

УДК 681.3.019

В.А. Краснобаев, А.Д. Черенков

*Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. Петра Василенко, Харьков***МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ПОДВИЖНОСТИ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ***В работе предложена модель для оценки скорости, траектории и ритмики движения отдельных клеток и определение их параметров в режиме реального времени.***Ключевые слова:** модель, траектории движения, биологический объект.**Введение**

Исследование скорости, траектории и ритмики движения отдельных клеток производится путем покадрового сканирования при микроскопической регистрации расстояния пройденного клеткой за определенный интервал времени [1]. Примерами данного метода являются: реакция отдельных клеток на изменение интенсивности лазерного и СВЧ КВЧ облучения в различном диапазоне длин волн, при исследовании корреляционных зависимостей между характером траектории, частоты биений, скоростью движения и интенсивностью и направлением стимулирующего излучения; соотношением подвижных, слабоподвижных, неподвижных и отличных от прямолинейного движения клеток; измерение электрофоретической подвижности микробиологических объектов и т.п. [2 – 4].

Основной материал

Постановка задачи, на основе приведенных выше методов диагностирования может быть сформулирована следующим образом. В поле зрения оптической системы на плоскости дана область F с координатами $\Sigma = \{O; x, y\}$. В начальный момент времени $t = 0$ в ней имеется n объектов, которые обозначим номерами $I = \{1, 2, \dots, n\}$, с координатами $\{(x_i^0, y_i^0)\}_{i=1,2,\dots,n}$. В последующем объекты могут перемещаться по плоскости, выходя за пределы области F . По характеру своего движения, в пределах заданной точности, каждый объект должен относиться к одному из следующих трех классов, причем принадлежность объектов к классам в процессе движения не изменяется: класс K_1 – неподвижные объекты – их положение неизменно; класс K_2 – маневренные объекты – перемещаются по окружности; класс K_3 – линейные объекты – перемещаются прямолинейно.

В течение промежутка времени T объекты мо-

гут перемещаться со скоростью, не превосходящей v_{\max} . В этот период их координаты сканируются в дискретные моменты времени

$$t_j = j\tau_s, \quad (j = 1, 2, \dots, m),$$

с шагом по времени $\tau_s = T/m$, необходимым для определения координат объектов в области F . Эти моменты времени обозначим номером j шага.

Физические условия протекания процесса перемещения объектов и регистрации их координат при сканировании определяются следующими допущениями: (1а) за промежуток времени T большая часть объектов не покидает область F . Объект, покинувший область F , может в нее вернуться; (2а) на каждом шаге j фиксируются лишь координаты всех объектов, находящихся в области F , без соотнесения полученных точек с номерами объектов, идентифицированных на предыдущем шаге $j-1$. Параметры T , τ_s и v_{\max} таковы, что если объект не покинул область F , его класс может быть однозначно идентифицирован по его траектории на основе соответствующего детерминированного или стохастического критерия; (3а) если два объекта сблизилась на расстояние $\delta \leq 2\tau_s v_{\max}$, они могут вступить во взаимодействие, подобно одноименным зарядам, в результате чего параметры, определяющие ориентацию их траекторий (но не класс объекта), могут измениться.

Вместе с тем, физические условия протекания процесса таковы, что для одного объекта возможность многократного взаимодействия можно считать [5] событием достаточно редким, как и одновременное взаимодействие трех объектов.

При этом вероятность того, что объект вступит во взаимодействие за период T , можно оценить величиной

$$p_* = 2n_* / n = 0,003, \quad (1)$$

где n_* – экспериментально полученное число взаимодействий для стандартных условий протекания

процесса при фиксированном значении n , определяемом площадью области F и концентрацией анализируемого состава.

Для всех рассмотренных случаев задачу оценки параметров движения, необходимо свести к построению траекторий движения клеток. Поскольку траектории движения объектов могут быть различными необходимо разделить объекты по классам. В рассмотренных выше примерах дискриминация объектов по классам невозможна без предварительного решения задачи идентификации их траекторий. Поэтому рассмотрим математическую модель и метод решения этой задачи.

