

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА В СЕЛЕКТИВНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ С ОБРАБОТКОЙ ИЗОБРАЖЕНИЙ ПО ТЕХНОЛОГИИ BIG DATA



В.С. Осипович¹

Доцент кафедры инженерной психологии и эргономики БГУИР, кандидат технических наук, доцент, Республика Беларусь



А.А. Быков¹

Ассистент кафедры инженерной психологии и эргономики БГУИР, магистр технических наук, Республика Беларусь



Д.В. Лихачевский²

Декан факультета компьютерного проектирования БГУИР, кандидат технических наук, Республика Беларусь



К.Д. Яшин¹

Заведующий кафедрой инженерной психологии и эргономики БГУИР. Кандидат технических наук, доцент, Республика Беларусь

¹Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, ул. П. Бровки, 6, БГУИР, каф. ИПиЭ, 220013, Минск, Беларусь, тел. +375 17 2938524, e-mail: seth22@yandex.ru

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, ул. П. Бровки, 6, БГУИР, каф. ПИКС, 220013, Минск, Беларусь, тел. +375 17 2938863, e-mail: likhachevskiyd@bsuir.by

Abstract. The development of nano-bio-information technologies for solving urgent problems of biomedical diagnostics: in particular, for imaging of pathologically changed cells and tissues. Big Data technologies for this purpose.

Целью исследований явилась разработка нанобиоинформационных технологий для решения актуальных задач совершенствования приемов биомедицинской диагностики заболеваний и визуализации биологических объектов. Для достижения цели необходимо было решить ряд задач: 1) разработать конструкцию флуоресцентных нанобиомаркеров, пригодных для визуализации опухолевых клеток *in vitro*; 2) отработать технологию получения нанобиомаркеров; 3) осуществить апробацию разработанных нанобиомаркеров для визуализации биологических объектов (клеток, вирусов, антигенов); 4) разработать схему считывания, обработки и хранения визуализированной нанобиомаркерами информации; 5) подготовить исходные экспериментальные результаты для обработки больших статистических данных клеточных биологических объектов с применением технологии BIGDATA. Рисунок 1 показывает схему сегментации визуальной информации, полученной при помощи подсветки флуоресцентными нанобиомаркерами.

