

ЧИСЛЕННЫЙ АНАЛИЗ ТРАЕКТОРИЙ ЧАСТИЦ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ В УСЛОВИЯХ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ

© 2015 г. А.С. Писарев*, С.А. Руколайне* **, А.М. Самсонов* **, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29;

**Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 11.06.15 г.

Разработан метод численного анализа траекторий частиц в живых клетках, в котором тип движения частицы определяется с применением информационного критерия Акайке, а идентификация параметров модели выполняется методом взвешенных наименьших квадратов. Метод реализован в программном комплексе на языке Java и позволяет выполнять анализ траекторий в автоматическом режиме. Метод апробирован на синтетических траекториях с известными значениями параметров моделей движения, а затем применен для анализа траекторий движения репликационных комплексов в клетках, инфицированных вирусом гепатита С. Полученные результаты согласуются с известными данными о движении биологических объектов по микротрубочкам.

Ключевые слова: анализ траекторий движения, трекинг, вирус гепатита С, метод средних квадратов смещений.

В настоящее время активно развиваются количественные методы изучения внутриклеточных процессов с использованием видеоизображений, которые получают при наблюдении за живыми клетками с помощью микроскопов. Траектории движения биологических объектов и частиц, извлекаемые путем процессинга таких изображений, содержат важную информацию о механизмах транспорта частиц.

В большинстве случаев характер движения частицы заранее неизвестен и должен быть найден путем подгонки решений модели движения к данным. Качество такой подгонки зависит от условий эксперимента – температуры среды, уровня вибрации и дрейфа, частоты кадров видеоизображения, времени наблюдений, числа траекторий и точности алгоритмов трекинга – локализации позиций частиц в пространстве и времени, объединения позиций в индивидуальные траектории частиц [1–5].

Для количественного описания движений частиц используют кривые зависимости средних квадратов смещений от времени. Эти кривые высоко вариабельны в силу неопределенности в локализации частиц и поэтому могут различаться даже у двух одинаково движущихся частиц [2,5]. Такая вариабельность может привести

к выбору неправильной и/или слишком сложной модели движения при решении обратной задачи. В связи с этим способность того или иного метода правильно определять тип движения частицы сначала тестируют на синтетических траекториях с заранее известным типом движения и только потом применяют к анализу экспериментальных траекторий [6].

Несмотря на важность изучения механизмов транспорта частиц в биологических системах, автоматические методы трекинга и определения типов и параметров движения биологических объектов до сих пор отсутствуют [6,7]. Это отчасти объясняется тем, что в настоящее время в большинстве публикаций исследуются отдельные типы моделей движения с применением методов наименьших квадратов, оптимизированных наименьших квадратов, обобщенных наименьших квадратов, оценки максимального правдоподобия, байесовского подхода к проверке множества гипотез.

Мы разработали автоматический метод определения типа движения биологических частиц, в котором выбор наилучшей модели движения осуществляется на основе информационного критерия АИС с учетом полученных при параметрической идентификации значений взвешенных сумм квадратов остатков и показателей структурной сложности модели. Метод

Сокращение: HCV – вирус гепатита С.

реализован в программном комплексе на языке Java, апробирован путем анализа синтетических траекторий с известным типом движения и применен к анализу траекторий движения репликационных комплексов вируса гепатита С (НСV).

В мире насчитывается более 160 миллионов человек, зараженных НСV, еще три-четыре миллиона человек инфицируются ежегодно [8]. Инфекция часто переходит в хроническую стадию и приводит к смертельным заболеваниям печени – циррозу и гепатокарциноме. Репликация НСV в клетке происходит в составе репликационных комплексов, ассоциированных с модифицированными мембранами. Природа этих комплексов и их динамика до конца не ясны. Так, например, в работе [9] было показано, что в инфицированной клетке репликационные комплексы представлены двумя типами структур. Большие структуры неподвижны, а маленькие структуры совершают быстрые скачкообразные перемещения на значительные расстояния. Движение малых комплексов прекращается при обработке клеток нокадазолом – агентом, деполимеризующим микротрубочки. Для того чтобы лучше понять роль движений репликационных комплексов в жизненном цикле НСV, в этой работе мы выполнили обработку траекторий движения малых комплексов с помощью методов средних квадратов смещений и средних по ансамблю квадратов смещений. Были определены тип и параметры движения репликационных комплексов, произведена оценка средних и максимальных значений скоростей движения. Полученные значения скоростей движения хорошо согласуются с известными данными о движении биологических молекул и комплексов по микротрубочкам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

Синтетические траектории частиц с известными моделями движения. Для оценки качества разработанных алгоритмов и программ автоматической обработки и анализа траекторий были сформированы синтетические траектории частиц (броуновская диффузия, направленное движение с диффузией, аномальная диффузия (субдиффузия), ограниченная диффузия).

