

DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.1>**АНАЛИЗ РАЗМЕРА ТРЁХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИЙ КОМПЬЮТЕРНОГО ЗРЕНИЯ**

Научная статья

**Лапенко А.К.<sup>1,\*</sup>, Ольховая Е.Р.<sup>2</sup>, Купцова П.С.<sup>3</sup>, Чудновец Т.А.<sup>4</sup>, Ляпунова Е.Р.<sup>5</sup>, Комарова Л.Н.<sup>6</sup>**<sup>1</sup> ORCID : 0009-0001-5738-8478;<sup>2</sup> ORCID : 0000-0002-8055-9239;<sup>3</sup> ORCID : 0000-0003-1298-920X;<sup>4</sup> ORCID : 0009-0000-4662-1206;<sup>5</sup> ORCID : 0000-0002-5744-9277;<sup>6</sup> ORCID : 0000-0003-0491-4486;<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup> Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (lapenkoak23[at]oiate.ru)

**Аннотация**

Трёхмерные клеточные модели активно используются в качестве объекта исследований в данное время. Клеточные сфероиды являются особо привлекательным объектом в связи с универсальностью, дешевизной и простотой применения. Определение размера трёхмерных клеточных культур является существенным аспектом при изучении характеристик и поведения трёхмерных клеточных моделей. Ручное определение морфологических характеристик является долгим и трудоёмким процессом. Цель исследования – анализ размера трёхмерных клеточных моделей с помощью технологий компьютерного зрения. Данный способ реализован на языке программирования Python с использованием библиотеки OpenCV. Предлагаемый способ был применён для анализа изображений трёхмерных клеточных моделей, полученных из разных клеточных линий и клеточных концентраций.

**Ключевые слова:** клеточные сфероиды, клетки человека, OpenCV, оптическая микроскопия.**SIZE ANALYSIS OF THREE-DIMENSIONAL CELLULAR MODELS WITH COMPUTER VISION TECHNOLOGY**

Research article

**Lapenko A.K.<sup>1,\*</sup>, Olkhovaya Y.R.<sup>2</sup>, Kuptsova P.S.<sup>3</sup>, Chudnovets T.A.<sup>4</sup>, Lyapunova Y.R.<sup>5</sup>, Komarova L.N.<sup>6</sup>**<sup>1</sup> ORCID : 0009-0001-5738-8478;<sup>2</sup> ORCID : 0000-0002-8055-9239;<sup>3</sup> ORCID : 0000-0003-1298-920X;<sup>4</sup> ORCID : 0009-0000-4662-1206;<sup>5</sup> ORCID : 0000-0002-5744-9277;<sup>6</sup> ORCID : 0000-0003-0491-4486;<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup> National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russian Federation

\* Corresponding author (lapenkoak23[at]oiate.ru)

**Abstract**

Three-dimensional cellular models are actively used as an object of research at this time. Cell spheroids are a particularly attractive object due to their versatility, low cost and ease of application. Size determination of three-dimensional cell cultures is an essential aspect in studying the characteristics and behaviour of three-dimensional cell models. Manual determination of morphological characteristics is a long and time-consuming process. The aim of this study is to analyse the size of three-dimensional cell models using computer vision techniques. This method is implemented in Python programming language using OpenCV library. The proposed method has been applied to analyse images of three-dimensional cell models derived from different cell lines and cell concentrations.

**Keywords:** cell spheroids, human cells, OpenCV, optical microscopy.**Введение**

Появление трёхмерных клеточных культур привело к важным открытиям в биологии опухолей [1]. Клеточные сфероиды стали промежуточным уровнем между культивированием клеток в виде монослоя и тканями у животных и людей [2]. В онкологических исследованиях, клеточные сфероиды довольно реалистично демонстрируют трёхмерный рост и организацию солидных опухолей и, следовательно, имитируют межклеточные взаимодействия и условия микросреды, обнаруженные в опухолях [3]. Например, клеточные сфероиды развивают центральный некроз, аналогичный тому, который наблюдается во многих опухолях *in vivo* [4]. Это обуславливает применимость клеточных сфероидов в исследованиях эффективности и цитотоксичности терапевтических соединений.