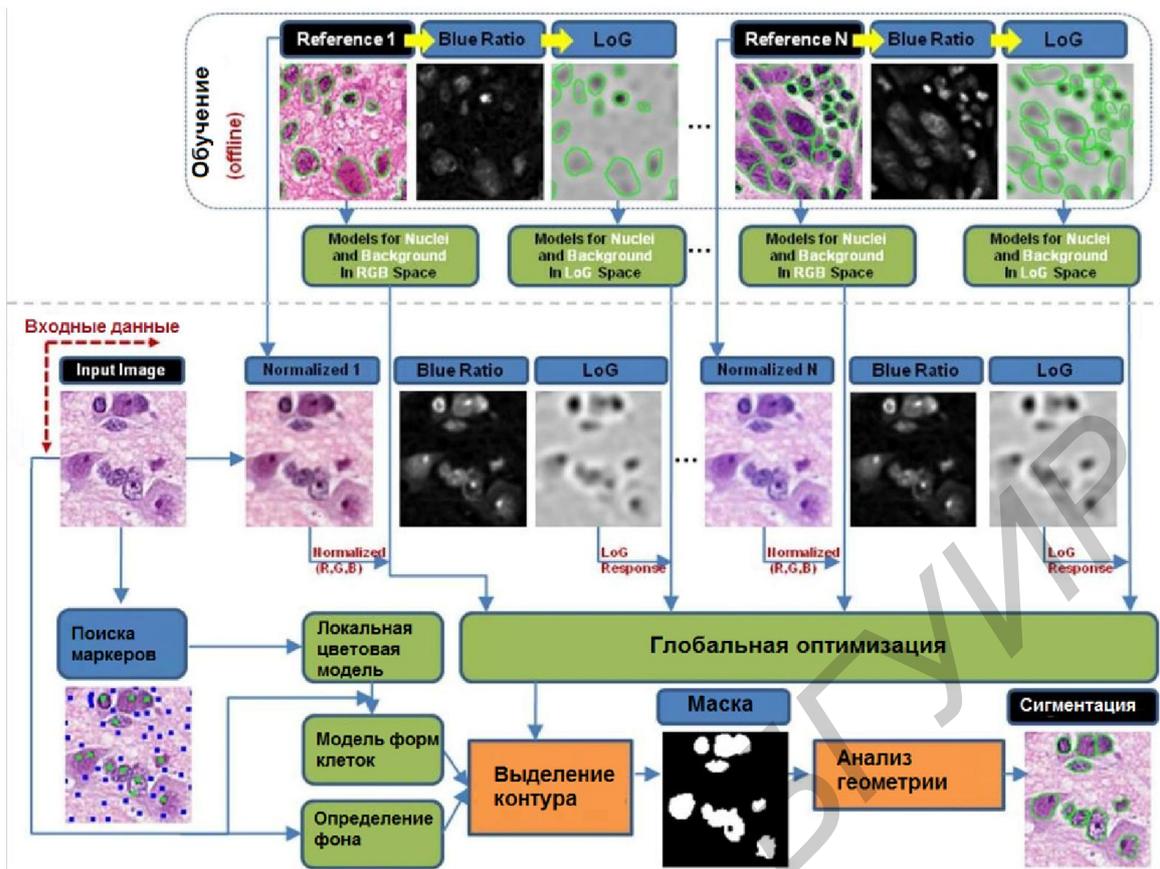


Рис. 1. Схема сегментации визуальной информации

Для анализа визуализированной нанобиомаркерами информации использовались алгоритмы как машинного зрения, так и алгоритмы машинного обучения. На начальном этапе выполнялось обучение алгоритмов распознавания, далее использовалась конвейерная обработка включающая быстрый поиск маркеров, корректировку локальной цветовой модели, контурный анализ для распознавания формы клеток, адаптивный анализ фона и глобальная оптимизация параметров системы.

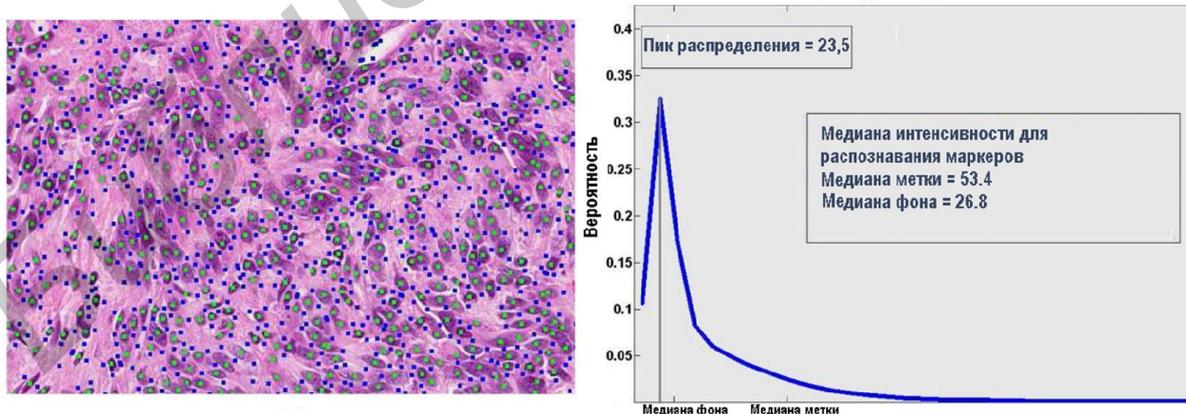


Рис. 2. (а) – Точки обнаружения нанобиомаркеров (б) – Медианы интенсивности цвета для распознавания

Для распознавания нанобиомаркеров на изображении использовался порог интенсивности цвета. Медианы для обнаружения фона и маркеров показаны ниже

На рисунке 2а показаны точки обнаружения маркеров (голубые) и фона (зеленые). На рисунке 2б показан пик распределения соответствующий частоте встречаемости фоновых пикселей. Этот порог гарантирует наиболее эффективное распознавание нанобиомаркеров.

Для повышения точности распознавания клеток и устранения ошибочно найденных точек используется алгоритм контурного анализа. В качестве основы для алгоритма определения контуров использовалась мера Лапласа-Гаусса (Laplacian of Gaussian, LoG). Это специализированная мера 2D изотропна, предназначена для сравнения регионов с быстрым изменением интенсивности цвета и поэтому выбрана для обнаружения контуров клеток. Функция Лапласа $L(x, y)$ для изображения со значениями интенсивности пикселей (x, y) определяется по формуле:

$$L(x, y) = \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I}{\partial y^2}$$