Ошибки локализации в траекториях частиц с броуновской диффузией и траекториях с направленным движением и диффузией [10] заданы в виде белого гауссова шума. Были выбраны следующие значения коэффициента диффузии $D = 0,001$ мкм²/с, скорости движения $V = 0,05$ мкм/с и стандартного отклонения белого гауссова шума ($\sigma = 0,005$ мкм) с нулевым средним

значением ($\mu = 0$ мкм). Всего было сформировано 10 траекторий первого и 20 траекторий второго типа. Каждая траектория включала 100 позиций частиц с временным лагом $\Delta t = 0,05$ с.

Синтетические траектории частиц при субдиффузии были сформированы с использованием метода FBM (fractional Brownian motion) [11,12]. Было получено 10 траекторий, каждая из которых содержала 1000 позиций частиц с временным лагом $\Delta t = 1$ с и показателем субдиффузии $\alpha = 0,7$. К координатам частиц был добавлен белый гауссов шум ($\sigma = 0,1$ мкм) с нулевым средним значением ($\mu = 0$ мкм).

Синтетические траектории частиц с ограниченной диффузией были сформированы с использованием метода и программного обеспечения, разработанного в работе [13]. Были получены 10 траекторий, каждая из которых содержала 1000 позиций частиц с временным лагом $\Delta t = 0,01$ с, коэффициентом диффузии $D = 0,1$ мкм²/с и радиусом ограничения движения частицы $R_c = 0,5$ мкм. К координатам частиц был добавлен белый гауссов шум ($\sigma = 0,03$ мкм) с нулевым средним значением ($\mu = 0$ мкм).

Экспериментальные траектории движения репликационного комплекса НСV были взяты из работы [9]. Эти траектории были получены путем трекинга комплекса «вручную» на видеоизображениях клеток Huh-7.5 с репликоном I/NS5A-GFP-6, в котором к белку репликасы вируса NS5 был пришит зеленый флуоресцентный белок.

МЕТОДЫ И МОДЕЛИ

Метод средних квадратов смещений. Средний квадрат смещения (mean square displacement – MSD) для временного лага $l\Delta t$ MSD определяется по формуле:

$$\langle r^2 \rangle_{l\Delta t} = \frac{\sum_{i=1}^{N-l+1} r_{i,l\Delta t}^2}{N-l+1}, \quad l=1,2,\dots,N, \quad (1)$$

где N – длина, равная числу соединений локальных позиций частицы в $(N+1)$ кадрах видеоизображения, Δt – интервал времени (лаг) между двумя последовательными кадрами; $r_{i,\Delta t}$ – расстояние между локальными позициями частицы в кадрах, разнесенных на время Δt , например, $r_{1,\Delta t}$ – это расстояние между 1-й и 2-й точками в соседних кадрах, $r_{2,\Delta t}$ – это расстояние между 2-й и 3-й точками в соседних кадрах; $r_{i,l\Delta t}$ – расстояние между точками траектории,

локальные позиции которых находятся в кадрах, разнесенных на время $l\Delta t$. Например, $r_{1,2\Delta t}$ – это расстояние между 1-й и 3-й точками траектории в кадрах, разнесенных на время $2\Delta t$, а $r_{2,2\Delta t}$ – расстояние между 2-й и 4-й точками траектории в кадрах.

Дисперсию среднего квадрата смещения вычисляют по формуле

$$\sigma_{l\Delta t}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N-l+1} (r_{i,l\Delta t}^2 - \langle r^2 \rangle_{l\Delta t})}{N-l}. \quad (2)$$

Метод средних по ансамблю квадратов смещений. Видеоизображения движущихся частиц в живых клетках содержат траектории, длина которых может варьировать от нескольких позиций до нескольких десятков и сотен позиций. В экспериментах наблюдается большое число коротких траекторий с длиной менее 100 позиций. Вычисление средних квадратов смещений в таких случаях может приводить к значительным ошибкам. Поэтому более статистически значимые результаты могут быть получены при анализе ансамбля траекторий в предположении о независимости усредняемых траекторий.

Средний по ансамблю траекторий квадрат смещения (EA-MSD) определяется усреднением MSD индивидуальных траекторий ансамбля по следующей формуле:

$$\bar{\rho}_n^{(ens)} = \frac{1}{N_T(N-n)} \sum_{j=1}^{N_T} \sum_{i=1}^{N-n} (\vec{r}_{i+n}^{(j)} - \vec{r}_i^{(j)})^2 = \frac{1}{N_T} \sum_{j=1}^{N_T} \bar{\rho}_n^{(j)}, \quad (3)$$

$n = 1, \dots, N-1,$

где n – номер позиции в траектории, N – длина наибольшей траектории ансамбля, равная числу позиций в траектории; $\vec{r}_i^{(j)}$ – i -я позиция в j -й траектории; $\bar{\rho}_n^{(j)}$ – значение MSD в позиции n , вычисленное для j -й индивидуальной траектории.

