

ردیابی خودکار سلول‌ها در تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی

رضا یزدی^۱ و حسن ختن‌لو^۲

چکیده

ردیابی سلول‌ها در طول زمان یکی از موثرترین انواع مطالعه برای درک سازوکارهای رشد، ترمیم بافت و درمان بیماری در موجودات زنده است. هدف از این تحقیق ارائه روشی جدید با کمک یادگیری ماشینی برای ردیابی سلول‌ها به شکل خودکار در تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی است. با توجه به پیشرفت‌های چشمگیر در فناوری میکروسکوپ در سال‌های اخیر، از میکروسکوپ گذر-زمانی معمولاً برای مطالعه سلول‌های درون اندام‌ها استفاده می‌شود که امکان تجزیه و تحلیل مستقیم رفتارهای سلولی را فراهم می‌کند. در این روش برای ردیابی سلول‌ها، پس از قطعه‌بندی تصاویر با یادگیری عمیق، عمل تشخیص رویداد تقسیم سلولی با منحنی کاسینی و عمل پیگرد سلول‌ها در فریم‌های متوالی با روش تطبیق قالب محدود شده انجام می‌شود. عملکرد ردیاب پیشنهادی توسط معیار TRA که یک معیار استاندارد برای ارزیابی الگوریتم‌های ردیابی سلول‌ها است، اندازه‌گیری شد. ردیاب پیشنهادی روی دو مجموعه داده DIC-C2DH-HeLa و Fluo-N2DH-SIM+ دارای عملکرد ۹۶٪ و ۹۵٪ در ردیابی است و در معیارهای ترکیبی قطعه‌بندی و ردیابی بهبود ۵ درصدی را نشان داد. بر اساس آزمایشات با افزایش دقت قطعه‌بندی و تشخیص تقسیم سلولی، عملکرد کلی الگوریتم ردیابی سلول هم افزایش می‌یابد.

کلید واژه‌ها

ردیابی سلول، قطعه‌بندی سلول، تشخیص میتوز، سلول

۱- مقدمه

سلول‌های طبیعی فرآیندهای پیچیده‌ای مانند تقسیم سلولی، مهاجرت، تغییراتریخت‌شناسی و مرگ سلولی را طی می‌کنند که برای رشد بافت ضروری هستند [۱، ۲]. جزئیات مهاجرت سلولی (یعنی تغییراتریخت‌شناسی که سلول در طول حرکت متحمل می‌شود) [۳] و میتوز (تقسیم سلولی) برای درک بهتر فرآیندهای بنیادی زیستی [۴] مانند تشکیل و ترمیم مناسب بافت [۵]، بهبود زخم [۶]، درمان و پیشگیری سرطان [۷]، توسعه داروهای جدید، و تجزیه و تحلیل پاسخ ایمنی [۸، ۹] حیاتی هستند. به عنوان

مثال، اندازه‌گیری پیشرفت چرخه سلولی تحت شرایط مختلف درمان دارویی، می‌تواند به ما اجازه دهد سازوکارهای زیست‌دخیل در بیماری‌های انکولوژیک را درک کنیم و کارایی کشف و توسعه دارو را افزایش دهیم [۱۰].

با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در فناوری میکروسکوپ در سال‌های اخیر، میکروسکوپ گذر-زمانی در حال حاضر معمولاً برای مطالعه سلول‌ها در اندام‌ها استفاده می‌شود که امکان تجزیه و تحلیل مستقیم رفتارهای سلولی را فراهم می‌کند [۱۱]. امروزه چندین فن‌آوری میکروسکوپ در دسترس است، اما رایج‌ترین آنها برای تصویربرداری از سلول‌های زنده، میکروسکوپ فلورسنس، کنتراست فاز، و کنتراست تداخل دیفرانسیل است که برای تولید تصاویر گذر-زمانی در مقیاس تراپایت استفاده می‌شوند.

مراحل الگوریتم ردیابی سلول به طور کلی در شکل ۱ نشان داده شده است. ابتدا، تصاویر ورودی پیش‌پردازش شده

مقاله در اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۳ دریافت گردید؛ در مردادماه بازنگری و در مهرماه پذیرفته شد

^۱ دانشجوی دکتری مهندسی کامپیوتر، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

^۲ گروه مهندسی کامپیوتر، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

رایانامه : r.yazdi , khotanlou@eng.basu.ac.ir

نویسنده مسئول: (حسن ختن‌لو)



شکل (۱): مراحل اصلی یک الگوریتم ردیابی سلول

همپوشان، چالش سوم نیاز به استفاده از روش‌های پردازش تصویر ریخت‌شناسی مقاوم [۱۴] یا نقشه‌های تکمیلی مانند نقشه‌های همسایگی [۱۵، ۱۶] دارد.

اخیراً، شبکه‌های عصبی عمیق به دلیل اثربخشی ثابت شده‌ی آنها در کاربردهای مختلف پردازش تصویر، به عنوان یک راه‌حلمطمئن برای قطعه‌بندی تصاویر میکروسکوپی سلول ظاهر شده‌اند [۱۷-۱۸]. از آنجایی که تصاویر سلولی، بصورت متوالی هستند، بسیاری از راه‌حل‌های ارائه شده از اطلاعات مرتبط مکانی-زمانی^۳ از طریق طیف گسترده‌ای از شبکه‌های بازگشتی^۴ بهره‌مند شده‌اند. اکثر آنها از شبکه‌های عصبی کانولوشنال به عنوان ساختار ستون فقرات خود برای طبقه‌بندی استفاده می‌کنند [۱۹].

تفاوت‌های اساسی بین ردیابی سلول‌ها در توالی‌های گذرزمانی و ردیابی اشیاء در سایر انواع ویدیوها وجود دارد. اول، سلول‌ها معمولاً اشیایی با وضوح بسیار پایین با ویژگی‌های ظاهری بصری متمایزکننده‌ی کمتری در تصاویر هستند، در حالی که برای اشیایی مانند اتومبیل‌ها و انسان‌ها، مجموعه‌های غنی از ویژگی‌های مفید را می‌توان استخراج کرد که می‌تواند برای ردیابی مفید باشد. دوم، سلول‌ها الگوی حرکتی تصادفی، غیرخطی و غیرگوسی دارند، بنابراین ممکن است در هر نقطه‌ای از میدان دید ظاهر یا ناپدید شوند، در حالی که اشیاء در ویدیوی معمولی دارای حرکت صاف و قابل پیش‌بینی هستند و احتمال بیشتری وجود دارد که در محدوده‌های صحنه بمانند. سوم، تعداد سلول‌های شناسایی شده در بسیاری از آزمایش‌های زیستی از صدها تا هزاران متغیر است، که بسیار بیشتر از اکثر کاربردهای ردیابی اشیاء است که فقط به دنبال ردیابی یک یا فقط چند شیء هستند. چهارم، توالی‌های سلولی وضوح زمانی کمتری نسبت به سایر انواع ویدیوها دارند. پنجمین تفاوت میتوز است که هرگز در برنامه‌های ردیابی اشیاء رخ نمی‌دهد. و ششمین، مرگ سلولی است زیرا در طی این رویداد، کل سلول به طور ناگهانی از تصویر ناپدید می‌شود. البته اینها همه چالش‌های موجود در ردیابی سلول نیست. در [۲۰] یک

و برای شناسایی همه سلول‌ها قطعه‌بندی^۱ می‌شوند. سپس، هم‌زمان که مسیرها کاوش می‌شوند، تشخیص تقسیم سلولی برای ردیابی صحیح‌تر مسیرها انجام می‌شود. برای ایجاد مسیرها، سلول‌های قطعه‌بندی شده با استفاده از یک معیار پیوند در سراسر فریم‌ها به هم متصل می‌شوند. به عنوان مثال، یکی از روش‌های رایج پیوند سلول‌ها، فاصله اقلیدسی برای مقایسه مکان‌های مرکز سلول‌ها در فریم‌های متوالی است. در نهایت خروجی ردیابی به صورت متن و تصویر تولید می‌شوند. در ادامه گام‌های اصلی الگوریتم ردیابی سلول بررسی می‌شود.

قطعه‌بندی نمونه‌ای^۲ بسیار مهم است زیرا شناسایی درست هر کدام از سلول‌ها مقدمه هر الگوریتم ردیابی سلولی است بطوریکه عملکرد مرحله پیگرد سلول به شدت به مرحله قطعه‌بندی بستگی دارد [۱، ۲، ۳]. قطعه‌بندی سلول‌های زنده در توالی‌های میکروسکوپ گذر-زمانی به دلیل ساختارهای فضایی پیچیده و دینامیک زمانی آنها یک کار چالش برانگیز است. قطعه‌بندی سلولی با چالش‌های شناخته‌شده مشترک زیر مواجه هستند:

۱. سلول‌ها شکل‌ها، اندازه‌ها، توزیع شدت روشنایی و لبه‌های مختلفی دارند.

۲. کنتراست سلول به پس‌زمینه ممکن است کمتر از کنتراست سلول نسبت به سلول‌های مجاورش باشد. حتی سلول‌های مختلف در یک تصویر ممکن است شدت روشنایی‌های بسیار متفاوتی داشته باشند.

۳. سلول‌ها به طور بالقوه می‌توانند با هم همپوشانی یا اتصال داشته باشند.

در اولین چالش، روش‌های قطعه‌بندی باید از اطلاعات قبلی در مورد ساختار سلولی که تصویربرداری می‌شود استفاده کنند [۱۲]. برای مثال، رن و همکاران [۱۳] از نقشه‌های تراکم سلولی برای تشخیص بهتر سلول‌های قطعه‌بندی‌شده استفاده کردند. چالش دوم استفاده از الگوریتم‌های قطعه‌بندی مقاوم را ضروری می‌سازد که رویکرد آستانه‌گذاری تطبیقی محلی اولین گزینه است. برای جداسازی سلول‌های متصل یا

³ Spatio-temporal

⁴ Recurrent networks

⁵ Field of view

¹ Segmentation

² Instance Segmentation

یک مدل ریاضی از هر سلول در طول زمان منتشر می‌شود تا اطلاعات بصری را با این مدل در هر نقطه از زمان تطبیق دهد. این روش به طور موثر مرزهای سلول را در کل توالی ردیابی می‌کند. فریم اول برای مقداردهی اولیه مرزها یا موقعیت‌های هسته سلول استفاده می‌شود و سپس این مرزها و موقعیت‌ها با هر فریم بعدی تکامل می‌یابند [۳۰، ۳۱].