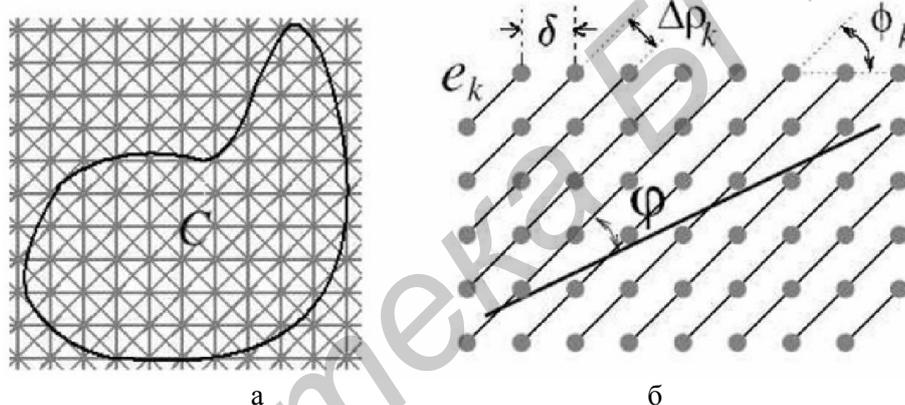


Рис. 3. (а) – Клеточный контур, (б) – Коэффициенты для расчета меры Лапласа

Так входное изображение представляется в виде набора дискретных точек, функция находит дискретное ядро свертки, которое могут описать вторые производные в определении Лапласа. На основе предложенной меры использовался комбинированный алгоритм для поиска границ, представленные ниже

На рисунке 3(а) изображен контур клеточный контур в дискретном 2D пространстве точек в виде сетки, где каждая точка имеет восемь соседей. На рисунке 3(б) показано получение коэффициентов для определения вектора направления контура в точке. Направление контура аппроксимируется как решение задачи максимального потока минимальной длины (max-flow/min-cut) со следующими весовыми коэффициентами, показанными на рисунке 3(б):

$$\omega_k(p) = \frac{\delta^2 \cdot |e_k|^2 \cdot \Delta\phi_k \cdot \det D(p)}{2 \cdot (e_k^T \cdot D(p) \cdot e_k)^{3/2}},$$

где δ – размер ячейки сетки пикселей. $\Delta\phi_k$ – изменение углового коэффициента между k -ой и $(k+1)$ -ой линией сетки, $\Delta\phi_k = \phi_{k+1} - \phi_k$

$$D(p) = g(|\nabla I|) \cdot I + (1 - g(|\nabla I|)) \cdot u \cdot u^T,$$

где $u = \frac{\nabla I}{|\nabla I|}$ – единичный вектор в направлении линии градиента в точке p , I –

единичная матрица и $g(x) = \exp(-\frac{x^2}{2\sigma^2})$.

Хотя контурный анализ позволил существенно повысить точность распознавания, важнейшим фактором для потоковой обработки визуальной информации стало использование нанобиомаркеров. Рассмотрим принципы формирования маркеров на основе наночастиц.

Принципы построения нанобиоинформационной системы на основе полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) CdSe/ZnS. Для визуализации процессов функционирования, взаимодействия различных типов клеток, выявления путей клеточной миграции и других биологических и медицинских исследований применяется маркирование (мечение) определенных типов клеток. Одним из наиболее распространенных способов мечения живой клетки является введение в нее флуоресцентных зондов. Ранее для этого чаще всего применялись органические флуоресцентные красители; в последнее десятилетие все более широкое использование получают квантовые точки – полупроводниковые флуоресцентные наночастицы, обладающие существенными преимуществами над традиционными органическими красителями, в частности, по интенсивности и длительности флуоресценции [1 – 4]. В настоящее время ведутся интенсивные исследования по разработке методов синтеза наночастиц с заданными оптическими свойствами и конструкцией, изучению их взаимодействия с живыми клетками, возможностей практического использования.

Концепция построения и принцип действия наноразмерной системы для индикации и диагностики биологических клеток и клеточных компонентов описаны в [3]. Информационная составляющая наноразмерной биосистемы основана на флуоресценции нанокристаллов CdSe/ZnS. Проникая внутрь диагностированной биологической клетки, нанокристаллы «окрашивают» её, заставляя светиться при облучении препарата возбуждающим ультрафиолетовым (УФ) светом. На этом основывается «информирование» о наличии опухолевых клеток (искомых биологических объектов). Биолого-медицинская составляющая наноразмерных полупроводниковых систем основана на специфическом «узнавании» определённого вида

клеток (биологических объектов) в анализируемых образцах. Такого рода диагностика очень широко применяется в иммунолюминесцентном и иммуноферментном анализе. К сожалению, метод имеет много ограничений, нанокристаллы в этом анализе пока ещё не имеют широкого применения. Полупроводниковая составляющая биосистемы основана на применении наноразмерных кристаллов A_2B_6 полупроводников. На рисунке 4 представлено схематическое изображение иммунолюминесцентного анализа с использованием нанокристаллов CdSe/ZnS зафиксированных стабилизирующей оболочкой, которая позволяет работать в физиологических растворах.