Дисперсия σ_n^2 определяется по формуле:

$$\sigma_n^2 = \frac{\sum_{j=1}^{N_n} (\bar{\rho}_n^{(j)} - \bar{\rho}_n^{(ens)})^2}{N_n - 1}, \quad (4)$$

где N_n – число траекторий, длина которых более или равна $(n + 1)$.

Весовой коэффициент среднего по ансамблю траекторий квадрата смещения (EA-MSD) определяется по формуле:

$$\bar{w}_n^{(ens)} = \frac{1}{\sigma_n^2}. \quad (5)$$

Модели движений. Для ряда моделей движения частиц существуют аналитические решения для зависимости средних квадратов смещений от времени. Приблизительная оценка предполагаемых постоянными значений коэффициентов диффузии и скоростей движения частиц может производиться в соответствии с техникой идентификации параметров моделей по экспериментальным данным [14,15].

Модели $M = \{M_1, \dots, M_8\}$ содержат в левой части уравнений средний квадрат смещения, а в правой части – зависимость от времени $l\Delta t$, коэффициента диффузии (D), скорости (V) и др.

Модель свободной диффузии (D) описывает случайное движение частицы:

$$\langle r^2 \rangle = kDl\Delta t, \quad (6)$$

где $k = 2 \dim$; $\dim = 1, 2, 3$ – размерность пространства; $l = 1, 2, \dots, N$ [1].

Модель направленного движения (V) описывает однонаправленное движение частиц по микротрубочке [16]:

$$\langle r^2 \rangle = (v\Delta t)^2. \quad (7)$$

Модель направленного движения с диффузией (DV) характеризует движение, объединяющее свободную диффузию и направленные движения [1]:

$$\langle r^2 \rangle = kDl\Delta t + (v\Delta t)^2. \quad (8)$$

Модель аномальной диффузии (AD) описывает движение частицы в случае возникновения на ее пути различных помех и кратковременных взаимодействий [4]:

$$\langle r^2 \rangle = kD(l\Delta t)^\alpha, \quad 0 < \alpha < 1. \quad (9)$$

Модель ограниченной диффузии (RD) характеризует диффузию частицы, окруженной, например, элементами цитоскелета:

$$\langle r^2 \rangle = R_C^2 (1 - e^{-kDl\Delta t/R_C^2}), \quad (10)$$

где R_C – радиус ограниченного движения частицы [1,19].

Учет среднеквадратичных ошибок локализации частиц выполняется путем добавления в

правой части уравнения слагаемого $k\sigma^2$, где σ – стандартное отклонение [3,4].

Качественный предварительный анализ позволяет по виду зависимости MSD от времени оценить тип движения частицы. Линейная зависимость может свидетельствовать о наличии свободной диффузии, параболическая зависимость – о направленном движении частицы.

Методы решения обратной задачи. *Метод параметрической идентификации.* Идентификация параметров моделей осуществляется на основе решения обратной задачи с ограничениями на допустимые значения параметров (положительные значения коэффициентов диффузии, квадратов ошибок локализации, показателя субдиффузии, радиуса ограниченного движения) и метода взвешенных наименьших квадратов (weighted least squares method – WLS-метод).

Взвешенная сумма квадратов остатков (WRSS) имеет вид:

$$WRSS = \sum_{i=1}^M w'_i (y_i^{\text{model}} - y_i^{\text{data}})^2, \quad (11)$$

где y_i^{model} , y_i^{data} – модельные и экспериментальные данные в дискретные моменты времени t_i ; w'_i – нормализованный коэффициент веса i -го измерения.

Весовой коэффициент среднего квадрата смещения MSD для l -го временного шага находится по формуле:

$$w_l = \frac{1}{\sigma_{l\Delta t}^2}, \quad (12)$$

а нормализованный весовой коэффициент среднего квадрата смещения MSD имеет следующий вид:

$$w'_l = \frac{w_l}{\sum_{l=1}^M w_l}. \quad (13)$$

При идентификации параметров модели движения частиц с использованием EA-MSD используется модификация критерия взвешенных сумм квадратов остатков (WRSS), учитывающая весовой коэффициент EA-MSD $\bar{w}_n^{(\text{ens})}$ и вариабельность средних квадратов смещений всех индивидуальных траекторий с n – номером позиции в траектории:

$$WRSS = \sum_{i=1}^M \frac{\bar{w}_n^{(\text{ens})}}{N_{Tr}} \bar{w}'_i (y_i^{\text{model}} - y_i^{\text{data}})^2,$$

где $\bar{w}_i = \frac{1}{N_T}$, а \bar{w}'_i – нормализованный коэф-

$$\sum_{n=1}^2 \sigma_n^2$$

фициент веса i -го измерения:

$$\bar{w}'_i = \frac{\bar{w}_i}{M \sum_{j=1}^M \bar{w}_j}.$$

Метод структурной идентификации. Для корректного выбора структуры модели типа движения по результатам EA-MSD анализа применяются различные подходы, основанные на обучении нейронных сетей, байесовском подходе к проверке множеств гипотез, использовании коэффициента детерминации R^2 , BIC и AIC [4,10,22,23].

