Санкт-Петербургский государственный университет

На правах рукописи

Шпильман Алексей Александрович

Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур

1.2.2 — Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

> Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор Новиков Борис Асенович

Санкт-Петербург 2021

Содержание

Введение		
1	Микротрубочковые системы и методы их анализа и	
	моделирования	10
	1.1 Микротрубочки	10
	1.1.1 Строение микротрубочек	10
	1.1.2 Функция микротрубочек	11
	1.1.3 Динамика микротрубочек	13
	1.1.4 Самоорганизация микротрубочковой сети	15
	1.2 Анализ клеточных изображений	18
	1.2.1 Анализ радиальности	19
	1.2.2 Сверточные нейронные сети для анализа изображений	20
	1.2.3 Использование трансферного обучения в условиях малого	
	количества данных	24
	1.2.4 Метод опорных векторов для классификации клеточных	
	изображений	24
	1.3 Моделирование работы внутриклеточных компонентов	27
	1.3.1 Динамика микротрубочковой сети	27
	1.3.2 Самоорганизация микротрубочковых структур	28
2	Используемые методы анализа изображений и имитационного	
	моделирования	30
	2.1 Программные продукты и окружения	30
	2.2 Сегментация изображений микротрубочковых сетей	30
	2.3 Подсчет статистики радиальности по кластеру самых ярких	
	пикселей	32
	2.4 Классификация клеточных изображений с помощью сверточных	
	нейронных сетей	33

	2.4.1 Обучение сети простой архитектуры	34
	2.4.2 Применение маски sharpen	35
	2.4.3 Трансферное обучение предобученной глубокой	
	нейронной сети	35
	2.5 Модель микротрубочковой сети в клеточной геометрии	36
	2.6 Модель самоорганизации микротрубочек <i>in vitro</i>	37
3	Результаты анализа и моделирования микротрубочковых систем.	40
	3.1 Анализ геометрии микротрубочковой сети	40
	3.1.1 Анализ геометрии регионов флуоресценции	41
	3.1.2 Анализ микротрубочковых сетей с помощью глубоких	
	нейронных сетей	41
	3.2 Моделирование динамики микротрубочковой сети	45
	3.2.1 Эксперимент Митчисона-Киршнера	46
	3.2.2 Роль ГТФ-азной активности тубулина	46
	3.2.3 Влияние геометрии клетки	47
	3.3 Влияние концентрации моторных белков и размеров капли и	
	микротрубочек на самоорганизацию микротрубочковой сети	
	in vitro	48
4	Обсуждение результатов анализа изображений и имитационного	
	моделирования микротрубочковых систем	52
	4.1 Анализ изображений клеточных микротрубочек	52
	4.2 Модель клеточного пространства и сети микротрубочек	53
	4.3 Самоорганизация микротрубочковой сети	53
3	аключение	55
С	писок рисунков	56
С	писок таблиц	59
Л	итература	60
П	риложение А	66

Введение

Изучение биологических систем с помощью методов компьютерного анализа и моделирования приобретает все большую популярность в связи с развитием вычислительных методов и перспективностью таких подходов для получения новой информации о системах, в том числе и клеточных.

Интерес к компьютерному анализу микроскопических изображений клеток и моделированию клеточных систем нашел отражение в многочисленных исследованиях российских и зарубежных авторов. В данной работе разобраны статьи и монографии, посвященные компьютерному анализу изображений, в том числе и биологического происхождения. Основным объектом изучения этой работы являются непосредственно микротрубочковые внутриклеточные системы. В работе рассмотрены исследования динамики микротрубочек и их систем и самоорганизации микротрубочек. Многие аспекты этих тем не были проработаны в достаточной степени в предыдущих исследованиях и подлежат изучению, в том числе, методами и подходами, представленными в этой работе. Отдельно стоить отметить все больший интерес исследователей к методам, основанным на применении глубоких нейронных сетей (глубоком обучении) к анализу изображений, которые также используются в данной работе.

Целью данной работы является исследование микротрубочковых структур, их геометрии, динамики и процессов самоорганизации и выявление ключевых факторов, влияющих на такие структуры. В работе исследовались следующие аспекты данной темы:

- Анализ радиальности микротрубочковых сетей с помощью методов анализа изображений.
- Моделирование динамики микротрубочковых сетей в клетке произвольной геометрии.
- Моделирование динамики сборки микротрубочковых биополимеров *in vitro*.

Для достижения поставленных целей необходимо было решить следующие задачи:

- 1. Собрать набор данных для обучения глубокой нейронной сети для классификации изображений микротрубочковых сетей.
- 2. Обучить нейронные сети различных архитектур на полученном наборе данных с применением различных методов аугментации данных.
- 3. Создать программу, реализующую модель динамики микротрубочковой сети в клетке сложной геометрии.
- 4. Провести эксперименты *in silico* с клетками различных геометрий для изучения влияния клеточной геометрии на микротрубочковые сети.
- 5. Разработать модель самоорганизации клеточной сети в квазитрехмерном пространстве, включающую физически достоверные микротрубочки в вязкой среде и моторные белки.
- 6. Воспроизвести все наблюдаемые *in vitro* структуры микротрубочковых сетей.

В результаты работы было сделано следующее:

- Был проведен анализ клеточных изображений и классификация таких изображений с помощью кластерной характеристики и сверточных нейронных сетей.
- 2. Была разработана модель клеточного пространства, включающего микротрубочковые сети, позволяющая воспроизводить сложные эффекты, связанные с геометрией клетки.
- 3. Была разработана модель самоорганизации клеточной сети в квазитрехмерном пространстве. Были воспроизведены основные типы наблюдаемых структур самоорганизации клеточных микротрубочек.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1. Анализ радиальности микротрубочковых сетей может давать понимание параметров клеточных процессов. Такой анализ возможен как с помощью классических методов анализа изображений, основанных на изучении статистических зависимостей между уровнями флуоресценции участков изображения, так и с помощью глубоких нейронных сетей. В узком классе задач глубокие нейронные сети показывают лучшую точность как над классическими методами, так и над экспертными оценками, однако требуют большого количества данных для обучения.
- 2. Многие эффекты, наблюдаемые в системах клеточных микротрубочек *in vivo*, могут быть объяснены геометрическими особенностями системы. При этом отсутствует необходимость в дополнительных механизмах, что показывает компьютерная модель микротрубочковой сети в клетке про-извольно сложной геометрии.
- 3. Отношение концентраций моторных белков и вероятность отсоединения белков от микротрубочек может определять тип структуры самоорганизации микротрубочек, что доказывается при применении квазитрехмерной компьютерной модели. Квазитрехмерность позволяет воспроизвести эффекты, невоспроизводимые в предыдущих, двумерных, моделях за меньшее вычислительное время, чем понадобилось бы полностью трехмерной модели.

Научная новизна:

- Впервые был реализован и протестирован алгоритм анализа радиальности микротрубочковых сетей, основанных на кластерных статистиках пикселей изображения.
- 2. Впервые был собран набор данных для задачи классификации микротрубочковых изображений по состоянию микротрубочковых сетей.
- 3. Впервые была обучена глубокая нейронная сеть на набор данных для классификации состояний микротрубочковых сетей.

- Впервые с помощью компьютерной модели продемонстрирована достаточность геометрии клетки для серии наблюдаемых эффектов микротрубочковой сети.
- 5. Впервые были найдены параметры, обеспечивающие воспроизведение в компьютерной модели всех типов структур самоорганизации клеточных микротрубочек *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные результаты важны как для дальнейшего развития направления компьютерного анализа и моделирования внутриклеточных систем, так и для понимания отдельных механизмов функционирования клеток.

Создание автоматических методов классификаций изображений клеток может принести пользу в клинической диагностике для оценки восприимчивости клеток к тем или иным препаратам, в том числе противораковым.

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается экспериментальным подтверждением прогнозируемых с помощью компьютерных моделей параметров. Результаты прошли экспертную оценку специалистов в соответствующих областях. Для всех результатов, где это применимо, приведены статистические тесты.

Апробация работы.

Основные результаты работы опубликованы в девяти статьях, три из которых проиндексированы в **РИНЦ**, **Scopus** и **Web of Science**:

- 1. A. Shpilman, D. Boikiy, M. Polyakova, D. Kudenko, A. Burakov, E. Nadezhdina. "Deep Learning of Cell Classification using Microscope Images of Intracellular Microtubule Networks". Proceedings of 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications. 2017.
- E.V. Primako, A.A. Shpilman. "Using Quazi-3D Approach for Microtubule Self-Organization Model". Proceedings of 5th International Conference on Mathematical Biology and Biophysics. 2014.
- A. Shpilman. "Simple Computer Model Posibility of Non-Motor Microtubule Binded Gradient Transport". Proceedings of 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2009.

- A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Imitational Modeling of Cytoskeleton: Dynamics, Differentiation, Active Transport and Membrane Interactions". Proceedings of 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2008.
- 5. E.V. Usova, A.V. Burakov, A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Disturbance of the Radial System of Interphase Microtubules in the Presence of Excess Serum in Cell Culture Medium". Biophysics. 2008.
- A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "In silico vs in vitro: Mimitation v1.0 program allows to predict morphological and dynamic changes of tubulin cytoskeleton caused by microtubule stabilization". Proceeding of International Conference on Biological Motility. 2008.
- A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Computational Stochastic Modeling of Cellular Microtubule Network". Proceedings of 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2006.
- 8. A.A. Shpil'man, E.S. Nadezhdina. "Stochastic Computer Model of the Cell Microtubule Dynamics". Biophysics. 2006.
- A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Stochastic Model of Microtubule Networks". Proceedings of International Conference on Mathematical Biology and Biophysics. 2006.

Результаты работы докладывались на следующих конференциях:

- 1. International Conference on Machine Learning and Applications, 2017, Cancun, Mexico.
- 2. International Conference on Mathematical Biology and Biophysics, 2014, Pushchino, Russia.
- 3. Annual Scientific Conference of the Institute of Protein Research, 2013, Pushchino, Russia.
- III Annual Meeting of the Society for Cell Biology, 2012, Saint-Petersburg, Russia.

- 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, San-Diego CA, USA.
- 6. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2008, San-Francisco CA, USA.
- 7. International Conference on Biological Motility, 2008, Pushchino, Russia.
- 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2006, San-Diego CA, USA.
- 9. International Conference on Mathematical Biology and Biophysics, 2006, Pushchino, Russia.

Глава 1

Микротрубочковые системы и методы их анализа и моделирования

1.1 Микротрубочки

Микротрубочки — внутриклеточные структуры, один из компонентов цитоскелета эукариот. Они представляют собой длинные белковые неветвящиеся полые нити диаметром 25 нм. Микротрубочки образуют внутриклеточную сеть в интерфазе, митотическое ахроматиновое веретено в митозе, служат структурной основой ресничек и жгутиков. Система микротрубочек в интерфазе обеспечивает поддержание формы клеток и создает упорядоченную систему движений внутриклеточных компонентов, в том числе хромосом.

1.1.1 Строение микротрубочек

Микротрубочки состоят из структурных единиц — гетеродимеров α - и β тубулина. Каждая субъединица тубулина связана с молекулой ГТФ. ГТФ при α -субъединице не подвергается гидролизу, а ГТФ при β -тубулине способен гидролизоваться до ГДФ в процессе динамики микротрубочки. Встраивание тубулина в микротрубочку не сопровождается немедленным гидролизом ГТФ, это происходит несколько позднее [1]. Вероятно, при встраивании тубулина в микротрубочку и при гидролизе ГТФ конформация молекулы тубулина меняется, что отражается на степени ассоциации молекул друг с другом. Форма микротрубочек поддерживается электростатическими взаимодействиями между субъединицами тубулина, как латеральными, так и продольными. Продольные взаимодействия формируют протофиламент, в котором α мономер одного димера соединен с β мономером другого. Взаимодействие латеральных поверхностей субъединиц соединяет протофиламенты в слой, а затем в цилиндр микротрубочку. Схема строения микротрубочки из статьи [2] представлена на Рис.1.1.



Рисунок 1.1: Схема строения микротрубочки из статьи [2].

Микротрубочки формируются тринадцатью протофиламентами и в синглетном состоянии собираются в систему — цитоскелет клетки. Существуют собранные из микротрубочек специализированные структуры, например, реснички и жгутики, собранные из дублетов микротрубочек. Центриоли и базальные тела собраны из триплетов микротрубочек [1].

В большинстве интерфазных клеток животных микротрубочки располагаются радиально: их плюс-концы обращены к периферии клетки, а минус-концы собраны в центре, обычно в районе центросомы (Рис. 1.2). Радиальность микротрубочек задает анизотропию цитоплазмы, что важно для движения клетки и для внутриклеточного транспорта молекул и органелл. Если в клетках деполимеризовать микротрубочки действием колцемида или холода, то после снятия воздействия можно наблюдать растущие микротрубочки в виде радиально отходящих от одного центра (от центросомы) лучей [3]. В физиологических условиях звезда из микротрубочек, отходящих от центросомы, может быть выражена в разной степени: иногда большинство микротрубочек отходят от центросомы, иногда же с ней связана лишь небольшая часть.

1.1.2 Функция микротрубочек

Микротрубочки участвуют в создании эластичного внутриклеточного скелета (цитоскелета), необходимого для поддержания формы клетки. Эта роль



Рисунок 1.2: Микротрубочка в интерфазной живой клетке [4].

хорошо видна в экспериментах с деполимеризацией микротрубочек при добавлении к клеткам колхицина или при охлаждении клеток [3].

Микротрубочки служат рельсами для внутриклеточного транспорта, причем объектами транспорта могут быть как мембранные везикулы, так и немембранные компоненты, например, белковые сложные комплексы или рибонуклеопротены. Перемещение клеточных компонентов вдоль микротрубочек может происходить как путем диффузии вдоль микротрубочек [5], так и путем активного транспорта с помощью специальных белков-моторов. К белкам-моторам относятся цитоплазматический динеин и многочисленные кинезины. Эти белки

могут развивать силу до 2-3 pN и сообщать переносимым грузам скорость до 1 микрона в секунду.

Помимо этого, микротрубочки также участвуют в движении клетки, вместе с актиновой сетью обеспечивая поляризацию клетки [6].

В процессе митоза микротрубочки образуют митотическое веретено, которое позволяет разделить хромосомы и локализовать полный генетический набор в дочерних клетках [6]. Механизм образования и работы этого веретена до сих пор остается одним из интереснейших научно-исследовательских направлений, в том числе и для компьютерного моделирования. Однако для создания полноценной его модели необходимо предварительно изучить более простые аспекты организации микротрубочковой сети *in vitro*.

1.1.3 Динамика микротрубочек

Ориентация мономеров в протофиламенте определяет полярность микротрубочки: направление от α - до β -тубулина сонаправлено вектору от минус- до плюс-конца микротрубочки [6]. Скорость диссоциации полимера тубулина на плюс-и минус-конце отличается: на плюс-конце мы наблюдаем более медленную диссоциацию, т.е. на нем преимущественно идет рост микротрубочки. Процесс роста микротрубочки in vitro и in vivo разделяют на три фазы — нуклеацию, элонгацию и steady-state (динамическое равновесие). In vitro на формирование микротрубочек из очищенного тубулина влияют три основных фактора: температура (должна быть в пределах 30 - 37 С°), отсутствие ионов кальция и присутствие ГТФ. Нуклеация микротрубочек начинается, когда концентрация тубулина превышает критическую (ее значение зависит от условий эксперимента). В процессе нуклеации образуется "затравка" для роста микротрубочки олигомер тубулина. В состав этого олигомера по разным данным входит от 6 до 13 димеров тубулина. В растворе чистого тубулина "затравки" практически не образуются, для их образования необходимы специальные белки, ассоциирующиеся с димерами тубулина и способствующие их ассоциации.

На протяжении второй фазы — элонгации — гетеродимеры тубулина "голова к хвосту" присоединяются к микротрубочке. Было показано, что при физиологических условиях микротрубочки, выделенные из экстракта яиц Xenopus,

13

растут за счет формирования плоского листа протофиламентов, которые затем сворачиваются в цилиндр [7].

Третья стадия — динамическое равновесие — характеризуется определенным соотношением полимеризованного и растворенного тубулина, которое зависит как от физических условий, так и от наличия белков, ассоциирующихся с тубулином. Между этими пулами возможны два пути обмена молекулами: тредмиллинг и динамическая нестабильность. В первом случае на плюс-конце происходит сборка, а на минус-конце — разборка микротрубочки, во втором же и сборка и разборка происходят на плюс-конце. Переход от медленного роста к быстрой разборке на плюс-конце микротрубочки получил название "катастрофа", обратный переход к сборке — "спасение". Катастрофа случается, когда на плюс-конце микротрубочки из-за замедленного поступления новых димеров тубулина оказывается легко диссоциирующий ГДФ-тубулин. Если на плюс-конце сохраняется несколько молекул ГТФ-тубулина (так называемый ГТФ-колпачок), то диссоциация тубулина практически не происходит, и катастрофа не случается.



Рисунок 1.3: Полимеризация (рост) и деполимеризация (катастрофа) микротрубочки [4].

В целом, динамика микротрубочек характеризуется следующими параметрами: скорость роста на плюс-конце, скорость роста на минус-конце, скорость разборки на плюс-конце, скорость разборки на минус-конце, частота катастроф, продолжительность катастроф, частота спасений, продолжительность спасений, продолжительность и частота пауз, когда не происходит ни разборки, ни сборки микротрубочки. В живых клетках динамика микротрубочек может отличаться этими деталями, иногда довольно существенно. В живых клетках в полимеризованном виде обычно находится от 60 до 75% тубулина. Как правило, в них наблюдают динамическую нестабильность микротрубочек, т.е. плюс-концы, обращенные к периферии клетки, то нарастают, то разбираются. В некоторых случаях, например при удалении из клеток центросомы, динамика микротрубочек меняется на тредмиллинг, когда на плюс-конце происходит сборка, а на минус-конце — разборка микротрубочки [8] (Рис.1.1). В некоторых системах, например в нейронах, микротрубочки стабилизированы, и их динамику трудно проследить. При переходе клеток от интерфазы к митозу микротрубочки становятся более динамичными.

Выявлено много клеточных факторов, которые влияют на динамику микротрубочек, однако остается неясным, какие параметры сборки-разборки микротрубочек (количество полимера или скорость гидролиза ГТФ) наиболее важны для перехода от динамической нестабильности к тредмиллингу и наоборот. Неясно также, как формируется радиальная система микротрубочек.