Определение размера и оценка закономерностей роста являются двумя существенными аспектами при изучении характеристик и процессов, происходящих в трёхмерных клеточных моделях. Это важные факторы в исследованиях, в которых, например, количественно оценивается поглощение и распределение радиоактивных агентов, и в терапевтических исследованиях, где фармакологические соединения могут вызывать морфологические и структурные изменения в опухолях [5].

Наиболее часто используемый метод определения размера клеточных сфероидов заключается в измерении двух диаметров сфероида с помощью калиброванного окулярного микрометра на инвертированном микроскопе [6]. Затем эти значения используются для ориентировочного определения объема трехмерной клеточной модели [7]. Это измерение является как трудоемким, так и неточным, особенно для гетерогенных клеточных сфероидов и трехмерных клеточных культур, которые не имеют правильную форму и ровный контур. В связи с этим методы, которые автоматически сегментируют и измеряют морфологические показатели множества изображений клеточных сфероидов, играют важную роль в исследовании трехмерных клеточных моделей. Некоторые инструменты для сегментации и обработки изображений клеточных сфероидов доступны в виде плагинов ImageJ, пакетов Matlab или отдельных программ [8], [9]. Морфологические особенности клеточных сфероидов, такие как отсутствие четких контуров, могут осложнять детекцию клеточных сфероидов. Из-за различий в размерах и морфологии сфероидов существующие инструменты не всегда могут обобщать результаты должным образом. Поиск универсального способа автоматизированного количественного анализа позволит расширить использование сфероидов в качестве надежной модели клеточной биологии. В связи с этим, целью работы является анализ размера трехмерных клеточных моделей с помощью технологий компьютерного зрения.

### Методы и принципы исследования

Изображения клеточных сфероидов были получены с помощью инвертированного микроскопа «Микромед И» и видеокамеры "ORBITOR 0,3 MPix", а также программного обеспечения "Future Win Joe". Для получения изображений клеточных сфероидов использовали различные клеточные линии: фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104, клетки почки эмбриона человека НЕК 293, клетки аденокарциномы легкого человека А549. Клетки почки эмбриона человека НЕК 293 и аденокарцинома легкого человека А549 имеют эпителиоподобную морфологию, фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104 – фибробластоподобную морфологию. В исследовании использовали изображения клеточных сфероидов различных размеров. Различные размеры клеточных сфероидов обеспечивали с помощью изменения начальной концентрации 5000, 8000, 10000, 15000, 30000 клеток/сфероид.

Способ определения размера трехмерных клеточных моделей реализован на языке программирования Python с использованием библиотек Pillow, OpenCV, Scikit-image [10]. В качестве основного морфологического параметра клеточных сфероидов оценивали диаметр. Используемый для измерения диаметра автоматизированный способ включает в себя следующие процессы: загрузку изображений, преобразование изображения в оттенки серого, выделение области интереса, маркировку областей, наложение меток на исходное изображение, определение морфологических показателей, сохранение результатов для дальнейшей работы. Результат сохраняли в виде файла формата Excel. Для проверки применимости и корректности работы данного способа использовали ручной метод определения диаметра клеточных сфероидов с помощью программного обеспечения ImageJ.

### Основные результаты

В ходе исследования были получены изображения клеточных сфероидов, сформированных из разных клеточных линий. На рисунке 1 представлены исходные изображения клеточных сфероидов: а – фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104, б – клетки почки эмбриона человека НЕК 293, в – аденокарцинома легкого человека А549. Данные клеточные линии имеют отличающиеся морфологические характеристики, что позволяет использовать исследуемый метод при анализе клеточных сфероидов с различающимися структурными особенностями.