Пусть $Z_j = \{z_{\eta j} = (x_{\eta j}, y_{\eta j})\}_{\eta \in I_j}$ – множество точек в области F , координаты которых получены на первом шаге сканирования $j \in J$; назовем эти точки субъектами.

На начальном шаге ($j=0$) пронумеруем эти точки в произвольном порядке и назовем их объектами; положим $I = I_0 = \{1, 2, \dots, n\}$. Объект μ , вошедший в область F на шаге $j \geq 1$, назовем внешним и положим

$$\mu \in I^* = \{I \cup \{n+1, n+2, \dots\}\}, \quad \mu \geq n+1.$$

На каждом последующем шаге j , начиная с первого ($j=1$), необходимо решать задачу идентификации субъектов $\{z_{\eta j}\}_{\eta \in I_j}$, т.е. присваивать каждому субъекту $\eta \in I_j$ номер $\xi \in I^*$ того объекта, который на шаге j перешел в точку $z_{\eta j} = (x_{\eta j}, y_{\eta j})$. При этом возможны следующие ситуации:

- {1} – объект ξ остался в области F и не имел взаимодействий;
- {2} – объект ξ покинул область F ;
- {3} – объект ξ остался в области F и имел взаимодействие;
- {4} – некоторый внешний объект μ вошел в область F .

В первом случае идентификация основана на том, что при отсутствии взаимодействий объекта ξ на шаге j , в ε_m -окрестности $\varepsilon_{\xi, j-1}$ точки $s_{\xi, j-1}$, определяемой кругом радиуса $\varepsilon_m = v_m \tau$ с центром в точке $s_{\xi, j-1}$, может содержаться лишь субъект $z_{\eta j}$, определяющий положение объекта $\xi \in I$ на шаге j . Поэтому, если ε_m -окрестность $\varepsilon_{\xi, j-1}$ точки $s_{\xi, j-1}$ содержится в F и содержит единственный субъект $z_{\eta j}$, то $\eta = \xi$.

Соответствующая последовательность точек $J_{\xi j} = \{s_{\xi l} = (x_{\xi l}, y_{\xi l})\}_{l=0,1,\dots,j}$ определяет траекторию объекта ξ на интервале $T' = j\tau_s$.

Во втором случае объекту ξ не соответствует ни один субъект $\eta \in I_j$. Поэтому выводим этот объект из последующего рассмотрения при отслеживании траекторий, при этом усеченную траекторию $J_{\xi j}^* = \{s_{\xi l} = (x_{\xi l}, y_{\xi l})\}_{l=0,\dots,j-1}$ для объекта $\xi \in I$ запомним, а траекторию для объекта $\mu \in I^* \setminus I$ отбрасываем.

В третьем случае имеем взаимодействие двух объектов. Это означает, что на шаге $j-1$ некоторая пара объектов ξ, η имеет пересекающиеся ε_m -окрестности $\varepsilon_{\xi, j-1}, \varepsilon_{\eta, j-1}$, т.е. $\varepsilon_{\xi, j-1} \cap \varepsilon_{\eta, j-1} \neq \emptyset$.

Поскольку после взаимодействия ориентация (но не тип) траекторий может быть изменена, считаем траектории

$$J_{\xi j}^* = \{s_{\xi l}\}_{l=0,\dots,j-1} \text{ и } J_{\eta j}^* = \{s_{\eta l}\}_{l=0,\dots,j-1}$$

усеченными и начинаем отслеживать для этих объектов новые траектории

$$J'_{\xi k} = \{s_{\xi l}\}_{l=j,\dots,k}, \quad J'_{\eta k} = \{s_{\eta l}\}_{l=j,\dots,k}, \quad k > j,$$

начиная с точек $z_{\xi j}, z_{\eta j}$. При этом различие субъектов z_{1j}, z_{2j} для объектов ξ, η на шаге j производится следующим образом.