روش‌های مبتنی بر فاصله از حداقل فاصله بین سلول‌ها در فریم‌های متوالی برای انتخاب سلول هدف استفاده می‌کنند. فاصله اقلیدسی ساده‌ترین معیار فاصله است، با این حال، لیانگ و همکاران [۳۲] فاصله بین سلول‌ها را با استفاده از معیار "فاصله حرکت دهنده زمین"^۶ اندازه‌گیری کردند. در [۳۳]، سلول‌ها با استفاده از عملگر ریخت‌شناسی گسترش در محور زمان ردیابی شده‌اند، و در [۳۴]، گسترش ریخت‌شناسی^۷ گسترش ریخت‌شناسی^۷ برای اتصال موقعیت‌های سلول مجاور در امتداد محور زمان و ایجاد یک مسیر سلولی متصل تکرار می‌شود.

در روش‌های مبتنی بر شباهت از بردارهای ویژگی که بصورت دستی تولید می‌شوند برای محاسبه شباهت بین سلول‌ها در فریم‌های متوالی استفاده می‌کنند [۳۵، ۳۶]. دوان و همکاران [۳۷]، ویژگی‌های توپولوژیکی سازگاری مثل رنگ، همپوشانی ناحیه و تغییر شکل را با ویژگی‌های حرکتی مثل کشیدگی و جایجایی ادغام کردند تا ابهام تطبیق را کاهش دهند و مسیرهای سلولی را به درستی بسازند.

راه‌حل حریصانه دیگر بر اساس حداکثر همپوشانی مساحت سلول‌ها در فریم‌های متوالی است. ژو و همکاران [۳۸] و شیائو و همکاران [۳۹] از نمودار ورونی^۸ همپوشانی همپوشانی سلول با مساحت سلول پیش‌بینی شده برای حل مشکل ابهام در اختصاص دادن و بهبود قطعه‌بندی سلول‌هایی هم‌چسبیده استفاده کردند.

در بیشتر موارد می‌توان از جهت، سرعت، و الگوی حرکت سلول‌ها در فریم‌های قبلی برای پیش‌بینی مکان بعدی آنها استفاده کرد. اکثر الگوریتم‌های مبتنی بر نقشه حرکت^۹ از جریان نوری^{۱۰} هم برای قطعه‌بندی و هم برای ردیابی استفاده می‌کنند [۴۰]. جریان نوری سرعت هر پیکسل را بین دو فریم متوالی با توجه به تغییرات شدت روشنایی با استفاده از یک عملگر مشتق جزئی محاسبه می‌کند.

رویکردهای مبتنی بر گراف امکان مدل‌سازی رفتار ایستا و پویای سلول از جمله ریخت‌شناسی سلولی، مهاجرت سلولی و تغییرات در حالات سلولی (مثلاً میتوز و مرگ سلولی) را ارائه می‌دهند. سلول‌ها به‌عنوان رئوس یک گراف در نظر

تحلیل جامع روی چالش‌های موجود در ردیابی سلول از سطح نرم افزار کاربردی تا سطح تصاویر گذر-زمانی سلولی ارائه شده است.

تشخیص میتوز برای قطعه‌بندی سلولی و رفع ابهام در طول ردیابی ضروری است زیرا هنگام جستجوی متناظر بین سلول‌ها در فریم‌های متوالی، نشانه‌ای مفید است [۲۱]. تقسیم سلولی انواع مختلفی دارد، اما در این پژوهش منظور ما از آن، فقط میتوز است. روش‌های تشخیص میتوز را می‌توان به دو گروه کلی تقسیم کرد: تشخیص میتوز بدون ردیابی و تشخیص میتوز مبتنی بر ردیابی. گروه اول تنها بر روی ویژگی‌های دست ساز سلول‌های مادر و دختر، مانند HoG^۱، SIFT^۲ و GIST^۳ تمرکز می‌کنند [۲۲، ۲۳].

در روش‌های تشخیص میتوز مبتنی بر ردیابی، مرحله اولیه شامل شناسایی مناطق محتمل رویداد است. سپس، توالی کوتاهی از سلول‌های موجود در این ناحیه برای ترکیب ویژگی‌های سلولی با ویژگی‌های مکانی-زمانی [۲۴] و نقشه حرکت سلولی [۲۵] ردیابی می‌شود.

در سالهای اخیر یادگیری عمیق در تشخیص میتوز به شدت مورد توجه قرار گرفته است [۲۶]. با توجه به مدل‌سازی رویدادهای میتوز، روش‌های CNN محور را می‌توان به سه دسته تقسیم کرد. اولین مورد، ساختار سلسله مراتبی [۲۷] است که شامل چندین لایه از یک شبکه CNN برای استخراج ویژگی‌های بصری و کشف ساختارهای متوالی است. دسته دوم [۲۸ CNN-LSTM] است که در آن CNN برای استخراج ویژگی‌های بصری و LSTM برای مدل‌سازی زمانی استفاده می‌شود. در نهایت، 3D-CNN [۲۹] وجود دارد که ویژگی‌های مکانی-زمانی را از توالی‌های تصویر سلولی با استفاده از عملیات کانولوشن سه‌بعدی استخراج می‌کند.

ردیابی خودکار سلول یعنی شناسایی و قطعه‌بندی تمام رخدادها سلولی مورد نیاز در یک توالی تصاویر گذر-زمانی و همچنین تعریف روابط زمانی آنهاست. در [۲۰] الگوریتم‌های ردیابی سلول در سه سطح راهبرد، راهکنش، و روش دسته‌بندی شده است. ردیابی سلول در سطح راهبرد به دو صورت ردیابی بدون شناسایی^۴ و ردیابی حین شناسایی^۵ تقسیم‌بندی شده است. راهکنش‌های مختلف ردیابی سلول مبتنی بر مدل تکاملی، فاصله، شباهت، همپوشانی، الگوی تحرک، مدل‌های احتمالاتی، و یادگیری عمیق است.

روش تکامل منحنی از راهکنش مدل تکاملی و راهبرد ردیابی بدون شناسایی سلول استفاده می‌کند. در این روش

^۶ Earth Mover's Distance

^۷ Morphological dilation

^۸ Voronoi

^۹ Motion map

^{۱۰} Optical flow

^۱ Histogram of oriented gradients

^۲ Scale-invariant feature transform

^۳ Global Image Structure

^۴ Tracking before Detection

^۵ Tracking by Detection

شبکه اجازه می‌دهد تا ویژگی‌های چندمقیاسی را بهتر کاوش ترکیب کند.

در کل، مزایا و معایب کارهای پیشین در ردیابی سلول شامل روش‌های سنتی پردازش تصویر که ساده و سریع اما با دقت پایین هستند، روش‌های مبتنی بر شبکه‌های عصبی عمیق که دقت بالا اما نیاز به منابع محاسباتی و مجموعه داده‌های بزرگ دارند، مدل‌های تکاملی که توانایی ردیابی دقیق اما حساس به نویز هستند و روش‌های مبتنی بر گراف که مدل‌سازی رفتار ایستا و پویا را ممکن اما پیچیدگی محاسباتی بالایی دارند.

در این پژوهش، نوآوری‌های ما شامل استفاده از مدل MaxSigNet برای قطعه‌بندی دقیق‌تر [۵۰]، روش تطبیق قالب [۵۳] محدود شده برای ردیابی سلول‌ها با کارایی بالا و الگوریتم جدید تشخیص رویداد تقسیم سلولی با استفاده از منحنی کاسینی^۷ [۵۲] است که بهبود قابل‌ملاحظه‌ای در دقت و کارایی ردیابی سلول‌ها نسبت به روش‌های موجود ارائه می‌دهند. علاوه بر این، ردیاب پیشنهادی ما بسیار ساده است، غیرنظارتی است، منابع محاسباتی زیادی نمی‌خواهد و تنها یک پارامتر برای تنظیم اندازه ناحیه تطبیق لازم دارد.

در ادامه پس از شرح مجموعه داده‌ها و نحوه ارزیابی الگوریتم‌های ردیابی سلول به جزئیات طراحی و پیاده‌سازی روش پیشنهادی پرداخته و در انتها نتایج گزارش و مورد بحث قرار می‌گیرند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مجموعه داده‌ها

برای ارزیابی عملکرد الگوریتم پیشنهادی و به دست آوردن بینشی در مورد قابلیت‌ها و محدودیت‌های آن، از تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی سلول‌ها استفاده شد که در www.celltracjkingchallenge.net در دسترس عموم قرار دارند. جزئیات این تصاویر در جدول ۱ و نمونه‌هایی از آنها در شکل ۲ آورده شده است.

