

## Морфологический анализ изолированных астроцитов с использованием фазово-контрастной микроскопии

© А.А. Широкова<sup>1</sup>, Е.В. Яковлев<sup>1</sup>, И.В. Симкин<sup>1</sup>, Н.А. Колотьева<sup>1,2</sup>, С.В. Новикова<sup>1,2</sup>, А.Д. Насыров<sup>1</sup>, И.Р. Денисенко<sup>1</sup>, К.Д. Гурский<sup>1</sup>, И.Н. Шишков<sup>1</sup>, Д.Е. Нарзаева<sup>1,2</sup>, А.Б. Салмина<sup>1,2</sup>, С.О. Юрченко<sup>1</sup>, Н.П. Крючков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский центр неврологии, Москва, Россия

e-mail: shirokova2001@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.05.2024 г.

В окончательной редакции 19.06.2024 г.

Принята к публикации 30.10.2024 г.

Представлен новый метод сбора и анализа данных для создания цифровых двойников клеточных систем. Для сбора данных были проведены эксперименты по ежедневной визуализации роста астроцитов в течение 18 дней со второго дня культивации. Полученные изображения были размечены, и на их основе обучена нейронная сеть Mask R-CNN. Из детектированных астроцитов были выделены такие признаки, как длины всех отростков астроцитов  $L_i$ , количество узлов  $Nb_i$  и общая площадь астроцитов  $V_i$ . Полученные параметры были определены как функции времени культивации. Полученные временные зависимости будут использованы для создания цифрового двойника изолированных клеток астроцитов.

**Ключевые слова:** цифровой двойник, астроциты, фазово-контрастная микроскопия, машинное обучение.

DOI: 10.61011/OS.2024.12.59802.6617-24

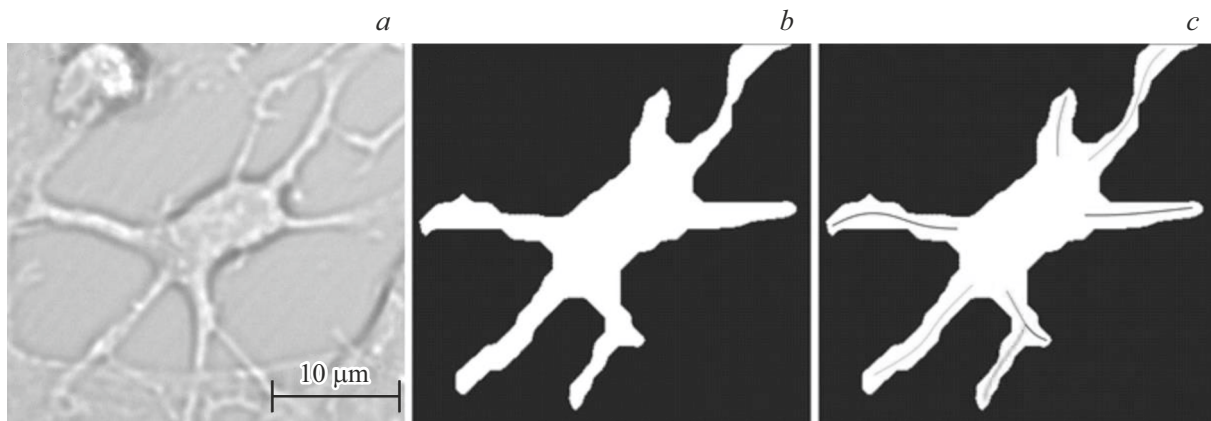
В области биологии актуальной задачей является производство новых биоматериалов. Для этого необходимо детальное понимание процессов на уровне клеток. Традиционные эксперименты ограничивают исследования, поэтому все больше внимания уделяется цифровым двойникам — цифровым представлениям реальных объектов, основанным на компьютерных моделях и экспериментальных данных. Цифровые двойники в клеточной биологии позволяют описывать динамику клеток [1], взаимодействие клеток между собой [2,3], процесс роста [4–6] и т.д. Важной областью для создания цифрового двойника на основе компьютерного моделирования является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Он играет важную роль в поддержании центральной нервной системы, контролируя процессы метаболизма, гомеостаза, нейровоспаления, нейропластичности и нейрогенеза. Создание цифрового двойника ГЭБ позволит ускорить и упростить эксперименты, приблизит к пониманию межклеточных взаимодействий в мозге. Первым шагом для создания цифрового двойника ГЭБ является создание цифрового двойника астроцитов. Поэтому изучение процесса роста астроцитов методами компьютерного моделирования является важной задачей на сегодняшний день. Астроциты представляют собой звездчатые глиальные клетки, широко распространенные в центральной нервной системе (ЦНС). Они играют важнейшую роль в различных функциях ЦНС, таких как поддержание гомеостаза внеклеточного пространства, метаболический контроль нейроваскулярных единиц, со-