В случае (рис. 1, а), когда только один из субъектов z_{1j} принадлежит пересечению областей $\varepsilon_{\xi, j}, \varepsilon_{\eta, j}$, дискриминация субъектов производится по очевидному правилу $s_{\xi j} = z_{1j}, s_{\eta j} = z_{2j}$, так как за один шаг τ_s объект ξ не может выйти за пределы соответствующей области $\varepsilon_{\xi, j-1}$. В случае, когда оба субъекта z_{1j}, z_{2j} принадлежат пересечению областей $\varepsilon_{\xi, j}, \varepsilon_{\eta, j}$ (рис.1,б), производим дискриминацию траекторий $J_{\xi \eta, j}^{(1)}, J_{\xi \eta, j}^{(2)}$ с начальными точками z_{1j}, z_{2j} по классу K_i . Если данных достаточно для проведения этой идентификации, относим их к объектам соответствующего класса; иначе – удаляем из рассмотрения.

В четвертом случае, на первом шаге вхождения объекта в область F присваиваем ему очередной номер (начиная с $n+1$), который заносим в множество $I^* = \{I \cup \{n+1, n+2, \dots\}\}$. Заметим, что в эту группу могут попасть и объекты типа {2}, которые ранее покинули область F . Однако, так как отличить их от объектов, не принадлежащих множеству I , невозможно, для исключения потери информации при подсчете классов K_2 и K_3 (за счет вхождения в область F тех из них, что первоначально не находились в ней), внешние объекты также отслеживаются, но не дискриминируются по классам и не учитываются в итоговом анализе. С этой целью для

внешних объектов хранятся только координаты по-

следнего шага идентификации.



Рис. 1. Дискриминация субъектов при взаимодействии их с соответствующими им объектами

Таким образом, на каждом шаге сканирования ($j = 1, 2, \dots$) решение задачи идентификации субъектов по описанным выше процедурам для возможных четырех ситуаций обеспечивает адекватное (соответственно точности по положению $v_{\max} \tau_s$ и времени τ_s) отслеживание траекторий исходных и внешних объектов. При этом по окончании всего процесса сканирования, для каждого исходного объекта $\xi \in I$ имеем

- одну полную траекторию $J_{\xi m}$, если объект ξ не имел взаимодействий и не покидал область F , либо
- одну усеченную траекторию $J_{\xi k}^*$, $k < m$, если объект ξ покинул область F на шаге k , либо
- две усеченных траектории – $J_{\xi k}^*$ (до взаимодействия на шаге k) и $J_{\xi k}'$ (или $J_{\xi \eta, j}^{(1)}$), определяющие движение объекта после взаимодействия до конца сканирования или до выхода из области F .

Рассмотрим теперь метод решения задачи дискриминации траекторий объектов из множества I по классам K_1, K_2, K_3 . Заметим, что в имеющемся представлении, траектории, если требуется, можно интерпретировать и как выборки в статистическом смысле.

При решении задачи дискриминации типа траектории, в целях упрощения индексации, рассмотрим объект, $i \in I$, который за период $T = m\tau_s$ не имел взаимодействий и не покинул области F . Тогда траекторию этого объекта определяет последовательность точек $J_{i m} = \{s_{il} = (x_{il}, y_{il})\}_{l=0,1,\dots,m}$.

Дискриминация класса K_1 . Если объект $i \in I$ принадлежит классу K_1 , совокупность точек $J_{i m} = \{s_{il} = (x_{il}, y_{il})\}_{l=0,1,\dots,m}$ должна, в среднем, располагаться в пределах круга (рис. 2) достаточно малого радиуса R_0 с центром в некоторой точке $z_i = (x_z, y_z)$, и в некоторой окрестности, где объект i совершает слабые флуктуации, обусловленные собственной малой подвижностью или дрейфом, связанным с током жидкости.