Рисунок 1 - Исходные изображения клеточных сфероидов  
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.1.1>

Примечание: шкала соответствуют 200 мкм

На рисунке 2 (а-в) представлен результат применения функций бинаризации изображений, полученных из разных клеточных линий: 2а – фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104, 2б – клетки почки эмбриона человека НЕК 293, 2в – аденокарцинома легкого человека А549. На рисунке 2 (г-е) представлен результат маркировки клеточных сфероидов на исследуемых изображениях клеточных сфероидов, полученных из разных клеточных линий: 2г – фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104, 2д – клетки почки эмбриона человека НЕК 293, 2е – аденокарцинома легкого человека А549. Несмотря на характерные морфологические особенности полученных клеточных сфероидов, этапы бинаризации изображений, детекции и маркировки объектов проходили успешно для различных клеточных линий, как эпителиальной, так и для фибробластоподобной морфологии.

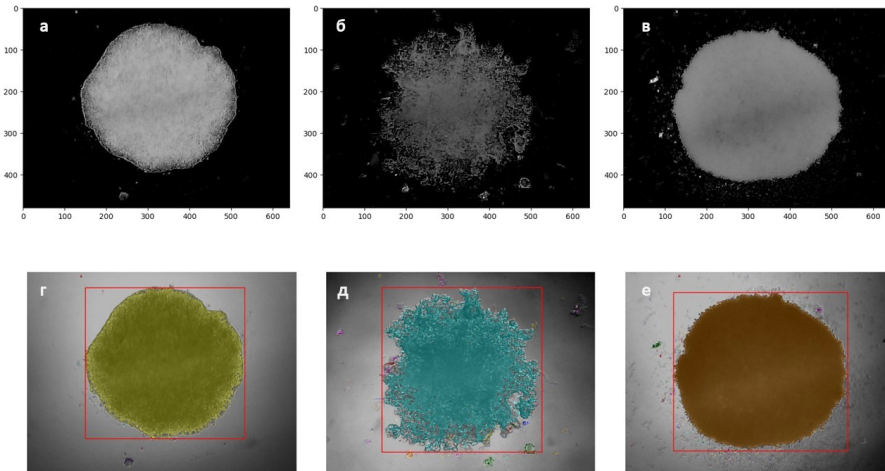


Рисунок 2 - Результат бинаризации изображений (а-в) и маркировки клеточных сфероидов на изображениях (г-е)  
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.1.2>

Во время выполнения анализа могут возникать определенные сложности. Например, наряду с нужным объектом могут детектироваться небольшие скопления клеток (рисунок 3). Для избежания данной проблемы использовали функцию "region.area". Данная функция позволяет сделать фильтрацию объектов, которые проходят детекцию, по размеру, заданному пользователем.