جدول (۱): مشخصات مجموعه داده‌های استفاده شده

ابعاد به پیکسل	تعداد میتوز	تعداد فریم	سلول
۶۲۸*۶۹۰	۲۶	۶۵	Fluo-N2DH-SIM+ ۰۱
۷۳۹*۷۷۳	۳۳	۱۵۰	Fluo-N2DH-SIM+ ۰۲
۵۱۲*۵۱۲	۱۱	۸۴	DIC-C2DH-HeLa ۰۱
۵۱۲*۵۱۲	۸	۸۴	DIC-C2DH-HeLa ۰۲

^۷Cassini oval

گرفته می‌شوند، در حالی که پیگردها به‌عنوان یال‌های گراف در نظر گرفته می‌شوند و هر یال دارای وزنی است. با این نحوه نمایش فیلترهای بیزین^۱ مانند فیلتر کالمن^۲ [۴۱]، فیلتر ذرات [۴۲]، یا فیلتر برنولی [۴۳] نیز برای ردیابی سلولی استفاده شده‌اند. همچنین در نحوه نمایش گرافی می‌توان از روش‌های بهینه‌سازی سراسری مانند الگوریتم ویتربی^۳ در صورتی که وزن یال‌ها یک مقدار احتمالی باشد، استفاده کرد [۴۴]. هایم و همکاران [۵۵] یک نوع جدید از گراف شبکه عصبی را معرفی کردند که به روزرسانی متقابل بردارهای ویژگی رثوس و یال‌ها را امکان‌پذیر می‌کند. مفهوم ارسال پیام بین رثوس و یال‌ها از اهمیت اساسی برخوردار است زیرا «جریان» اطلاعات بین رثوس و یال‌ها را در فریم‌های متوالی در مجاورت همسایه‌هایشان ممکن می‌سازد. در نهایت، آنها توسط یک طبقه‌بند، یال‌های فعال را شناسایی کرده و از آن برای ساخت مسیر سلول‌ها و درختان دودمان استفاده کردند.

شبکه‌های عصبی مصنوعی عمیق از لایه‌های کانولوشنال^۴ متوالی برای یادگیری مجموعه‌ای از انتزاع‌های پیچیده‌تر با چیدن چند تبدیل غیرخطی بر روی یکدیگر استفاده می‌کنند. یک شبکه عصبی عمیق برای ردیابی سلول به نام «شبکه حافظه پویا» توسط لی و همکاران معرفی شد [۴۵]. این معماری از یک شبکه کاملاً پیچیده برای استخراج ویژگی به همراه یک ماژول LSTM برای تمرکز روی تغییرات ظاهر سلول در طول زمان استفاده می‌کند. چن و همکاران [۴۶] یک شبکه عصبی جدید برای قطعه‌بندی و ردیابی همزمان سلول ارائه کردند. شبکه آنها معماری-Mask R-CNN را با یک ردیاب مبتنی بر شبکه عصبی Siamese^۵ ادغام عصبی Siamese^۵ ادغام می‌کند تا سرعت و کارایی بهتری نسبت به روش‌های قبلی که نیاز به مراحل پردازش اضافی دارند، داشته باشد.

ردیابی خودکار سلول حتی در جدیدترین پژوهش‌های یادگیری عمیق هم مورد توجه قرار گرفته است. به عنوان مثال، جستجوی معماری عصبی^۱ (NAS) روشی است که به دنبال معماری ایده‌آل شبکه عصبی برای یک کار معین می‌شود. ژو و میجرینگ [۴۷] یک روش قطعه‌بندی سلول در تصاویر گذر-زمانی مبتنی بر NAS را توسعه دادند که جستجوی ریزساختارهای غیرتکراری را با ساخت یک شبکه کلان که شبکه تکرارپذیر به خوبی مطالعه شده از قبل را تکمیل می‌کند، ترکیب کرد. این کار اجازه می‌دهد تا لایه‌های مختلف شبکه کلان تمرکز خاص خود را داشته باشند و به

^۱Bayesian filters

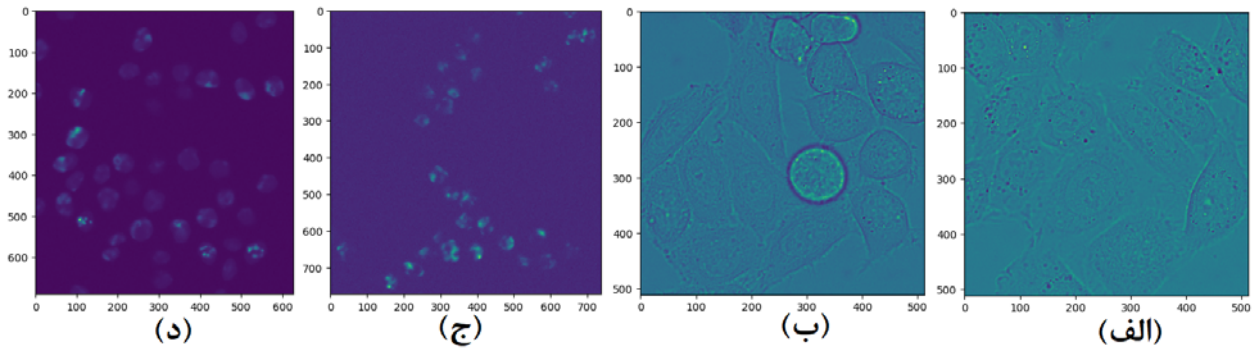
^۲Kalman filter

^۳Viterbi

^۴Convolutional

^۵Siamese neural network

^۶Neural architecture search (NAS)



شکل (۲): نمونه‌ای از تصاویر سلولی استفاده شده. (الف): DIC-C2DH-HeLa 02: (ب): DIC-C2DH-HeLa 01: (ج): Fluo-N2DH-SIM+ 01: (د): N2DH-SIM+ 02

رویدادهای تقسیم سلولی را جمع‌آوری می‌کند. از نظر عددی، TRA به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$TRA = 1 - \frac{\min(AOGM, AOGM0)}{AOGM} \quad (1)$$

که در آن AOGM0 مقدار AOGM مورد نیاز برای ایجاد گراف مرجع است (یعنی مقدار AOGM برای یک ردیابی خالی است). عملکرد حداقل در شمارشگر از منفی بودن مقدار TRA در مواردی که ایجاد گراف مرجع کم هزینه‌تر از تبدیل گراف محاسبه شده به گراف مرجع است، جلوگیری می‌کند. نرمال سازی تضمین می‌کند که TRA همیشه در بازه [۰, ۱] قرار می‌گیرد، بطوریکه مقادیر بالاتر، نشان‌دهنده عملکرد بهتر در ردیابی است.

با اینکه معیار TRA رویدادهای سلولی بیشتری را دخالت می‌دهد، اما مستقیماً خطای قطعه‌بندی را برای ارزیابی الگوریتم‌های ردیابی در نظر نمی‌گیرد. به عنوان مثال خطای قطعه‌بندی اغلب به ایجاد یک مسیر اضافی در گراف AOGM منجر می‌شود. بنابراین، برای مقایسه عادلانه الگوریتم‌های ردیابی از معیار^۴ OP_{CTB} استفاده می‌شود [۱, ۲, ۳] که کیفیت قطعه‌بندی و ردیابی را به طور همزمان اندازه‌گیری می‌کند و به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$OP_{CTB} = \frac{SEG + TRA}{2} \quad (2)$$

OP_{CTB} با میانگین‌گیری از این دو معیار، ارزیابی متعادلی از عملکرد الگوریتم در شناسایی مرزهای سلول (قطعه‌بندی) و دنبال کردن سلول‌ها در طول زمان (ردیابی) ارائه می‌دهد. در این رابطه SEG نشان‌دهنده عملکرد قطعه‌بندی نمونه‌ای است که از معیار ضریب جاکارد^۵ استفاده می‌کند.

همچنین برای اندازه‌گیری کیفیت قطعه‌بندی معنایی سلول‌ها از معیار Dice (رابطه (۴)) برای تشخیص رویداد میتوز پس از شمارش تعداد تشخیص‌های صحیح (True Positive)، اضافی (False Positive)، و عدم تشخیص (False Negative) از معیار F1 (رابطه (۷)) استفاده شد. نمونه TP یعنی تقسیم سلولی رخ داده و الگوریتم پیشنهادی هم به درستی آن را گزارش کرده است. نمونه FP یعنی تقسیم سلولی نبوده است ولی الگوریتم تشخیص تقسیم سلولی آن را به اشتباه تقسیم سلولی گزارش کرده

در ادامه آزمایش‌هایی برای ارزیابی عملکرد روش پیشنهادی بر روی Fluo-N2DH-SIM+ انجام شد [۴۸]. این مجموعه داده شامل دو دنباله است که از نظر شکل و تعداد فریم‌ها و تقسیمات سلولی، متفاوت هستند. همچنین تصاویر و برجسب^۱ (GT) آن توسط رایانه تولید شده است بطوری که سناریوهای مختلف چالشی برای ردیابی سلول‌ها و شناسایی رویداد تقسیم سلولی در آن دیده شده است. این مجموعه داده چالش‌های مختلفی دارد: (۱) هر کدام از تصاویر دارای شدت روشنایی متفاوتی هستند. (۲) کنتراست بین اشیاء پیش‌زمینه و پس‌زمینه در تصاویر کم است. (۳) سلول‌ها در هر فریم تعداد، شکل و مراحل چرخه زندگی متفاوتی دارند. (۴) سلول‌ها مرز مشخصی ندارند.

مجموعه داده DIC-C2DH-HeLa شامل دو دنباله است که هر کدام ۸۴ تصویر با ابعاد یکسان دارد [۲]. دنباله‌های ۰۱ و ۰۲ این مجموعه داده به ترتیب دارای ۱۱ و ۸ رویداد تقسیم سلولی هستند. اگرچه سلول‌های این مجموعه داده بسیار نزدیک به هم هستند و اغلب به هم چسبیده‌اند، سلول‌های میتوزی آن ریخت‌شناسی کاملاً متفاوتی با سلول‌های غیرمیتوزی دارند، بطوریکه تشخیص میتوز در این مجموعه داده به صورت بصری قابل تشخیص است.