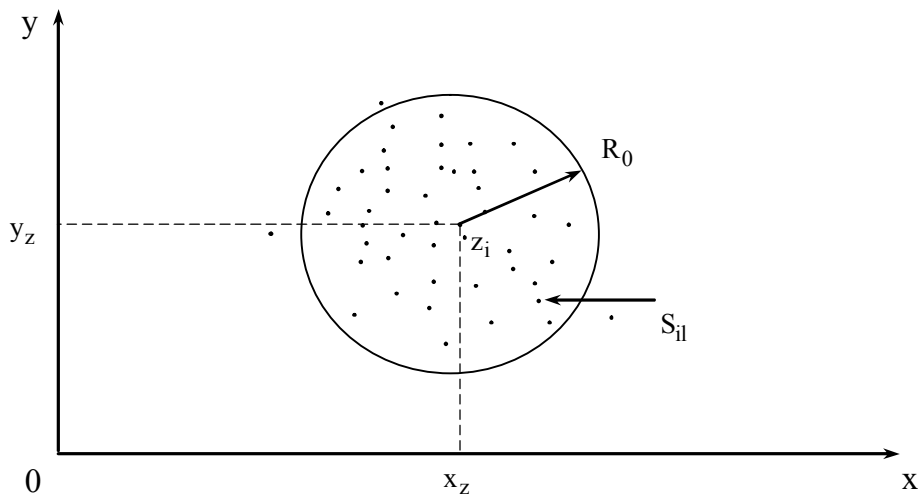


Рис. 2. Дискриминация объектов класса K_1

Пусть

$$x_z = \frac{1}{m+1} \sum_{l=0}^m x_{il}, \quad y_z = \frac{1}{m+1} \sum_{l=0}^m y_{il}; \quad (2)$$

$$\bar{R} = \frac{1}{m+1} \sum_{l=0}^m r_l; \quad (3)$$

$$r_l = [(x_{il} - x_z)^2 + (y_{il} - y_z)^2]^{1/2};$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{l=0}^m [r_l - \bar{R}]^2}. \quad (4)$$

Рассмотрим следующие критерии дискриминации для отнесения объекта i к классу K_1 :

$$f_1^{(1)}: \max_{l=0,1,\dots,m} [(x_{il} - x_z)^2 + (y_{il} - y_z)^2]^{1/2} \leq R_0; \quad (5)$$

$$f_2^{(1)}: \bar{R} \leq R_0; \quad (6)$$

$$f_3^{(1)}: P[H: r < R_0] \geq \beta. \quad (7)$$

Критерий (5) определяет жесткую детерминацию условия о том, что объект i не удалился от начальной точки (x_i^0, y_i^0) на расстояние, превышающее $2R_0$, а, в среднем, совершает флуктуации в пределах круга радиуса R_0 с центром в точке $z_i = (x_z, y_z)$. На практике этот критерий важен там, где следует выделить максимальное число объектов, хоть в малой степени обладающих подвижностью. Кроме того, он может быть полезен при выборках малого объема.

Критерий (5) определяет, что средняя флуктуация объекта соответствует значению R_0 , характерному для данных условий эксперимента (по температуре, плотности анализируемой среды и др.). В смысле жесткости дискриминации он занимает промежуточное положение между (4) и (6).

Критерий (7) определяет, что если рассматривать совокупность точек

$$J_{im} = \{s_{il} = (x_{il}, y_{il})\}_{l=0,1,\dots,m}$$

как выборку с доверительной вероятностью β , можно считать, что истинное отклонение r объекта от центра флуктуаций не превышает предельного значения R_0 . Этот критерий целесообразен там где нет возможности задаться точным значением R_0 , или при исследовании нового состава для определения критического значения R_0 . Флуктуации объекта, с одной стороны, имеют случайный характер и определяются внешними факторами и слабой подвижностью самого объекта. Поэтому, в силу независимости блужданий объекта и идентичности типа его движений по шагам, в первом приближении можно считать, что величины $r_l = [(x_{il} - x_z)^2 + (y_{il} - y_z)^2]^{1/2}$ из (2) одинаково рас-

пределены, и тогда их среднее \bar{R} стремится к нормальному распределению. С другой стороны, объект i может испытывать дрейф, в связи с чем в качестве центра распределения имеет смысл рассматривать не начальную точку (x_i^0, y_i^0) , а точку $z_i = (x_z, y_z)$.

