropathol Appl Neurobiol. 1983. №2. pp. 195-206.
4. Zimmerman B. Educational Psychologist. 1990. №1. pp. 3-17.
5. Zefirov A.L. Usp. fiziol. nauk. 2000. №3. pp. 3-22.
6. Mehta et al. Indian J. Mycol. Pl Pathol. 1996. №28. pp. 243-247.
7. Balezina, O. P. Uspehi fiziologicheskikh nauk. 2002. №3. pp. 38-56.
8. Zefirov, A. L. Uspehi fiziol. nauk. 2002. №4. pp. 3-33.
9. Tsien RY Annu Rev Neurosci. 1989. №12. pp. 227-253.
10. Samigullin D., Khaziev E, Zhilyakov N, Bukharaeva E., Nikolsky E. Journal of Visualized Experiments. 2017. №125. pp. 1-8.
11. Khaziev E, Golovyahina A., Bukharaeva E, Nikolsky E, Samigullin D. BioNanoScience. 2017. №1. pp. 254-257.
12. Khaziev E, Bukharaeva E, Nikolsky E, Samigullin D. BioNanoScience. 2017. №7. pp. 106-108.
13. Khaziev E, Samigullin D, Zhilyakov N, Fatikhov N, Bukharaeva E, Front. Physiol. 2016. №621. pp. 1-10.
14. Nobuyuki O. A IEEE. 1979. №1. pp. 62-66.
15. Jun Zh., Jinglu H. 2008 International Conference on Computer Science and Software Engineering. China, 2008. pp. 105-108.