۲-۲- روش ارزیابی الگوریتم ردیابی سلول

برای اندازه‌گیری کمی نتایج الگوریتم‌های ردیابی سلول، از معیار TRA^۲ [۳, ۲, ۱] استفاده شد. معیار TRA بر اساس مقایسه رئوس و یال‌های گراف جهت‌دار بدون دور^۳ مرجع با گراف مسیرهای پیش‌بین شده توسط ردیاب است. این گراف نشان‌دهنده سلول‌ها و ارتباط آن‌ها در GT و روش ارزیابی شده است. در واقع این معیار مجموع وزن‌های عملیات مورد نیاز برای تبدیل درخت دودمان سلولی پیش‌بینی شده به درخت نسل سلولی GT را محاسبه می‌کند و تمام اطلاعات مورد نیاز برای ارزیابی ردیابی، از جمله

¹ Ground-Truth (GT)

² Tracking accuracy measure (TRA)

³ Acyclic-Oriented Graph Metric (AOGM)

⁴ Overall Performance Cell Tracking Benchmark

⁵ Jaccard Similarity Index (SEG)

دارند. همان‌طور که در شکل ۳ نمایش داده شده است، معماری MaxSigNet از شش بلاک موازی تشکیل شده است. هر بلاک از یک لایه MaxSigLayer و چند لایه کانولوشنی تشکیل شده است که نتیجه این بلاک‌ها با یک نقشه از لایه‌های سلول [۵۱] ترکیب شده تا نتیجه نهایی قطعه‌بندی را تولید کند. در ابتدا، تصویر ورودی از طریق MaxSigLayer برای استخراج ویژگی‌های اولیه تغذیه می‌شود، سپس برای حفظ اطلاعات مهم، از MaxPooling و در ادامه از Upsampling برای بازگرداندن اندازه اصلی تصویر انجام می‌شود. به طور تجربی با در نظر گرفتن ابعاد سلول‌های درون تصاویر، اندازه بهینه کرنل MaxPooling مقدار ۳۲ تعیین شد. متعاقباً، همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، کانولوشن گسترده با یک نرخ انبساط کاهشی به سمت انتهای معماری اعمال می‌شود. اما در دو بلوک آخر، کانولوشن گسترده با کانولوشن معمولی جایگزین شده‌اند، زیرا آنها در اندازه‌های کرنل خاصی از MaxSigLayer ها بهتر از همتایان گسترده خود عمل می‌کنند. در انتهای هر بلوک، از یک لایه کانولوشن اضافی برای کاهش بار کانال استفاده شد. در شکل ۳ اندازه کرنل مربوط به هر لایه درون بلوک، در آن فهرست شده است. پس از آن، خروجی‌های MaxSigLayer با خروجی‌های به دست آمده از مجموعه عملیات قبلی ادغام می‌شوند. این نقشه‌های ویژگی به دست آمده، همراه با نقشه لبه [۵۱]، با درگیر کردن سه کانولوشن متوالی دیگر برای کاهش تعداد کانال‌ها از ۶۶ به ۲۵۶ قبل از تولید نتایج قطعه‌بندی نهایی از طریق یک لایه کانولوشن ۱×۱، تولید می‌شوند. به طور خلاصه، شبکه پیشنهادی از اجزای پیشرفته مانند MaxSigLayer در کنار اجزای سنتی برای دستیابی به نتایج بهتر استفاده می‌کند.

۳-۳- تشخیص تقسیم سلولی

تشخیص صحیح رویداد تقسیم سلولی در ردیابی درست سلول‌ها ضروری ولی چالشی است، زیرا در حین آن شناسه مسیر متعلق به مادر به پایان می‌رسد و دختران هر کدام شناسه مسیر جدیدی دریافت می‌کنند.

در این پژوهش برای تشخیص تقسیم سلولی از منحنی کاسینی استفاده شد [۵۲]. منحنی کاسینی یک بیضی دویعدی است که در آن فاصله حاصل ضرب هر نقطه از محیط بیضی مثل p تا دو نقطه کانونی f_1 , f_2 مقداری ثابت و مثبت مثل b است.

$$(|PF_1| + |PF_2| = b^2) \quad (8)$$

اگر این رابطه برای صفحه دویعدی با این فرض که نقاط کانونی در مختصات $(-a, 0)$ و $(a, 0)$ قرار داشته باشند بازنویسی شود، در این صورت خواهیم داشت:

$$((x-a)^2 + y^2)((x+a)^2 + y^2) = b^4 \quad (9)$$

همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است شکل منحنی کاسینی با توجه به نسبت $\frac{b}{a}$ تغییر می‌کند. در طول رویداد تقسیم سلولی یک سلول میتوزی اغلب رفتارهای متوالی زیر را از خود

است. در تصاویر سلولی چون سلول‌ها به هم می‌چسبند این موضوع چالشی است، ولی الگوریتم پیشنهادی تا حد زیادی در برابر این چالش مقاوم است. نمونه FN یعنی تقسیم سلولی رخ داده است ولی الگوریتم آن را تشخیص ندهد.

$$SEG = \frac{(Predicted \cap GT)}{(Predicted \cup GT) - (Predicted \cap GT)} \quad (3)$$

$$Dice = \frac{2 * (Predicted \cap GT)}{Predicted \cup GT} \quad (4)$$

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (5)$$

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (6)$$

$$F1 = \frac{2 * Recall * Precision}{Recall + Precision} \quad (7)$$

۳- روش پیشنهادی

در روش پیشنهادی که در این قسمت توضیح داده خواهد شد، ورودی، دنباله تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی سلولی و خروجی، دنباله تصاویری است که در آن هر کدام از سلول‌ها دارای برچسب یکتایی هستند که در کلیه مراحل چرخه سلولی قابل ردیابی مکانی و زمانی هستند. همچنین در کنار خروجی تصویری برای ارزیابی عملکرد قطعه‌بندی معنایی و نمونه‌ای، برای محاسبه مقدار TRA یک فایل متنی نیز باید تولید شود که در آن هر مسیر یک شناسه دارد. این شناسه دارای چهار مقدار است که به ترتیب شامل: شماره مسیر، شماره فریم شروع مسیر، شماره فریم پایان مسیر، و شناسه مسیر والد است.

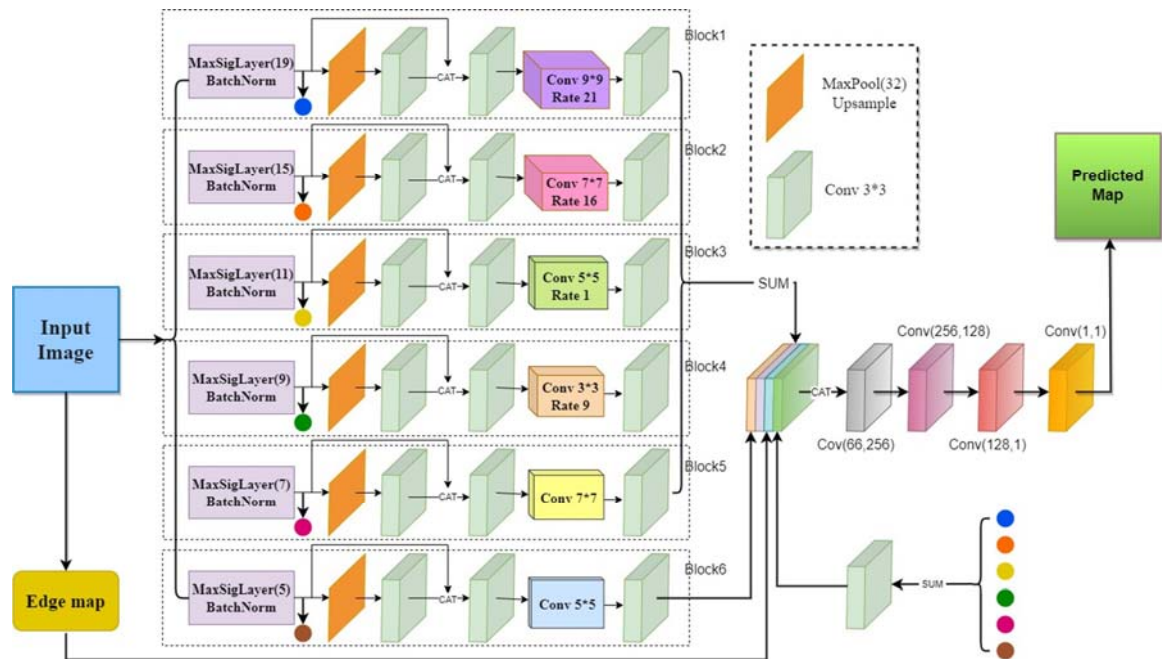
۳-۱- پیش پردازش

برای بهبود کیفیت تصاویر قبل از وارد کردن آن به شبکه عصبی، یک سری مراحل پیش پردازش را انجام می‌شود. ابتدا از فیلتر گاوسی برای کاهش نویز و افزایش همواری^۱ تصویر استفاده شد. پس از آن، الگوریتم متعادل‌سازی بافت‌نگار تطبیقی کنتراست محدود (CLAHE) [۴۹] را برای متعادل‌سازی بافت‌نگار تصویر اعمال شد.

۳-۲- قطعه‌بندی تصاویر

در ردیابی سلول اولین مرحله، قطعه‌بندی تصاویر به منظور شناسایی هر کدام از سلول‌ها است. در این پژوهش برای قطعه‌بندی تصاویر از MaxSigNet [۵۰] استفاده شد. این شبکه عصبی از یک لایه قابل یادگیری جدید به نام MaxSigLayer استفاده می‌کند. این لایه یک نمایش جدید از تصاویر را ارائه می‌کند که در آن سلول‌ها از پس‌زمینه‌شان قابلیت تشخیص بیشتری

¹ Smoothness



شکل (۳): معماری شبکه MaxSigNet [۵۰] که برای قطعه‌بندی سلول‌ها در تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی استفاده شده است.

است، اما حداقل مقدار ۰٫۷ را می‌توان در نظر گرفت. این تطابق باید مقادیر کانونی متفاوتی داشته باشد و حاصل ضرب آنها نیز مثبت باشد. اگر چنین تطابقی پیدا شود، تأیید می‌کند که تقسیم سلولی رخ داده است.

