

СПОСОБ УСКОРЕНИЯ СКАНИРОВАНИЯ СПЕКТРОВ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК CdSe/ZnS, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ОКРАСКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Копыцкий А. В., Хильманович В. Н., Бич Н. Н., Караогул О. В.,
Шульга А. В., Басинский В. А.

Гродненский государственный медицинский университет

Актуальность. Современные гистология и патоморфология находятся в поиске новых перспективных красителей срезов тканей или в совершенствовании уже существующих методик окраски и изучения образцов. Так, в последние десятилетия появилось новое поколение органических флюоресцентных красителей, универсальных или специфичных к определённым видам клеток и меняющих свои спектры люминесценции в зависимости от параметров окружения. Одним из таких параметров является рН, связанный течением метаболических процессов, протекающих в отдельных клетках, или их компонентах. Несмотря на отличные перспективы нового поколения красителей в настоящий момент нельзя говорить об их активном внедрении в современную медицину и биологию. Другое перспективное направление – применение неорганических красителей на основе квантовых точек (КТ). Последние также способны к изменениям спектров собственной люминесценции при вариациях рН. Один из указанных красителей основан на КТ CdSe/ZnS. Ранее было показано, что их спектры поглощения и люминесценции меняются при увеличении рН среды, что делает их специфическими индикаторами «защелачивания» или «защелачивания» и перспективными гистологическими красителями [1]. Нами был предложен также метод виртуального окрашивания гистологического среза по спектрам люминесценции КТ [2]. Для внедрения описанного метода в практическое здравоохранение необходимо упростить процедуру сканирования гистологического препарата конфокальным микроскопом. На текущий момент сканирование спектров образца в области 100x100 точек длится 5-6 часов. Таким образом, актуальным является разработка методов ускорения процесса сканирования.

Цель. Разработка методологической базы ускорения процесса сканирования спектров гистологического образца, окрашенного КТ CdSe/ZnS.

Методы исследования. Для достижения поставленной цели использовался сравнительный анализ методов преобразования многомерных данных.

Результаты и их обсуждение. По результатам изучения технических возможностей современных конфокальных микроскопов (КМ) и по результатам

сравнительного анализа преобразования многомерных данных была определена следующая логика ускорения сканирования:

1. Современные КМ обладают режимом одномоментной регистрации люминесценции на одной длине волны. Например, комплекс «NanoFinder 30» может выполнять одновременный съём сигнала в области 512x512 точек. Согласно техническим возможностям модуля сканирования такая регистрация длится примерно 1 секунду. Для 1024 длин волн, таким образом, минимальное время сканирования составит примерно 17 минут. Однако на практике время сканирования оказывается значительно больше, так как, переключение спектрографа на новую длину волны, передача данных на ПК, запись итогов сканирования в буфер и последующая запись из буфера на жёсткий диск занимают существенное время. Поэтому естественное решение проблемы – уменьшение числа длин волн, на которых производится регистрация люминесценции КТ.

2. Указанное выше уменьшение числа длин волн – задача снижения размерности многомерного массива. Такое снижение должно проводиться с минимизацией потери полезной информации. В нашем случае важно сохранение информации о различиях между гистологическими образцами. То есть после проведения этой процедуры оставшихся данных должно хватать, чтобы всё ещё различать 3 класса тканей: «П», «Д», «Н» – ткань, поражённую раком; ткань с дисплазией, нормальную (здоровую) ткань, соответственно.

3. Для снижения размерности на ранее полученных сканах без противоречий между результатами виртуального окрашивания и заключениями патоморфологических исследований могут быть применены следующие методы:

а) кластерный анализ;

б) последовательный перебор длин волн λ_i и построение нейросетевых классификаторов с применением softmax-регрессии, где в качестве предикторов используются интенсивности спектров только для одной длины волны λ_i .

Указанные методы относительно легко реализуются программно, и их назначение можно описать как отбор таких длин волн, для которых удовлетворяются следующие условия:

$$D_{12}, D_{13}, D_{23} \rightarrow \max \quad (1)$$

$$(d_{ij})_1, (d_{ij})_2, (d_{ij})_3 \rightarrow \min \quad (2)$$

где

D_{ij} – меры расстояний между 3 классами образцов,

$(d_{ij})_k$, – меры расстояний между сканами спектров внутри каждого класса.

Упрощение достижения условий (1) и (2) возможно за счёт предварительного получения усреднённых значений интенсивностей спектров на каждой длине волны λ_i по отдельно взятым образцам, то есть за счёт

получения «спектральных профилей образцов». Однако для этого требуются образцы с однородной структурой их ранее выполненного виртуального окрашивания.

4. По результатам предыдущего шага должны быть отобраны несколько длин волн, эффективно разделяющих образцы на классы. Таких длин волн должно быть не много (до нескольких десятков). По результатам предыдущих исследований ожидается, что они будут находиться в 3 областях: недалеко от линии возбуждения, в середине спектра, и, возможно, ближе к инфракрасной границе. Далее выбираются длины волн, консенсусные для кластерного анализа и последовательного перебора, и в массивах данных сканирования остаются только интенсивности на этих длинах волн.

5. Массивы данных сниженной размерности используются в качестве входных для методов виртуального окрашивания, имплементированных ранее. Далее сопоставлением результатов окрашивания на полных массивах и массивах сниженной размерности, определяется точность окрашивания.

6. Если на массивах сниженной размерности образцы идентифицируются верно (то есть сохраняют свои классы), то выделенные в п. 4 длины волн и будут в дальнейшем использоваться в качестве опорных при сканировании новых образцов.

Выводы. Таким образом, нами обоснована логика отбора длин волн для сканирования спектров гистологических образцов, окрашенных КТ CdSe/ZnS. В перспективе предлагаемая методика позволит значительно снизить время сканирования препаратов с сохранением достаточного качества их классификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флуоресцентные наночастицы CdSe/ZnS как нанозонды локального pH в диагностике онкологических заболеваний / И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, А. В. Шульга, С. А. Маскевич // Оптика и спектроскопия. – 2018. – Т. 124, № 5. – С. 605–611.

2. Программное окрашивание гистологических срезов тканей по спектрам люминесценции квантовых точек CdSe/ZnS / А. В. Копыцкий, В. Н. Хильманович, Н. Д. Стрекаль, И. Г. Мотевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. К 100-летию белорусской академической науки : тез. докл. междунар. науч. конф., Пятнадцатого съезда Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, Респ. Беларусь, Минск, 15–17 июня 2022 г. / Минск : БГУ, 2022. – С. 165.