1.1.4 Самоорганизация микротрубочковой сети

Одним из самых интересных явлений, наблюдаемых как *in vivo* так и *in vitro*, является самоорганизация цитоскелетных структур, в том числе и сети микротрубочек.

Филаменты в эукариотических клетках выполняют различные функции, такие как поддержание клеточной формы, обеспечение движения клетки, внутриклеточный транспорт и деление клетки. Эти функции зачастую активны, т.е. могут происходить только при участии механизмов, на работу которых требуется энергия. Такие механизмы включают в себя рост и разборку филаментов и работу транспортных моторных белков [10].

15



Рисунок 1.4: Белки плюс-концов микротрубочек [9].

Одним из примеров самоорганизации является митотическое веретено, образующееся в клетках при делении. Для клеток дрожжей было показано, что эта биполярная структура, состоящая из микротрубочек, исходящих из полюсов веретена к срединной области, может существовать и функционировать на достаточном уровне даже в клетках без центра организации микротрубочек, связанного с ядром [11].

Из этого можно сделать вывод, что структуру и расположение полюсов веретена определяет взаимодействие филаментов и моторных белков в ограниченной геометрии клетки.

Также, в экстракте яйцеклетки *Xenopus* может образовываться веретено правильной формы, несмотря на полное отсутствие центросом [12]. Понимание принципов, лежащих в основе самоорганизации клеточных филаментов, обеспеченной моторными белками в ограниченном пространстве, важно для правильного анализа многих живых систем [13]. Масса мотора мала по сравнению с массой микротрубочки, однако в случае, если один мотор присоединится сра-

16

зу к двум микротрубочкам, это приведет к движению одной микротрубочки относительно другой и к движению системы микротрубочек в растворе.

Учитывая сложность клеток *in vivo*, зачастую удобнее рассматривать упрощенные модельные системы, и этот подход был применен к исследованию самоорганизации смесей филаментов и моторных белков.

Surrey et al. наблюдали каплю буферного раствора с добавленным тубулином и кинезином (плюс ориентированным моторным белком) [14]. При нагревании до 37С° тубулин полимеризуется, образуя микротрубочки, первоначально случайно и равномерно распределенные. Примерно через 90 секунд они формируют "звезду" с центром в центре капли. Спустя же еще 90 секунд можно наблюдать так называемую "воронку" (Рис.1.5). При изменении концентрации кинезина можно наблюдать, как с ростом концентрации "воронки" сменяются "звезда-ми" (Рис.1.5). Минус ориентированные моторные белки не образуют "воронок" независимо от концентрации — наблюдаются лишь "звезды".

В случае, если в эксперименте присутствует смесь различно ориентированных моторных белков, с ростом доли плюс ориентированных моторов на смену "звездам" приходят "пучки" — структуры, похожие на те, что образуются в клетке во время митоза [15].

Эксперименты с растущими микротрубочками в сферических эмульсионных каплях показали зависимость структуры от размера капли: в каплях больше $\approx 29 \,\mu\text{m}$ в диаметре образовывались "звезды" с минус-концом, направленным к центру, и плюс-концом — к периферии, собирающимися с помощью моторного белка динеина; в каплях меньшего диаметра ($\approx 20 \,\mu\text{m}$) наблюдались "полузвезды" с центром ближе к краю капли; при дальнейшем уменьшении капли микротрубочки, из-за их механических свойств, образуют прилегающую к границе капли структуру — "колодец" [16].

Это удивительно неравновесное свойство смесей филаментов и моторов связано с их способностью к спонтанному появлению потоков из-за действия активных компонентов [17].



Рисунок 1.5: Примеры структур самоорганизации микротрубочек: "звезды"(А,Г), "воронки"(Б), "пучки"(В), "полу-звезда"(Д), "колодец"(Е). Из статей [14, 16].

1.2 Анализ клеточных изображений

Анализ изображений клеточных препаратов широко используется и может давать большое количество информации как о состоянии отдельных клеток, так и о состоянии организма в целом [18, 19].

В области гистологических препаратов можно выделить следующие задачи, выполняемые с помощью методов анализа изображений:

- Сегментация изображений. Выделение объектов на изображениях как для дальнейшего их анализа, так и для прямого, например, количественного, анализа.
- Детектирование объектов. Выделение объектов заданного типа (класса). Определение наличия/отсутствия объекта на изображении.



Рисунок 1.6: (А) Клетки с радиальной системой микротрубочек. (В) Клетки с хаотичной системой микротрубочек после воздействия таксола

• Морфологический анализ. Определение параметров изображения в целом, характеризующих ту или иную физиологическую особенность.

1.2.1 Анализ радиальности

В эукариотических клетках в нормальном состоянии в G_0 фазе микротрубочки представляют собой радиальную систему — так называемую "звезду". При воздействии на клетку определенными химическими веществами (например, таксолом), радиальная система хаотизируется.

На Рис. 1.6 можно увидеть пример клеток с радиальной системой микротрубочек (А) и с хаотизированной с помощью таксола системой микротрубочек (В).

Анализ радиальности микротрубочковой сети может давать дополнительную информацию о клетке, в том числе, и о воздействующих на нее веществах. Так, таксол является одним из агентов для химиотерапии рака [20], и анализ разрушения радиальности клеток после воздействия таксола может давать информацию о восприимчивости клеток к химиотерапии. Для анализа и классификации радиальности микротрубочковой сети в большинстве исследований используются в основном экспертные оценки. Требуется автоматический метод оценки, не зависимый от конкретного эксперта.

1.2.2 Сверточные нейронные сети для анализа изображений

В предыдущей главе для анализа изображений использовались эвристически выделяемые признаки изображения, заданные человеком. Это сильно ограничивает модель.

Для того, чтобы обойти это ограничение, можно использовать методы, основанные на глубоких нейронных сетях.

Сверточные глубокие нейронные сети были представлены в работе LeCun et al. [21] и основаны на принципе применения операции свертки к участкам изображения. Свертка — это операция поэлементного умножения двух матриц (Puc.1.7) с последующим сложением получившихся произведений. Результатом применения свертки к изображению является так называемая карта (map) свертки. Большие числа в карте свертки соответствуют большей корреляции между частью изображения и сверткой. Это позволяет детектировать характерные формы на изображении.

Карты свертки в каком-то смысле сами являются изображениями. Это значит, что к ним тоже можно применять свертки.

Рассмотрим архитектуру одной из первых глубоких нейронных сетей — LeNet5 (Рис.1.8). Сеть состоит из трех сверточных слоев и трех полносвязных слоев нейронов (где каждый нейрон связан с каждым). При этом в каждом нейроне сумма произведений сигналов из связанных с ним нейронов проходит через нелинейное преобразование. В случае с сетью LeNet5 - это логистическая функция:

$$x_j^l = \sigma(s_j^l) = \frac{1}{1 + e^{-s_j^l}}$$
(1.1)

где s_j^l — это входящий сигнал в нейрон j в слое l, т.е. $\sum_i (x_i w_{i,j})$, а x_i^{l-1} — это исходящий сигнал нейрона i в слое l-1, и $w_{i,j}$ — это коэффициент умножения.



Рисунок 1.7: Применение операции свертки — поэлементного умножения матриц. Зеленым выделена исходная матрица, желтым — матрица свертки, красным — коэффициенты свертки, розовым — результирующая карта (map) свертки.

Собственно, коэффициенты умножения в свертке — это тоже коэффициенты w, и именно эти коэффициенты и подбираются в процессе обучения нейронной сети.

Если сигмоидная функция больше использовалась на этапе становления глубокого обучения, то самой популярной функцией активации сейчас является, несомненно, ReLU (Rectified Linear Unit).

$$\sigma(s) = max(0, s) \tag{1.2}$$

Функция активации ReLU позволяет значительно ускорить расчет градиента в процессе обучение нейронной сети (алгоритм обратного распространения градиента описан дальше в этой главе).

Вид различных функций активации можно увидеть на Рис.1.9.

Несмотря на то, что в научной литературе существует множество описаний того, почему та или иная функция лучше в той или иной ситуации, на практике почти всегда приходится подбирать лучшую функцию эмпирически.



Рисунок 1.8: Архитектура сверточной сети LeNet5 [22].



Рисунок 1.9: Виды функций активаций слоев нейронной сети. Горизонтальная ось соответствует входящему на нейрон сигналу, вертикальная — исходящему.

Обучение нейронных сетей, т.е. подбор коэффициентов w, осуществляется с помощью обратного распространения градиента [23]. Основная идея заключается в том, что для минимизации некой заранее определенной функции ошибки C мы идем против градиента $\nabla_w C(w)$. Причем вычисление градиента происходит послойно, начиная с последнего слоя нейронной сети.

Можем выразить градиент по индивидуальному весу между j-м нейроном слоя l и i-м нейроном предыдущего слоя w_{ij}^l :

$$\frac{\partial C(w)}{\partial w_{ij}^l} = \frac{\partial C(w)}{\partial s_j^l} \times \frac{\partial s_j^l}{\partial w_{ij}^l}$$
(1.3)

Первая часть — это выход с нейрона предыдущего слоя:

$$\frac{\partial s_j^l}{\partial w_{ij}^l} = x_i^{l-1} \tag{1.4}$$

Вторая часть — это фактически ошибка индивидуального нейрона, обозначим ее за δ_j^l :

$$\delta_i^l = \frac{\partial C(w)}{\partial s_i^l} \tag{1.5}$$

Возьмем для примера задачу, для которой и будут использованы нейронные сети в этой работе, задачу классификации объектов. Последний слой *L* состоит из нейронов, в количестве равном количеству классов. Выходное значение в нейронах соответствует вероятности соответствующего класса и определяется с помощью функции softmax [24]:

$$x_i^L = Softmax(s_i) = \frac{e^{s_i}}{\sum_j e^{s_j}}$$
(1.6)

Ошибка классификации для softmax — это кросс-энтропия:

$$C(w) = -\sum_{i} o_i log(x_i^L)$$
(1.7)

Где $o_i = 1$ для нейрона правильного класса и $o_i = 0$ для остальных классов. Тогда индивидуальная ошибка для последнего слоя — это:

$$\delta_i^l = \frac{\partial C(w)}{\partial s_i^L} = o_i - x_i^L \tag{1.8}$$

Для предыдущих слоев индивидуальная ошибка выражается через вычисленные ошибки на следующих слоях:

$$\delta_i^{l-1} = \frac{\partial C(w)}{\partial s_i^{l-1}} = \sum_j \frac{\partial C(w)}{\partial s_j^l} \times \frac{\partial s_j^l}{\partial x_i^{l-1}} \times \frac{\partial x_i^{l-1}}{\partial s_i^{l-1}} = \sum_j \delta_j^l \times w_{ij}^l \times \sigma'(s_i^{l-1}) \quad (1.9)$$

Таким образом, алгоритм обратного распространения градиента и обучения нейронной сети выглядит так:

- 1. Инициализируем веса w случайным образом.
- 2. Прямой проход: вычисляем все x и s.
- 3. Обратный проход: вычисляем все δ .

4.
$$w_{ij}^l \leftarrow w_{ij}^l - \eta x_i^{l-1} \delta_j^l$$
.
5. \rightarrow (2).

Где η — это коэффициент скорости обучения (learning rate).

1.2.3 Использование трансферного обучения в условиях малого количества данных

Для обучение глубоких нейронных сетей зачастую требуется большое количество данных. Чем больше параметров w у нейронной сети, тем больше наблюдается склонность к переобучению на малом наборе данных. Вместо того, чтобы выявлять общие закономерности в данных, сеть "запоминает" отдельные примеры [25].

Чтобы решить эту проблему, можно применить так называемое трансферное обучение нейронных сетей [26, 27]. Во время трансферного обучения сеть обучается в два этапа (Рис. 1.10):

- Обучение на большом наборе данных, близких к искомым. Так, например, для задачи классификации изображений можно использовать сети ResNet [28] или VGG [29], предобученные на наборе данных ImageNet [30].
- 2. От обученной на первом шаге сети параметры нескольких первых слоев переносятся в сеть для решения конечной задачи. При обучении этой сети на искомом наборе данных перенесенные параметры не изменяются.

Таким образом, на первом этапе обучения сеть "учится" выделять признаки анализа изображений, которые впоследствии могут быть использованы и для решения конечной задачи.

1.2.4 Метод опорных векторов для классификации клеточных изображений

Метод опорных векторов (support vector machines, SVM) также можно применять в комплексе с предобученными нейронными сетями. Его использование бывает оправданно именно в условиях малого количества данных, так как этот метод является одним из самых устойчивых к переобучению.



Network B

Рисунок 1.10: Схема трансферного обучения нейронной сети. От обученной на большем количестве данных сети А переносятся параметры (веса)
 нескольких первых слоев в сеть В. Сеть В обучается на искомом наборе, при этом веса перенесенных слоев не меняются.

Метод опорных векторов был впервые предложен в работе [31]. Математическая постановка состоит в том, чтобы провести такую гиперплоскость, заданную уравнением $w^{T}x - b = 0$, чтобы расстояние до ближайших точек (ширина полосы) из одного или другого класса было максимальным (Рис. 1.11).

При этом, если мы домножим вектор w и число *b* на один и тот же коэффициент, вид решения не изменится. Если мы отнормируем так, что выражение w^Tx – *b* для ближайших точек класса y = +1 и y = -1 было бы равно +1 и -1соответственно, то ширину полосы можно выразить как $\frac{2}{|w|}$. Тогда задачу SVM можно сформулировать следующим образом:



Рисунок 1.11: Постановка задачи для метода опорных векторов. Алгоритм находит гиперплоскость такую, чтобы расстояние от неё до классов (ширина полосы) было максимальным.

$$\begin{cases} \frac{1}{2} \mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x} \to \min\\ y_i(\mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x}_i - b) \ge 1 \end{cases}$$
(1.10)

Стоит заметить, что алгоритм в такой постановке работает только для линейно разделимых классов. В случае, когда классы линейно неразделимы, задача SVM переформулируется следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{1}{2} \mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x} + C \sum \xi_{i} \to \min\\ y_{i}(\mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x}_{i} - b) \ge 1 - \xi_{i} \end{cases}$$
(1.11)

Коэффициенты ξ - это допустимое отклонения от 1 для так называемых объектов-нарушителей, которые могут находится как внутри полосы, так и в другом классе. Коэффициент C при этом контролирует чему оптимизатор отдает больший приоритет: ширине полосы или количеству "нарушителей".

Для нахождения оптимального решения используются методы квадратичной оптимизации, такие как CVXOPT [32]. Решение при этом получается в виде

линейной комбинации объектов из обучающей выборки w = $\sum \alpha_i x_i$. Объекты с ненулевыми коэффициентами α и называются опорными.

Метод SMV использовался в нескольких работах для анализа клеточных изображений, при этом на вход могут подаваться как исходные признаки (значения яркости пикселей), так и посчитанные признаки, характеризующие изображение в целом [33, 34]. В последнее время, однако, все большую и большую популярность приобретают гибридные методы, основанные к применению SVM на признаках, полученных с помощью предобученной нейронной сети [35]. Такой метод получается аналогичным трансферному обучению, только вместо использования нейронной сети, мы используем классификатор SVM.

1.3 Моделирование работы внутриклеточных компонентов

1.3.1 Динамика микротрубочковой сети

Существует множество моделей как отдельных микротрубочек, так и микротрубочковой сети в целом, различающихся по определению динамики, по геометрии системы и т.п. [36, 37].

Самой простой моделью является модель одной микротрубочки, которая, по сути, характеризуется длиной *L*, и вся динамика происходит на плюс-конце. В самом простом варианте микротрубочка может находиться в двух состояниях: роста и сокращения. И в том и в другом состоянии скорость роста или сокращения постоянна и является константой модели.

Другие константы — это вероятности перехода между состояниями и максимальная длина микротрубочки. Такая модель позволяет получить отражающую реальность картину динамики единичной микротрубочки. Наиболее продвинутым вариантом такой модели является стохастическая модель, в которой микротрубочка представляет собой набор сегментов, отображающих кластеры тубулина. Такой сегмент может быть двух типов, соответствующих двум состояниям димера тубулина: GTP и GDP. В данном случае параметрами программы являются вероятности присоединения/удаления сегмента и перехода сегмента из одного типа в другой.

Следующий класс моделей предполагает наличие пространства клетки и геометрической привязки микротрубочек. Микротрубочки могут быть как ли-

нейными, так и более геометрически сложными структурами. В данных моделях зачастую бывает добавлена динамика минус-конца микротрубочки для отображения процесса тредмиллинга. В таком случае каждый сегмент имеет, помимо своих свойств в составе микротрубочки, также координаты в пространстве системы. Такие модели позволяют анализировать влияние параметров системы не только на динамику, но и на геометрию сети микротрубочек.

Для решения некоторых задач бывает необходимо внести в систему возможность нетредмиллингового перемещения микротрубочек, например, под воздействием транспортных молекул. В таких случаях необходимо работать с механическими свойствами микротрубочки [38]. Чаще всего микротрубочки приближаются гибкими жгутами или несколькими негибкими участками, соединенными шарнирами [39].

Механические свойства в целом стабильной микротрубочки были проанализированы в статье [40], где стенка микротрубочки моделировалась как упругая двумерная поверхность с внутренним и внешним радиусом кривизны.

Главный недостаток всех вышеупомянутых моделей - это относительная простота геометрии модельных клеток. Эти модели не позволяют воспроизводить эффекты, возникающие за счет сложных геометрических взаимодействий.

1.3.2 Самоорганизация микротрубочковых структур

Этот аспект динамики полимерных структур является одним из самых интересных для компьютерного моделирования в связи с его многокомпонентностью, дискретностью и геометрией.

На данный момент выделяют пять структур, которые порождает самоорганизация микротрубочек *in vitro*: это "звезда", "воронка", "пучок", "полузвезда" и "колодец" (Рис.1.5).

Как правило, исследователи ограничивались двумерными моделями, мотивируя это квазидвумерностью *in vitro* системы и вычислительной сложностью трехмерной симуляции.