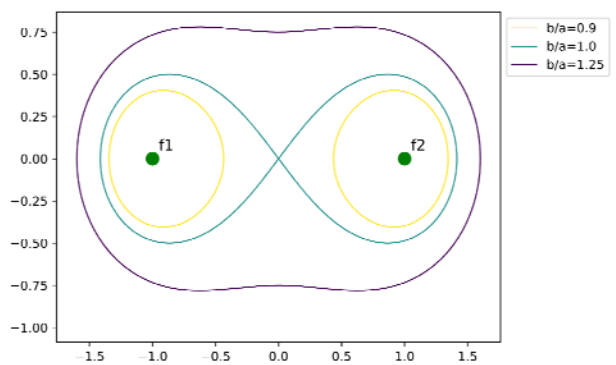
۳-۴- ردیابی سلول با تطبیق قالب

برای ردیابی سلول‌ها پس از قطعه‌بندی باید آنها را در تصاویر متوالی مورد پیگرد قرار داد. برای اینکار باید به هر کدام از سلول‌ها یک برچسب یکتا داد و سپس آن را در فریم بعدی شناسایی کرده و دوباره همان برچسب را به آن اختصاص داد. این کار تا زمانی که سلول در تصاویر وجود داشته باشد یا دچار تقسیم سلولی شود ادامه می‌یابد. برای شناسایی سلول در فریم بعدی از تطبیق قالب استفاده می‌شود. تطبیق قالب روشی برای جستجو و یافتن مکان یک تصویر الگو در یک تصویر بزرگتر است. در این روش تصویر الگو روی تصویر ورودی می‌لغزد (مانند کانونولوشن دو بعدی) و الگو و تصویر ورودی مقایسه می‌شوند. خروجی یک تصویر در مقیاس خاکستری است، که در آن هر پیکسل نشان می‌دهد که همسایگی آن پیکسل چقدر با الگو مطابقت دارد. روش‌های زیادی برای مقایسه الگو و تصویر ورودی پیاده‌سازی شده‌اند، اما در اینجا از تابع همبستگی سریع نرمال شده [۵۳] برای یافتن نمونه‌هایی از الگو در تصویر استفاده شد.

برای افزایش سرعت و دقت، جستجو برای تطبیق الگوی هر سلول را با توجه به میزان جابجایی احتمالی آن، فقط در یک ناحیه کوچک از فریم بعدی انجام می‌شود. اندازه این ناحیه برابر با کوچکترین مستطیل محیط بر سلول به علاوه حداکثر مقدار جابجایی سلول‌ها درون دنباله است. به این صورت که پس از قطعه‌بندی دو فریم متوالی، برای هر کدام از سلول‌ها در فریم اول

نشان می‌دهد: سرعت مهاجرت خود را کاهش می‌دهد، کوچک‌تر می‌شود، روشن‌تر می‌شود، شبیه عدد هشت انگلیسی می‌شود و سپس به دو دختر تقسیم می‌شود. نویسندگان مقاله [۵۲]، با تطبیق دادن فازهای مختلف رویداد تقسیم سلولی با منحنی کاسینی اقدام به تشخیص آن کردند. در این روش، تطابق سلول مادر با حالت تک‌حلقه‌ای و تطابق سلول‌های دختر با حالت دو حلقه‌ای منحنی کاسینی برای تشخیص می‌توز به کار گرفته می‌شود.

ابتدا تصاویر را قطعه‌بندی کرده و هر سلول در فریم جاری تجزیه و تحلیل می‌شود. هدف این است که بهترین تطابق بین سلول و منحنی کاسینی در حالت تک‌حلقه‌ای را با تنظیم پارامترهای آن برای به حداکثر رساندن همپوشانی آنها یافت شود. سپس همین ناحیه در فریم بعدی بررسی می‌شود. بیشترین تطابق IOU برای منحنی کاسینی در حالت دو حلقه‌ای نیز مدنظر می‌باشد. مقدار آستانه IOU برای سلول‌های مختلف کمی متفاوت



شکل (۴): اگر مقدار >1 آنگاه منحنی کاسینی فقط یک حلقه بیضی شکل خواهد بود، اگر $=1$ آنگاه شکل منحنی کاسینی بصورت دو حلقه است که در وسط نقاط کانونی به هم متصل می‌شود، و اگر <1 آنگاه منحنی کاسینی، به دو حلقه جدا از هم تبدیل می‌شود.

۴-۲- نتایج قطعه‌بندی

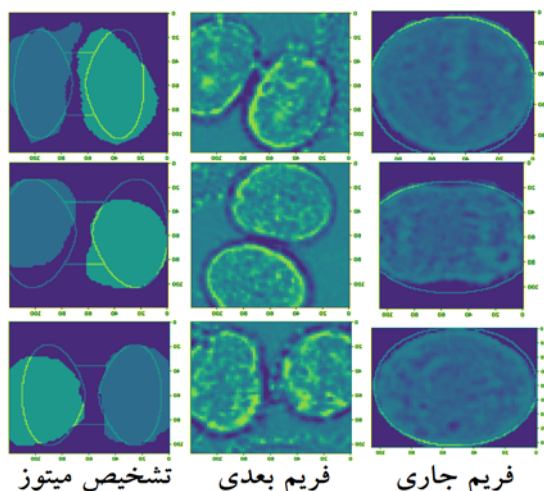
ابتدا مدل MaxSigNet [۵۰] برای انجام قطعه‌بندی سلول‌ها آموزش داده شد. برای انجام این کار تصاویر دنباله‌های هر مجموعه داده با هم ادغام شدند و سپس بصورت تصادفی ۸۰٪ از آنها را برای آموزش و ۲۰٪ باقیمانده را برای آزمون در نظر گرفته شد. دقت قطعه‌بندی معنایی هر کدام از مجموعه داده‌ها برای مجموعه آزمون در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول (۲): عملکرد قطعه‌بندی با MaxSigNet

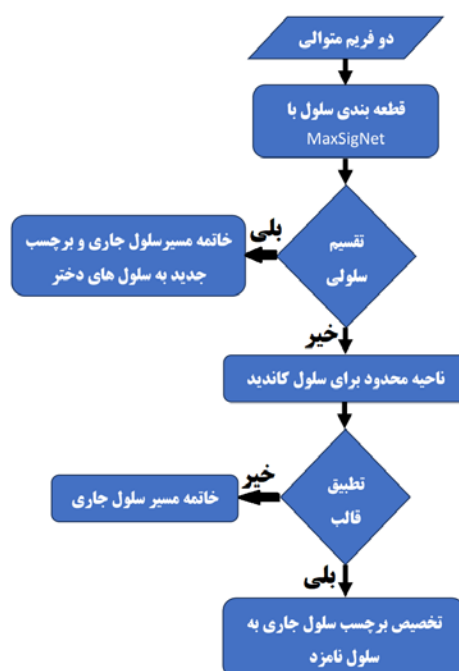
مقدار Dice مجموعه تست	دنباله سلول
۰,۹۳۷	Fluo-N۲DH-SIM+
۰,۹۳۱	DIC-C2DH-HeLa

۴-۳- نتایج تشخیص تقسیم سلولی

در این پژوهش در حین انجام عملیات ردیابی سلول عملکرد ماژول تشخیص رویداد تقسیم سلولی هم ارزیابی می‌شود. عمل تشخیص رویداد تقسیم سلولی به کمک منحنی کاسینی انجام می‌شود، به این صورت که از انطباق سلول میتوزی با حالت‌های مختلف منحنی کاسینی استفاده می‌شود [۵۲]. روش پیشنهادی، پس از قطعه‌بندی تصویر، برای هر سلول در فریم فعلی، ابتدا بهترین تطابق با حالت تک‌حلقه‌ای منحنی کاسینی پیدا می‌شود. سپس، در فریم بعدی، اشیاء موجود در همان ناحیه را برای تطابق حداکثری با حالت دو حلقه‌ای مجزای منحنی کاسینی بررسی می‌کند. نتیجه این ارزیابی توسط سه معیار Precision، Recall، و F1 در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین نمونه‌هایی از نتیجه قطعه‌بندی و تشخیص تقسیم سلولی در شکل ۶ و ۷ نمایش داده شده است. توجه داشته باشید که در ستون سوم این تصاویر الگوریتم تشخیص میتوز برای تطابق حداکثری تصویر را چرخانده



شکل (۶): نتیجه قطعه‌بندی و تشخیص تقسیم سلولی الگوریتم پیشنهادی روی مجموعه داده DIC-C2DH-HeLa.



شکل (۵): ساختار کلی روش ردیابی پیشنهادی

که دارای برجسب هستند ناحیه کاندیدی در فریم بعدی در نظر گرفته شده و الگوریتم تطبیق قالب در این ناحیه محدود به سلول اعمال می‌شود. شکل ۵ ساختار کلی روش ردیابی پیشنهادی را نمایش می‌دهد.

۴-۴- آزمایشات و نتایج

وظیفه ردیابی سلول از زیروظایف قطعه‌بندی، تشخیص تقسیم سلولی و پیگرد تک‌تک سلول‌ها در طول فریم‌های مجموعه داده تشکیل شده است. برای ارزیابی عملکرد روش ارائه شده از مجموعه داده‌های DIC-C2DH-HeLa و Fluo-N2DH-SIM+ استفاده شد. مجموعه داده Fluo-N2DH-SIM+ با برجسب دقیق و کافی است، در حالیکه مجموعه داده DIC-C2DH-HeLa یک مجموعه داده از سلول‌های واقعی است که تصاویر برجسب‌گذاری شده کمتری دارد. در این بخش عملکرد روش پیشنهادی برای سه ماژول قطعه‌بندی سلول، تشخیص رویداد تقسیم سلولی، و ردیابی سلول گزارش می‌شود.