здание и контроль синаптических связей [7], реакция на нейротравмы [8,9]. Однако любая компьютерная модель должна быть подтверждена экспериментальными данными.

Для экспериментальных исследований морфологических признаков астроцитов используются различные методы микроскопии, например электронная [10], флуоресцентная [11,12], фазово-контрастная [13] и т.д. Однако большинство этих методов требуют процедуры фиксации, из-за чего наблюдение происходит за неживыми клетками. Такая методика не подходит для наблюдения за динамикой роста и изменением морфологических признаков. Для этой цели в настоящей работе используется фазово-контрастная микроскопия.

Для проведения экспериментов по наблюдению за ростом изолированных астроцитов использовали диссоциированную культуру астроцитов, полученную из новорожденных крыс. Астроцитарная культура развивалась в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре +37°C и относительной влажности 98%. После формирования монослоя культура помещалась в 96-луночный планшет.

Морфология астроцитов была изучена с помощью метода фазово-контрастной микроскопии, не требующего окрашивания и фиксации. Наблюдения проводились при помощи системы визуализации „EVOS M7000“ (Thermo Fisher Scientific, США). В течение 18 дней проводилась ежедневная съемка культуры астроцитов, помещенных в инкубатор микроскопа с моторизованным столиком.



**Рис. 1.** Сегментация астроцита: (а) оригинальное изображение астроцита; (b) детектирование астроцита моделью 30; (с) сегментированная маска астроцита и его скелетированных ветвей, разные цвета соответствуют распознанным сегментам.

Ежедневно снималось поле  $5 \times 5$  кадров ( $320 \times 240 \mu\text{m}$ ) с увеличением  $\times 40$  в каждой из 6 лунок планшета.

В настоящее время для сегментации изображений используются сверточные нейронные сети, так как они показывают достаточно высокую точность. Они широко применяются в различных задачах физики [14], биологии [15] и т.д. Однако методы детекции клеток созданы для детекции иммуногистохимически окрашенных и зафиксированных клеток, что не подходит для проведенных экспериментов. Поэтому для детекции изолированных астроцитов была использована нейросетевая модель Mask R-CNN (regions with convolution neural networks) [16], обученная на наших экспериментальных данных.

Нейронная сеть была обучена на изображениях астроцитов, размеченных LabelMe. Для обучения использовались более 200 изображений  $1024 \times 1024$ , полученных из исходных изображений, поделенных на 4 части. В итоге для обучения использовалось более 1000 изображений, полученных путем расширения исходного набора данных с помощью аугментации.

Полученный набор данных использовался для обучения трех моделей. Их основное различие заключается в разрешении получаемого изображения. Так, модель 20 принимает на вход изображение с разрешением  $256 \times 256$  пикселей, модель 30 —  $512 \times 512$  пикселей и модель 50 —  $700 \times 700$  пикселей. Числа в названиях моделей обозначают количество тысяч шагов для обучения. Модель 20 обладала наихудшими характеристиками среди всех моделей. Несмотря на то, что модель 50 обладает наивысшей точностью ( $P = 0.72$ ), модель 30 лучше минимизирует ложноположительные результаты. Поэтому для детектирования и дальнейшего анализа астроцитов была выбрана модель 30. Пример определенного моделью астроцита приведен на рис. 1, b.