Модели микротрубочек как полугибких филаментов воспроизводят в достаточной степени "звезды", "воронки" и "пучки" (Рис.1.12А-В) и их превращения друг в друга в зависимости от концентрации противоположно ориентированных моторов [14]. "Колодцы" были воспроизведены в статье [16]. Однако удовлетворительного воспроизведения "полузвезд" на данный момент не удалось добиться, несмотря на то, что в 2011 году Неаd и др. с этой целью ввели в систему дополнительные ограничения в виде взаимоотталкивания микротрубочек на расстоянии [41]. Реализовано это было при помощи потенциала Леннарда-Джонса. С одной стороны, он объясняет отталкивание микротрубочек вблизи, как тел ненулевого размера. С другой стороны, ненулевое дальнодействие, им обеспечивающееся, вносит искажения в моделируемое явление. И, наконец, в условиях двумерной модели это привносит сильные ограничения на начальное расположение микротрубочек — его уже трудно назвать случайным, хаотичным (Рис.1.12Г,Д).



Рисунок 1.12: Воспроизведенные в компьютерных моделях структуры: "звезды" (А,Г), "пучки" (Б), "воронка" (В) и "полузвезда" (Д) [14, 16, 41].

Глава 2

Используемые методы анализа изображений и имитационного моделирования

2.1 Программные продукты и окружения

- Для разработки и визуализации модели сети микротрубочек в геометрии клетки и самоорганизации структур клеточных микротрубочек использовался язык программирования C++ и графическая библиотека OpenGL.
- Для анализа результатов и создания диаграмм использовалась программа Microsoft Excel.
- Для обработки изображений и графиков использовалась программа Adobe Photoshop CC.
- Для сегментации изображений микротрубочковых сетей использовалась библиотека JDeli.
- Для реализации нейронной сети использовались библиотеки Tensorflow и PyTorch для языка программирования Python.

2.2 Сегментация изображений микротрубочковых сетей

Для выделения одиночных изображений клеток с микрофотографий микротрубочковых сетей был реализован метод сегментации, основанный на обходе в ширину графа, где вершинами являются пиксели, и ребра проведены между соседними пикселями (в том числе — по диагонали).

На первом шаге алгоритма мы выделяем связные компоненты из пикселей выше определенного порога яркости.

Результат первого шага можно увидеть на Рис. 2.1.

На втором шаге на каждом ребре задается обратно пропорциональная яркости функция расстояния и производится обход в ширину графа с ребрами



Рисунок 2.1: Результат первого шага алгоритма сегментации клеток выделения связных компонент в графе соседних пикселей выше определенного порога яркости.

ограниченного по модулю положительного веса. Этот обход запускался из найденных на предыдущем шаге компонент, таким образом, для оставшихся пикселей вычислялось расстояние до ближайшей компоненты.

Далее пиксели приписывались к ближайшей компоненте. Результат второго шага алгоритма сегментации можно увидеть на Рис. 2.2.

Для того, чтобы подобрать параметры алгоритма сегментации, были вручную размечены несколько изображений с клетками. После оптимизации параметров, мера сегментации IoU (intersection over union), определенная как площадь пересечения сегментов деленная на площадь их объединения, стала превышать 90%. В связи с тем, что сегментация является лишь вспомогательным шагом для классификации и точность сегментации не оказывает большого влияния на точность классификации, дальнейшая оптимизация не производилась.



Рисунок 2.2: Результат второго шага алгоритма сегментации — приписывания пикселей к ближайшим компонентам связности, полученным на шаге 1.

2.3 Подсчет статистики радиальности по кластеру самых ярких пикселей

Для оценки радиальности был предложен метод, основанный на подсчете следующего критерия:

$$W = \sum_{t \in A} [(x_t - x_m)^2 + (y_t - y_m)^2], \qquad (2.1)$$

где x_t и y_t — координаты точек, принадлежащих к кластеру, состоящему из k% самых ярких пикселей изображения клетки, а x_m и y_m — координаты геометрического центра такого кластера. Пример таких кластеров можно увидеть на Рисунке 2.3. Как видно из рисунка, для сетей с характерной радиальностью такой кластер более компактен, соответственно значение статистики должно быть меньше.



Рисунок 2.3: Примеры кластеров (3% самых ярких пикселей) для радиальной сети (A) и сети с нарушенной радиальностью (B).

Однако устойчивость такого критерия начинает снижаться в ситуации, когда исследуемые клетки имеют большой разброс по форме и размеру. Для того, чтобы учитывать размеры и форму клетки, нами была разработана следующая модификация критерия:

$$W_n = \sum_{t \in A} \left[\frac{(x_t - x_m)^2}{a^2} + \frac{(y_t - y_m)^2}{b^2} \right],$$
(2.2)

где a и b — длины большой и малой полуосей эллипса, описывающего клетку (Рис. 2.4). При этом изображение повернуто так, что оси эллипса параллельны осям координат. Такой критерий может показывать хорошую корреляцию с концентрацией агента (Рис. 3.2), стабилизирующего и запутывающего микротрубочки, однако высокой точности мультиклассовой классификации с помощью одного такого критерия добиться не удалось (Таблица 3.1), в связи с чем было принято решение использовать сверточные нейронные сети, хорошо зарекомендовавшие себя в задачах распознавания и классификации изображений.

2.4 Классификация клеточных изображений с помощью сверточных нейронных сетей

В связи с небольшим размером набора данных (несколько тысяч изображений на каждый класс) обучение глубокой нейронной сети может приводить к переобучению, т.е. ситуации, когда вместо выделения закономерностей в изобра-



Рисунок 2.4: Примеры клеток разных размеров и описывающего клетку эллипса (С).

жении, позволяющих делать вывод о его свойствах, сеть в определенном смысле начинает просто "запоминать" обучающий набор данных и теряет способность к обобщению на новые данные.

В этой работе для борьбы с переобучением нами были использованы следующие подходы и методы:

- Обучение сети простой архитектуры для уменьшения возможности сети к переобучению.
- Аугментация изображений для увеличения размера набора данных.
- Трансферное обучение предобученной глубокой нейронной сети.

2.4.1 Обучение сети простой архитектуры

На Рис. 3.3 представлена схема используемой сети простой архитектуры.

Простая архитектура позволяет избежать переобучения на малом количестве данных.

Гиперпараметры обучения варьировались при этом в следующих интервалах:

- 1. Количество сверточных слоев варьировалось от 1 до 5.
- 2. Количество слоев пулинга варьировалось от 0 до 5.

3. Количество фильтров в слоях варьировалось от 8 до 256.

4. Размеры сверточных слоев варьировались от 2х2 до 5х5.

5. Количество полнозвязных слоев варьировалось от 1 до 4.

6. Размеры полносвязных слоев варьировались от 16 до 512.

Финальные параметры представлены в главе 3.1.2.

2.4.2 Применение маски sharpen

Микротрубочки — линейные структуры постоянного диаметра. В связи с этим логично предположить, что информация о геометрии сети и свойствах этого компонента цитоскелета будет в достаточной степени воспроизведена в случае, если мы будем рассматривать микротрубочки как де-факто одномерные структуры.

Однако, в связи с особенностями получения микрофотографий клеток, таких как варьирующееся фокусное расстояние, интерпретация сетью может быть затруднена.

Чтобы улучшить структурированность изображений, одной из примененных операций было использование маски sharpen из библиотеки PIL для языка Python.

Результат применения этой операции изображен на Рис. 2.5.

2.4.3 Трансферное обучение предобученной глубокой нейронной сети

Для трансферного обучения использовались предобученнные на наборе данных ImageNet [30] сети VGG [29], ResNet [28] и MobileNet [42].

От предобученных сетей в сеть для конечной классификации переходили только сверточные слои, после которых следовали полносвязные слои размера 128 и 64 нейрона. В процессе обучения на наборе данных с клетками параметры (веса) сверточных слоев фиксировались, и обучались только полносвязные слои. Такой подход позволяет избежать переобучения большой сети, при этом использовать большой спектр выделяемых ей признаков.



Рисунок 2.5: Изображение клетки до (слева) и после (справа) применения операции sharpen из библиотеки PIL для языка Python.

2.5 Модель микротрубочковой сети в клеточной геометрии

Основной структурный элемент программы — это виртуальный кластер тубулина, который представляет собой направленный цилиндр со следующими параметрами: координаты в клеточном трехмерном пространстве, вектор направленности, степень фосфорилирования присоединенных нуклеотидов, размер (количество димеров тубулина в кластере).

Кластеры организованы в цепи (виртуальные микротрубочки). Цепь — массив типа list виртуальных кластеров.

Константы и переменные: коэффициентные вероятности действий, распределение вероятности углов поворота кластера, коэффициент прочности микротрубочек, концентрация тубулина, размеры кластера.

Вероятность добавления кластера к концу микротрубочки определяется формулой:

$$P_{attach} = C_{attach} \times C_{free} = \frac{C_{attach} \times N_{free}}{V_{cell} \times N_a},$$
(2.3)

где P_{attach} — итоговая вероятность прибавления кластера, C_{attach} — коэффициентная вероятность, C_{free} — концентрация свободного тубулина, N_{free} —
количество димеров тубулина в растворе, V_{cell} — объем виртуальной клетки, а N_a — число Авогадро. Таким образом, вероятность присоединения тубулинового кластера прямо пропорциональна концентрации свободного тубулина в клетке.

Вероятность удаления — $P_{dettach} = C_{dettach}$, где C_P — коэффициентная вероятность удаления. Эта вероятность не зависит от концентрации тубулина.

Вероятность разлома цепи равна $P_{break} = 1 - 1.5^{C_{break} - L_{chain}}$, где L_{chain} — длина цепи, C_{break} — коэффициент разлома. При разломе образуются две независимые цепи. Вероятность разлома выше у более длинных цепей.

Вероятность нуклеации (в случайном месте) — $P_{nucl} = \frac{C_{nucl} \times N_{free}}{V_{cell} \times N_a}$, где C_{nucl} — это коэффициентная вероятность нуклеации.

При присоединении нового объекта к цепи определяются следующие два параметра:

- Ротационный угол $\omega = random[0:1] \times 2\pi$.
- Угол отклонения от оси предыдущего кластера $\phi = random[0:1] \times 0.5\pi$.

Перед тем, как добавить новый кластер к цепи, происходит проверка на возможное пересечение с уже существующими объектами. В случае пересечения новый кластер не добавляется.

В виртуальной клетке мы ввели несколько зон, соответствующих разным влияющим на микротрубочки элементам клетки реальной: виртуальная центросома – зона изменения коэффициентной вероятности нуклеации, виртуальная зона заякоривания – зона измененного коэффициента делеции, виртуальное ядро – внутренняя граница виртуального пространства.

Интерфейс получившейся программы можно увидеть на рисунке 2.6.

2.6 Модель самоорганизации микротрубочек in vitro

Для того, чтобы совместить простоту двумерной и реалистичность трехмерной моделей, был использован квазитрехмерный подход, который заключается в том, что мы выделяем N_{layers} двумерных слоев, между которыми могут с вероятностью p_{layer} переходить микротрубочки и свободные моторы. При этом



Рисунок 2.6: Интерфейс программы Mimitation, воспроизводящей динамику микротрубочкового скелета клетки.

между собой могут взаимодействовать только объекты, находящиеся на одном слое.

Капля раствора, в которой находятся микротрубочки, представлена кругом радиуса R. В капле находятся $N_{tubules}$ микротрубочек средней длины L, N_+ плюс и N_- минус ориентированных моторов.

Микротрубочки смоделированы согласно механизмам, приведенным в статье [39], и представляют собой цепи из $N_{segments}$, соединенных упругими сочленениями, создающими вращающий момент, рассчитанный по формуле:

$$M_i = \beta d(\pi - \alpha_i), \tag{2.4}$$

где
 d — длина сегмента микротрубочки,
 β — коэффициент жесткости, а
 α — угол между сегментами.

Моторы моделируются как круги малого радиуса, которые могут при контакте с микротрубочкой с вероятностью p_{attach} присоединиться к ней. Моторы двухвалентны: могут присоединить к себе одновременно не более двух микротрубочек. После присоединения мотор движется по трубочке со скоростью v в соответствующем направлении (в зависимости от ориентации мотора). Достигнув конца микротрубочки, мотор может отсоединиться с вероятностью p_{detach} . Вероятность также зависит от типа мотора.

Свободные моторы передвигаются по броуновским законам [43].

Вязкая среда создает для движущихся микротрубочек и моторов силу сопротивления по закону Стокса. Сопротивление цитоплазмы для микротрубочек рассчитывается по формуле Рейли:

$$F_S = 6\pi\eta r v, \tag{2.5}$$

где η — это динамическая вязкость цитоплазмы, r — радиус (площадь сечения) объекта, v — скорость объекта.

Как параметры нами варьировались концентрации моторов и размеры капли и микротрубочек.

Глава 3

Результаты анализа и моделирования микротрубочковых систем

3.1 Анализ геометрии микротрубочковой сети

Результаты, описанные в этой главе, опубликованы в работах [44, 45].

Для эксперимента по анализу геометрии микротрубочковых сетей был собран набор данных с изображениями клеток линии CV1 под разными концентрациями (0, 0.1 и 1М) агента паклитаксель (таксол), обладающего противораковым действием. Принцип действия препарата заключается в стабилизации микротрубочек, предотвращения их разборки, и как следствие, запутывания микротрубочковой сети. Так как микротрубочковая сеть активно участвует в процессе клеточного деления, это запутывание приводит к ингибированию роста опухоли.

Примеры изображений клеток под воздействием разных концентраций таксола можно увидеть на Рис. 3.1.



Рисунок 3.1: Примеры изображений клеток линии CV1 под различной концентрацией таксола (0, 0.1М и 1М).

Были поставлены следующие задачи классификации изображений:

• Мультиклассовая классификация на 3 класса (0, 0.1, 1).

- Бинарная классификация (0 vs. 0.1).
- Бинарная классификация (0 vs. 1).
- Бинарная классификация (0.1 vs. 1).

Всего было собрано по 200 изображений групп клеток для каждого класса, что позволило получить около 2000 изображений индивидуальных клеток для каждого значения концентрации химического агента.

Единичные изображения клеток были выделены методом, описанным в главе 2.2. После выделения изображения были переформатированы в разрешение 300х300 пикселей.

Помимо автоматических методов, клетки также были классифицированы тремя экспертами. Результаты экспертной классификации в двух вариантах определения класса (голосование экспертом и лучший эксперт по общей точности) представлены в Таблице 3.1. Для классификации на 3 класса (0 vs. 0.1M vs. 1M) были использованы 300 клеток. Для классификации на 2 класса — 200 клеток.

3.1.1 Анализ геометрии регионов флуоресценции

Значения характеристики кластерного анализа, описанной в главе 2.3, подсчитанные на разных уровнях (в процентах) выбора самых ярких пикселей, показаны на Рис. 3.2.

Как видно из Рис. 3.2, полученная характеристика показывает корреляцию с уровнем концентрации таксола, особенно на уровне выбора самых ярких пикселей в районе 1-3%. Однако классификация клеток по одному этому показателю уступает как экспертным оценкам, так и методам, основанным на применении глубоких нейронных сетей (Таблица 3.1).

3.1.2 Анализ микротрубочковых сетей с помощью глубоких нейронных сетей

Так как в изображениях микротрубочек присутствует довольно малое количество информативных признаков (в отличие от, например, базы ImageNet, где собраны изображения объектов нескольких тысяч классов) и само количество





изображений довольно мало в связи со сложностью эксперимента, использование стандартных сетей (VGG [29], ResNet [28], MobileNet [42]) в стандартном же режиме обучения приводит к неизбежному переобучению.

В подобных случаях обычно используется два основных подхода: использование части нейронной сети с предобученными весами и уменьшение геометрии (количества слоев и нейронов в слоях) сети.

В этой работе были применены оба подхода.

В качестве сети уменьшенной геометрии использовалась сеть, изображенная на Рис.3.3.

Она состоит из следующих слоев:

- Входной слой черно-белое 8-битовое изображение. Размер 300х300 пикселей.
- 2. Свертка. 16 фильтров. Размер фильтра 2х2. Шаг 1х1.
- 3. Макс-пулинг. Размер ядра 2х2. Шаг 2х2.
- 4. Свертка. 64 фильтра. Размер фильтра 3х3. Шаг 1х1.
- 5. Макс-пулинг. Размер ядра 2х2. Шаг 2х2..
- 6. Полносвязный слой. 32 нейрона.
- 7. Полносвязный слой. 32 нейрона.
- 8. Выходной слой функция активации softmax с категориальной кроссэнтропией в качестве функции потерь.



Рисунок 3.3: Архитектура сверточной нейронной сети простой геометрии для классификации клеток.

Параметры обучения сети (также после оптимизации) были выбраны следующие:

- Оптимизатор "NAdam" ("Adam" [46] с методом импульса Нестерова).
- Скорость обучения 0.002.
- Коэффициент L2 регуляризации 0.01.
- Коэффициент dropout 0.5.
- Размер выборки на шаге обучения (batch) 32.

Для улучшения работы сети также были применены следующие методы обработки данных:

- Была применена маска sharpen библиотеки PIL для языка Python. Такая операция помогает повысить резкость изображения.
- Для увеличения количества данных к изображениям были применены операции отражения и поворота, что позволило увеличить количество изображений для обучения в 8 раз. Стоит отметить, что изображения, являющиеся преобразованиями друг друга, не разделялись по обучающим и тестовым выборкам для чистоты эксперимента.

Результаты классификации с помощью такой сети представлены в таблице 3.1. Как видно из таблицы, с помощью дополнительных методов обработки действительно удается повысить точность.

При этом такая сеть достигает сравнимых результатов с экспертной оценкой, а в одном случае (0.1M vs. 1M) — даже превосходит экспертную оценку по точности (p-value = 0.008).

Для второго подхода были использованы предобученные на наборе данных ImageNet глубокие нейронные сети (VGG [29], ResNet [28] и MobileNet [42]). Веса сверточных слоев в этих сетях были фиксированы и дообучались только веса последнего, полносвязного слоя. Лучший результат показала сеть MobileNet [42]. Результаты этой сети также представлены в Таблице 3.1. Также на признаках, полученных с помощью предобученной нейронной сети, был обучен алгоритм SVM.

Как видно из Таблицы 3.1, трансферное обучение показывает хорошие результаты, несмотря на то, что изначальная сеть была предобучена на данных другой природы (ImageNet). Это говорит о том, что сверточные признаки предобученной сети покрывают достаточное количество информации об изображении.