۴-۱- تنظیمات پیاده‌سازی

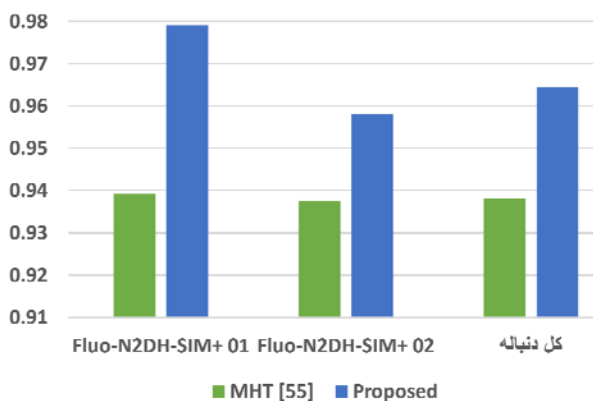
پارامترهای آموزشی برای MaxSigNet [۵۰] با استفاده از بهینه‌ساز AdamW و با کاهش نرخ یادگیری بر اساس تعداد دوره (کاهش ۰,۲٪ از نرخ یادگیری بعد از هر ۱۵۰ دوره) و با شروع از مقدار پایه ۰,۰۰۰۱ تنظیم شد. بهینه‌سازی AdamW یک روش نزولی‌گرادیان تصادفی است که مبتنی بر تخمین تطبیقی ممان‌های مرتبه اول و دوم با روش اضافه شده به وزن‌های کاهش‌ی است [۵۴]. برای آموزش مدل‌ها از یک GPU محلی (GeForce 1080 Ti) با ۱۱ گیگا بایت رم استفاده شد. همچنین مدل پیشنهادی در چارچوب PyTorch پیاده‌سازی شد.

جدول (۴): عملکرد روش ردیابی سلول پیشنهادی

دنباله سلول	S EG	T RA	O P _{CTB}
Fluo-N ₂ DH-SIM+ ۰۱	۰, ۸۷۳۸	۰, ۰.۹۳۶	۰, ۹۲۶۴
Fluo-N ₂ DH-SIM+ ۰۲	۰, ۸۱۰۲	۰, ۰.۹۷۰	۰, ۸۸۴۲
DIC-C2DH-HeLa ۰۱	۰, ۹۳۳۵	۰, ۰.۸۵۳	۰, ۹۵۱۸
DIC-C2DH-HeLa ۰۲	۰, ۹۵۱۶	۰, ۰.۸۹۷	۰, ۹۴۵۸

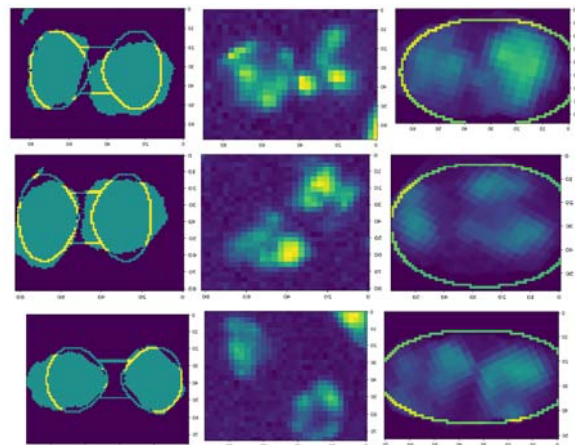
در نمودار شکل ۸ روش پیشنهادی با روش ردیابی با فرضیه‌های چندگانه مبتنی بر مسیر (MHT) [۵۶] بر اساس معیار TRA برای مجموعه سلول چالشی Fluo-N₂DH-SIM+ مقایسه شده است. همانطور که در نمودار مشخص است الگوریتم پیشنهادی عملکرد بهتری در هر دو دنباله داشته است و برای کل دنباله سلولی بیش از ۲ درصد نتیجه بهتری تولید کرده است.

در نهایت عملکرد کلی ردیاب پیشنهادی با روش s-TAS [۵۷] و با معیار OP_{CTB} مقایسه شد. ردیاب پیشنهاد شده در [۵۷] دارای معماری پیچیده‌ای است و از ترکیب شبکه‌های کانولوشنی با ویژگی‌های مورفولوژی برای غلبه بر چالش قطعه‌بندی و تشخیص حین ردیابی استفاده می‌کند. همانطور که در جدول ۵ و نمودار شکل ۹ نمایش داده شده است، با اینکه مقدار معیار TRA برای روش ردیابی پیشنهادی این پژوهش با روش s-TAS [۵۷] برابر است، اما عملکرد الگوریتم ردیابی پیشنهادی بر اساس معیار OP_{CTB} ۵ درصد بهتر است، زیرا قطعه‌بندی پیشنهادی



شکل (۸): مقایسه روش پیشنهادی با ردیابی با فرضیه‌های چندگانه مبتنی بر مسیر [۵۶] روی دنباله Fluo-N₂DH-SIM+

این پژوهش عملکرد بهتری در قطعه‌بندی نمونه‌ای (SEG) داشته است. این مقایسه روی مجموعه سلول DIC-C2DH-HeLa انجام شد.



شکل (۷): نتیجه قطعه‌بندی و تشخیص تقسیم سلولی الگوریتم پیشنهادی روی مجموعه داده Fluo-N₂DH-SIM+.

است.

جدول (۳): عملکرد تشخیص رویداد تقسیم سلولی

دنباله سلول	TP	FP	FN	Precision	Recall	F1
Fluo-N ₂ DH-SIM+ ۰۱	۲۵	۱	۱	۰,۹۶	۰,۹۶	۰,۹۶
Fluo-N ₂ DH-SIM+ ۰۲	۲۸	۵	۵	۰,۸۵	۰,۸۵	۰,۸۵
DIC-C2DH-HeLa ۰۱	۱۱	۰	۰	۱	۱	۱
DIC-C2DH-HeLa ۰۲	۸	۰	۰	۱	۱	۱

۴-۴- نتایج ردیابی سلول

برای ردیابی سلول‌ها پس از قطعه‌بندی باید هر کدام از آنها را بطور جداگانه در تصاویر متوالی مورد پیگرد قرار داد. برای ردیابی باید به هر کدام از سلول‌ها یک برجسب یکتا داد و سپس آن را در فریم بعدی شناسایی کرده و دوباره همان برجسب را به آن اختصاص داد. این کار تا زمانی که سلول در تصاویر وجود داشته باشد یا دچار تقسیم سلولی شود ادامه می‌یابد. برای شناسایی سلول در فریم بعدی از تطبیق قالب استفاده شد. در جدول شماره ۴ گزارش نتایج روش پیشنهادی برای ردیابی سلول‌ها در دو دنباله از مجموعه داده‌های مذکور، ارائه شده است. در این جدول در ستون اول نام دنباله سلولی، در ستون دوم مقدار قطعه‌بندی نمونه‌ای، در ستون سوم مقدار TRA و در ستون آخر عملکرد کلی ردیاب پیشنهادی برای هر دنباله آورده شده است. الگوریتم پیشنهادی هم سلول‌های تصاویر را برجسب گذاری می‌کند و هم یک فایل متنی از شناسه مسیرها را تولید می‌کند.

در نهایت هدف ما ردیابی همه‌ی سلول‌ها در همه فریم‌های دنباله‌ها است. برای ردیابی یک سلول نیاز به تشخیص درست آن در فریم بعدی است. برای اینکار نیاز است که در فریم بعدی یک ناحیه به اندازه پنجره محیط بر سلول (Bounding Box) به علاوه یک Offset به اندازه حداکثر جابجایی مراکز سلول‌ها درون دنباله، در نظر گرفته شود. سپس برای هر سلول در این ناحیه، عمل تطبیق قالب انجام می‌شود تا سلول هدف در فریم بعدی مشخص شود و به آن برچسب سلول جاری اختصاص داده شود.

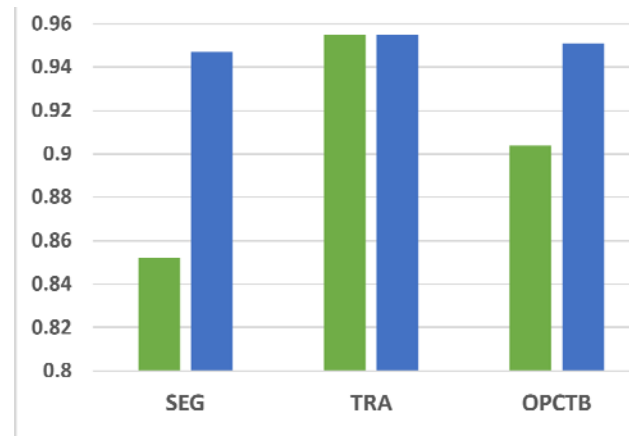
از مزایای روش پیشنهادی می‌توان به سادگی، عملکرد قابل قبول در مقایسه با سایر روش‌ها، استفاده از مدل یادگیری عمیق برای قطعه‌بندی سلول‌ها، و استفاده از منحنی کاسینی برای تشخیص رویداد تقسیم سلولی اشاره کرد. با این وجود، هنوز دقت تشخیص رویداد تقسیم سلولی در تصاویر با سلول‌های مترکم و شبیه به هم، می‌تواند بهینه شود. همچنین برای افزایش دقت ردیابی، می‌توان از روش‌های پیچیده‌تر و ترکیبی استفاده کرد.

از آنجا که ردیابی سلول در محیط بسیار چالشی تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی شامل عملیات‌هایی مثل قطعه‌بندی، تشخیص تقسیم سلولی و ردیابی سلول‌ها است استفاده از معیارهایی نظیر OP_{CTB} مقایسه جامع‌تری ارائه می‌کنند. با توجه به مقادیر جداول ۴ و ۵ و همچنین نمودارهای شکل ۸ و ۹ می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از قطعه‌بند MaxSigNet و تشخیص دهنده تقسیم سلولی مبتنی بر منحنی کاسینی به همراه ردیابی با روش تطبیق قالب محدود شده در نتیجه کلی ردیابی موثر بوده است.