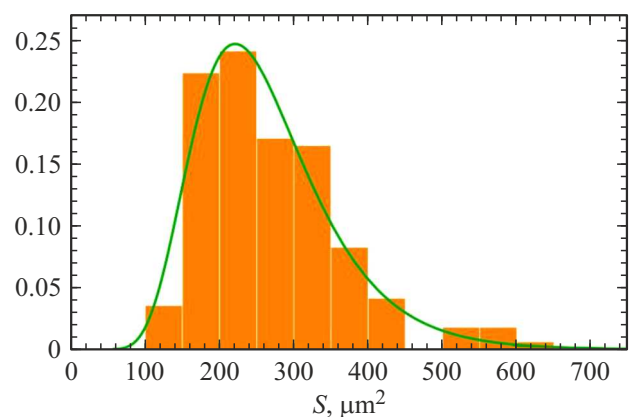
Для анализа морфологических признаков были выбраны три параметра: общая длина отростков, число отростков и площадь астроцита (включая отростки). Для определения отростков астроцитов сначала извле-

кались ядра на основе локальной изотропии изображения. После этого ядро удаляется из маски, а отростки подвергаются скелетонизации, в результате чего остаются отростки толщиной в один пиксель. После этого определяется количество сегментов (отростков) методом модернизированного графа. Пример определенных отростков показан на рис. 1, c. На основании этого результата мы идентифицировали узлы, отростки и сегменты отростков, что позволило измерить динамику роста клеток в эксперименте.

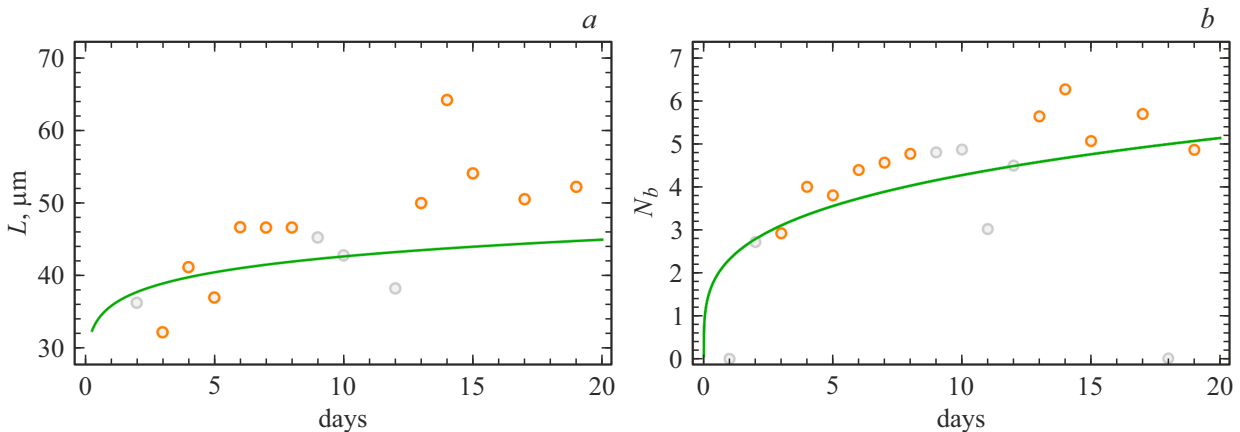
В результате пост-обработки были построены гистограммы распределений площадей астроцитов  $V_i$  на седьмой день, показанные на рис. 2, и временные зависимости длины отростков  $Nb_i$  и количества узлов  $L_i$ , показанные на рис. 3. В итоге общая площадь астроцитов была определена как функция логнормального распределения:

$$V_i = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right),$$

где  $x$  — площадь астроцитов,  $\sigma = 0.42$  — стандартное отклонение,  $\mu = 5.50$  — математическое ожидание.