Задача	Голос.	Лучший	Кл.	CNN	CNN-T	CNN-T-S	CNN-SVM	CNN-Tran
3 класса	62	62.7	61	57.7	59	66	75.0	76.7
0 vs 0.1	89	90.5	80	79.5	84	88.5	90.5	93
0 vs 1	90.5	93	76	88	90.5	91	93	96.5
0.1 vs 1	51	52	60	55	56	70.5	70.5	71

Таблица 3.1: Результаты (в процентах) классификации изображений клеточных микротрубочек под воздействием различных концентраций таксола. Задачи ставились в виде мультиклассовой классификации на 3 класса и бинарных классификаций для пар концентраций. Приведены результаты двух экспертных классификаций (для голосования экспертов и для лучшего эксперта), классификации с помощью кластерной характеристики, и четырех классификаций с помощью нейронных сетей: сверточная сеть простой геометрии (CNN), сверточная сеть простой геометрии с добавлением транспонированных изображений (CNN-T), сверточная сеть простой геометрии с добавлением транспонированных сете с последующим SVM (CNN-SVM), сверточная сеть с последующим с собучения (CNN-Tran).

3.2 Моделирование динамики микротрубочковой сети

Результаты, описанные в этой главе, прошли экспертную оценку и опубликованы в работах [47–52].

Наша программа хорошо имитировала поведение микротрубочек в цитоплазме клетки, особенно в бесцентриолярных цитопластах. Наблюдались события, соответствующие динамической нестабильности и тредмиллингу микротрубочек. Далее представлены результаты изучения влияния параметров на динамику и поведение микротрубочек и геометрию цитосклета.

3.2.1 Эксперимент Митчисона-Киршнера

Известный опыт Митчисона-Киршнера состоит в том, что в пробирке с собранными микротрубочками они фрагментируются путем пропускания через шприц с тонкой иглой, но через некоторое время в присутствии ГТФ длина микротрубочек восстанавливается. При этом фактически количество микротрубочек сначала увеличивается в разы (за счет фрагментации), а в процессе восстановления возвращается к исходному.

Для воспроизведения опыта в модели после стабилизации микротрубочковой сети был уменьшен параметр C_{break} , после чего цепи подверглись многочисленным разломам. И, несмотря на простые законы работы системы, модель полностью и в точности отразила поведение реальной системы (Рис.3.4)



Рисунок 3.4: Воспроизведение в модели эксперимента Митчисона-Киршнера.

3.2.2 Роль ГТФ-азной активности тубулина

Гидролиз ГТФ — это один из факторов, влияние которого на динамику микротрубочковой сети изучено плохо, в основном из-за того, что манипулировать этим фактором *in vivo* исключительно сложно. В модели же изменение параметров ГТФ-азной активности заложено в интерфейс, и при ее отсутствии весь тубулин находится в одинаковом состоянии. Как показали виртуальные эксперименты, присутствие гидролиза критично для стабилизации плюс-конца микротрубочек и системы в целом (Рис.3.5). В отсутствие гидролиза система

претерпевает значительные колебания (Рис.3.5А), в то время как в его присутствии система существенно более стабильна (Рис.3.5В-Г).



Рисунок 3.5: Влияние ГТФ-азной активности тубулина на динамику различных элементов сети микротрубочек. А,В,Г) Зависимость количества сегментов тубулина в микротрубочках от времени в отсутствии ГТФ-азной активности тубулина (А) и в ее присутствии (В,Г) при различных коэффициентных вероятностях присоединения тубулина (А,Г) и его отсоединения (В). Б) Вид модельной микротрубочковой сети без гидролиза.

3.2.3 Влияние геометрии клетки

Одним из наиболее сложных для изучения параметров, влияющих на динамику и состояние микротрубочковой сети, является геометрия клетки. Созданная нами модель подходит и для этой задачи. В частности, при изменении геометрии клетки на более сложную (но сохранении того же объема) снижается потенциал полимеризации (Рис. 3.6).



Рисунок 3.6: Влияние геометрии клетки на потенциал полимеризации при низкой (А) и высокой (Б) коэффициентной вероятности присоединения тубулина.

3.3 Влияние концентрации моторных белков и размеров капли и микротрубочек на самоорганизацию микротрубочковой сети *in vitro*

Результаты, описанные в этой главе, прошли экспертную оценку и опубли-кованы в работе [53].

Общая цель экспериментов заключалась в воспроизведении структур, ранее наблюдавшихся *in vitro*. По умолчанию использовались следующие параметры:

- Радиус капли (*R*) 16 мкм;
- Число двумерных слоев $(N_{layers}) 3;$
- Вероятность перехода между слоями $(p_{layer}) 0.2;$
- Число сегментов микротрубочек ($N_{tubules}$) 150;
- Число микротрубочек (*N*_{tubules}) 150;
- Вероятность присоединения мотора к микротрубочке (*p*_{attach}) 0.9;

- Вероятность отсоединения плюс ориентированного мотора от микротрубочки (*p_{dettach.pos}*) — 0.8;
- Вероятность отсоединения минус ориентированного мотора от микротрубочки (*p_{dettach.neg}*) — 0.01;

При параметрах, аналогичных экспериментам из статьи [14], наблюдается формирование "звезды" и превращение ее в "воронку" (Рис.3.7А) за счет расхождения концов микротрубочек и расширения свободной области в центре капли.

С более короткими трубочками и положительно ориентированными моторами образуется стабильная "звезда" (Рис.3.7Б). Также образуется "звезда" и с минус ориентированными моторами (Рис.3.7В). При наличии смеси моторов в соотношении 1:1 образуются несколько "пучков" (Рис.3.7Г). "Пучки" также образуются, если предположить равные вероятности отсоединения от микротрубочки для обоих типов моторов (Рис.3.7Г). Все эти результаты полностью соответствуют наблюдениям *in vitro*.

При уменьшении радиуса капли в соответствии с экспериментами в статье [16] полностью воспроизводятся наблюдаемые структуры (Рис.3.8). При радиусе капли 20 мкм образуется "звезда". В капле радиуса 11 мкм образуется "звезда", центр которой постепенно смещается к периферии капли, превращаясь в "полузвезду". В капле радиуса 6 мкм практически сразу образуется "колодец" за счет механических свойств микротрубочек, длина которых сильно больше диаметра капли.



Рисунок 3.7: Моделирование самоорганизации микротрубочковой сети. А) "Звезда" микротрубочек, переходящая в "воронку". Показан номер шага программы. Б) "Звезда", полученная с помощью одних плюс-ориентированных моторов. В) "Звезда", полученная с помощью одних минус-направленных моторов. Г) "Пучки" при равном количестве моторов разных типов, но с высокой вероятностью отсоединения плюс ориентированного мотора. Д) "Пучки" при равном количестве моторов разных типов и с равной вероятностью их отсоединения от микротрубочек.



Рисунок 3.8: Моделирование влияния размеров капли на самоорганизацию микротрубочковой сети. А) "Звезда" микротрубочек, R = 20 мкм. Б) "Колодец" микротрубочек, R = 6 мкм. В) Образование "полузвезды" происходит путем постепенного смещения области скоплений пересечений микротрубочек к периферии. Показан номер шага программы. Г) При двумерном подходе и тех же параметрах что и в (В), образование полузвезды не происходит. Показан номер шага программы.

Глава 4

Обсуждение результатов анализа изображений и имитационного моделирования микротрубочковых систем

4.1 Анализ изображений клеточных микротрубочек

В этой работе был проведен анализ изображений клеток линии CV1 с помощью методов анализа изображений, а именно:

- 1. Анализ с помощью подсчета кластерной характеристики самых ярких пикселей изображения.
- 2. Анализ с помощью сверточной нейронной сети простой геометрии.
- 3. Анализ с помощью глубокой сверточной нейронной сети и трансферного обучения.

Кластерная характеристика показала неплохую корреляцию с концентрацией химического агента таксола, стабилизирующего микротрубочки и, как следствие, нарушающего радиальную структуру в клетке. В качестве инструмента для сравнения методов была произведена классификация изображений на три класса (0 vs. 0.1M vs. 1M концентрации) и в трех вариантах на два класса (попарно). В такой постановке задачи лучше всего показали себя предобученные глубокие сети и, соответственно, трансферное обучение. Более того, с помощью глубоких нейронных сетей удалось получить классификацию лучше, чем была получена от экспертов.

Это демонстрирует возможность применения предобученных нейронных сетей к задаче классификации специфических изображений, таких как изображения клеток, несмотря на тот факт, что набор данных, используемый для предобучения, может иметь кардинально другую природу.

4.2 Модель клеточного пространства и сети микротрубочек

Имитационное (стохастически-объектное) моделирование открывает новые возможности для изучения влияния сложнопредсказуемых параметров на динамические системы, функции клетки. Такое моделирование позволяет напрямую изучать эффекты таких параметров в реальном времени и сравнивать результаты, исходящие из той или иной гипотезы, с результатами *in vivo*.

В дальнейшем планируется добавлять в систему новые элементы, такие как гибкая клеточная мембрана, находящаяся во взаимодействии с динамическим цитоскелетом для моделирования клеточного движения, транспортные и свободно движущиеся молекулы для моделирования активного транспорта и движение виртуальных органелл и элементов цитоскелета для моделирования митоза и прочих сложных динамических клеточных процессов.

4.3 Самоорганизация микротрубочковой сети

Задача изучения самоорганизации микротрубочковой сети заключается в анализе сложных отношений геометрии и концентраций клеточных моторов. Также экспериментальные наблюдения над этими системами производились в квазидвумерных системах, обладающих свойствами как трехмерных, так и двумерных систем.

С одной стороны, микротрубочки в этих системах ограничены в пространстве и это приводит к образованию особых по своей структуре систем. С другой стороны, при моделировании, если мы подходим к системе как к двумерной, воспроизвести все типы структур не удавалось. Нами был предложен метод квазитрехмерного моделирования, заключающийся в разделении пространства модели на несколько плоскостей с возможностью перехода частиц между ними.

После имплементации этого метода, в нашей модели удалось воспроизвести все основные типы структур. Причем, в отличие от работы Head et al. [41], для воспроизведения структур, образующихся при различных размерах капли буферного раствора, нам не пришлось вводить дополнительных условий на взаимодействие микротрубочек, искажающих систему. Поскольку изучение систем *in vitro* часто происходит в каплях или распластанных клетках, такой метод может быть полезным для дальнейшего создания моделей подобных систем.

В дальнейшем планируется с помощью метода автоматического анализа получившейся структуры самоорганизации изучить зависимость этих структур от всего спектра параметров модели.

Заключение

В процессе работы было выполнено следующее:

- Был проведен анализ клеточных изображений и классификация таких изображений с помощью кластерной характеристики и сверточных нейронных сетей. Кластерная характеристика изображений систем клеточных микротрубочек коррелирует с концентрацией химического агента таксол, стабилизирующего микротрубочки и приводящего к их запутыванию. Предобученная сверточная нейронная сеть классифицирует изображения микротрубочковых систем по концентрации химического агента таксол как лучше вышеупомянутой кластерной характеристики, так и экспертных оценок.
- 2. Была разработана модель клеточного пространства, включающего микротрубочковые сети, позволяющая воспроизводить сложные эффекты, связанные с геометрией клетки. Созданная модель клеточного пространства обладает сложной геометрией и включает в себя микротрубочковую сеть. Такая модель позволяет воспроизвести эффекты, связанные с клеточной геометрией, без дополнительных факторов.
- 3. Была разработана модель самоорганизации клеточной сети в квазитрехмерном пространстве, включающая физически достоверные микротрубочки в вязкой среде и моторные белки. Квазитрехмерное моделирование позволяет воспроизвести различные типы самоорганизации микротрубочек, наблюдаемые *in vitro*, и взаимодействующих с ними моторных белков при вариациях параметров взаимодействия и без введения дополнительных условий.

Полученные результаты вносят научный вклад в направление компьютерного анализа и моделирования внутриклеточных систем.

Список рисунков

1.1 Схема строения микротрубочки из статьи [2]	11
1.2 Микротрубочка в интерфазной живой клетке [4]	12
1.3 Полимеризация (рост) и деполимеризация (катастрофа) микротру-	
бочки [4]	14
1.4 Белки плюс-концов микротрубочек [9]	16
1.5 Примеры структур самоорганизации микротрубочек: "звез-	
ды"(А,Г), "воронки"(Б), "пучки"(В), "полу-звезда"(Д), "коло-	
дец"(Е). Из статей [14, 16]	18
1.6 (А) Клетки с радиальной системой микротрубочек. (В) Клетки с	
хаотичной системой микротрубочек после воздействия таксола	19
1.7 Применение операции свертки — поэлементного умножения мат-	
риц. Зеленым выделена исходная матрица, желтым — матрица	
свертки, красным — коэффициенты свертки, розовым — резуль-	
тирующая карта (map) свертки.	21
1.8 Архитектура сверточной сети LeNet5 [22]	22
1.9 Виды функций активаций слоев нейронной сети. Горизонтальная	
ось соответствует входящему на нейрон сигналу, вертикальная —	
исходящему	22
1.10 Схема трансферного обучения нейронной сети. От обученной на	
большем количестве данных сети А переносятся параметры (веса)	
нескольких первых слоев в сеть В. Сеть В обучается на искомом	
наборе, при этом веса перенесенных слоев не меняются	25
1.11 Постановка задачи для метода опорных векторов. Алгоритм на-	
ходит гиперплоскость такую, чтобы расстояние от неё до классов	
(ширина полосы) было максимальным	26
1.12 Воспроизведенные в компьютерных моделях структуры: "звезды"	
(А,Г), "пучки" (Б), "воронка" (В) и "полузвезда" (Д) [14, 16, 41]	29

2.1 Результат первого шага алгоритма сегментации	и клеток — выделе-
ния связных компонент в графе соседних пикс	селей выше опреде-
ленного порога яркости	
2.2 Результат второго шага алгоритма сегментаци	и — приписывания
пикселей к ближайшим компонентам связнос	ти, полученным на
шаге 1	
2.3 Примеры кластеров (3% самых ярких пикселе	ей) для радиальной
сети (А) и сети с нарушенной радиальностью (В	B)
2.4 Примеры клеток разных размеров и описывающ	цего клетку эллипса
(C)	
2.5 Изображение клетки до (слева) и после (справ	а) применения опе-
рации sharpen из библиотеки PIL для языка Pyt	hon
2.6 Интерфейс программы Mimitation, воспроизн	водящей динамику
микротрубочкового скелета клетки.	
3.1 Примеры изображений клеток линии CV1 под	различной концен-
трацией таксола (0, 0.1М и 1М)	40
3.2 Значение посчитанной характеристики кластер	ров флуоресценции
для клеток с различной концентрацией таксола	(0, 0.1М и 1М) 42
3.3 Архитектура сверточной нейронной сети прос	стой геометрии для
классификации клеток	
3.4 Воспроизведение в модели эксперимента Митч	исона-Киршнера 46
3.5 Влияние ГТФ-азной активности тубулина на ди	инамику различных
элементов сети микротрубочек. А,В,Г) Зависимо	ость количества сег-
ментов тубулина в микротрубочках от времени	в отсутствии ГТФ-
азной активности тубулина (А) и в ее присутств	ии (В,Г) при различ-
ных коэффициентных вероятностях присоедине	ения тубулина (А,Г)
и его отсоединения (В). Б) Вид модельной микр	ротрубочковой сети
без гидролиза	
3.6 Влияние геометрии клетки на потенциал полиме	ризации при низкой
(А) и высокой (Б) коэффициентной вероятно	сти присоединения
тубулина	

- 3.8 Моделирование влияния размеров капли на самоорганизацию микротрубочковой сети. А) "Звезда" микротрубочек, R = 20 мкм. Б)
 "Колодец" микротрубочек, R = 6 мкм. В) Образование "полузвезды" происходит путем постепенного смещения области скоплений пересечений микротрубочек к периферии. Показан номер шага программы. Г) При двумерном подходе и тех же параметрах что и в (В), образование полузвезды не происходит. Показан номер шага программы.
 А1 Акт о внедрении результатов работы.

Список таблиц

3.1 Результаты (в процентах) классификации изображений клеточных микротрубочек под воздействием различных концентраций таксола. Задачи ставились в виде мультиклассовой классификации на 3 класса и бинарных классификаций для пар концентраций. Приведены результаты двух экспертных классификаций (для голосования экспертов и для лучшего эксперта), классификации с помощью кластерной характеристики, и четырех классификаций с помощью нейронных сетей: сверточная сеть простой геометрии (CNN), сверточная сеть простой геометрии (CNN), сверточная сеть простой геометрии с добавлением транспонированных изображений и маски sharpen (CNN-T-S), предобученная сеть сложной геометрии с использованием трансферного обучения (CNN-Tran).

45

Литература

- Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky et al. W. H. Freeman & Co, 2003.
- Song Y. H., Mandelkow E. Recombinant kinesin motor domain binds to betatubulin and decorates microtubules with a B surface lattice // Proceedings of National Academy of Science USA. 1993. Vol. 90. P. 1671–1675.
- 3. Ченцов Ю С. Общая цитология. Издательство Московский Университет, 2004.
- Howard J., Hyman A. A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end // Nature. 2003. Vol. 422. P. 753–758.
- A microtubule-binding domain in dynactin increases dynein processivity by skating along microtubules / T. L. Culver-Hanlon, S. A. Lex, A. D. Stephens et al. // Nature Cell Biology. 2006. Vol. 8. P. 264–270.
- 6. Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. Garland Publishing, 2007.
- Arnal I., Karsenti E., Hyman A. A. Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in Xenopus egg extracts // Journal of Cell Biology. 2000. Vol. 149. P. 767–774.
- CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport / A. J. Lomakin, I. Semenova, I. Zaliapin et al. // Developmental cell. 2009. Vol. 17. P. 323–333.
- XMAP215 is a processive microtubule polymerase / G. J. Brouhard, J. H. Stear, T. L. Noetzel et al. // Cell. 2008. Vol. 132. P. 79–88.

- Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks / D. Mizuno,
 C. Tardin, C. F. Schmidt et al. // Science. 2007. Vol. 315. P. 370–373.
- Carazo-Salas R. E., Nurse P. Self-organization of inter-phase microtubule arrays in fission yeast // Nature Cell Biology. 2006. Vol. 8. P. 1102–1107.
- Hentrich C., Surrey T. Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14 // The Journal of Cell Biology. 2010. Vol. 189. P. 465–480.
- Physical Mechanisms Redirecting Cell Polarity and Cell Shape in Fission Yeast / C. R. Terenna, T. Makushok, G. Velve-Gasquillas et al. // Current Biology. 2008. Vol. 18. P. 1748–1753.
- Physical Properties Determining Self-Organization of Motors and Microtubules / T. Surrey, F. Nedelec, S. Leibler et al. // Science. 2001. Vol. 392. P. 1167–1171.
- Goshima G., Nedelec F., Vale R. D. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins // Journal of Cell Biology. 2005. Vol. 171. P. 229–240.
- Effects of Confinement on the Self-Organization of Microtubules and Motors / M. Pinot, F. Chesnel, J. Kubiak et al. // Current Biology. 2009. Vol. 19. P. 954– 960.
- Voituriez R., Joanny J. F., Prost J. Spontaneous flow transisiton in active polar gels // Europhysics Letters. 2005. Vol. 70. P. 404–410.
- A Review of Biological Image Analysis / Weiyang Chen, Weiwei Li, Xiangjun Dong [и др.] // Current Bioinformatics. 2018. 07. Т. 13. С. 337– 343.
- Gamarra Margarita, Zurek Eduardo, San Juan Vergara Homero. Study of Image Analysis Algorithms for Segmentation, Feature Extraction and Classification of Cells // Journal of Information Systems Engineering and Management. 2017. 08. T. 2.

- 20. Weaver Beth A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // Molecular biology of the cell. 2014. T. 25, № 18. C. 2677–2681.
- 21. Backpropagation applied to handwritten zip code recognition / Yann LeCun, Bernhard Boser, John S Denker [и др.] // Neural computation. 1989. T. 1, № 4. C. 541–551.
- 22. Gradient-based learning applied to document recognition / Yann LeCun, Léon Bottou, Yoshua Bengio [и др.] // Proceedings of the IEEE. 1998. Т. 86, № 11. С. 2278–2324.
- 23. Hecht-Nielsen Robert. Theory of the backpropagation neural network // Neural networks for perception. Elsevier, 1992. C. 65–93.
- Goodfellow Ian, Bengio Yoshua, Courville Aaron. Deep learning. MIT press, 2016.
- 25. Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting / Nitish Srivastava, Geoffrey Hinton, Alex Krizhevsky [и др.] // The Journal of Machine Learning Research. 2014. T. 15, № 1. С. 1929–1958.
- 26. Lemley Joseph, Bazrafkan Shabab, Corcoran Peter. Transfer Learning of Temporal Information for Driver Action Classification // MAICS. 2017.
- 27. A survey on deep transfer learning / Chuanqi Tan, Fuchun Sun, Tao Kong [идр.] // International conference on artificial neural networks / Springer. 2018. C. 270– 279.
- 28. Deep residual learning for image recognition / Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren [и др.] // Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2016. C. 770–778.
- 29. Simonyan Karen, Zisserman Andrew. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition // arXiv preprint arXiv:1409.1556. 2014.
- 30. Imagenet: A large-scale hierarchical image database / Jia Deng, Wei Dong, Richard Socher [и др.] // 2009 IEEE conference on computer vision and pattern recognition / Ieee. 2009. C. 248–255.

- Cortes Corinna, Vapnik Vladimir. Support-vector networks // Machine learning. 1995. T. 20, № 3. C. 273–297.
- 32. Vandenberghe Lieven. The CVXOPT linear and quadratic cone program solvers // Online: http://cvxopt. org/documentation/coneprog. pdf. 2010.
- 33. Nanni Loris, Lumini Alessandra. A reliable method for cell phenotype image classification // Artificial intelligence in medicine. 2008. T. 43, № 2. C. 87–97.
- 34. Blood cell image classification based on hierarchical SVM / Wei-Liang Tai, Rouh-Mei Hu, Han CW Hsiao [и др.] // 2011 IEEE International Symposium on Multimedia / IEEE. 2011. C. 129–136.
- 35. Convolutional neural networks for histopathology image classification: Training vs. using pre-trained networks / Brady Kieffer, Morteza Babaie, Shivam Kalra [и др.] // 2017 Seventh International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA) / IEEE. 2017. C. 1–6.
- Воробьев И А, Малый И В. Об отношении длины и динамики микротрубочек: краевой эффект и свойства протяженной радиальной сети // Цитология. 2008. Т. 50. С. 477–486.
- Insights into cytoskeletal behavior from computational modeling of dynamic microtubules in a cell-like environment / I. V. Gregoretti, G. Margolin, M. S. Alber et al. // Journal of Cell Science. 2006. Vol. 119. P. 4781–4788.
- VanBuren V., Odde D. J., Cassimeris L. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice // Proceedings of National Academy of Science USA. 2002. Vol. 99. P. 6035–6040.
- Kim M. J., Maly I. V. Deterministic mechanical model of T-killer cell polarization reproduces the wanderign of aim between simultaneously engaged targets // PLoS Computational Biology. 2009. Vol. 5. P. e1000260.
- Janosi I. M., Chretien D., Flyvbjerg H. Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state // Biophysical Journal. 2002. Vol. 83. P. 1317– 1330.

- 41. Head D. A., Briels W. J., Gompper G. Spindles and active vortices in a model of confined filament-motor mixtures // MBC Biophysics. 2011. Vol. 4. P. 18.
- 42. MobileNets: Efficient Convolutional Neural Networks for Mobile Vision Applications / Andrew G. Howard, Menglong Zhu, Bo Chen [и др.] // CoRR. 2017. T. abs/1704.04861.
- 43. Brown R. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies // Philosophy Magazine. 1828. Vol. 4. P. 161–173.
- 44. Disturbance of the radial system of interphase microtubules in the presence of excess serum in cell culture medium / EV Usova, AV Burakov, AA Shpilman [и др.] // Biophysics. 2008. T. 53, № 6. C. 523–526.
- 45. Deep learning of cell classification using microscope images of intracellular microtubule networks / Aleksei Shpilman, Dmitry Boikiy, Marina Polyakova [и др.] // 2017 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA) / IEEE. 2017. C. 1–6.
- 46. Kingma Diederik, Ba Jimmy. Adam: A Method for Stochastic Optimization // International Conference on Learning Representations. 2014. 12.
- 47. Shpil'man AA, Nadezhdina ES. Stochastic computer model of the cell microtubule dynamics // Biophysics. 2006. T. 51, № 5. C. 776–780.
- Shpilman AA, Nadezhdina ES. Stochastic Model of Microtubule Networks // International Conference on Mathematical Biology and Biophysics / ICMBB. 2006.
- Shpilman AA, Nadezhdina ES. Computational Stochastic Modeling of Cellular Microtubule Network // 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology / ASCB. 2006.
- 50. Shpilman AA, Nadezhdina EV. In silico vs in vitro: Mimitation v1.0 program allows to predict morphological and dynamic changes of tubulin cytoskeleton

caused by microtubule stabilization // International Conference on Biological Motility / ICBM. 2008.

- 51. Shpilman A, Nadezhdina ES. Imitational Modeling of Cytoskeleton: Dynamics, Differentiation, Active Transport and Membrane Interactions // 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology / ASCB. 2008.
- Shpilman AA. Simple Computer Model Posibility of Non-Motor Microtubule Binded Gradient Transport // 49th Annual Meeting of theAmerican Society for Cell Biology / ASCB. 2009.
- Primako EV, Shpilman AA. Using Quazi-3D Approach for Microtubule Self-Organization Model // 5th International Conference on Mathematical Biology and Biophysics / ICMBB. 2014.

Приложение А

Акт о внедрении результатов работы

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

результатов кандидатской диссертационной работы

Шпильмана Алексея Александровича

«Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур»

Результаты диссертационной работы Шпильмана Алексея Александровича «Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур» внедрены в рабочий исследовательский и образовательный процесс АНО ДПО «Научно-исследовательский и образовательный центр «ДжетБрейнс».

- Разработанная Шпильманом А.А. программа для моделирования динамики внутриклеточной микротрубочковой системы позволяет проводить широкий класс исследований в области моделирования внутриклеточных систем.
- Разработанная модель также позволяет осуществлять большое количество образовательных проектов, позволяя наглядно демонстрировать функционал внутриклеточных компонентов.

Представленные в работе рекомендации могут служить основой для разработок компании в соответствующей области.

Директор АНО ДПО «Научно-исследовательский и образовательный центр «ДжетБрейнс»: /Иванов Андрей Владимирович/

Рисунок А1: Акт о внедрении результатов работы.

Saint-Petersburg State University

Manuscript copyright

Shpilman Aleksei Aleksandrovich

Analysis and Computer Modeling of Microtubule Structures

1.2.2 — Mathematical modeling, numerical methods, and software packages

Thesis is submitted for the degree of Candidate of Technical Sciences

Translation from Russian

Under the supervision of Doctor of Physical and Mathematical Sciences Novikov Boris Asenovich

Saint-Petersburg 2021

Table of contents

In	trodu	iction		4		
1	Mic	rotubu	les and methods of analysis and modeling of their systems .	9		
	1.1	tubules	9			
		1.1.1	Microtubule structure	9		
		1.1.2	Microtubule functions	10		
		1.1.3	Microtubule dynamics	12		
		1.1.4	Microtubule network self-assembly	13		
	1.2	1.2 Analysis of cell images				
		1.2.1	Analysis of the radiality of microtubule networks	16		
		1.2.2	Convolutional neural networks for image analysis	17		
		1.2.3	Transfer learning in the case of limited data	20		
		1.2.4	Support vector machines for cell image classification	22		
	1.3	Mode	ling of intracellular structures	23		
		1.3.1	Models of microtubule network dynamic	23		
		1.3.2	Microtubule structures self-assembly models	24		
2	Met	hods of	f image analysis and imitational modeling	26		
	2.1	Softwa	are and libraries used	26		
	2.2	Segme	entation of microtubule network images	26		
	2.3	Radia	liality statistic by clusters of the brightest pixels			
	2.4	Classi	fication of cell images with convolutional neural networks	29		
		2.4.1	Small neural network architecture	30		
		2.4.2	Application of sharpen mask	30		
		2.4.3	Transfer learning of a pretrained deep neural network	31		
	2.5	Micro	tubule network model in a cell of complex geometry	31		
	2.6	Micro	tubule <i>in vitro</i> self-assembly model	33		

3	Res	ults of the analysis and modeling of microtubule systems	35
	3.1	Microtubule network geometry analysis	35
		3.1.1 Cluster analysis of the brightest pixels	36
		3.1.2 Microtubule network analysis with convolutional neural	
		networks	36
	3.2	Computer model of microtubule network dynamics	40
		3.2.1 Mitchison-Kirschner Experiment	40
		3.2.2 The role of GTP hydrolysis	40
		3.2.3 Influence of cell geometry	42
	3.3	Self-assembly of microtubule structures in the quasi-three-	
		dimensional model	42
4	Disc	cussion of results of image analysis and imitational modeling of	
	mic	rotubule systems	46
	4.1	Cellular microtubule image analysis	46
	4.2	Cell space and microtubule network model	46
	4.3	Microtubule network self-organization	47
Co	onclu	sion	48
Li	st of j	pictures	49
Li	st of 1	tables	51
Re	eferer	nces	52
Aj	opend	lix A	58

Introduction

The study of biological systems via computer analysis and modeling is on the rise due to an overall increase in computing power and methods. These methods show promise in helping us to extract new information about biological systems, including cellular ones.

A growing interest in computer analysis of microscopic images of cells and modeling of cellular systems is reflected in numerous research papers. This work examines recent advances in computer vision techniques, such as deep neural networks. Many of these techniques are already being applied to biological images. This research is mainly focused on the analysis of systems of intracellular microtubules. We approach the study of microtubule systems from both computer vision analysis and computer modeling perspectives. Many aspects of these systems have not been thoroughly studied.

The goal of this work is to study microtubule structures, their dynamic, geometry, and self-assembly, and revealing key factors that influence these structures. In particular, we study the following aspects of this research area:

- 1. Analysis of microtubule network radiality via computer vision methods.
- 2. Modeling of microtubule network dynamics in complex geometry cells.
- 3. Modeling of microtubule structures assembly *in vitro*.

In this work, we complete the following tasks:

- 1. Create a dataset of images of microtubule systems under different concentration of stabilizing agent for the training of convolutional deep neural networks.
- 2. Train deep neural networks with various architectures to classify collected images.
- 3. Develop a computer model that will recreate the microtubule system's dynamic inside a cell of complex geometry.

- 4. Perform experiments *in silico* with cells of variable geometry to study the effect of such geometry on a microtubule system.
- 5. Develop a computer model of microtubule structures' assembly *in vitro* in a quasi-three-dimensional space that will include both physically accurate microtubules and motor proteins.
- 6. Recreate *in silico* all observable *in vitro* structures.

Main **results** of this work are:

- 1. We have created a dataset and performed the analysis of images of microtubule systems, both with image analysis techniques, such as convolutional neural networks. Deep convolutional neural networks, together with transfer learning, demonstrate the best results in the task of classification of these images even when compared with human experts.
- 2. We have created a computer program that allows modeling a cell of complex geometry and includes dynamic microtubules. This model reproduces complex phenomena that are observed *in vivo* with no additional factors introduced to the system.
- 3. We have developed a model of microtubules self-organization in a quasithree-dimensional space that can reproduce most observable structures with no additional factors, except for the presence of microtubules and motor proteins.

Main conclusions of this thesis:

- The analysis of microtubules' radiality can give us a deeper understanding of various intracellular mechanisms. This analysis can be performed by both the "classic" computer vision methods and the convolutional neural networks. In some specific cases, such as the classification of cell images by a concentration of the microtubule-stabilizing agent, methods based on convolutional neural networks outperform even the human experts.
- 2. Many observable *in vivo* effects can be explained by the geometry of the cell. Comprehensive modeling that includes complex cell geometry may help disprove the hypothesis that postulates a need for a specific mechanism.

3. The type of structure of a microtubule system *in vitro* is mostly determined by the concentrations of motor proteins, which can be demonstrated by our quasi-three-dimensional model. This model also allows for the reproduction of previously unreproducible structures, in contrast with two-dimensional models, while also not using the number of resources that would be required for a full three-dimensional model.

Novelty:

- 1. A novel algorithm based on cluster analysis of the brightest pixels was implemented and tested.
- 2. A unique dataset was created that allows testing various computer vision methods for the task of classification of microtubule images.
- 3. A deep learning approach was used for the task of microtubule image classification and outperformed human experts on that task.
- 4. A computer model of dynamic cellular microtubules was developed. This model shows the intricate effects of cellular geometry on the dynamic and state of the microtubule network.
- 5. All previously unreproduced *in vitro* structures of microtubules were reproduced with the quasi-three-dimensional model.

Impact: These results are important both for the following development of computer analysis and modeling of intracellular components and well as for the understanding of cell mechanisms.

Image analysis of cell structures can be applied to improve clinical diagnosis accuracy by evaluating the reaction of a patient to a specific drug on a cellular level. This is especially of high interest for cancer treatment.

The credibility of these results is based on the conformity of results of the models to experimental results both *in vivo* and *in vitro*. Statistical significance and confidence intervals are shown where appropriate. Results correlate with previously published works.
Publications:

The results of this research are presented in the following publications. Three publications are indexed by **RISC**, **Scopus**, and **Web of Science**:

- 1. A. Shpilman, D. Boikiy, M. Polyakova, D. Kudenko, A. Burakov, E. Nadezhdina. "Deep Learning of Cell Classification using Microscope Images of Intracellular Microtubule Networks". Proceedings of 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications. 2017.
- E.V. Primako, A.A. Shpilman. "Using Quasi-3D Approach for Microtubule Self-Organization Model". Proceedings of 5th International Conference on Mathematical Biology and Biophysics. 2014.
- A. Shpilman. "Simple Computer Model Possibility of Non-Motor Microtubule Bonded Gradient Transport". Proceedings of 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2009.
- A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Imitational Modeling of Cytoskeleton: Dynamics, Differentiation, Active Transport, and Membrane Interactions". Proceedings of 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2008.
- 5. E.V. Usova, A.V. Burakov, A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Disturbance of the Radial System of Interphase Microtubules in the Presence of Excess Serum in Cell Culture Medium". Biophysics. 2008.
- A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "In silico vs. in vitro: Mimitation v1.0 program allows to predict morphological and dynamic changes of tubulin cytoskeleton caused by microtubule stabilization". Proceeding of International Conference on Biological Motility. 2008.
- A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Computational Stochastic Modeling of Cellular Microtubule Network". Proceedings of 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2006.
- 8. A.A. Shpil'man, E.S. Nadezhdina. "Stochastic Computer Model of the Cell Microtubule Dynamics". Biophysics. 2006.

 A.A. Shpilman, E.S. Nadezhdina. "Stochastic Model of Microtubule Networks". Proceedings of International Conference on Mathematical Biology and Biophysics. 2006.

The results of this work were presented at the following conferences:

- 1. International Conference on Machine Learning and Applications, 2017, Cancun, Mexico.
- 2. International Conference on Mathematical Biology and Biophysics, 2014, Pushchino, Russia.
- 3. Annual Scientific Conference of the Institute of Protein Research, 2013, Pushchino, Russia.
- 4. III Annual Meeting of the Society for Cell Biology, 2012, Saint-Petersburg, Russia.
- 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2009, San-Diego CA, USA.
- 6. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2008, San-Francisco CA, USA.
- 7. International Conference on Biological Motility, 2008, Pushchino, Russia.
- 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2006, San-Diego CA, USA.
- 9. International Conference on Mathematical Biology and Biophysics, 2006, Pushchino, Russia.

Chapter 1

Microtubules and methods of analysis and modeling of their systems

1.1 Microtubules

Microtubules are intracellular structures and one of the components of the eukaryotic cytoskeleton. They are long protein non-branching hollow tubes 25nm in diameter. Microtubules compose intracellular networks during the interphase, mitotic spindle during mitosis, and serve as a structural basis for flagella. The microtubule system sustains cellular shape and serves as "rails" for many intracellular transport systems.

1.1.1 Microtubule structure

Microtubules are composed of heterodimers of α - and β -tubulin. Each subunit of tubulin is bound to a GTP molecule. α -subunit-bound GTP is stable, while β tubulin bound can by hydrolyzed to GDP. This hydrolysis happens in some time after the incorporation of the new tubulin heterodimer into the microtubule [1]. This hydrolysis also leads to structural changes in the tubulin molecule, which, in turn, lead to changes in microtubule's structural integrity.