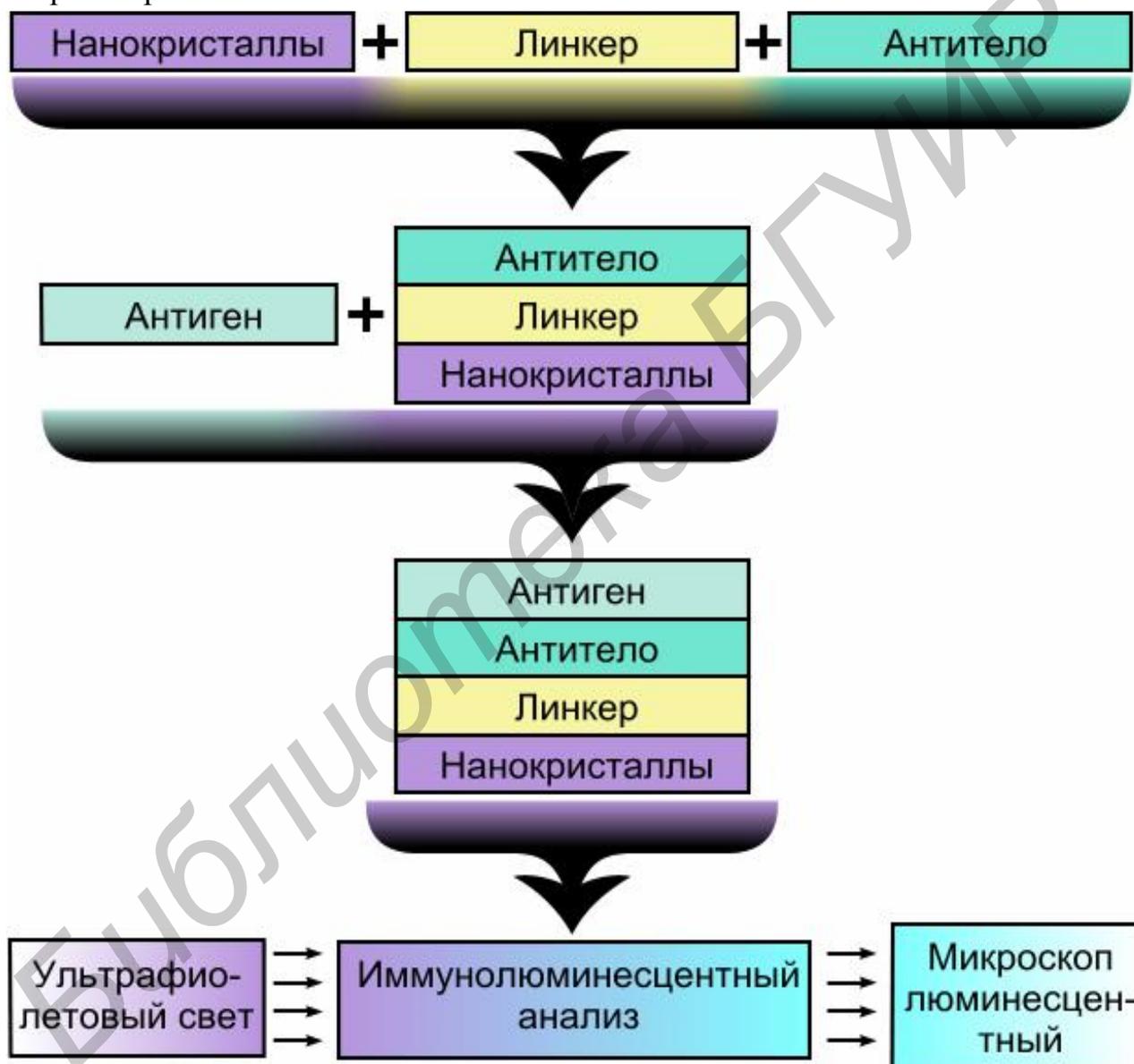


Рис. 4. Схема иммунолюминесцентного анализа с использованием полупроводниковых нанобиомаркеров (система антиген/антитело)

В процессе экспериментов было изучено поглощение наночастиц всех различных модификаций (образцы №1 – пассивирующая плёнка из плотноупакованных молекул меркаптоундекановой кислоты; образцы №2 – тиоглинолевая ки-