В этой работе используется модифицированный информационный критерий Akaike [22,23], в котором при сравнительной оценке качества моделей учитывается их сложность и точность описания экспериментальных данных:

$$AIC_{cw} = 2k + n \ln \frac{WRSS}{n} + \frac{2k(k+1)}{n-k-1}, \quad (14)$$

где k – число параметров модели, n – размер выборки, WRSS – взвешенная сумма квадратов остатков.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ среднеквадратичных смещений траекторий частиц с помощью метода взвешенных наименьших квадратов. Наиболее распространенным подходом к определению типа движения частиц является использование моделей движения без учета ошибок их локализации. Идентификация параметров моделей движения частиц обычно осуществляется методом наименьших квадратов с итеративным выбором длины начальных участков зависимостей средних квадратов смещений от времени. Такой подход, например, реализован в пакете программ, разработанном в работе [10].

При применении метода наименьших квадратов часто используется допущение, что каждая точка данных обеспечивает одинаково точ-

ную информацию о детерминированной части вариации процесса, т.е. стандартное отклонение погрешности является постоянным для всех значений переменной, которые распределены по нормальному закону. Однако значения средних квадратов смещений характеризуются негауссовыми законами распределения [3]. Поскольку стандартное отклонение погрешности является непостоянным, для оценки параметров правильным является использование метода взвешенных наименьших квадратов.

В разработанном нами методе wMSD при определении типа и параметров движения частицы учитываются среднеквадратичные ошибки их локализации, а идентификация параметров модели выполняется методом взвешенных наименьших квадратов (см. Методы и модели). Метод реализован в программном комплексе на языке Java и позволяет выполнять анализ траекторий в автоматическом режиме, в отличие от других известных алгоритмов и программ, в которых требуются дополнительные настройки или обучение классификаторов [4,10].

Анализ синтетических траекторий. Ввиду высокой вариабельности кривых зависимости квадратов средних смещений от времени возможность применения того или иного метода для определения типа движения частицы принято сначала тестировать на синтетических траекториях с заранее известным типом движения. Мы провели такую проверку для метода wMSD, используя созданные нами синтетические траектории частиц, соответствующие основным типам движения частиц (см. Материалы и методы).

При анализе ансамбля синтетических траекторий с броуновским типом движения метод wMSD правильно предсказывает тип движения частиц и идентифицирует свободную диффузию со средним значением коэффициента диффузии $D = 0,00108$ мкм²/с. Заметим, что относительная погрешность вычисления D по нашему методу составляет 8% и существенно меньше верхней оценки точности метода наименьших квадратов (29%), полученной при анализе траекторий только со свободной диффузией [2].

Анализ результатов предсказания типов движения был выполнен для второго типа синтетических траекторий частиц при направленном движении с диффузией. Метод wMSD правильно предсказывает тип направленного движения с диффузией для всех индивидуальных траекторий. Значение коэффициента диффузии для ансамбля траекторий $D = 0,001$ мкм²/с, скорости $V = 0,052$ мкм/с, при этом относительные погрешности вычисления коэффициен-

та диффузии составляют $\delta_D = 0,6\%$ и скорости – $\delta_V = 5\%$.

На этих же данных метод наименьших квадратов, реализованный в программе MSD-анализа для пакета MatLab [10], при использовании 25%-го начального участка MSD показывает значения относительных погрешностей вычисления коэффициента диффузии и скорости – 18% и 8,4% соответственно.

В случае анализа ансамбля синтетических траекторий с ограниченной диффузией метод wMSD правильно предсказывает тип движения и значения коэффициента диффузии $D = 0,10025$ мкм²/с с относительной погрешностью $\delta_D = 0,25\%$ и радиуса $R_C = 0,52$ мкм с относительной погрешностью $\delta_R = 6\%$.

Следует заметить, что в работе [13] приведены данные о возможности применения байесовского метода только для правильного определения типа движения (броуновская диффузия или ограниченная диффузия), в то время как наш метод кроме правильного предсказания типа движения позволяет оценить и значения параметров – коэффициента диффузии и радиуса ограниченного движения.

