

Применение методов количественного фазового имиджинга с использованием когерентного и низкокогерентного излучения для исследования реакции живых клеток на фотодинамическое воздействие

А. А. Жихорева¹, А. В. Белашов¹, Т. Н. Беляева², А. В. Салова², Е. С. Корнилова², И. В. Семенова¹, О. С. Васютинский¹

¹ Физико-технический институт имени А. Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Представлены результаты разработки методов неинвазивного долговременного мониторинга клеток с использованием голографических методов при инициации различных типов клеточной гибели. Нами было показано, что комплексный анализ десяти клеточных характеристик, извлекаемых из фазовых изображений, позволяет с высокой точностью разделить различные типы и состояния живых клеток, что может быть использовано для определения их реакции на фотодинамическое воздействие. Количественный фазовый имиджинг живых клеток может осуществляться как с помощью внеосевой цифровой голографической микроскопии, так и при использовании низкокогерентной голографии, что позволяет подавить негативное влияние когерентного шума и получить более объективные данные о параметрах клеток.

Ключевые слова: Количественный фазовый имиджинг, Цифровая голографическая микроскопия, Фазовое изображение, Низкокогерентная голография, Внеосевая цифровая голография.

Цитирование: Жихорева, А. А. Применение методов количественного фазового имиджинга с использованием когерентного и низкокогерентного излучения для исследования реакции живых клеток на фотодинамическое воздействие / А. А. Жихорева, А. В. Белашов, Т. Н. Беляева, А. В. Салова, Е. С. Корнилова, И. В. Семенова, О. С. Васютинский // HOLOEXPO 2022: XIX Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — Барнаул: ИП Колмогоров И. А., 2022. — С. 410–413.

Введение

Методы количественной фазовой визуализации представляют большой интерес в научной литературе из-за возможности длительного мониторинга живых клеток и вычисления большого количества оптических и морфологических клеточных характеристик [1]. Использование цифровой голографической микроскопии позволяет напрямую вычислить из фазовых изображений клеток более 9 клеточных параметров, таких как средний фазовый набег, индуцированный клеткой, сухую массу и фазовый объем клетки [1]. Анализ этих клеточных параметров, полученных методами фазовой визуализации, позволяет детектировать заражение малярией эритроцитов [2], определять живые и мертвые клетки *in vitro* [3], а также выявлять клетки с патологической морфологией [4]. Однако обработка больших объемов экспериментальных данных и выявление клеточных патологий требует автоматизации процесса получения и анализа фазовых изображений [4]. В рамках данной работы был разработан и апробирован метод определения типа клеток (среди клеточных

линий HeLa, A549, 3T3), а также их состояния (живые, некротические или апоптотические клетки) на основе анализа фазовых изображений, полученных методами цифровой голографической микроскопии и TIE-визуализацией (Transport of Intensity Equation).

Используемые методы и подходы

В ходе выполнения работы было использовано два метода: когерентная цифровая голографическая микроскопия и метод фазовой визуализации, основанный на вычислении фазы из серии распределений интенсивности расфокусированных изображений клеток при использовании уравнения переноса интенсивности. Для разработки алгоритмов классификации с помощью цифровой голографической микроскопии, основанной на интерферометре Маха-Цендера, и TIE-визуализации было зарегистрировано и восстановлено несколько десятков цифровых голограмм клеток трех типов (HeLa, A549 и 3T3) находящихся в трех состояниях (живые клетки и, погибшие путем некроза и апоптоза). В качестве регистрирующего излучения в интерферометре использовался He-Ne лазер, а TIE-визуализация реализовывалась на базе микроскопа Nikon-TI2. Зарегистрированные в голографическом микроскопе типичные фазовые изображения клеток в разных состояниях представлены на рисунке 1.

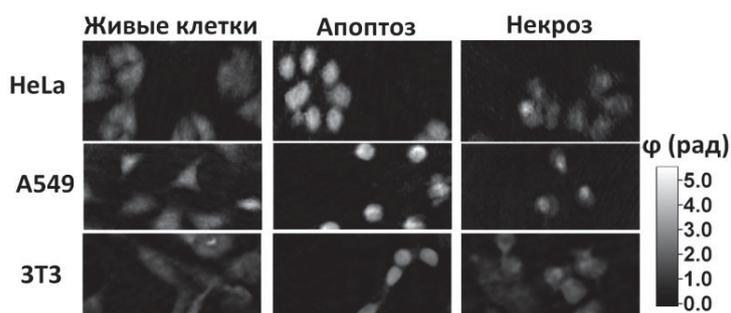


Рис. 1. Примеры фазовых распределений клеток разных типов, находящихся в разных состояниях.