با اینکه این پژوهش یک راه‌حل جدید و کارآمد را برای ردیابی سلول ارائه کرده است، اما زیر وظایف آن هنوز محدودیت‌هایی دارند که پیشنهاداتی برای بهبود آنها در کارهای آینده ارائه می‌شود. بررسی اندازه‌های کرنل مختلف، توابع فعال‌سازی جدید و تنظیم ابرپارامتر برای MaxSigLayer به طور بالقوه می‌تواند عملکرد آن را بیشتر بهبود بخشد. جالب است ببینیم که MaxSigNet با سایر معماری‌های رمزگذار و یا با ترکیب با شبکه‌های بازگشتی کانولوشنال (CRNN) چگونه عمل می‌کند. مطالعه جاری بر تصاویر دو بعدی متمرکز بود. گسترش MaxSigNet برای تحلیل داده‌های زیستی سه بعدی می‌تواند حوزه ارزشمندی برای پژوهش‌های آینده باشد. تشخیص دهنده تقسیم سلولی پیشنهاد شده با وجود کارایی و استحکام قابل توجه، هنوز نسبت به نتایج قطعه‌بندی وابسته است، جایی که قطعه‌بند نتواند سلول‌های دختر را بطور کامل از هم جدا کند. با این وجود، به دلیل بنیان ریاضی غنی، روش پیشنهادی قابلیت توسعه برای تشخیص تقسیم سلولی در تصاویر سه بعدی و همچنین تمایز سلول‌های همپوشانی را نیز دارد. علاوه بر این، این روش می‌تواند با تکنیک‌های موجود تجزیه و تحلیل چرخه سلولی ادغام شود و از اطلاعات زمان‌بندی حاصل از تشخیص تقسیم سلولی در کنار سایر نشانگرها برای دستیابی به دیدگاهی جامع‌تر از دینامیک تکثیر

جدول (۵): عملکرد روش ردیابی سلول پیشنهادی

Method	SEG	TRA	OP_{CTB}
s-TAS [56]	۰.۸۵۲	۰.۹۵۵	۰.۹۰۴
Proposed	۰.۹۴۷	۰.۹۵۵	۰.۹۵۱



شکل (۹): مقایسه عملکرد ردیابی پیشنهادی با روش s-TAS [56] بر اساس معیار OP_{CTB} بر روی دیتاست DIC-C2DH-HeLa.

۵- بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش روشی برای ردیابی سلول‌ها در تصاویر میکروسکوپی گذر-زمانی ارائه شد. الگوریتم‌های ردیابی سلول دارای سه ماژول اصلی هستند: قطعه‌بند سلول‌ها، تشخیص دهنده رویداد تقسیم سلولی، و پیگرد کننده سلول‌ها.

برای قطعه‌بندی تصاویر سلولی از یک مدل یادگیری عمیق جدید و کارا به نام MaxSigNet استفاده شد [50]. این شبکه عصبی تصاویر دنباله میکروسکوپی را دریافت کرده و تصاویر خروجی متناظری تولید می‌کند که در هر کدام از آنها سلول‌ها دارای برچسب متفاوت و یکتایی هستند. یکی از دلایل موفقیت این شبکه عصبی در قطعه‌بندی تصاویر میکروسکوپی استفاده از یک لایه جدید قابل یادگیری به نام MaxSigLayer به همراه یک نقشه جدید از لبه‌های سلول‌ها است [51].

در این پژوهش از منحنی کاسینی برای تشخیص رویداد تقسیم سلولی حین پیگرد آنها استفاده شد که برای دنباله DIC-C2DH-HeLa بصورت ۱۰۰٪ عمل تشخیص را انجام داد. زیرا در این مجموعه داده، علاوه بر اینکه تعداد رویداد تقسیم سلولی کمتر است، ظاهر سلول‌های میتوز نیز با سایر سلول‌ها کاملاً متفاوت می‌شود که امر تشخیص را راحت‌تر می‌کند. در Fluo-N2DH-SIM+ چون سلول‌ها در حین حرکت خیلی با هم تماس دارند و ویژگی‌های ریخت‌شناسی بسیار شبیه به سایر سلول‌های غیرمیتوز دارند، باعث تشخیص غلط رویداد تقسیم سلولی می‌شوند. مقادیر جدول ۳ این موضوع را تایید می‌کنند.

- [5] Li, X., Miao, Y., Pal, D., Devreotes, P.: *Excitable networks controlling cell migration during development and disease. Seminars in Cell and Developmental Biology* 100, 133–142 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.11.001>
- [6] Freitas, J.T., Jozic, I., Bedogni, B.: *Wound healing assay for melanoma cell migration. Methods in molecular biology* 2265, 65–71 (2021)
- [7] Liu, J.C., Zacksenhouse, M., Eisen, A., Nofech-Mozes, S., Zacksenhaus, E.: *Identification of cell proliferation, immune response and cell migration as critical pathways in a prognostic signature for her2+:eru–breast cancer. PLoS ONE* 12(6), 0179223 (2017) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179223>
- [8] Anjum, S., Gurari, D.: *Ctmc: Cell tracking with mitosis detection dataset challenge. In: 2020 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops (CVPRW)*, pp. 4228–4237 (2020). <https://doi.org/10.1109/CVPRW50498.2020.00499>
- [9] Amat, F., Lemon, W.C., Mossing, D.P., McDole, K., Wan, Y., Branson, K., Myers, E.W., Keller, P.J.: *Fast, accurate reconstruction of cell lineages from large-scale fluorescence microscopy data. Nature Methods* 11, 951–958 (2014)
- [10] Chen, X., Zhou, X., Wong, S.T.C.: *Automated segmentation, classification, and tracking of cancer cell nuclei in time-lapse microscopy. IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 53, 762–766 (2006)
- [11] Kok, R.N.U., Hebert, L., Huelsz-Prince, G., Goos, Y.J., Zheng, X., Bozek, K., Stephens, G.J., Tans, S.J., Zon, J.S.: *Organoidtracker: Efficient cell tracking using machine learning and manual error correction. PLoS ONE* 15(10), 0240802 (2020) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240802>
- [12] Lux, F., Matula, P.: *Dic image segmentation of dense cell populations by combining deep learning and watershed. In: 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019)*, pp. 236–239 (2019). <https://doi.org/10.1109/ISBI.2019.8759594>
- [13] Ren, W., Wang, X., Tian, J., Tang, Y., Chan, A.B.: *Tracking-by-counting: Using network flows on crowd density maps for tracking multiple targets. IEEE Transactions on Image Processing* 30, 1439–1452 (2021)
- [14] Wang, Z., Yin, L., Wang, Z.: *A new approach for cell detection and tracking. IEEE Access* 7, 99889–99899 (2019) <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2930532>
- [15] Scherr, T., Löffler, K., Böhlend, M., Mikut, R.: *Cell segmentation and tracking using cnn-based distance predictions and a graph-based matching strategy. PLoS ONE* 15(12), 0243219 (2020) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243219>
- سلولی استفاده کند. در حوزه ردیابی سلول پیشنهاد می‌شود یک مدل یادگیری عمیق مناسب توسعه و آموزش داده شود تا سلول کاندید را هر سلول را انتخاب کند.
- در این پژوهش به ردیابی سلول‌های زیستی در تصاویر میکروسکوپ گذر-زمانی پرداخته شد. ردیابی سلولی برای نظارت و تحلیل حرکت، رفتار و ویژگی‌های سلول‌ها در طول زمان به کار می‌رود. این تکنیک‌ها نقش مهمی در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی ایفا می‌کنند و به دانشمندان اجازه می‌دهند تا رشد، مهاجرت و تعامل سلول‌ها با محیط اطرافشان را مطالعه کنند. در کل با پیشرفت‌های مداوم در یادگیری ماشینی، انتظار می‌رود که روش‌های ردیابی سلول مبتنی بر هوش مصنوعی نقش مهمی در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی ایفا کنند.

مراجع

- [1] Maška, M., Ulman, V., Delgado-Rodriguez, P. et al. *The Cell Tracking Challenge: 10 years of objective benchmarking. Nature Methods* 20, 1010–1020 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01879-y>
- [2] Ulman, V., Maška, M., Magnusson, K.E.G., Ronneberger, O., Haubold, C., Harder, N., Matula, P., Matula, P., Svoboda, D., Radojevic, M., Smal, I., Rohr, K., Jalden, J., Blau, H.M., Dzyubachyk, O., Lelieveldt, B.P.F., Xiao, P., Li, Y., Cho, S.-Y., Dufour, A.C., Olivo-Marin, J.C., Reyes-Aldasoro, C.C., Solis-Lemus, J.A., Bensch, R., Brox, T., Stegmaier, J., Mikut, R., Wolf, S., Hamprecht, F.A., Esteves, T., Quelhas, P., Demirel, O.B., Malmstrom, L., Jug, F., Toman, P., Meijering, E.H.W., Munoz-Barrutia, A., Kozubek, M., Ortiz-de-Solorzano, C.: *An objective comparison of cell tracking algorithms. Nature methods* 14, 1141–1152 (2017)
- [3] Martin Maška, Vladimír Ulman, David Svoboda, Pavel Matula, Petr Matula, Cristina Ederra, Ainhoa Urbiola, Tomás España, Subramanian Venkatesan, Deepak M. W. Balak, Pavel Karas, Tereza Bolcková, Markéta Štreitová, Craig Carthel, Stefano Coraluppi, Nathalie Harder, Karl Rohr, Klas E. G. Magnusson, Joakim Jaldén, Helen M. Blau, Oleh Dzyubachyk, Pavel Křížek, Guy M. Hagen, David Pastor-Escuredo, Daniel Jimenez-Carretero, Maria J. Ledesma-Carbayo, Arrate Muñoz-Barrutia, Erik Meijering, Michal Kozubek, Carlos Ortiz-de-Solorzano, *A benchmark for comparison of cell tracking algorithms, Bioinformatics, Volume 30, Issue 11, June 2014, Pages 1609–1617*, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu080>
- [4] Ong, J.Y., Torres, J.Z.: *Dissecting the mechanisms of cell division. The Journal of Biological Chemistry* 294, 11382–11390 (2019). <https://doi.org/10.1074/jbc.AW119.008149>