При анализе ансамбля синтетических траекторий с аномальной субдиффузией метод wMSD правильно предсказывает тип движения частиц. Оценка показателя субдиффузии $\alpha = 0,701$ мкм²/с выполнена с относительной погрешностью $\delta_D = 0,3\%$. Доля индивидуальных траекторий, для которых идентифицированное значение показателя субдиффузии α^* не отличается от заданного значения более чем на 0,1, составила $F^* = 0,9$. Заметим, что эта оценка совпадает с результатом $F = 0,9$, полученными в работе [11] при анализе траекторий с аномальной субдиффузией и при ручной настройке оптимальных параметров метода идентификации.

Таким образом, по сравнению с известными методами анализа средних квадратов смещений индивидуальных и усредненных по ансамблю траекторий частиц, метод wMSD, разработанный в данной работе, продемонстрировал сопоставимые или лучшие результаты предсказания типа движения частицы и значения параметров моделей движения – коэффициента диффузии, скорости, показателя субдиффузии и радиуса ограниченной диффузии. Наиболее точные оценки типа и параметров модели движения частицы могут быть получены при использовании метода wMSD применительно к EА-MSD, усредненным по ансамблю траекторий.

В отличие от известных методов, метод wMSD позволяет выполнять анализ траекторий

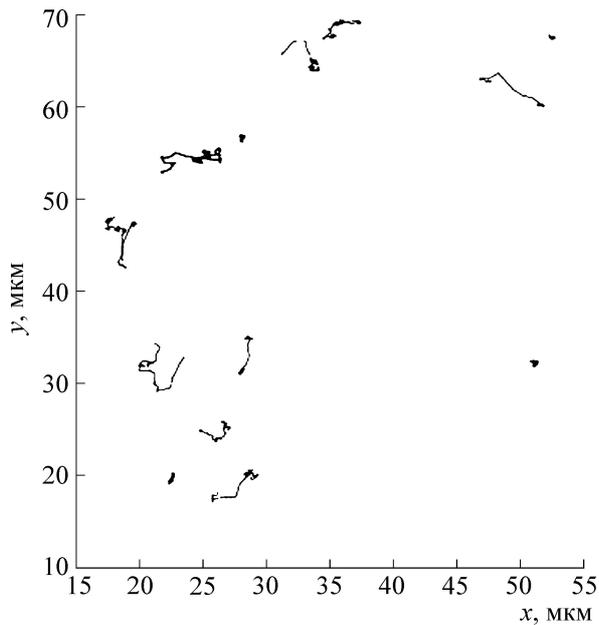


Рис. 1. Траектории движения репликационного комплекса вируса гепатита С [9].

в автоматическом режиме без дополнительных настроек.

Метод реализован в составе сетевого программного комплекса, который предоставляет дополнительные возможности визуализации результатов анализа траекторий в виде графиков и таблиц.

Анализ траекторий вируса гепатита С. Метод wMSD был применен к анализу траекторий движения репликационных комплексов вируса гепатита С (рис. 1). Анализ средних квадратов смещений траекторий частиц показал, что преобладающим типом движения является направленное движение с диффузией. Этот тип движения с медианными значениями коэффициента диффузии $D_C = 0,015$ мкм²/с и скорости $V = 0,01$ мкм/с наблюдался у 60% частиц. Для 27 и 13% траекторий типы движения были классифицированы соответственно как ограниченная диффузия с медианным значением коэффициента диффузии $D_C = 0,02$ мкм²/с и свободная диффузия с медианным значением коэффициента диффузии $D_C = 0,04$ мкм²/с.

При идентификации модели движения по усредненному ансамблю траекторий EA-MSD тип обобщенного движения был классифицирован как направленное движение с диффузией. Среднее значение коэффициента диффузии в соответствии с этой моделью движения составило $D = 0,0186$ мкм²/с, а среднее значение скорости $V = 0,008$ мкм/с.

На рис. 2 представлены траектории движения двух репликационных комплексов, обозначенных А.12 и А.3, а также графики зависимости скоростей движения этих комплексов от времени. Движение комплекса А.12 было классифицировано как ограниченная диффузия с радиусом $R_C = 1,02$ мкм. Среднее значение коэффициента диффузии в соответствии с этой моделью движения составило $0,0016$ мкм²/с.

Движение комплекса А.3 (рис. 2в,г) было классифицировано как диффузия с направленным движением. Средняя скорость в соответствии с этой моделью движения составила $0,018822$ мкм/с, а график скоростей (рис. 2г) демонстрирует наличие трех участков скачкообразных движений с максимумами скоростей $1,07$; $0,77$; $0,77$ мкм/с на 4-й, 54-й и 111-й секундах соответственно.

Движение комплекса В.1 (рис. 2д,е) было классифицировано как направленное движение с диффузией. Полученная оценка для средней скорости в соответствии с этой моделью движения составила $0,126$ мкм/с, для коэффициента диффузии $0,115$ мкм²/с. График скоростей (рис. 2е) демонстрирует наличие трех участков скачкообразных движений.