Тогда на уровне значимости $\alpha = 1 - \beta$ можем принять [5] гипотезу (7) о принадлежности объекта i классу K_1 при выполнении соответствующего из следующих двух неравенств, определяющих критерий с левосторонней критической областью для выборок различного объема:

$$\frac{\bar{R} - R_0}{S} \sqrt{m+1} \leq u_\alpha, \quad \text{при } m > 50, \quad (8)$$

$$\frac{\bar{R} - R_0}{S} \sqrt{m} \leq t_{\alpha/2; m}, \quad \text{при } m \leq 50, \quad (9)$$

где $u_\alpha, t_{\alpha/2; m}$ – квантили для нормального закона и распределения Стьюдента, соответственно.

Дискриминация класса K_2 . Поскольку некоторые объекты могут покидать область F до того как их класс по окончании сканирования может быть адекватно дискриминирован по одной или двум усеченным траекториям. Отнесем эти объекты к классу K_4 . Заметим, что класс K_4 не может содержать неподвижных объектов класса K_1 из экспериментальных исследований известно [6], что, в среднем, класс K_4 составлен из объектов классов K_2 и K_3 в соотношении 1:1. К числу таких объектов относим те, у которых число точек в усеченной траектории не превышает предельного значения N_* (как правило, полагают $N_* \leq 10$), либо объекты с нерегулярной траекторией, для которых ни один из рассматриваемых ниже критериев не дает устойчивой дискриминации.

Если объект i принадлежит классу K_2 , его траектория $J_{im} = \{s_{il} = (x_{il}, y_{il})\}_{l=0,1,\dots,m}$, в силу возмущений и собственных флуктуаций, не является точной окружностью и, в среднем, должна располагаться в пределах кольца (рис.3) с радиусами R_1 и R_2 , $R_0 \leq R_1 < R_2$ и центром в некоторой точке $z_i = (x_z, y_z)$ вида (2). Поэтому для дискриминации манежного объекта достаточно установить, что радиус его орбиты лежит в соответствующих пределах; для этого используем следующие обобщения критериев (5) – (7)

$$f_1^{(2)}: \begin{cases} \max_{l=0,1,\dots,m} [(x_{il} - x_z)^2 + (y_{il} - y_z)^2]^{1/2} \leq R_2, \\ \min_{l=0,1,\dots,m} [(x_{il} - x_z)^2 + (y_{il} - y_z)^2]^{1/2} \geq R_1; \end{cases} \quad (10)$$