**Рис. 2.** Гистограммы распределения площади астроцитов  $S, \mu\text{m}^2$ , измеренных на 7-й день эксперимента, измеренные моделью 30.



**Рис. 3.** Зависимости параметров астроцитов от времени: (а) средняя длина ветвей  $L$ ; (б) среднее количество узлов на астроцит  $N_b$ , измеренные моделью 30.

Длины всех отростков астроцитов и количество узлов были определены как степенные функции зависимости от времени культивации:

$$N_b t = a t^b,$$

где  $a = 2.30$ ,  $b = 0.27$  — коэффициенты, определенные из аппроксимации данных,

$$L_t = a t^b,$$

где  $a = 36.1$ ,  $b = 0.07$  — коэффициенты, определенные из аппроксимации данных.

Были проведены эксперименты по визуализации первичной культуры астроцитов при помощи фазово-контрастной микроскопии. Полученные изображения были размечены и использованы для обучения сверточной нейронной сети Mask R-CNN. С помощью полученной модели мы смогли измерить такие морфологические параметры, как длина всех отростков астроцита, количество узлов и общая площадь астроцита. Было установлено, что (i) зависимость общей длины отростков и их количество от времени описывается степенным законом, (ii) распределение астроцитов по размерам подчиняется гауссову распределению.

В настоящее время существует много работ по детектированию астроцитов и исследованию их динамики. Так, в работе [17] продемонстрирован новый метод по детектированию астроцитов на основе DCNN. Несмотря на то, что метод позволяет относительно быстро и точно детектировать астроциты, он не сегментирует полученные изображения, из-за чего нельзя определить их морфологические параметры. Анализ эволюции морфологических параметров клеток изучался в других работах. В работе [18] была разработана платформа для изучения динамики нейронов, но нейроны нужно сегментировать вручную.

Таким образом, был разработан метод, позволяющий детектировать астроциты на низкоконтрастных изобра-

жениях и выделять их морфологические признаки. Полученные данные будут использованы для создания цифровых двойников изолированных клеток астроцитов, которые позволят выявлять различные процессы в живых системах без необходимости проведения экспериментов. В дальнейшем планируется проведение экспериментов по наблюдению за астроцитами после добавления различных метаболитов, а также эксперименты с другими клеточными культурами. Полученные в рамках работы результаты могут быть полезны для научных сообществ в области биологии, биофизики, медицины, производства биоматериалов.

### Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке гранта РФ № 22-72-10128 на базе МГТУ им. Н.Э. Баумана.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Список литературы

- [1] J.A. Bull, F. Mech, T. Quaiser, S.L. Waters, H.M. Byrne. *PLoS Comput. Biol.*, **16** (8), e1007961 (2020). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007961
- [2] J. Metzcar, Y. Wang, R. Heiland, P. Macklin. *JCO Clin. Cancer Inform.*, **3**, 1–13 (2019). DOI: 10.1200/CCI.18.00069
- [3] G. Xu, H. Fang, Y. Song, W. Du. *Agriculture*, **13** (1), 142 (2023). DOI: 10.3390/agriculture13010142
- [4] M. Al Bakir, A. Huebner, C. Martínez-Ruiz, K. Grigoriadis, T.B.K. Watkins, O. Pich, D.A. Moore, S. Veeriah, S. Ward, J. Laycock, D. Johnson, A. Rowan, M. Razaq, M. Akther, C. Naceur-Lombardelli, P. Prymas, A. Toncheva, S. Hessey, M. Dietzen, E. Colliver, A.M. Frankell, A. Bunkum, E.L. Lim, T. Karasaki, C. Abbosh, C.T. Hiley, M.S. Hill, D.E. Cook, G.A. Wilson, R. Salgado, E. Nye, R.K. Stone, D.A. Fennell, G. Price, K.M. Kerr, B. Naidu, G. Middleton, Y. Summers, C.R. Lindsay, F.H. Blackhall, J. Cave, K.G. Blyth, A. Nair,