Microtubule's shape is sustained by electrostatic interaction between tubulin dimers, both lateral and longitudinal. Longitudinally, α -subunit of one tubulin is electrostatically bound to β -subunit of another tubulin [2]. Microtubule's structure can be seen in Figure 1.1.

Microtubules form a network as one of the components of the cytoskeleton. However, they can also form complex structures, such as flagella, centrioles, and basal bodies [1]. In most interphase cells, microtubules form a radial system. Their plus-ends are directed towards cell membrane, and minus-ends — towards cell center (Figure 1.2). The radiality of that structure is important for cytoplasm properties, intracellular transport, and functions of organelles. If you depolymerize microtubules



Picture 1.1: Microtubule's structure (from [2]).

with a chemical agent, you can observe them polymerize from the center of the cell [3]. In normal conditions, this so-called "aster" can be more or less pronounced. Sometimes most of the microtubules are connected to the centrosome. Other times only a part of them are connected.

1.1.2 Microtubule functions

Microtubules participate in the construction of elastic cell skeleton, or cytoskeleton, that is vita for many cell functions, including cell shape-sustaining. If you depolymerize them in a live cell, its shape will get distorted [3].

Microtubules serve as rails for intracellular transport. This transport may include membrane vesicles, and non-membrane components, such as protein complexes or ribonucleoproteins. Movement along the microtubules can occur with or without transport proteins. There is evidence of a 1D diffusion of particles along the microtubule [5]. Motor proteins include cytoplasmic dynein and kinesins. These proteins may reach forces of up to 2-3 pN and move their cargo with the speed of up to 1 micron a second.

Microtubules, together with actin filament network, realize cell polarization [6].

During the mitosis, microtubules form a mitotic spindle that allows for chromosome separation and localization of a full genetic set in both child cells [6].



Picture 1.2: Microtubules in an live interphase cell [4].

Spindle forming and functioning mechanisms are yet to be fully studied and remain one of the key research areas, especially for computer modeling methods. However, to fully model this complex process, we first need to create a comprehensive model of various simpler microtubule systems, such as microtubule self-organization *in vitro*.

1.1.3 Microtubule dynamics

The orientation of monomers in a protofilament determines the polarity of a microtubule: direction from α - to β - tubulin is co-directed with a vector from minus-to plus-end of a microtubule [6]. Speed of detachment differs on plus- and minus-ends. On the plus-end we mostly see the growth of the microtubule.

The growth process of a microtubule *in vitro* and *in vivo* is divided into three phases: nucleation, elongation, and steady-state. *In vitro* formation of new microtubules from free tubulin occurs under three conditions: the right temperature $(30 - 37 \text{ C}^\circ)$, the absence of calcium ions, and the presence of GTP. Microtubule nucleation occurs when tubulin concentration is higher than some threshold value, which depends on the experiment's conditions. During the nucleation process, first, a so-called "seed" is formed, or a tubulin oligomer, that consists out of 6 to 13 tubulin dimers. In a solution with purified tubulin, these "seeds" almost never form by themselves. They need special protein complexes to assemble.

During the second phase, elongation, heterodimers of tubulin attach to the plusend according to their polarity. It was shown that first, these dimers form a sheet which then folds into a tubular shape [7].

The third stage is the steady-state stage. This stage is characterized by a specific ratio of polymerized and free tubulin. The exchange between these pools happens in two ways: treadmilling and dynamic instability. Treadmilling occurs as a growth on the plus-end and disassembly on the minus end of a microtubule, while in dynamic instability, both growth and disassembly happen on the plus-end. The transition from slow growth to faster disassembly is called a "catastrophe". The reverse transition is called a "rescue". "Catastrophe" occurs when the plus-end is saturated with GDP-tubulin, which is prone to detachment to a higher degree than GTP-tubulin [4,6].

In live cells, 60 to 75% of tubulin is polymerized into microtubules. In most cases, microtubules in live cells exist in a steady-state and exhibit the aforementioned dynamic instability, where plus-ends that are directed towards the cell membrane are growing and shrinking. In some cases, such as if we delete the centrosome from the cell, microtubules state changes to treadmilling, where microtubules grow on the plus-end and shrink on the minus-end [8] (Figure 1.1). In some systems, such as in neurons, microtubules are stabilized, and their dynamic is less pronounced.



Picture 1.3: Polymerization (growth) and depolymerization ("catastrophe") of a microtubule [4].

When cell transitions from interphase to mitosis, microtubules become more active to form the mitotic spindle.

Many factors that influence cell microtubule dynamics have been identified. However, it is still unclear which parameters of microtubules' assembly and disassembly, such as tubulin concentration and the rate of GTP hydrolysis, are more important for observed changes in the microtubule network dynamic.

1.1.4 Microtubule network self-assembly

One of the most fascinating phenomena, observed both *in vivo* and *in vitro*, is the self-assembly of microtubule structures.

Eukaryotic cell filaments perform various functions, such as sustaining the cell shape, providing mechanisms for cell motility. These functions are often active, meaning they require energy. Mechanisms may include microtubulesássembly and disassembly and the work of transport motor proteins [10].

One of the examples of such self-assembly is the mitotic spindle, that occurs in cells during mitosis. The mitotic spindle is a bipolar structure that helps to



Picture 1.4: Plus-end proteins of a microtubule [9].

separate chromosomes among the daughter cells. Centrosomes serve as centers for this assembly. However, in yeast cells, it was demonstrated that the mitotic spindle could assemble on a level sufficient for correct cell division even in the absence of the centrosome [11]. We can conclude from that, that the structure and placement of spindle poles can be determined just by the interaction between microtubules and their associated proteins in cell geometry. The same effect was also shown for *Xenopus* egg extract with no centrosomes [12]. Understanding the underlying principles of this self-assembly is important for the analysis of many biological systems.

One of the processes that can facilitate the process of self-assembly is the interaction between microtubules and associated motor proteins [13]. Though a motor's mass is much lower in comparison to a microtubule, in a situation where a motor, or a group of motors, attaches itself to several microtubules at once, we can see the relative motion of microtubules and, subsequently, to a rearrangement of a whole system.

14

Taking into account the complexity of *in vivo* studies, often it is more convenient to study simpler model systems *in vitro*, which was used in several studies of microtubule systems' self-assembly.

Surrey et al. observed a droplet of a solution with tubulin and kinesin (a plus-end oriented motor protein) [14]. Heated to $37C^{\circ}$, tubulin polymerizes into microtubules that initially are distributed randomly and evenly. In approximately 90, seconds they form a "aster" in the center of the droplet. 90 more seconds later, the structure transitions to a "vortex" (Figure 1.5). With the increase in concentration of kinesins, "vortexes" transition to "asters".

In the case of the presence of both plus-end and minus-end oriented motor proteins, "asters" transition to "bundles", structures similar to mitotic spindles [15].

Experiments in droplets of various sizes also yield interesting observations. In droplets of size greater than $\approx 29 \ \mu\text{m}$ in diameter, microtubules form "asters". In droplets of diameter ($\approx 20 \ \mu\text{m}$), we can observe "semi-asters" with the center at the droplet's edge. With the diameter of the droplet decreasing even more, microtubules for a "well", lying along the droplet's border [16].

1.2 Analysis of cell images

Analysis of cell images is a widely used technique that can give insight into the state of single cells, tissues, and even whole organisms [17, 18].

In the area of the analysis of histological images, most tasks separate into the following groups:

- Image segmentation. Extraction of objects from images for the subsequent analysis of these objects.
- Object detection. Detection of specific objects in the image. Determination of the absence or presence of the object in the image.
- Morphological analysis. Determination of parameters of images as a whole that characterize the physiological conditions of the subject.



Picture 1.5: Examples of microtubule self-assembly structures: "asters" (A,D), "vortexes"(B), "bundles"(C), "semi-aster"(D), "well"(E); from [14, 16].

1.2.1 Analysis of the radiality of microtubule networks

In eukaryotic cells in the interphase microtubule form a radial system, a "aster". Under the influence of some chemical agent, for example, paclitaxel (taxol), microtubules stabilize, which in turn leads to the entanglement of the microtubule network.

Figure 1.6 shows examples of cells with radial and chaotic microtubule networks.

The analysis of radiality of microtubule networks may yield additional information about the cell, including the influence of various chemical agents. Taxol, for example, is a chemotherapy drug, so the analysis of the cell's reaction to it may give us information about a person's sensitivity to that particular drug [19].

Most of the analysis and classification of microtubule radiality is done through experts' evaluation, and the need for an automatic method is clearly present.



Picture 1.6: (A) Radial microtubule network. (B) Chaotic microtubule network.

1.2.2 Convolutional neural networks for image analysis

Convolutional neural networks were first presented in a paper by LeCun et al. [20] and are based on the application of convolutions, which are sum of products of point-wise multiplications of two tensors (Figure 1.7). The result of the convolution application is a so-called convolutional map. Higher numbers in a convolutional map correspond to higher correlations between the image part and the convolution. This allows us to detect specific shapes in images.

Convolutional maps can be seen as images themselves, which means that we can apply subsequent convolutions to them.

Figure 1.8 shows the architecture of one of the first convolutional networks (LeNet5). This network consists of three convolutional layers and three fully connected layers, where every neuron of the previous layer is connected to every neuron of the current layer. The output of every neuron is the sum inputs with an applied non-linear activation function. In LeNet5 this activation function is the sigmoid:

$$x_j^l = \sigma(s_j^l) = \frac{1}{1 + e^{-s_j^l}},$$
(1.1)



Picture 1.7: Application of convolution operation. Green is the source tensor. Yellow is the convolution filter. Red numbers are convolution weights. Pink is the resulting convolutional map.

where s_j^l is the incoming signal to neuron j in layer l, so that $\sum_i (x_i w_{i,j})$, and x_i^{l-1} is the outgoing signal of neuron i in layer l-1, and $w_{i,j}$ is the weight coefficient. These weights coefficients w are what is trained in neural networks.

While sigmoid function was more present in early neural networks, the most popular activation function now is ReLU (Rectified Linear Unit).

$$\sigma(s) = max(0, s) \tag{1.2}$$

ReLU activation function allows for a significant decrease in training and inference time. Figure 1.9 shows both sigmoid and ReLU activation functions.

Training of neural networks, i.e., determining the weight coefficients w is done through gradient backpropagation [22] and gradient descent. The main idea is that to minimize some loss function C, we need to go in the direction opposite to the gradient $\nabla_w C(w)$. Calculation of the gradient starts from the last layer and then is done for previous layers, hence, backpropagation.

We can express the gradient of the loss function by an individual weight w_{ij}^l between neuron j of layer l and neuron i of layer l - 1 using the chain rule:



Picture 1.8: Architecture of LeNet5 convolutional neural network ([21]).



Picture 1.9: Activation functions of neural networks. The horizontal axis is the input, and vertical is the output of the neuron.

$$\frac{\partial C(w)}{\partial w_{ij}^l} = \frac{\partial C(w)}{\partial s_j^l} \times \frac{\partial s_j^l}{\partial w_{ij}^l}$$
(1.3)

The first part of the equation is the output of the neuron from the previous layer:

$$\frac{\partial s_j^l}{\partial w_{ij}^l} = x_i^{l-1} \tag{1.4}$$

The second part we will denote δ_i^l :

$$\delta_i^l = \frac{\partial C(w)}{\partial s_i^l} \tag{1.5}$$

Let us take as an example the task of object classification. The last layer L consists of one neuron per class. Output values of neurons correspond to probabilities of specific classes and are determined via the softmax function [23]:

$$x_i^L = Softmax(s_i) = \frac{e^{s_i}}{\sum_j e^{s_j}}$$
(1.6)

Commonly use classification loss function for softmax is the cross-entropy:

$$C(w) = -\sum_{i} o_i log(x_i^L), \qquad (1.7)$$

where $o_i = 1$ for the correct class neuron and $o_i = 0$ for every other neuron. Then we can calculate the δ_i^L as:

$$\delta_i^l = \frac{\partial C(w)}{\partial s_i^L} = o_i - x_i^L \tag{1.8}$$

For every previous layer, we can express this value through values on the next layer:

$$\delta_i^{l-1} = \frac{\partial C(w)}{\partial s_i^{l-1}} = \sum_j \frac{\partial C(w)}{\partial s_j^l} \times \frac{\partial s_j^l}{\partial x_i^{l-1}} \times \frac{\partial x_i^{l-1}}{\partial s_i^{l-1}} = \sum_j \delta_j^l \times w_{ij}^l \times \sigma'(s_i^{l-1}) \quad (1.9)$$

Backpropagation algorithm then takes the following form:

- 1. Initialize w at random.
- 2. Forward pass: calculate x and s.
- 3. Backward pass: calculate δ .

4.
$$w_{ij}^l \leftarrow w_{ij}^l - \eta x_i^{l-1} \delta_j^l$$

5.
$$\rightarrow$$
 (2).

 η denotes the learning rate.

1.2.3 Transfer learning in the case of limited data

To train a deep convolutional network, we need a large amount of data. When we deal with a limited amount of data, with the increase in the number of parameters w, the probability of so-called overfitting also increases. Instead of learning general relevant features, the network instead "memorizes" the dataset [24].

One of the ways to fight that problem is transfer learning [25,26]. During transfer learning, network training occurs in two stages (Figure 1.10):



Network B

Picture 1.10: Transfer learning process. From a pretrained on a large dataset network A, we transfer convolutional weight of the several first layers to network B. We then train network B for the final task, while keeping the transfer weights frozen.

- Pretraining on a big dataset of the same nature. For example, to classify cell images, we can pretrain a deep network, such as ResNet [27] and VGG [28] on the ImageNet dataset that consists of images collected from the world wide web ImageNet [29].
- 2. From the pretrained network, several first layers, that learned relevant features are transferred to a network for the end task. The weights in these layers do not change during the training process on the final data.

In this way, at the first stage, the network is trained to extract relevant features, while at the second stage, the network uses these features for the end task.

1.2.4 Support vector machines for cell image classification

Support vector machines (SVM) can also be employed together with a pretrained neural networks. This method is especially useful in a case of limited data, since it can be mathematically shown whether or not it overfits in a particular task.



Picture 1.11: Support vector machines task formulation. The algorithm is tasked with finding a hyperplane that is the furthest from point in classes, i.e., the hyperplane with the widest margin.

Support vector machines were first described in a work by Cortes and Vapnik [30]. Mathematical formulation of its task is to find a hyperplane, defined by the equation $w^{T}x - b = 0$, that maximizes the distance to a nearest point in either of the classes (Figure 1.11).

We can note that, if we multiply the vector w and scalar b by the same number, it would result in no changes in the hyperplane. Therefore, we can scale them both so that the expression $w^{T}x - b$ for closes points y = +1 is y = -1 would be equal to +1 and -1 respectively. The width of the margin then becomes expressed as $\frac{2}{|w|}$. It allow us to formulate the SVM task as:

$$\begin{cases} \frac{1}{2} \mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x} \to \min\\ y_i(\mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x}_i - b) \ge 1 \end{cases}$$
(1.10)

It must be noted, that in this formulation, the SVM algorithm only works for linearly separable classes. In linearly inseparable case, we can reformulate in the following way:

$$\begin{cases} \frac{1}{2} \mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x} \to \min\\ y_i(\mathbf{w}^{\mathrm{T}} \mathbf{x}_i - b) \ge 1 \end{cases}$$
(1.11)

Here the ξ coefficients allow a deviation from 1 for so called "bad"vectors that can both lie in the margin and the wrong class. C coefficient regulates the prioritization of either the margin width or the number of "bad"vectors.

To find the optimal solution we can employ any of the multiple methods of quadratic programming, such as CVXOPT [31]. The solution for w is in form of the sum of some of the vectors in the training sample: $w = \sum \alpha_i x_i$. Vectors with positive α are called "support vectors".

The SVM methods was employed in several works on the classification of cell images, where features were either original pixel values, or meta-features that were calculated for an image as a whole [32, 33]. In recent works, more and more we see the application of the SVM algorithm with features extracted by a pretrained neural networks [34]. This method is similar to transfer learning, except we use SVM and not a small neural network for the final task.

1.3 Modeling of intracellular structures

1.3.1 Models of microtubule network dynamic

Many models of microtubule networks were developed in recent years, both of single microtubules and microtubule networks [35, 36]. The simplest model of a microtubule represent it as a linear structure, characterized by a single parameter L, and the dynamic only occurs on the plus-end. In this model, a microtubule can exist in two states, growth and "catastrophe". In both states, the speed of either growth or shrinking is constant. Other parameters of the model include state transition probabilities and the maximum length of microtubule. This model approximates a real-world microtubule well enough. An improvement on this model takes into

account the state of the plus-end tubulin, which can be either GTP or GDP bound. In this case, transition probabilities depend on the hydrolysis of the GTP molecule [4].

Next class of models places several microtubules within the cell space. Microtubules can be either straight or bendable linear structures. These models often add the minus-end dynamic that is needed for treadmilling simulations. These models allow observation of not only a single microtubule dynamic, but also a dynamic of microtubule networks as a whole.

Some tasks require the introduction of the motion of microtubules to the system, for example, under the influence of transport proteins. In these cases, microtubules' mechanical properties need to be taken into account [37]. Most often, microtubules are approximated as elastic rods or chains of several rigid segments, joined by flexible connections [38].

Mechanical properties of stable microtubule were studied in [39], where microtubule wall was modeled as a flexible two-dimensional surface with inside and outside curvature radii.

Most of the described models, however, only present a simple cell geometry and do not allow the study of the effects of complex geometry.

1.3.2 Microtubule structures self-assembly models

At this moment, researchers identify five main structures that self-assemble from microtubules under various conditions *in vitro*, namely "aster", "vortex", "bundle", "semi-aster", and "well" (Figure 1.5).

Most researchers resorted to two-dimensional models since most structures studied were observed in a flat droplet; hence the environment can be said to be quasi-two-dimensional. A three-dimensional simulation also would take much more computational resources.

Surrey et al. [14] recreated "asters", "vortexes", and "bundles" by modeling microtubules as flexible filaments and introducing various concentrations of plusend and minus-end directed motor proteins (Figure 1.12A-C). "Wells" were recreated *in silico* in [16].

Modeling of "semi-asters" remains a harder task. To model "semi-aster" structure, Head et al. introduced additional forces to the system that pushes away microtubules at a small distance [40]. This interaction is not only yet to be discovered, but also it restricts the initial state of the model, making the network less chaotic and more ordered than what we observe *in vitro* (Figure 1.12D,E).