$$f_2^{(2)}: R_1 \leq \bar{R} \leq R_2; \quad (11)$$

$$f_3^{(2)} : P[H : R_1 < r < R_2] \geq \beta. \quad (12)$$

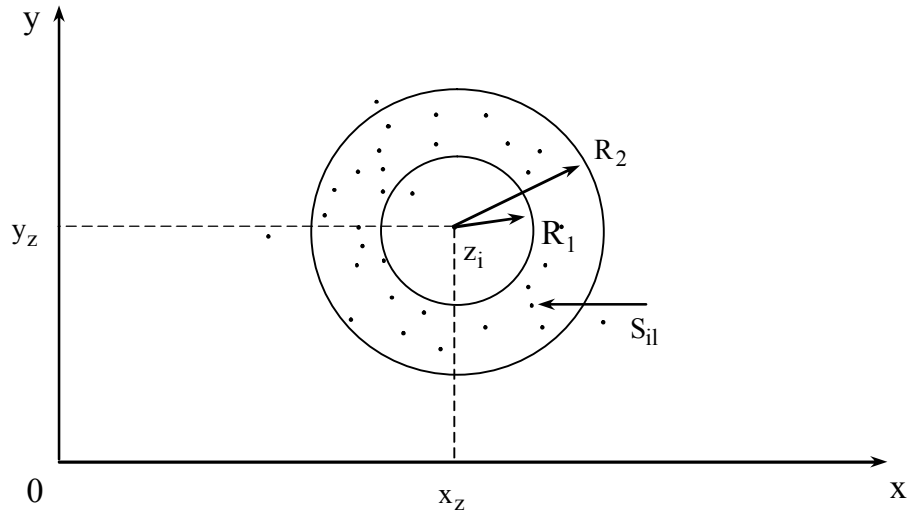


Рис. 3. Дискриминация объекта класса K_2

Подобно (4), критерий (9) определяет дискриминацию кругового движения без дрейфа при жестко специфицируемых стандартах на подвижность объекта за счет задания радиусов R_1, R_2 . При этом \max в (10) исключает смешение классов K_2 и K_3 , а \min – классов K_1 и K_2 , что может быть актуально для усеченных выборок. То же, что и о критериях (6) и (7), можно сказать и о критериях (11) и (12) с тем отличием, что для принятия гипотезы о маневрном движении объекта необходимо выполнение двух условий, аналогичных (8), (9), для окружностей с радиусами R_1, R_2 , соответственно:

$$R_1 - \psi \leq \bar{R} \leq R_2 + \psi; \quad \psi = \frac{S \cdot u_\alpha}{\sqrt{m+1}} \quad (\text{при } m > 50); \quad (13)$$

$$R_1 - \vartheta \leq \bar{R} \leq R_2 + \vartheta; \quad \vartheta = \frac{S \cdot t_{\alpha/2, m}}{\sqrt{m}} \quad \text{при } m \leq 50. \quad (14)$$

Дискриминация класса K_3 . Если объект i не относится к классам K_1 или K_2 , его можно просто отнести к классу K_3 , либо воспользоваться моделью линейной регрессии, которая позволяет с достаточной точностью отличить траекторию, близкую к прямой или параболе, от замкнутой траектории маневренного типа. При этом более точная оценка скорости объекта, не связанная с использованием линейной модели (рис. 4), определяется отношением фактического перемещения и времени T

$$\bar{c} = \frac{1}{T} \sum_{l=1}^m [(x_{i,l-1} - x_{i,l})^2 + (y_{i,l-1} - y_{i,l})^2]^{1/2}. \quad (15)$$

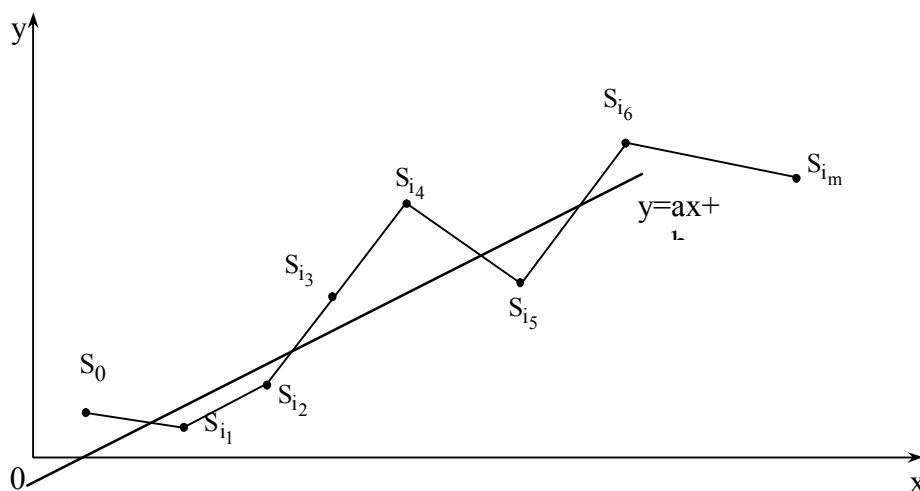


Рис. 4. Дискриминация объекта класса K_3

Выводы

Для траектории $J_{im} = \{s_{il} = (x_{il}, y_{il})\}_{l=0,1,\dots,m}$ оценки параметров уравнения регрессии

$$y = ax + b, \quad (16)$$

полученные по методу наименьших квадратов, имеют вид

$$a^* = \bar{y} - b^* \bar{x}; \quad (17)$$

$$b^* = \frac{\sum_{l=0}^m (x_{il} - \bar{x})(y_{il} - \bar{y})}{\sum_{l=0}^m (x_{il} - \bar{x})^2}, \quad (18)$$