- [28] Su, Y., Lu, Y., Chen, M., Liu, A.: Spatiotemporal joint mitosis detection using cnn-lstm network in time-lapse phase contrast microscopy images. *IEEE Access* 5, 18033–18041 (2017)
- [29] Zhou, Y., Mao, H., Yi, Z.: Cell mitosis detection using deep neural networks. *Knowl. Based Syst.* 137, 19–28 (2017)
- [30] Zhao, M., Jha, A., LIU, Q., Millis, B.A., Mahadevan-Jansen, A., Lu, L., Landman, B.A., Tyska, M.J., Huo, Y.: Faster mean-shift: Gpu-accelerated clustering for cosine embedding-based cell segmentation and tracking. *Medical image analysis* 71, 102048 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.media.2021.102048>
- [31] Jo, H., Han, J., Kim, Y.S., Lee, Y., Yang, S.: A novel method for effective cell segmentation and tracking in phase contrast microscopic images. *Sensors* 21(10), 3516 (2021) <https://doi.org/10.3390/s21103516>
- [32] Liang, P., Chen, J., Zhang, Y., Wang, H., Zheng, H., Gu, P., Chen, D.: Intracker: An integrated detector-tracker framework for cell detection and tracking. In: 2020 IEEE 33rd International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS), pp. 332–337 (2020). <https://doi.org/10.1109/CBMS49503.2020.00069>
- [33] Wang, Z., Yin, L., Wang, Z.: A new approach for cell detection and tracking. *IEEE Access* 7, 99889–99899 (2019) <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2930532>
- [34] Shailja, S., Jiang, J., Manjunath, B.S.: Semi supervised segmentation and graph-based tracking of 3d nuclei in time-lapse microscopy. In: 2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI), pp.385–389 (2021). <https://doi.org/10.1109/ISBI48211.2021.9433943>
- [35] Jun, B., Ahmadzadegan, A., Ardekani, A., Solorio, L., Vlachos, P.: Multi-feature-based robust cell tracking. *Annals of Biomedical Engineering* 51,604–617 (2023) <https://doi.org/10.1007/s10439-022-03073-1>
- [36] Turetken, E., Wang, X., Becker, C.J., Haubold, C., Fua, P.V.: Network flow integer programming to track elliptical cells in time-lapse sequences. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 36, 942–951 (2017)
- [37] Dewan, M.A.A., Ahmad, M.O., Swamy, M.N.S.: Tracking biological cells in time-lapse microscopy: An adaptive technique combining motion and topological features. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 58, 1637–1647 (2011)
- [38] Zhou, Z., Wang, F., Xi, W., Chen, H., Gao, P., He, C.: Joint multiframe detection and segmentation for multi-cell tracking. In: *Image and Graphics, ICIG 2019*, pp. 435–446 (2019). https://doi.org/10.1007/978-3-030-34110-7_36
- [39] Xiao, P., Zhong, L.: Tracking of non-dividing cells by using generalized voronoi diagram. In: 2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in
- [16] Hayashida, J., Bise, R.: Cell tracking with deep learning for cell detection and motion estimation in low-frame-rate. In: *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*, vol. 11764, pp. 397–405 (2019). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-32239-744>
- [17] Moen, E., Bannon, D., Kudo, T., Graf, W., Covert, M.W., Valen, D.V.: Deep learning for cellular image analysis. *Nature Methods* 16, 1233–1246(2019) <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0403-1>
- [18] Cheng, H.-J., Hsu, C.-H., Hung, C.-L., Lin, C.-Y.: A review for cell and particle tracking on microscopy images using algorithms and deep learning technologies. *Biomedical Journal* 45, 465–471 (2021)
- [19] Francani, A.O.: Analysis of the performance of U-Net neural networks for the segmentation of living cells (2022)
- [20] R. Yazdi and H. Khotanlou, “A Survey on Automated Cell Tracking: Challenges and Solutions,” To appear in *Multimedia Tools and Applications*, 2024.
- [21] Nishimura, K., Bise, R.: Spatial-temporal mitosis detection in phase-contrast microscopy via likelihood map estimation by 3dcnn. In: 2020, 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), pp. 1811–1815 (2020). <https://doi.org/10.1109/EMBC44109.2020.9179175>
- [22] Li, Y., Rose, F., Pietro, F., Morin, X., Genovesio, A.: Detection and tracking of overlapping cell nuclei for large scale mitosis analyses. *BMC Bioinformatics* 17, 183 (2016) <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1030-9>
- [23] Gilad, T., Reyes, J., Chen, J.-Y., Lahav, G., Riklin-Raviv, T.: Fully unsupervised symmetry-based mitosis detection in time-lapse cell microscopy. *Bioinformatics* 35(15), 2644–2653 (2019) <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1034>
- [24] Lu, Y., Liu, A., Chen, M., Nie, W., Su, Y.: Sequential saliency guided deep neural network for joint mitosis identification and localization in time-lapse phase contrast microscopy images. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics* 24, 1367–1378 (2020)
- [25] Mao, Y., Han, L., Yin, Z.: Cell mitosis event analysis in phase contrast microscopy images using deep learning. *Medical image analysis* 57, 32–43 (2019)
- [26] Su, Y., Lu, Y., Liu, J., Chen, M., Liu, A.: Spatio-temporal mitosis detection in time-lapse phase-contrast microscopy image sequences: A benchmark. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 40, 1319–1328 (2021)
- [27] Ma, M., Shi, Y., Li, W., Gao, Y., Xu, J.: A novel two-stage deep method for mitosis detection in breast cancer histology images. In: 2018 24th International Conference on Pattern Recognition (ICPR), pp. 3892–3897 (2018). <https://doi.org/10.1109/ICPR.2018.8546192>

- [51] R. Yazdi, H. Khotanlou, E. Alighardash, and M. Zolfaghari, "Edge detection method based on the differences in intensities of rotating kernel borders," in *2023 6th International Conference on Pattern Recognition and Image Analysis (IPRIA), 2023*, pp. 1–5.
- [52] Yazdi, Reza and Khotanlou, Hassan, *Cell Division Detection Using Cassini Oval Theory*. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4752301> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4752301>
- [53] Lewis, J.P. (2001). *Fast Normalized Cross-Correlation*. *Ind. Light Magic*. 10.
- [54] Loshchilov, I., & Hutter, F. (2017). *Decoupled Weight Decay Regularization*. *International Conference on Learning Representations*.
- [55] Ben-Haim, T., & Riklin-Raviv, T. (2022). *Graph Neural Network for Cell Tracking in Microscopy Videos*. *ECCV 2022: 17th European Conference, Tel Aviv, Israel, 2022, Proceedings, Pages 610–626*
- [56] Schacherer, D., Ritter, C., & Rohr, K. (2021). *Multiple Hypothesis Tracking with Integrated Cell Division Detection*. *2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, 165–168.
- [57] Panteli, A., Gupta, D.K., Bruijn, N.D., & Gavves, E. (2020). *Siamese Tracking of Cell Behaviour Patterns*. *PMLR 121:570–587*.
- [40] Boukari, F., Makrogiannis, S.: *Automated cell tracking using motion prediction-based matching and event handling*. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 17(3), 959–971 (2020) <https://doi.org/10.1109/TCBB.2018.2875684>
- [41] Arbelle, A., Drayman, N., Bray, M.-A., Alon, U., Carpenter, A.E., Riklin-Raviv, T.: *Analysis of high-throughput microscopy videos: Catching up with cell dynamics*. In: *MICCAI*, vol. 9351 (2015). https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_26
- [42] He, T., Mao, H., Guo, J., Yi, Z.: *Cell tracking using deep neural networks with multi-task learning*. *Image Vis. Comput.* 60, 142–153 (2017) <https://doi.org/10.1016/j.imavis.2016.11.010>
- [43] Nguyen, T.T.D., Shim, C., Kim, W.: *Biological cell tracking and lineage inference via random finite sets*. In: *2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pp. 339–343 (2021).
- [44] Magnusson, K.E.G., Jalden, J., Gilbert, P.M., Blau, H.M.: *Global linking of cell tracks using the viterbi algorithm*. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 34(4), 911–929 (2015) <https://doi.org/10.1109/TMI.2014.2370951>
- [45] Li, R., Gao, Q., Rohr, K.: *Multi-object dynamic memory network for cell tracking in time-lapse microscopy images*. In: *2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pp. 1029–1032 (2021).
- [46] Chen, Y., Song, Y., Zhang, C., Zhang, F., O'Donnell, L., Chrzanowski, W., Cai, W.: *Celltrack r-cnn: A novel end-to-end deep neural network for cell segmentation and tracking in microscopy images*. In: *2021 IEEE 18th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*, pp. 779–782 (2021).
- [47] Zhu, Y., Meijering, E.H.W.: *Automatic improvement of deep learning-based cell segmentation in time-lapse microscopy by neural architecture search*. *Bioinformatics* 37, 4844–4850 (2021)
- [48] D. Svoboda and V. Ulman, "Mitogen: A framework for generating 3d synthetic time-lapse sequences of cell populations in fluorescence microscopy," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 36, pp. 310–321, 2017.
- [49] S. Pizer, R. Johnston, J. Ericksen, B. Yankaskas, and K. Muller, "Contrast-limited adaptive histogram equalization: speed and effectiveness," in [1990] *Proceedings of the First Conference on Visualization in Biomedical Computing, 1990*, pp. 337–345.
- [50] R. Yazdi and H. Khotanlou, "MaxSigNet: Light learnable layer for semantic cell segmentation". *Biomed. Signal Process. Control.*, 95, 106464. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2024.106464>



رضا یزدی مدرک کارشناسی علوم کامپیوتر خود را از دانشگاه مازندران و کارشناسی ارشد هوش مصنوعی را از دانشگاه علم و صنعت دریافت کرد. او هم‌اکنون در حال تکمیل دوره دکتری خود در رشته هوش مصنوعی در دانشگاه بوعلی سینا همدان است. علائق او درباره بینایی‌ماشین، پردازش زبان طبیعی، پردازش تصاویر پزشکی و یادگیری عمیق است.



حسن ختن‌لو استاد گروه مهندسی کامپیوتر دانشگاه بوعلی سینا، در سال ۱۳۸۷ دکترای مهندسی کامپیوتر خود را از دانشگاه پیر و ماری کوری اخذ و تا به حال به عنوان عضو هیئت علمی گروه مهندسی کامپیوتر، مشغول به فعالیت است. زمینه‌های تحقیقاتی مورد علاقه ایشان، پردازش تصویر و ویدیو، پردازش سیگنال‌های پزشکی، سیستم‌های فازی، شناسایی الگو، یادگیری ماشین و اتوماسیون صنعتی است.