График средних и максимальных значений скоростей движений репликационных комплексов HCV приведен на рис. 3.

Экспериментальные данные о мобильности вирусных частиц в клетках очень немногочисленны. Наиболее подробно изучено движение аденоассоциированного вируса в клетках HeLa [24]. Этот небольшой вирус (25 нм) попадает в клетку посредством эндоцитоза, затем вирусный капсид перемещается по цитоплазме в ядро. Из 113-ти проанализированных в работе [24] траекторий движения этого вируса 53 были классифицированы как броуновская диффузия с коэффициентом $DC = 1,3$ мкм²/с, 51 – как аномальная диффузия ($0,5 < \alpha < 0,9$) с коэффициентом диффузии в диапазоне $0,3–1,5$ мкм²/с и только 9 траекторий – как направленное движение с диффузией (коэффициент диффузии $0,4–0,9$ мкм²/с, скорость движения $1,8–3,7$ мкм/с). Количественные характеристики движения репликационных комплексов, полученные нами, сильно отличаются от этих данных: коэффициенты диффузии у репликационных комплексов HCV меньше для всех типов движений. Другим важным отличием является то, что для репликационных комплексов преобладающим типом движения является направленное движение с диффузией, тогда как такой тип движения у аденоассоциированного вируса обнаружен только у 7% траекторий. Эти различия, по-видимому, связаны с разным типом движущихся

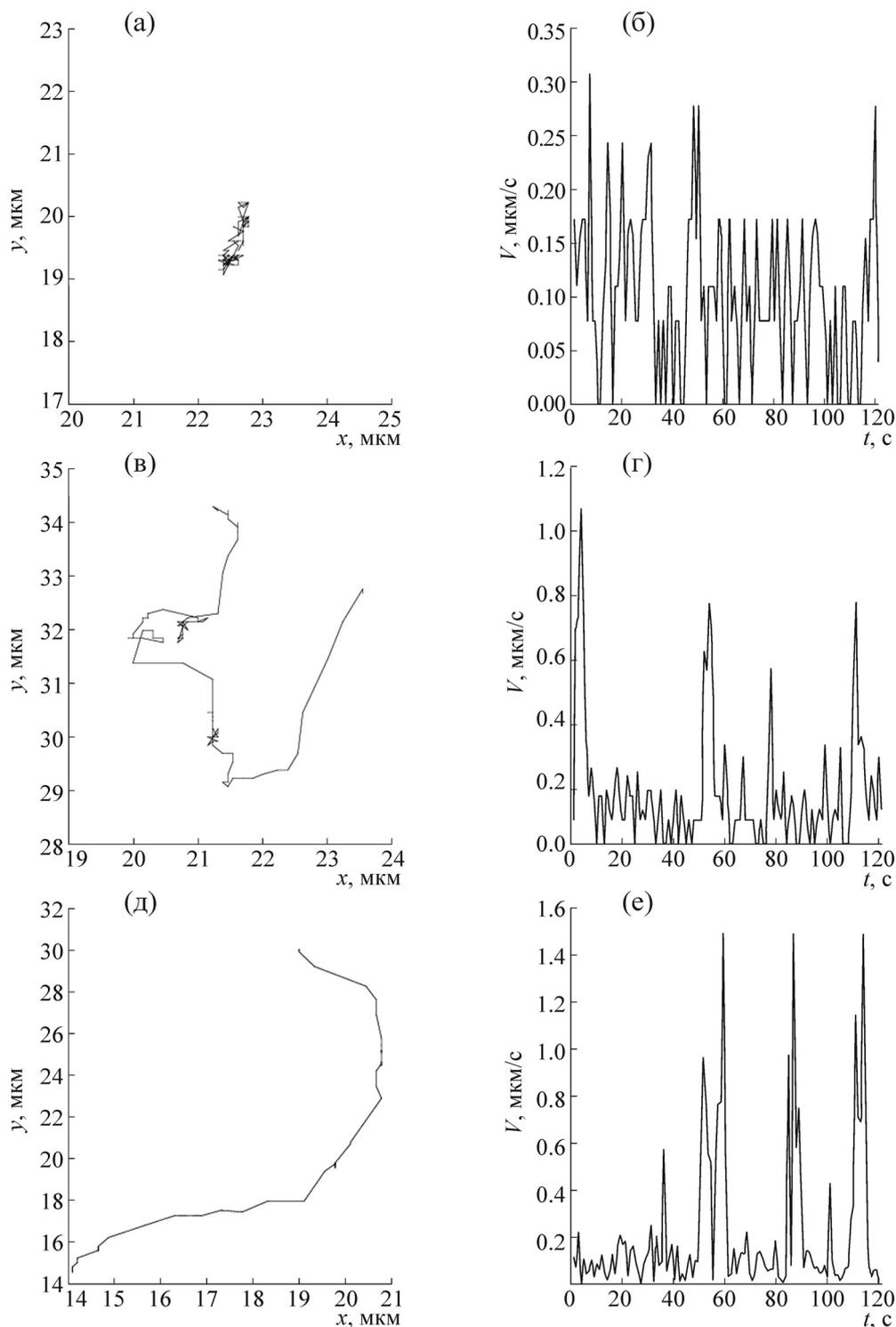


Рис. 2. Траектории движения (а, в) и графики скоростей (б, г) репликационных комплексов А.12 (а, б), А.3 (в, г) и В.1 (д, е).