где

$$\bar{x} = \frac{1}{m} \sum_{l=0}^m x_{il}, \quad \bar{y} = \frac{1}{m} \sum_{l=0}^m y_{il}. \quad (19)$$

Тогда для проверки гипотезы об адекватности модели регрессии (16), т.е. о том, что объект i не является неподвижным или маневренным, а движется по незамкнутой линии, более или менее близкой к прямой или параболе, достаточно проверить [3, 4] выполнение следующего неравенства

$$\frac{b^* (m-1) \sum_{l=0}^m (x_{il} - \bar{x})^2}{\sum_{l=0}^m (y_{il} - a^* - b^* x_{il})^2} \geq F_{\alpha, f_1, f_2}, \quad (20)$$

где F_{α, f_1, f_2} – критическая точка распределения Фишера для уровня значимости $\alpha = 1 - \beta$ и числа степеней свободы $f_1 = 1, f_2 = m - 1$.

В случае, если объект i не может быть отнесен к классам K_1 или K_2 , а по критерию (20) не может быть отнесен и к классу K_3 , относим его к классу K_4 , как подвижный объект со сложной траекторией, оценив его скорость по (15).

Предложенная модель оценки скорости, траектории и ритмики движения отдельных клеток и определение их параметров может быть применена в режиме реального времени и апостериорно (в случае запоминания данных обо всех шагах сканирования). При этом после дискриминации объектов по классам и оценивания их параметров по приведенным моделям, расчет требуемых характеристик образца – $n_1 (p_1)$, t_0 , $\bar{\Gamma}_m$ и СКО производится стандартным образом на основе статистических методов точечного и интервального оценивания.

Список литературы

1. Цифровая обработка телевизионных и компьютерных изображений / Под ред. Ю.Е. Зубарев, В.П. Дваркович. – М.: МЦНТИ, 1997. – 212 с.
2. Посудин Ю.И. Лазерная фотобиология / Ю.И. Посудин. – К.: Выща школа., 1989. – 248 с.
3. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко. – К.: Аграрна наука, 1995. – 183 с.
4. Биофизика / Под общ. ред. акад. П.Г. Костюка. – К.: Вища школа, 1988. – 504 с.
5. Герасимович А.И. Математическая статистика / А.И. Герасимович. – Минск: Высшая школа, 1983. – 279 с.
6. Мегель Ю.Е. Моделирование и компьютерная обработка изображения для анализа качества биоматериала / Ю.Е. Мегель, Н.Г. Лысенко, А.И. Рыбалка // Вісник Харківського ДПУ. – Х.: ХДПУ, 1999. – Вип. № 73. – С. 147-151.

Поступила в редколлегию 21.09.2009

Рецензент: д-р техн. наук, проф. И.А. Фурман, Харьковский национальный технический университет сельского хозяйства им. П. Василенко, Харьков.

МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ ОЦІНКИ РУХОМОСТІ
МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

В.А. Краснобаев, О.Д. Черенков

У роботі запропонована модель для оцінки швидкості, траєкторії і ритміки руху окремих кліток і визначення їх параметрів в режимі реального часу.

Ключові слова: модель, траєкторії руху, біологічний об'єкт.

MATHEMATICAL MODEL FOR ESTIMATION
OF BIOLOGICAL MICRO OBJECTS MOVES

V.A. Krasnobayev, A.D. Cherenkov

In work a model is offered for the estimation of speed, trajectory and pumtiku of motion of separate cages and determination of their parameters in the real-time mode.

Keywords: model, trajectories of motion, biological object.