слота; образцы №3 – цистеин) клетками опухолевых асцитов и костного мозга, выявлена зависимость качества окраски от концентрации наночастиц в инкубационной среде. Было выявлено поглощение клетками асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) наночастиц всех трёх типов образцов (рисунок 5), окрашивание вели 1 час при 37°C. При этом частицы образцов №1 и №3 в большинстве клеток равномерно распределялись преимущественно в околосмембранном пространстве; на фоне относительно равномерной флуоресценции наблюдалось более яркое свечение мелких гранул. В то же время после инкубации клеток с частицами образцов №2 были видны более крупные ярко флуоресцирующие гранулы. Различное статистическое распределение нанокристаллов в цитоплазме может быть свидетельством различий в механизмах поглощения наночастиц клетками, обусловленных особенностями физико-химических свойств частиц.

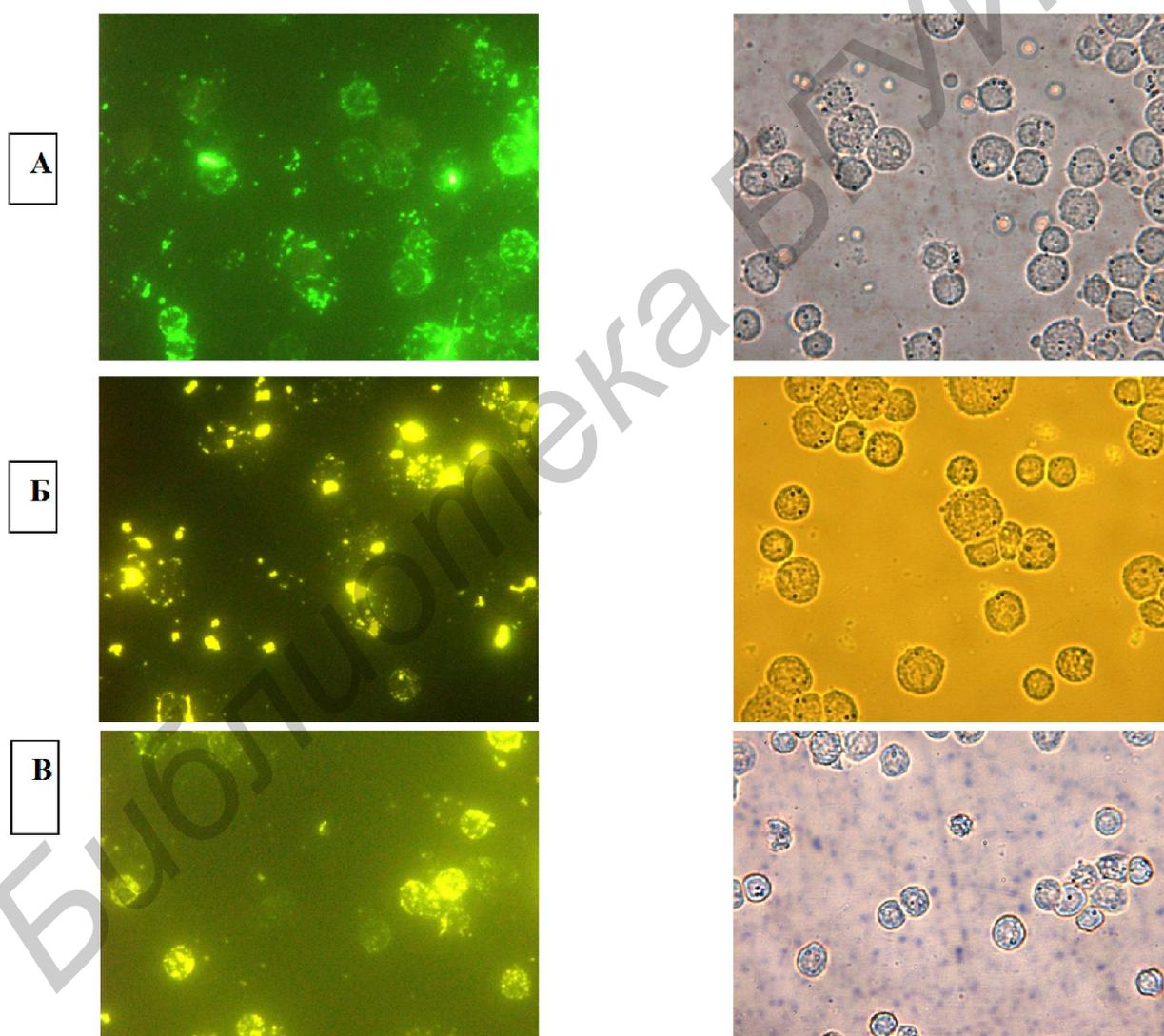


Рис. 5. Микрофотографии клеток асцита АКЭ, окрашенных полупроводниковыми нанокристаллами, в люминисцентном (слева) и обычном (справа) объективе: образцы №1(А), образцы №2(Б) и образцы №3(В).