Picture 1.12: Models of self-assembling microtubule structures, namely "asters" (A,D), "bundles" (B), "vortex" (C), and "semi-star" (E) [14, 16, 40].

Chapter 2

Methods of image analysis and imitational modeling

2.1 Software and libraries used

- For cell image segmentation, we have used the JDeli library.
- For building neural networks, we have used Tensorflow and PyTorch libraries for Python.
- For the development of the model of the microtubule network and microtubule self-assembly, we have used the OpenGL library for the C++ programming language.
- For statistics calculation and graph drawing, we have used Microsoft Excel software and Matplotlib package for Python.
- For the processing of images and figures, we have used the Adobe Photoshop CC software.

2.2 Segmentation of microtubule network images

To extract images of single cells from raw microscopy images that contain groups of cells, we have created a method based on the bread-first search algorithm, where the graph consists of neighboring pixels (including diagonally).

At the first step, we extract components of pixels with brightness higher than some predetermined threshold. The result of this step can be seen in Figure 2.1.

At the second step, each edge is weighted according to its brightness, and we launch the breadth-first search from found components. Therefore, for every pixel, we find the closest component.

We then assign pixels to the closest component. The result of the second step can be seen in Figure 2.2.



Picture 2.1: The result of the first step of the cell segmentation algorithm — the selection of graph components in a graph of the brightest neighboring pixels.

To optimize the parameters of the segmentation algorithm, we manually segmented several images. After optimization, the IoU (intersection over union) metric have surpassed 90%. Since segmentation is just a supplemental step in our pipeline, we have not set a goal to go over this result.

2.3 Radiality statistic by clusters of the brightest pixels

To access the radiality of a microtubule system, we propose a method, based on the following criterion:

$$W = \sum_{t \in A} [(x_t - x_m)^2 + (y_t - y_m)^2], \qquad (2.1)$$

where x_t and y_t — are coordinates of the brightest k% of pixels, x_m and y_m — coordinates of the geometric center of the cluster of these pixels. Examples of such



Picture 2.2: The result of the second step of the cell segmentation algorithm — the assignment of pixels to the closest component.

clusters can be seen in Figure 2.3. This figure shows that this cluster is more compact for cells with a more radial network.

This criterion, however, is less stable when we deal with different sized and shaped cells. To take this into account, we modify it in the following way:

$$W_n = \sum_{t \in A} \left[\frac{(x_t - x_m)^2}{a^2} + \frac{(y_t - y_m)^2}{b^2} \right],$$
(2.2)

where a and b — are lengths of the major and the minor axes of the ellipsis that circumvent the cell (Figure. 2.4). This criterion shows a good correlation with the concentration of the taxol agent (Figure 3.2), that stabilizes and entangles the microtubule network.



Picture 2.3: Examples of clusters of (brightest 3% of pixels) for a radial network(A), and for a network with disturbed radiality (B).



Picture 2.4: Examples of cells of different sizes and shapes and an ellipsis that is used in a modified cluster criterion.

2.4 Classification of cell images with convolutional neural networks

Since we had a limited number of cell images to work with (2000 for each class), training of a deep convolutional neural network leads to overfitting, i.e., the situation where instead of extracting general features that are relevant to the end task we learn single image-specific features.

To fight the overfitting, we have employed the following approaches:

- Small neural network architecture, less prone to overfitting.
- Image augmentation to increase the size of the dataset.

• Transfer learning of a pretrained deep convolutional neural network.

2.4.1 Small neural network architecture

Figure. 3.3 shows the architecture of the best small convolutional neural network that we have used. This architecture allows us to avoid overfitting on a relatively small dataset.

Hyperparameters of the network were optimized through grid search in the following sets:

- 1. The number of convolutional layers varied from 1 to 5.
- 2. The number of pulling layers varied from 0 to 5.
- 3. The number of maps in layers varied from 8 to 256.
- 4. The sizes of convolutional filters varied from 2x2 to 5x5.
- 5. The number of fully connected layers varied from 1 to 4.
- 6. The sizes of fully connected layers varied from 16 to 512.

The best set of hyperparameters is described in Chapter 3.1.2.

2.4.2 Application of sharpen mask

Microtubules are linear structures of constant width. To that end, we assume that all the information that describes a microtubule network can be extracted if we approach microtubules as effectively one-dimensional structures.

However, in the process of the acquisition of microtubule images, because of fluctuations in camera parameters, such as focal distance, we may observe fluctuations in the width of microtubules in images, which lead to additional noise in the image.

To improve the performance of our convolutional neural network, we applied the sharpen method from the PIL library for Python. Result of such application can be seen in Figure 2.5.



Picture 2.5: Cell image before (left) and after (right) the application of the sharpen method.

2.4.3 Transfer learning of a pretrained deep neural network

For transfer learning, we have used networks that were pretrained on ImageNet dataset [29], namely VGG [28], ResNet [27], and MobileNet [41].

From these pretrained networks, we took convolutional layers and then appended two fully connected layers (sizes 128 and 64). In the process of training on our dataset, weights in convolutional layers remained frozen, and only fully connected layers were trained. This approach allows the use of pretrained features while avoiding overfitting.

2.5 Microtubule network model in a cell of complex geometry

The main structural element in our model is a virtual tubulin cluster, that is represented by a polar directed cylinder with the following attributes: coordinates in a 3D space, direction vector, phosphorylation of attached nucleotides, and the number of tubulin dimers in a cluster, i.e., the length of the cylinder.

These clusters are connected in chains (virtual microtubules). These chains are represented in code as lists of virtual clusters.

The model has these hyperparameters:

- Probability coefficients for attachments and detachments.
- Parameters of the distribution of the angle of cluster direction upon attachment.
- Breaking coefficient.
- Tubulin concentration in the cell.
- Tubulin cluster size.

The probability of cluster attachment to the end of a microtubule is defined by the following equation:

$$P_{attach} = C_{attach} \times C_{free} = \frac{C_{attach} \times N_{free}}{V_{cell} \times N_a},$$
(2.3)

where C_{attach} is the probability coefficient, C_{free} is the concentration of free tubulin, N_{free} is the number of free tubulin dimers in the cytoplasm, V_{cell} is the volume of the virtual cell, and N_a is the Avogadro's constant. This way, the probability of attachment is higher with the rise of free tubulin concentration.

Probability of detachment $P_{dettach} = C_{dettach}$, where C_{detach} is the probability coefficient of detachment.

Probability of break $P_{break} = 1 - 1.5^{C_{break} - L_{chain}}$, where L_{chain} is the length of the chain, and C_{break} is the breaking coefficient. The probability is higher, the higher the length of the microtubule. When the chain breaks, two new chains emerge.

Probability of nucleation (emergence of a new microtubule) in a random space $P_{nucl} = \frac{C_{nucl} \times N_{free}}{V_{cell} \times N_a}$, where C_{nucl} is the probability coefficient of nucleation.

When a new cluster is attached to a plus-end of an existing microtubule, we randomly determine the angle of the new cluster to the vector of the current plus-end cluster, i.e.:

- Rotation angle $\omega = random[0:1] \times 2\pi$.
- Deviation angle $\phi = random[0:1] \times 0.5\pi$.

Before attaching a new cluster, we first check, so it does not intersect with any existing objects. In the case that it does, the cluster is not attached.

We also have introduced several zones to our virtual cells that correspond to various real-world elements that might influence the dynamics and geometry of microtubule networks. These zones include:

- Virtual centrosome space of increased nucleation probability and decreased detachment probability.
- Virtual nucleus space, excluded from the cell space available for microtubules.

Figure 2.6 shows the interface of our model, the program we dubbed Mimitation.



Picture 2.6: Mimitation program interface, the program to model the dynamics of microtubule networks in a virtual cell.

2.6 Microtubule in vitro self-assembly model

To combine the simplicity of a 2D model with the complexity of 3D, we developed a quasi-3D approach. We create N_{layers} of 2D layers populated by microtubules and

motor proteins, that can transition between layers with probability p_{layer} . Only objects on the same layer may interact with each other.

Solution droplet with microtubules is represented by a circle with radius R. This droplet contains $N_{tubules}$ microtubules with the average length L, N_+ plus-end and N_- minus-end oriented motor proteins.

Microtubules are modeled according to [38] and are chains of $N_{segments}$ segments, joined with flexible connections that create a rotation force according to the following equation:

$$M_i = \beta d(\pi - \alpha_i), \tag{2.4}$$

where d is the length of a microtubule segment, β is the stiffness coefficient, and α is the angle between segments.

Motors are modeled as small circles that can attach to microtubules upon contact with the probability p_{attach} . All motor proteins can attach to no more than two microtubules. After attachment, the motor protein starts to move in its direction with speed v. When the motor reaches the end, it detaches with the probability p_{detach} .

Free-flowing motor proteins move via Brownian motion [42].

The viscous environment creates resistance for microtubules and motors due to Stokes's law. To calculate the resistance of the cytoplasm to a moving microtubule, we use the Riley equation:

$$F_S = 6\pi\eta r v, \tag{2.5}$$

where η is the dynamic viscosity of the cytoplasm, r is the radius of the object, and v is the speed of the object.

The hyperparameters of the model are concentrations of microtubules and motor proteins, size of the droplet, and attachment and detachment probabilities.

Chapter 3

Results of the analysis and modeling of microtubule systems

3.1 Microtubule network geometry analysis

The results described in this chapter are published in [43, 44].

For the experiments on microtubule network geometry analysis, we collected a dataset with CV1 cell images under different concentrations (0, 0.1M, and 1M) of the microtubule-stabilizing agent with anti-cancer properties, taxol. This agent stabilizes microtubules and prevents their disassembly that leads to microtubule network entanglement. As the microtubule network actively participates in cell division during mitosis, this entanglement leads to an inhibition of mitosis and tumor growth.

Examples of the images of cells under different concentrations of taxol can be seen in Figure 3.1.



Picture 3.1: Examples of CV1 cell images under different concentrations of taxol agents (0, 0.1M, and 1M).

We postulated the following classification tasks both for automated methods and human experts:

• Three class classification (0, 0.1, 1).

- Binary classification (0 vs. 0.1).
- Binary classification (0 vs. 1).
- Binary classification (0.1 vs. 1).

Altogether, we collected 200 images of cell groups for each class that leads to 2000 images of individual cells for each class. Single-cell images have been extracted with the method described in 2.2. After extraction, all images have been resized to 300x300 pixels.

Apart from automatic methods, we also asked three experts to classify images. Results of two variants of expert classification, namely voting and classification by the best experts, are shown in Table 3.1. For three-class classification, we used 300 images, for binary classification — 200 images.

3.1.1 Cluster analysis of the brightest pixels

Values of cluster analysis characteristic, described in Chapter 2.3, that were calculated for different percentage levels of the brightest pixels selected, can be seen in Figure 3.2.

As can be seen from Figure 3.2, the resulting characteristic correlates well with taxol concentration levels, especially at 1-3% of the brightest pixels selected. However, the classification of images only according to this characteristic shows sub-par results in comparison with convolutional neural networks and human experts (Table 3.1).

3.1.2 Microtubule network analysis with convolutional neural networks

In contrast with, for example, ImageNet dataset that collects millions of images of 1000 classes, microtubule images contain few distinctive features and the size is relatively small due to the complex acquisition process, the use of standard deep learning networks, such as VGG [28], ResNet [27], and MobileNet [41]) leads to inevitable overfitting.

In cases like these, two main approaches are utilized: reduction of network size in terms of the number of layers and neurons, and the use of pretrained network through transfer learning. In this work, we utilize both approaches.



Picture 3.2: Values of cluster characteristic of the brightest pixels for cell images under different concentrations of taxol agent (0, 0.1М и 1М).

For a small convolutional network, we used the network shown in Figure 3.3. It contains the following layers:

- 1. Input layer black and white 8-bit image. Size 300x300 pixels.
- 2. Convolution. 16 filters. Filter size $-2x^2$. Stride $-1x^1$.
- 3. Max pooling. Kernel size 2x2. Stride 2x2.
- 4. Convolution. 64 filters. Filter size -3x3. Stride -1x1.
- 5. Max pooling. Kernel size 2x2. Stride 2x2.
- 6. Fully connected layer. 32 neurons.

- 7. Fully connected layer. 32 neurons.
- 8. Output layer softmax layer with cross-entropy as the loss function.



Picture 3.3: Simple architecture network for microtubule image classification.

Training parameters were as follows:

- Optimizer "NAdam" ("Adam" [45] with Nesterov momentum).
- Learning rate 0.002.
- Weight decay coefficient 0.01.
- Dropout coefficient 0.5.
- Batch size 32.

To improve classification performance, we used the following techniques on our dataset:

• Application of sharpen mask from the PIL Python package.

• Turns and mirroring for data augmentation. This increased our dataset size 8 fold. It is important to note that images and their augmentations were not separated between the training and testing dataset.

Classification results in Table 3.1 show that these methods actually increase the accuracy of the algorithm.

Even this small neural network performs on par with human experts and, in one case (0.1 M vs. 1 M) — even outperforms them (p-value = 0.008).

For the second approach, we used pretrained (on the ImageNet dataset) deep neural networks, namely VGG [28], ResNet [27], and MobileNet [41]. The weights in convolutional layers of the network were frozen, and only the additional fully connected layer was trained. The best results were achieved with MobileNet [41], shown in Table 3.1. We also employed an SVM model that was trained on features from a pretrained network.

As can be seen from Table 3.1, transfer learning demonstrates the best results despite the fact that pretraining was performed on a drastically different type of data. This indicates that convolutional features cover enough information about cell images.

Task	Vote	Best	Cl.	CNN	CNN-T	CNN-T-S	CNN-SVM	CNN-Tran
3 classes	62	62.7	61	57.7	59	66	75.0	76.7
0 vs. 0.1	89	90.5	80	79.5	84	88.5	90.5	93
0 vs. 1	90.5	93	76	88	90.5	91	93	96.5
0.1 vs. 1	51	52	60	55	56	70.5	70.5	71

Table 3.1: Results (in percents) of classification of images of cellular microtubules under different concentrations of taxol chemical agent. Tasks were: three class multi-classifications and three binary classification pairwise. Vote denotes human expert classification by expert voting, Best — by the best expert, Cl.[uster] — automatic classification by cluster characteristic. Classification by neural networks was performed in four variants: CNN — small convolutional neural network,

CNN-T - same small network with data augmentation, CNN-T-S - same small network with data augmentation and sharpen mask, CNN-SVM - SVM trained on features from a pretrained network, CNN-Tran - transfer learning of deep neural network (data augmentation was also used in this case).

3.2 Computer model of microtubule network dynamics

The results presented in this section have been evaluated by experts in the field and are published in [46–51]

Our Mimitation program has shown good results in terms of modeling of microtubule behavior in cytoplasmic space, especially in cytoplasts with no centrioles. We can observe complex events, including catastrophes and treadmilling. In the next chapters, we present the results of modeling various *in vivo* experiments and studies of how various parameters may influence the microtubule network.

3.2.1 Mitchison-Kirschner Experiment

A well-known Mitchison-Kirschner experiment [52] goes as follows. Microtubules *in vitro* are mechanically fragmented by going through the needle of a syringe, then, in the presence of GTP, microtubule restore. The interesting thing is that at first, we see a several-fold increase in the number of microtubules due to fragmenting, but the system is not stabilized at this increased number, but rather microtubules revert to a number and length close to the original.

To recreate this effect, we momentarily increase the C_{break} parameter that controls the brittleness of model microtubules. After this increase, microtubules fragment. We then observe the full recreation of the Mitchison-Kirschner experiment with the initial increase in microtubule number followed by restoration of the original system state. That shows that we do not need to introduce any additional factors, except for the limited concentration of tubulin. This phenomenon can be explained by lesser stability of the short microtubule, while with increase in length, the stability of the microtubules increases as well (Figure 3.4).

3.2.2 The role of GTP hydrolysis

GTP hydrolysis is one of the factors that is very hard to study since it are very hard to influence that parameter in a live cell. This inhibits our ability to study the influence of GTP activity on the microtubule system. This is one of the ways a computer model can help since it is in our power to change any part of it.



Picture 3.4: In silico recreation of the Mitchison-Kirschner experiment.

As *in silico* experiments show, the GTP hydrolysis is a crucial part of the network's stability. Without it, the system goes through violent fluctuations (Figure 3.5).



Picture 3.5: The influence of GTP hydrolysis on the microtubule network's stability.A,C,D) Dependence of the number of incorporated tubulin segments in time in the presence and absence of GTP hydrolysis and under different probabilities of polymerization. B) Microtubule network with no GTP hydrolysis.

3.2.3 Influence of cell geometry

Again, one of the hard-to-study parameters is the cell geometry. With our model, it is, however, very easy to control it. Figure 3.6 shows the dynamic of the microtubule network in various geometries, from simple to complex ones. All experiments have been performed in the same volume by cutting and pasting cell fragments from one place in the cell to another.



Picture 3.6: Influence of cell geometry on microtubule network dynamics under low (A) and high (B) tubulin polymerization probability.

3.3 Self-assembly of microtubule structures in the quasi-three-dimensional model

The results described in this section have been evaluated by experts in the field and are published in [53].

The general purpose of these experiments has been to recreate structures observable *in vitro*. Default parameters have been set as follow:

- The radius of the droplet $(R) 16 \,\mu\text{m}$;
- The number of 2D layers $(N_{layers}) 3$;
- The probability of layer transition $(p_{layer}) 0.2$;
- The number of microtubule segments $(N_{tubules}) 150;$
- The number of microtubules $(N_{tubules}) 150;$
- The probability of motor attachment upon contact to a microtubule (*p_{attach}*) 0.9;
- The probability of motor detachment from the plus-end of a microtubule $(p_{dettach.pos}) 0.8;$
- The probability of motor detachment from the minus-end of a microtubule $(p_{dettach.neg}) 0.01;$

With these parameters, we can observe the formation of a "aster" and its transition into a "vortex" (Figure 3.7A).

With shorter microtubules, we can form a stable "aster" (Figure 3.7B). With a more even mixture or even detachment probability of plus- and minus-end motors, we see the formation of "bundles" (Figure 3.7D).