В ходе численного анализа распределений интегрального фазового набег, внесенного клетками в проходящий волновой фронт, были определено 10 характеристик, описывающих: морфологические, оптические и физиологические свойства анализируемой клетки. Для оценки морфологических параметров клетки из распределения интегрального фазового набег $\varphi(x,y)$ вычислялось пространственное распределение толщины клетки $h(x,y)$ в предположении постоянства внутриклеточного показателя преломления $n_{cell} = \text{const}$ по формуле 1.

$$h = \frac{\varphi \lambda (n_{medium} - n_{cell})}{2\pi}, \quad (1)$$

где λ – длина волны зондирующего излучения, а n_{medium} – показатель преломления окружающей среды. После сегментации отдельных клеток на фазовых изображениях и определения их параметров были составлены базы данных для каждого метода визуализации, включающие информацию о более чем 100 клетках в разных состояниях.

Результаты

Сравнение клеточных параметров, полученных разными методами визуализации, показал, незначительное влияние когерентного шума на определение среднего фазового набега, сухой массы и фазового объема клетки. Кроме того, динамики изменений клеточных параметров при разных типах клеточной гибели одинаковы как при исследовании клеточных структур голографической микроскопией, так и при использовании ТЕ-визуализацией. На основе накопленных фазовых клеточных параметрах была проведена разработка нескольких алгоритмов машинного обучения с использованием 1) метода опорных векторов (SVM), 2) метода k-ближайших соседей (k-NN), 3) метода ансамбля классификаций алгоритмов деревьев решений и k-ближайших соседей (EC).

Таблица 1. Точность классификации по состояниям и типам клеток с использованием разных алгоритмов.

Тип классификации\Метод	SVM	k-NN	EC
Состояния клеток HeLa	89,4%	84,4%	85,0%
Состояния клеток A549	90,0%	89,0%	82,0%
Состояния клеток ЗТЗ	88,9%	82,7%	83,9%
Тип живых клеток	92,7%	78,1%	81,7%

Для каждого из разработанных алгоритмов проводилась оценка точности классификации при классификации между тремя состояниями одного и того же типа клеток (строки 2-4 таблицы 1) или классификации между типами живых клеток (нижняя строка таблицы 1)

Заключение

В ходе работы было показано, что точность определения клеточных параметров, таких как средних фазовый набег, сухая масса и фазовый одинакова для обоих используемых методов фазовой визуализации. В ходе анализа зарегистрированных параметров было установлено, что наибольшая точность классификации достигается при использовании метода опорных векторов. При этом классификация по состояниям и типу клеток может быть проведена с точностью около 90%. Таким образом, в настоящей работе было продемонстрировано, что методы фазовой визуализации позволяют получить важные количественные данные о биологических объектах. Анализ этих параметров с помощью алгоритмов машинного обучения позволяет проводить точную классификацию клеток по типу и состоянию.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-72-10044).

Список источников

- [1] **Kim, Myung K.** "Digital holographic microscopy." Digital Holographic Microscopy. Springer, New York, NY, (2011).

- [2] **Singla**, Neeru, Vishal Srivastava, and Dalip Singh Mehta. "Development of full-field optical spatial coherence tomography system for automated identification of malaria using the multilevel ensemble classifier." *Journal of biophotonics* 11.5 (2018): e201700279.
- [3] **Жихорева А. А.** и др. "Разработка системы автоматической классификации живых и мертвых клеток на основе анализа их фазовых изображений" в XXXI Международная школа-симпозиум по голографии, когерентной оптике и фотонике: материалы школы-симпозиума. УрФУ им. Б.Н. Ельцина (2019): 59-60.
- [4] **Javidi, Bahram**, et al. "Automated cell identification with compact field portable 3D optical imaging." in *proceedings SPIE: Optical Methods for Inspection, Characterization, and Imaging of Biomaterials IV*. Vol. 11060. International Society for Optics and Photonics, 2019.
- [5] **Belashov, A. V.**, et al. "Machine Learning Assisted Classification of Cell Lines and Cell States on Quantitative Phase Images." *Cells* 10.10 (2021): 2587.

Application of machine learning classification algorithm for distinguishing between cells lines and states based on digital holographic microscopy

*A. A. Zhikhoreva¹, A. V. Belashov¹, T. N. Belyaeva², A. V. Salova², E. S. Kornilova²,
I. V. Semonova¹, O. S. Vasyutinskii¹*

¹ Ioffe Institute, Saint-Petersburg, Russia

² Institute of Cytology of RAS, Saint-Petersburg, Russia

We report development and validation of machine learning classification algorithm aimed at distinguishing between cells lines and states based on analysis of their phase images obtained by digital holographic microscopy. The developed algorithm demonstrate classification accuracy between three cells lines or three cells states (living cells, necrosis, apoptosis) of about 90% using support vector machine algorithm.

Keywords: Digital holographic microscopy, Cells death, Phase images, Classification.