После 5-часовой инкубации клеток асцитной карциномы Эрлиха с наночастицами не была зарегистрирована цитотоксичность последних. Статистически жизнеспособность клеток снизилась всего лишь на 5 – 9%, однако отличий между опытными сериями (с использованием наночастиц) и контрольными сериями (вместо наночастиц использовали дистиллированную воду) не наблюдали (таблица 1).

При окраске клеток АГ22а или костного мозга частицы проникали в клетки. Не выявлено значительных отличий в окрашивании клеток при инкубации их с частицами всех трёх типов в течение 60 или 120 минут (рисунок 6). При инкубации суспензии нанобиомаркеров (квантовые точки) 3 часа при 37°C с клеточной суспензией АГ 22а или костного мозга наблюдалась агрегация наночастиц (рисунок 3) в изотоническом растворе, что вело к снижению качества окраски, окрашивалась лишь часть клеток опухолевого асцита. Так, при использовании частиц образцов №1 наблюдалась флуоресценция части клеток опухолевого асцита; в единичных клетках наблюдалось яркое свечение по всему фону, в большинстве клеток флуоресцировала клеточная мембрана (рисунок 3А).

Таблица 1 – Таблица жизнеспособности клеток АКЭ

№ п/п	Серия опыта	Жизнеспособность клеток АКЭ, %
1	АКЭ + образцы №1	89,4 ± 2,1
2	АКЭ + образцы №2	92,9 ± 0,8
3	АКЭ + образцы №3	90,6 ± 2,5
4	АКЭ + дистиллированная вода, без наночастиц	90,5 ± 1,8
5	АКЭ, исходный, до окраски	98,1 ± 1,6

Для тушения флуоресценции нанокристаллов, не вошедших в клетки, использовали трипановый синий (рисунок 6Б). Применение трипанового синего показало, что интенсивно поглощают нанокристаллы погибшие клетки (свечение нанокристаллов в погибших клетках постепенно тушится трипановым синим и заменяется через 15 – 20 минут красной флуоресценцией, характерной для этого красителя) и единичные живые клетки.

В большинстве клеток нанокристаллы оседают на клеточной мембране с наружной стороны и их свечение тоже постепенно тушится трипановым синим (сравнение рисунок 3А и 3Б). При инкубации наночастиц с клетками костного мозга последние захватывали частицы (рисунок 6В) и сохраняли флуоресценцию при добавлении трипанового синего (рисунок 6Г), что свидетельствует о проникновении квантовых точек внутрь клеток.