частиц – аденовирусов и репликационных комплексов клеток, в которых происходит движение – HeLa. Интересно, что количественные характеристики движения частиц могут меняться даже в рамках одного механизма. Так, на-

пример, HCV и вирус Денге инфицируют клетки посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза [25,26]. Показано, что в неполяризованных клетках HepG2 в первый час после инфицирования псевдочастицами HCVpp преобладает

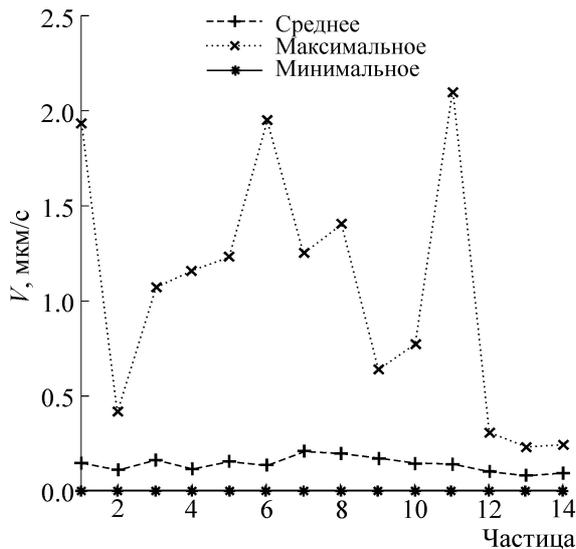


Рис. 3. Средние и максимальные значения скоростей движения частиц репликационных комплексов.

броуновская диффузия (78,3% траекторий), ограниченная диффузия обнаружена у 5,1% траекторий и смешанная диффузия – в 15,2% случаев. Поляризация клеток ограничивает подвижность вируса в мембране и приводит к возрастанию числа смещенных траекторий и траекторий с ограниченной диффузией, а также к уменьшению коэффициента свободной диффузии с 0,14 мкм²/с до 0,07 мкм²/с [26]. Вместе с тем для вируса Денге показано [25], что его частицы свободно диффундируют с коэффициентом диффузии (0,02–0,16 мкм²/с) до тех пор, пока не достигнут выстланных клатрином углублений, где диффузия, по-видимому, становится ограниченной и принимает значения 0,003–0,02 мкм²/с, что в несколько раз меньше, чем у HCV. Интересные данные получены о движении аденовируса сразу же после инфицирования клеток [27]. Перемещение типа 2 (Ad2) по поверхности клеток эмбриональных ретинобластов человека (HER) включает диффузию (0,05 мкм²/с), ограниченную диффузию (0,001–0,01 мкм²/с) и направленное движение (0,005 мкм²/с), для которого требуется интактный цитоскелет и активность моторного белка актин-зависимого миозина-2.

Многие частицы репликационных комплексов демонстрируют быстрые перемещения на значительные расстояния. Скорость таких перемещений достигает 2 мкм/с и сравнима со скоростью движения белковых комплексов и органелл по микротрубочкам [28,29]. Косвенным указанием на то, что репликационные комплексы перемещаются по микротрубочкам, является исчезновение траекторий с такими дви-

жениями после обработки клеток нокадазолом – агентом, деполимеризующим микротрубочки [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен wMSD-метод компьютерного анализа траекторий частиц в живых клетках при неизвестных заранее типах, скоростях движения, коэффициентах диффузии и погрешностях в координатах частиц. Наилучшая из моделей выбирается на основе информационного критерия AICsw (14) с учетом полученных при параметрической идентификации значений взвешенных сумм квадратов остатков. Метод реализован в программном комплексе на языке Java, апробирован на синтетических траекториях с известными значениями параметров моделей движения и применен для анализа траекторий, получаемых при трекинге частиц в видеоизображениях живых клеток. Разработанные алгоритмы и программы позволяют выполнять анализ траекторий в автоматическом режиме, в отличие от других известных алгоритмов и программ, в которых требуются дополнительные настройки или обучение классификаторов.

Метод применен для анализа траекторий движения репликационных комплексов в клетках, инфицированных HCV. Показано, что преобладающим типом движения таких комплексов является направленное движение с диффузией, установлено, что многие частицы репликационных комплексов демонстрируют быстрые перемещения на значительные расстояния. Скорость таких перемещений достигает 2 мкм/с и сравнима со скоростью движения белковых комплексов и органелл по микротрубочкам.