With a decrease in droplet size as in [16], our model fully recreates observable structures (Figure 3.8). In a 11 μ m droplet, we see a "aster" forming in the center and then shifting to the edge to form a "semi-aster". In a 6 μ m droplet, a "well" forms nearly instantly due to the mechanical properties of microtubules.



Picture 3.7: Model of microtubule network self-assembly *in vitro*. Numbers reflect program steps. A) A "aster" transitioning into a "vortex" B) Plus-end "aster". C)Minus-end "aster". D,E) "Bundles" with an equal number of plus- and minus-end motors but different detachment probability.



Picture 3.8: Model of microtubule system self-assembly in various sized droplets of radius R. Numbers reflect program steps. A) "Aster", $R = 20 \ \mu\text{m}$. B) "Well", $R = 6 \ \mu\text{m}$. C) "Aster" transition to "semi-aster", $R = 11 \ \mu\text{m}$. D) In 2D space we see no transition to "semi-aster".

Chapter 4

Discussion of results of image analysis and imitational modeling of microtubule systems

4.1 Cellular microtubule image analysis

In this work, we performed an analysis of images of CV1 cells with the following methods:

- 1. The cluster analysis of the brightest pixels.
- 2. The analysis with convolutional neural networks of simple architecture.
- 3. The analysis with deep convolutional neural networks and transfer learning.

The cluster characteristic have demonstrated a good correlation with the concentration of the chemical agent (taxol) that stabilizes microtubules and entangles microtubule networks.

To compare different methods, we postulated a classification problem with three classes of a different concentration of taxol (0 vs. 0.1M vs. 1M). We looked at three class multi-classification and three different binary classification (pair-wise). The best algorithm in that task turned out to be deep convolutional neural networks trained through transfer learning. This method also outperformed human experts in this task.

This demonstrates an ability of pretrained neural networks to be applied in the analysis of domain-specific images, such as cell images, despite the fact that the data used for the pretraining could be of different nature, such as general images pulled from the internet.

4.2 Cell space and microtubule network model

Imitational modeling opens new possibilities for the study of hard-to-predict effects of various parameters of dynamic systems, such a cell functions. With this model, we can demonstrate how cell geometry can influence microtubule network and compare the results with the results obtained *in vivo*.

In the future, we plan to add new elements to that model, such as pliable cell membrane that interacts with the dynamic cytoskeleton to model cell motility, transport and diffusible molecules for modeling of material redistribution in the cell, and various cytoskeleton elements for modeling of mitosis and other complex cell processes.

4.3 Microtubule network self-organization

The task of studying microtubule self-organization lies in the analysis of the complex relationship between the geometry and properties of cellular motor proteins. Experimental observations over these systems occur in an environment of thin films that has properties of both two- and three-dimensional systems.

On the one hand, microtubules are limited in their movement that, in turn, leads to the formation of specific structures. On the other, the model in the two-dimensional space fails to reproduce all observable *in vitro* structures.

We proposed a new, quasi-three-dimensional method of modeling the selforganization of microtubule structures that consists of several two-dimensional planes that microtubules and motors can travel between.

This method allowed us to realize all observable structures, and it must be noted that, in contrast with work by Head et al. [40], we did not need to introduce additional interactions to the system with no physical mechanism behind them. This approach can show promise in the study of processes that occur in flat environments.

Conclusion

In the process of working on this thesis we have achieved the following:

- 1. We created a dataset and performed an analysis of images of microtubule systems, both with the cluster characteristic of brightest pixels and with convolutional neural networks. The cluster characteristic of the brightest pixels of microtubule images correlates well with the taxol agent concentration that stabilizes microtubules and leads to their entanglement. Pretrained convolutional neural net through transfer learning outperforms both that cluster characteristic as well as human experts in the task of classification of cell images according to the taxol concentration.
- 2. We have created a computer program that allows modeling a cell of complex geometry and includes dynamic microtubules. This model can reproduce various effects observable *in vivo* with no additional factors introduced to the system.
- 3. We have developed a model of microtubules self-organization in a quasithree-dimensional space that includes physically accurate microtubules in the viscous medium along with transport proteins. This Quasi-three-dimensional model of microtubule self-organization *in vitro* can reproduce most observable structures with no additional factors except the presence of microtubules and motor proteins.

We believe that these results make a substantial contribution to the area of computer analysis and modeling of intracellular systems.

List of pictures

1.1	Microtubule's structure (from [2])	10
1.2	Microtubules in an live interphase cell [4]	11
1.3	Polymerization (growth) and depolymerization ("catastrophe") of a	
	microtubule [4]	13
1.4	Plus-end proteins of a microtubule [9]	14
1.5	Examples of microtubule self-assembly structures: "asters" (A,D),	
	"vortexes"(B), "bundles"(C), "semi-aster"(D), "well"(E); from [14, 16].	16
1.6	(A) Radial microtubule network. (B) Chaotic microtubule network	17
1.7	Application of convolution operation. Green is the source tensor.	
	Yellow is the convolution filter. Red numbers are convolution weights.	
	Pink is the resulting convolutional map.	18
1.8	Architecture of LeNet5 convolutional neural network ([21])	19
1.9	Activation functions of neural networks. The horizontal axis is the	
	input, and vertical is the output of the neuron	19
1.10	Transfer learning process. From a pretrained on a large dataset	
	network A, we transfer convolutional weight of the several first layers	
	to network B. We then train network B for the final task, while keeping	
	the transfer weights frozen.	21
1.11	Support vector machines task formulation. The algorithm is tasked	
	with finding a hyperplane that is the furthest from point in classes,	
	i.e., the hyperplane with the widest margin	22
1.12	Models of self-assembling microtubule structures, namely "asters"	
	(A,D), "bundles" (B), "vortex" (C), and "semi-star" (E) [14, 16, 40]. $\ .$	25
2.1	The result of the first step of the cell segmentation algorithm — the	
	selection of graph components in a graph of the brightest neighboring	
	pixels	27

2.2	The result of the second step of the cell segmentation algorithm —	
	the assignment of pixels to the closest component	28
2.3	Examples of clusters of (brightest 3% of pixels) for a radial	
	network(A), and for a network with disturbed radiality (B)	29
2.4	Examples of cells of different sizes and shapes and an ellipsis that is	
	used in a modified cluster criterion.	29
2.5	Cell image before (left) and after (right) the application of the sharpen	
	method	31
2.6	Mimitation program interface, the program to model the dynamics of	
	microtubule networks in a virtual cell	33
3.1	Examples of CV1 cell images under different concentrations of taxol	
	agents (0, 0.1M, and 1M)	35
3.2	Values of cluster characteristic of the brightest pixels for cell images	
	under different concentrations of taxol agent (0, 0.1Ми 1М)	37
3.3	Simple architecture network for microtubule image classification	38
3.4	In silico recreation of the Mitchison-Kirschner experiment	41
3.5	The influence of GTP hydrolysis on the microtubule network's	
	stability. A,C,D) Dependence of the number of incorporated tubulin	
	segments in time in the presence and absence of GTP hydrolysis	
	and under different probabilities of polymerization. B) Microtubule	
	network with no GTP hydrolysis	41
3.6	Influence of cell geometry on microtubule network dynamics under	
	low (A) and high (B) tubulin polymerization probability	42
3.7	Model of microtubule network self-assembly in vitro. Numbers reflect	
	program steps. A) A "aster" transitioning into a "vortex" B) Plus-end	
	"aster". C) Minus-end "aster". D,E) "Bundles" with an equal number	
	of plus- and minus-end motors but different detachment probability	44
3.8	Model of microtubule system self-assembly in various sized droplets	
	of radius R. Numbers reflect program steps. A) "Aster", $R = 20 \mu\text{m}$.	
	B) "Well", $R = 6 \mu m. C$) "Aster" transition to "semi-aster", $R = 11$	
	μ m. D) In 2D space we see no transition to "semi-aster"	45
A1	Certificate of implementation of results	58

List of tables

3.1 Results (in percents) of classification of images of cellular microtubules under different concentrations of taxol chemical agent. Tasks were: three class multi-classifications and three binary classification pairwise. Vote denotes human expert classification by expert voting, Best — by the best expert, Cl.[uster] — automatic classification by cluster characteristic. Classification by neural networks was performed in four variants: CNN — small convolutional neural network, CNN-T - same small network with data augmentation, CNN-T-S - same small network with data augmentation and sharpen mask, CNN-SVM - SVM trained on features from a pretrained network, CNN-Tran - transfer learning of deep neural network (data augmentation was also used in this case).

References

- Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky et al. W. H. Freeman & Co, 2003.
- Song Y. H., Mandelkow E. Recombinant kinesin motor domain binds to betatubulin and decorates microtubules with a B surface lattice // Proceedings of National Academy of Science USA. 1993. Vol. 90. P. 1671–1675.
- 3. Chentsov U.S. General Cytology. Moscow University Publishing, 2004.
- Howard J., Hyman A. A. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end // Nature. 2003. Vol. 422. P. 753–758.
- A microtubule-binding domain in dynactin increases dynein processivity by skating along microtubules / T. L. Culver-Hanlon, S. A. Lex, A. D. Stephens et al. // Nature Cell Biology. 2006. Vol. 8. P. 264–270.
- Molecular Biology of the Cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al. Garland Publishing, 2007.
- Arnal I., Karsenti E., Hyman A. A. Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in Xenopus egg extracts // Journal of Cell Biology. 2000. Vol. 149. P. 767–774.
- CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport / A. J. Lomakin, I. Semenova, I. Zaliapin et al. // Developmental cell. 2009. Vol. 17. P. 323–333.
- XMAP215 is a processive microtubule polymerase / G. J. Brouhard, J. H. Stear, T. L. Noetzel et al. // Cell. 2008. Vol. 132. P. 79–88.
- Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks / D. Mizuno,
 C. Tardin, C. F. Schmidt et al. // Science. 2007. Vol. 315. P. 370–373.

- 11. Carazo-Salas R. E., Nurse P. Self-organization of inter-phase microtubule arrays in fission yeast // Nature Cell Biology. 2006. Vol. 8. P. 1102–1107.
- Hentrich C., Surrey T. Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14 // The Journal of Cell Biology. 2010. Vol. 189. P. 465–480.
- Physical Mechanisms Redirecting Cell Polarity and Cell Shape in Fission Yeast / C. R. Terenna, T. Makushok, G. Velve-Gasquillas et al. // Current Biology. 2008. Vol. 18. P. 1748–1753.
- Physical Properties Determining Self-Organization of Motors and Microtubules / T. Surrey, F. Nedelec, S. Leibler et al. // Science. 2001. Vol. 392. P. 1167–1171.
- Goshima G., Nedelec F., Vale R. D. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins // Journal of Cell Biology. 2005. Vol. 171. P. 229–240.
- Effects of Confinement on the Self-Organization of Microtubules and Motors / M. Pinot, F. Chesnel, J. Kubiak et al. // Current Biology. 2009. Vol. 19. P. 954– 960.
- 17. A Review of Biological Image Analysis / Weiyang Chen, Weiwei Li, Xiangjun Dong et al. // Current Bioinformatics. 2018. 07. T. 13. C. 337–343.
- Gamarra Margarita, Zurek Eduardo, San Juan Vergara Homero. Study of Image Analysis Algorithms for Segmentation, Feature Extraction and Classification of Cells // Journal of Information Systems Engineering and Management. 2017. 08. T. 2.
- Weaver Beth A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // Molecular biology of the cell. 2014. T. 25, № 18. C. 2677–2681.
- 20. Backpropagation applied to handwritten zip code recognition / Yann LeCun, Bernhard Boser, John S Denker et al. // Neural computation. 1989. T. 1, № 4. C. 541–551.

- 21. Gradient-based learning applied to document recognition / Yann LeCun, Léon Bottou, Yoshua Bengio et al. // Proceedings of the IEEE. 1998. T. 86, № 11. C. 2278–2324.
- 22. Hecht-Nielsen Robert. Theory of the backpropagation neural network // Neural networks for perception. Elsevier, 1992. C. 65–93.
- Goodfellow Ian, Bengio Yoshua, Courville Aaron. Deep learning. MIT press, 2016.
- 24. Dropout: a simple way to prevent neural networks from overfitting / Nitish Srivastava, Geoffrey Hinton, Alex Krizhevsky et al. // The Journal of Machine Learning Research. 2014. T. 15, № 1. C. 1929–1958.
- 25. Lemley Joseph, Bazrafkan Shabab, Corcoran Peter. Transfer Learning of Temporal Information for Driver Action Classification // MAICS. 2017.
- 26. A survey on deep transfer learning / Chuanqi Tan, Fuchun Sun, Tao Kong et al. // International conference on artificial neural networks / Springer. 2018. C. 270–279.
- Deep residual learning for image recognition / Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren et al. // Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2016. C. 770–778.
- Simonyan Karen, Zisserman Andrew. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition // arXiv preprint arXiv:1409.1556. 2014.
- Imagenet: A large-scale hierarchical image database / Jia Deng, Wei Dong, Richard Socher et al. // 2009 IEEE conference on computer vision and pattern recognition / Ieee. 2009. C. 248–255.
- Cortes Corinna, Vapnik Vladimir. Support-vector networks // Machine learning. 1995. T. 20, № 3. C. 273–297.
- 31. Vandenberghe Lieven. The CVXOPT linear and quadratic cone program solvers // Online: http://cvxopt. org/documentation/coneprog. pdf. 2010.

- 32. Nanni Loris, Lumini Alessandra. A reliable method for cell phenotype image classification // Artificial intelligence in medicine. 2008. T. 43, № 2. C. 87–97.
- Blood cell image classification based on hierarchical SVM / Wei-Liang Tai, Rouh-Mei Hu, Han CW Hsiao et al. // 2011 IEEE International Symposium on Multimedia / IEEE. 2011. C. 129–136.
- 34. Convolutional neural networks for histopathology image classification: Training vs. using pre-trained networks / Brady Kieffer, Morteza Babaie, Shivam Kalra et al. // 2017 Seventh International Conference on Image Processing Theory, Tools and Applications (IPTA) / IEEE. 2017. C. 1–6.
- Vorobiev I.A., Maliy I.V. On the relation between length and dynamics of microtubules: edge effect and properties of spanned radial network // Cytology. 2008. T. 50. C. 477–486.
- Insights into cytoskeletal behavior from computational modeling of dynamic microtubules in a cell-like environment / I. V. Gregoretti, G. Margolin, M. S. Alber et al. // Journal of Cell Science. 2006. Vol. 119. P. 4781–4788.
- VanBuren V., Odde D. J., Cassimeris L. Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice // Proceedings of National Academy of Science USA. 2002. Vol. 99. P. 6035–6040.
- Kim M. J., Maly I. V. Deterministic mechanical model of T-killer cell polarization reproduces the wanderign of aim between simultaneously engaged targets // PLoS Computational Biology. 2009. Vol. 5. P. e1000260.
- Janosi I. M., Chretien D., Flyvbjerg H. Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state // Biophysical Journal. 2002. Vol. 83. P. 1317– 1330.
- 40. Head D. A., Briels W. J., Gompper G. Spindles and active vortices in a model of confined filament-motor mixtures // MBC Biophysics. 2011. Vol. 4. P. 18.
- MobileNets: Efficient Convolutional Neural Networks for Mobile Vision Applications / Andrew G. Howard, Menglong Zhu, Bo Chen et al. // CoRR. 2017. T. abs/1704.04861.

- 42. Brown R. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies // Philosophy Magazine. 1828. Vol. 4. P. 161–173.
- 43. Disturbance of the radial system of interphase microtubules in the presence of excess serum in cell culture medium / EV Usova, AV Burakov, AA Shpilman et al. // Biophysics. 2008. T. 53, № 6. C. 523–526.
- 44. Deep learning of cell classification using microscope images of intracellular microtubule networks / Aleksei Shpilman, Dmitry Boikiy, Marina Polyakova et al. // 2017 16th IEEE International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA) / IEEE. 2017. C. 1–6.
- 45. Kingma Diederik, Ba Jimmy. Adam: A Method for Stochastic Optimization // International Conference on Learning Representations. 2014. 12.
- 46. Shpil'man AA, Nadezhdina ES. Stochastic computer model of the cell microtubule dynamics // Biophysics. 2006. T. 51, № 5. C. 776–780.
- Shpilman AA, Nadezhdina ES. Stochastic Model of Microtubule Networks // International Conference on Mathematical Biology and Biophysics / ICMBB. 2006.
- Shpilman AA, Nadezhdina ES. Computational Stochastic Modeling of Cellular Microtubule Network // 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology / ASCB. 2006.
- 49. Shpilman AA, Nadezhdina EV. In silico vs in vitro: Mimitation v1.0 program allows to predict morphological and dynamic changes of tubulin cytoskeleton caused by microtubule stabilization // International Conference on Biological Motility / ICBM. 2008.
- 50. Shpilman A, Nadezdhina ES. Imitational Modeling of Cytoskeleton: Dynamics, Differentiation, Active Transport and Membrane Interactions // 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology / ASCB. 2008.

- Shpilman AA. Simple Computer Model Posibility of Non-Motor Microtubule Binded Gradient Transport // 49th Annual Meeting of theAmerican Society for Cell Biology / ASCB. 2009.
- Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth // Nature.
 1984. Vol. 312. P. 237–242.
- 53. Primako EV, Shpilman AA. Using Quazi-3D Approach for Microtubule Self-Organization Model // 5th International Conference on Mathematical Biology and Biophysics / ICMBB. 2014.

Appendix A

Certificate of implementation of results

АКТ О ВНЕДРЕНИИ

результатов кандидатской диссертационной работы

Шпильмана Алексея Александровича

«Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур»

Результаты диссертационной работы Шпильмана Алексея Александровича «Анализ и компьютерное моделирование микротрубочковых структур» внедрены в рабочий исследовательский и образовательный процесс АНО ДПО «Научно-исследовательский и образовательный центр «ДжетБрейнс».

- Разработанная Шпильманом А.А. программа для моделирования динамики внутриклеточной микротрубочковой системы позволяет проводить широкий класс исследований в области моделирования внутриклеточных систем.
- Разработанная модель также позволяет осуществлять большое количество образовательных проектов, позволяя наглядно демонстрировать функционал внутриклеточных компонентов.

Представленные в работе рекомендации могут служить основой для разработок компании в соответствующей области.

Директор АНО ДПО «Научно-исследовательский и образовательный центр «ДжетБрейнс»: Olle /Иванов Андрей Владимирович/

Picture A1: Certificate of implementation of results.