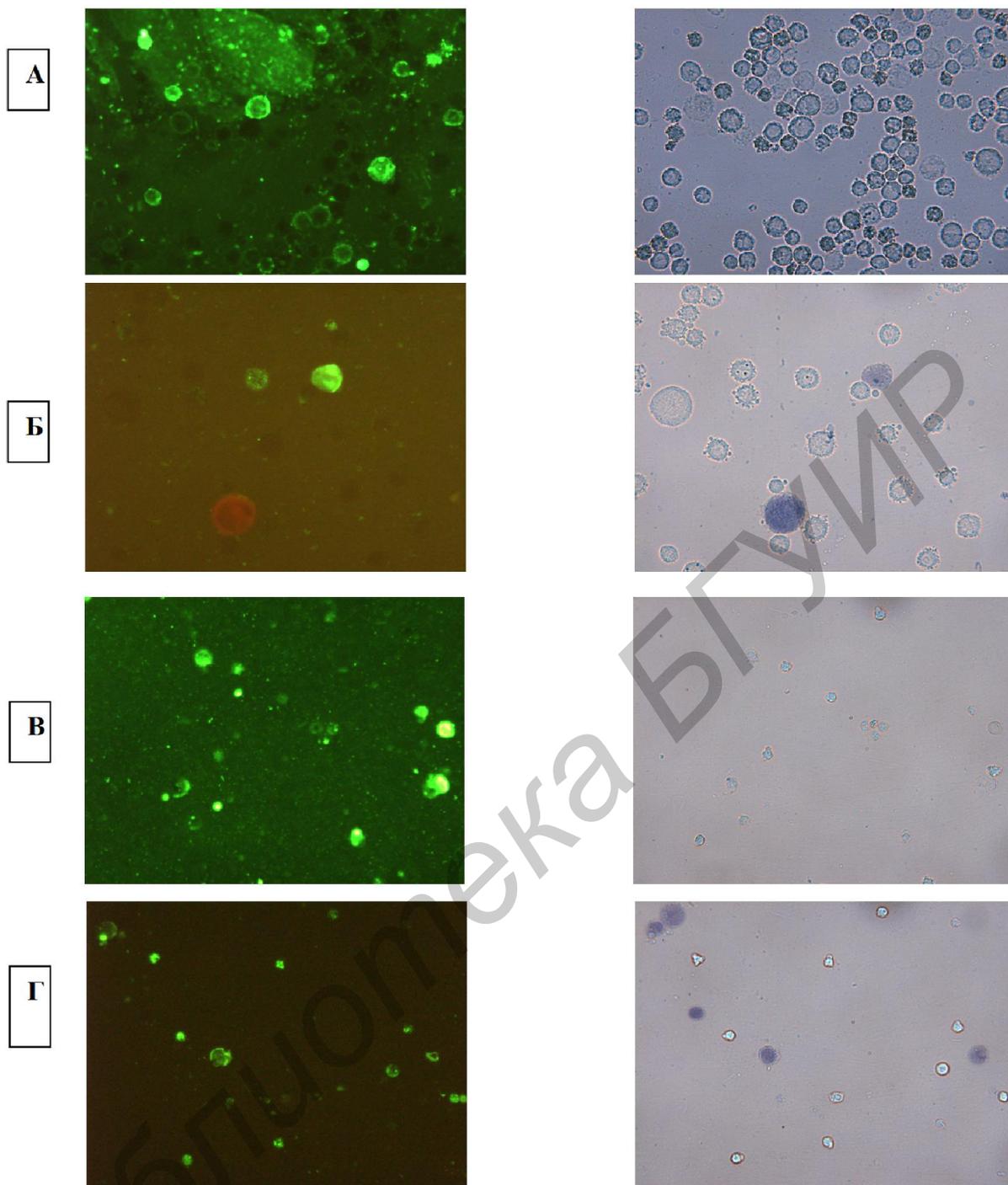


Рис. 6. Микрофотографии клеток асцита АГ22а (А – без окраски трипановым синим, Б – с окраской трипановым синим) и костного мозга мыши (В – без окраски трипановым синим, Г – с окраской трипановым синим), после инкубации с нанокристаллами CdSe/ZnS/ меркаптоундекановая кислота в люминисцентном (слева) и обычном (справа) объективе, 16х.

При окраске частицами образцов №3 наблюдали аналогичную картину, однако проникновение квантовых точек в опухолевые клетки было несколько лучше, и при добавлении трипанового синего флуоресценция в околосмембранном пространстве в большинстве клеток сохранялась.

При инкубации клеток асцита с частицами образцов №2 наблюдалось яркое свечение единичных живых клеток и флуоресценция квантовых точек в примембранном пространстве внутри клеток; причем наночастицы видны в виде мелких

гранул на мембране (рисунок 7А); клетки костного мозга также поглощали нанокристаллы образцов №2 (рисунок 7Б). Следует отметить, что во всех случаях клетки костного мозга лучше поглощали наночастицы, чем клетки опухолевых асцитов. Вероятно, это объясняется различными механизмами поглощения: клетки ретикуло-эндотелиальной системы, такие, как макрофаги, моноциты и нейтрофилы, способны поглощать относительно крупные частицы путем фагоцитоза, в то время как для остальных клеток характерны только процессы пиноцитоза – поглощения жидкостей и растворенных веществ размером до 5 мкм при макропиноцитозе и до 120 нм - при микропиноцитозе [1].

Перспективы развития технологии. Актуальность разработки обусловлена необходимостью совершенствования методов клинической диагностики для раннего определения раковых заболеваний, заболеваний сахарным диабетом и других заболеваний. Однако, визуализация, наблюдение и анализ отдельно взятых клеток ещё не даёт полной картины о всём объекте наблюдения и исследования. Обработка больших статистических структурированных и плохо структурированных данных клеточных образцов, значительного многообразия и огромных объёмов клеток возможна с использованием технологии обработки информации BIG DATA.