Работа выполнена в рамках проектной части государственного задания в сфере научной деятельности (№1.1422.2014/К) Министерства образования и науки РФ. Исследования С.А. Руколайне и А.М. Самсонова проведены при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 14-01-00334).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. J. Saxton, *Biophys. J.* **72** (4), 1744 (1997).
2. X. Michalet and A. J. Berglund, *Phys. Rev. E* **85** (6), 1 (2012).
3. X. Michalet, *Phys. Rev. E* **82** (4), 1 (2010).
4. N. Monnier, S. M. Guo, M. Mori, et al., *Biophys. J.* **103** (3), 616 (2012).
5. M. A. Catipovic, P. M. Tyler, J. G. Trapani, and A. R. Carter, *Am. J. Phys.* **81** (7), 485 (2013).

6. M. J. A. Saxton, *Nature Methods* **11** (3), 247 (2014).
7. N. Chenouard, I. Smal, F. de Chaumont, et al., *Nature Methods* **11** (3), 281 (2014).
8. L. Fénéant, S. Levy, and L. Cocquerel, *Viruses* **6** (2), 535 (2014).
9. B. Wölk, B. Büchele, D. Moradpour, and C. M. Rice, *J. Virology* **82** (21), 10519 (2008).
10. N. Tarantino, J. Y. Tinevez, E. F. Crowell, et al., *J. Cell Biol.* **204** (2), 231 (2014).
11. E. Kepten, et al., *PLoS One* **10** (2), e0117722 (2015).
12. *Anomalous Transport: Foundations and Applications*, Ed. by R. Klages, G. Radons, I. M. Sokolov (John Wiley & Sons, 2008).
13. S. Türkcan and J. B. Masson, *PloS One* **8** (12), e82799 (2013).
14. H. Qian, M. P. Sheetz, and E. L. Elson, *Biophys. J.* **60** (4), 910 (1991).
15. M. J. Saxton, in *Methods in Membrane Lipids* (Humana Press, 2007), pp. 295–321.
16. V. Bormuth, V. Varga, J. Howard, and E. Schäffer, *Science* **325** (5942), 870 (2009).
17. X. Wang, T. Wohland, and V. Korzh, *Develop. Biol.* **347** (1), 1 (2010).
18. S. C. Weber, A. J. Spakowitz, and J. A. Theriot, *Phys. Rev. Lett.* **104** (23), 238102 (2010).
19. C. W. Cairo, R. Das, A. Albohy, et al., *J. Biol. Chem.* **285** (15), 11392 (2010).
20. A. S. Pisarev and M. G. Samsonova, *Biophysics* **58** (2), 157 (2013).
21. А. С. Писарев, *Изв. СПбГЭТУ «ЛЭТИ», № 5*, 72 (2013).
22. H. Akaike, *IEEE Transactions on Automatic Control* **19** (6), 716 (1974).
23. K. P. Burnham, D. R. Anderson, *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach* (Springer Science & Business Media, 2002).
24. G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, et al., *Science* **294** (5548), 1929 (2001).
25. H. M. van der Schaar, M. J. Rust, C. Chen, et al., *PLoS Pathogens* **4** (12), e1000244 (2008).
26. H. J. Harris, C. Clerte, M. J. Farquhar, et al., *Cell. Microbiol.* **15** (3), 430 (2013).
27. C. J. Burckhardt, M. Suomalainen, P. Schoenenberger, et al., *Cell Host & Microbe* **10** (2), 105 (2011).
28. C. Kural, H. Kim, S. Syed, et al., *Science* **308** (5727), 1469 (2005).
29. R. Dixit, J. L. Ross, Y. E. Goldman, and E. L. Holzbaur, *Science* **319** (5866), 1086 (2008).

Numerical Analysis of Particle Trajectories in Living Cells under Uncertainty Conditions

A.S. Pisarev*, **S.A. Rukolaine* ****, **A.M. Samsonov* ****, and **M.G. Samsonova***

**Peter the Great St.Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

***Ioffe Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Polytekhnicheskaya 26, St. Petersburg, 194021*

We have developed a numerical method for the analysis of particle trajectories in living cells, where a type of movement is determined by Akaike's information criterion, while model parameters are identified by a weighted least squares method. The method is realized in computer software, written in the Java programming language, that enables us to automatically conduct the analysis of trajectories. The method is tested on synthetic trajectories with known parameters, and applied to the analysis of replication complexes in cells, infected with hepatitis C virus. Results of the analysis are in agreement with available data on the movement of biological objects along microtubules.

Key words: analysis of trajectories, tracking, hepatitis C virus, weighted least squares method