- A. Ahmed, M.N. Taylor, A.J. Procter, M. Falzon, D. Lawrence, N. Navani, R.M. Thakrar, S.M. Janes, D. Papadatos-Pastos, M.D. Forster, S.M. Lee, T. Ahmad, S.A. Quezada, K.S. Peggs, P. Van Loo, C. Dive, A. Hackshaw, N.J. Birkbak, S. Zaccaria, TRACERx Consortium, M. Jamal-Hanjani, N. McGranahan, C. Swanton. *Nature*, **616** (7957), 534–542 (2023). DOI: 10.1038/s41586-023-05729-x
- [5] M. Fujiwara, M. Imamura, K. Matsushita, P. Roszak, T. Yamashino, Y. Hosokawa, K. Nakajima, K. Fujimoto, S. Miyashima. *Curr. Biol.*, **33** (5), 886–898.e8 (2023). DOI: 10.1016/j.cub.2023.01.036
- [6] S. Loerakker, T. Ristori. *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, **15**, 1–9 (2020). DOI: 10.1016/j.cobme.2019.12.007
- [7] E. Vezzoli, C. Cali, M. De Roo, L. Ponzoni, E. Sogne, N. Gagnon, M. Francolini, D. Braidà, M. Sala, D. Müller, A. Falqui, P.J. Magistretti. *Cereb. Cortex*, **30** (4), 2114–2127 (2020). DOI: 10.1093/cercor/bhz226
- [8] Y. Zhou, A. Shao, Y. Yao, S. Tu, Y. Deng, J. Zhang. *Cell Commun. Signal.*, **18**, 1–16 (2020). DOI: 10.1186/s12964-020-00549-2
- [9] R. Siracusa, R. Fusco, S. Cuzzocrea. *Front. Pharmacol.*, **10**, 479091 (2019). DOI: 10.3389/fphar.2019.01114
- [10] S. Loerakker, T. Ristori. *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, **15**, 1–9 (2020). DOI: 10.1016/j.cobme.2019.12.007
- [11] A. Horvat, M. Muhić, T. Smolić, E. Begić, R. Zorec, M. Kreft, N. Vardjan. *Cell Calcium*, **95**, 102368 (2021). DOI: 10.1016/j.ceca.2021.102368
- [12] R.V. Allahyari, K.L. Clark, K.A. Shepard, A.D.R. Garcia. *Sci. Rep.*, **9** (1), 565 (2019). DOI: 10.1038/s41598-018-37555
- [13] Y.C. Cheng, C.J. Huang, W.C. Ku, S.L. Guo, L.T. Tien, Y.J. Lee, C.C. Chien. *Stem Cell Rev. Rep.*, **18** (2), 839–852 (2022). DOI: 10.1007/s12015-021-10319-3
- [14] T. Lu, B. Han, F. Yu. *Ecol. Inform.*, **62**, 101277 (2021). DOI: 10.1016/j.ecoinf.2021.101277
- [15] F.R. Mashrur, A.D. Roy, D.K. Saha. In: 2019 4th Int. Conf. Electr. Inf. Commun. Technol. (EICT), IEEE (2019), pp. 1–5. DOI: 10.1109/EICT48899.2019.9068806
- [16] H.F. Tsai, J. Gajda, T.F. Sloan, A. Rares, A.Q. Shen. *SoftwareX*, **9**, 230–237 (2019). DOI: 10.1016/j.softx.2019.02.007
- [17] I. Suleymanova, T. Balassa, S. Tripathi, C. Molnar, M. Saarma, Y. Sidorova, P. Horvath. *Sci. Rep.*, **8** (1), 12878 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-31284-x
- [18] A. Mencattini, A. Spalloni, P. Casti, M.C. Comes, D. Di Giuseppe, G. Antonelli, M. D’Orazio, J. Filippi, F. Corsi, H. Isambert, C. Di Natale, P. Longone, E. Martinelli. *Patterns*, **2** (6), 100261 (2021). DOI: 10.1016/j.patter.2021.100261