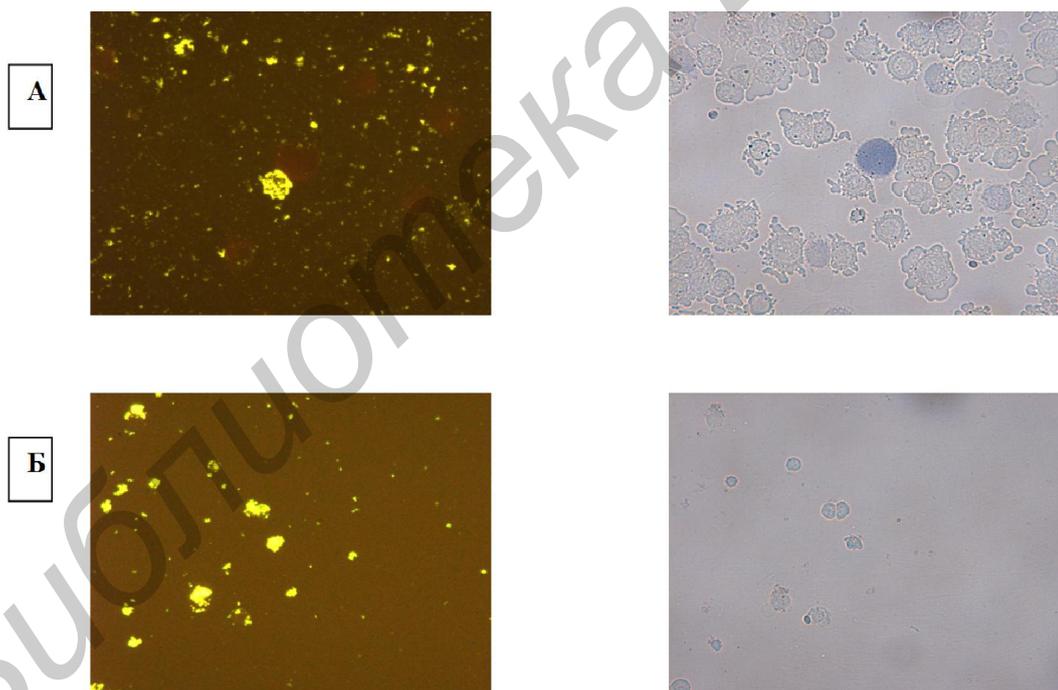


Рис. 7. Микрофотографии клеток асцита АГ22а (А, с окраской трипановым синим) и костного мозга мыши (Б, без окраски трипановым синим) после инкубации с нанокристаллами №2 в люминисцентном (слева) и обычном (справа) объективе, 16х.

Заключение. Разработан ряд модификаций полупроводниковых наночастиц CdSe/ZnS с пассивирующей плёнкой различного состава (из молекул меркаптоундекановой кислоты, тиоглинолевой кислоты и цистеина), пригодных для визуализации живых клеток, и методика прижизненной окраски. Результаты визуализации

продемонстрированы на моделях клеток костного мозга мышей и асцитической жидкости опухолей асцитной карциномы Эрлиха и асцитной гепатомы 22а. Не выявлено цитотоксического эффекта наночастиц в течение 5-часовой инкубации. Наблюдаются различия в морфологической картине поглощения опухолевыми клетками нанокристаллов с различным пассивирующим покрытием, что, вероятно, является отражением различий в механизмах поглощения этих частиц. Результаты опытов свидетельствуют о возможности применения исследованных полупроводниковых наночастиц для прижизненной визуализации и маркировки клеток, а также для изучения закономерностей поглощения клетками нанообъектов различного размера и конструкции. Получен большой экспериментально наработанный материал в виде изображений клеточных биологических объектов. Полученный экспериментальный материал представляет собой большие статистически структурированные и плохо структурированные данные клеточных образцов. Обработка значительного многообразия и огромных объёмов изображений клеток возможна с использованием технологии BIG DATA.

Литература

1. Aldana J., Wang Y.A., Peng X. 2001. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. J Am Chem Soc. V. 123. P. 8844 – 8850.
2. Zhang Y., Chen Y., Westerhoff P., Crittenden J.C. Stability and removal of water soluble CdSe quantum dots in water. Environ Sci Technol. 2008 Jan 1;42(1):321-5.
3. Etxeberrial E., Gonzalez P., Baroja-Fernandez E., Romero J.P. Fluid Phase Endocytic Uptake of Artificial Nano-Spheres and Fluorescent Quantum Dots by Sycamore Cultured Cells // Plant Signaling & Behavior. 2006. V. 1. № 4. P. 196-200.
4. Hansen C.G., Nichols B.J. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis // Journal of Cell Science. 2009. V. 122. № 11. P. 1713-1721.