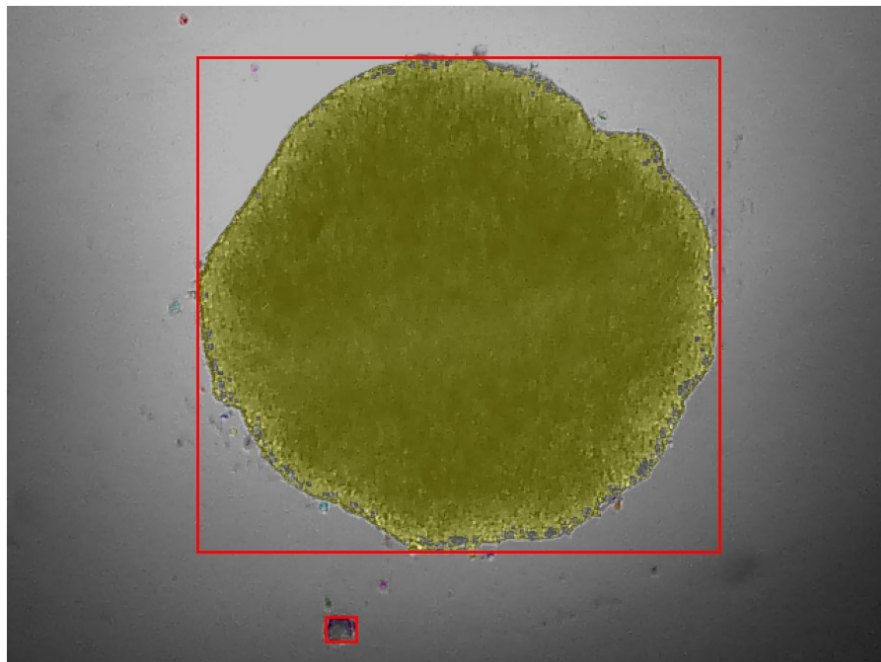


Рисунок 3 - Результат детекции клеточного сфероида и отдельного скопления клеток  
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.1.3>

Примечание: клеточная линия: ФЛЭЧ-104

Результат измерения диаметра клеточных сфероидов, полученных из разных клеточных линий, представлен на рисунке 3.

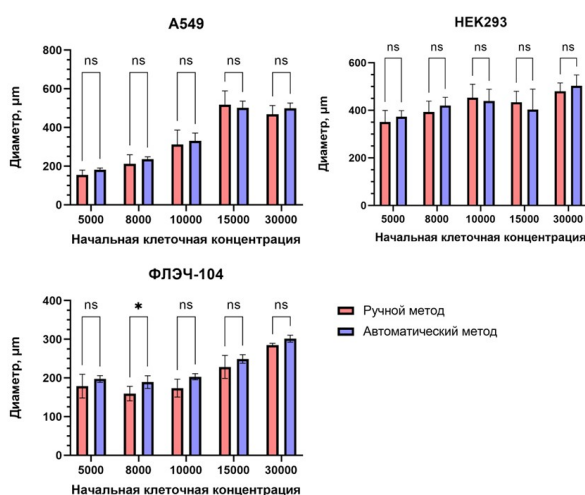


Рисунок 4 - Результат измерения диаметра клеточных сфероидов ручным и автоматизированным методом  
DOI: <https://doi.org/10.60797/jbg.2024.26.1.4>

Примечание: ns – достоверных различий нет, \* – имеются достоверные различия

Показано, что достоверные различия в результатах измерения диаметра клеточных сфероидов ручным и автоматизированным методом были обнаружены на клеточной линии ФЛЭЧ-104 с начальной клеточной концентрацией 8000 клеток/сфероид. Продemonстрировано, что достоверных различий между ручным и автоматическим методами измерения диаметра клеточных сфероидов в оставшихся концентрациях и на остальных клеточных линиях обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что автоматизированный метод определения размера клеточных сфероидов соответствует ручному. Данный метод может применяться для автоматизированного, быстрого способа обработки множества изображений клеточных сфероидов.

#### Заключение

Таким образом, в данной работе был применен метод автоматизированного определения диаметра клеточных сфероидов, полученных из разных клеточных линий. Автоматизированный метод был основан на библиотеках Python. Сравнительный анализ исследуемого способа и ручного методов показал, что автоматизированный метод может применяться для обработки изображений клеточных сфероидов, имеющих различные морфологические характеристики и начальную концентрацию клеток.

#### Конфликт интересов

Не указан.

#### Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

#### Conflict of Interest

None declared.

#### Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

#### Список литературы на английском языке / References in English

1. Bates R.C. Spheroids and cell survival / R.C. Bates, N.S. Edwards, J.D. Yates // Critical Reviews in Oncology/Hematology. — 2000. — Vol. 36. — № 2–3. — P. 61–74. — DOI: 10.1016/S1040-8428(00)00077-9.
2. Achilli T.M. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids / T.M. Achilli, J. Meyer, J.R. Morgan // Expert Opinion on Biobiochemical Therapy. — 2012. — Vol. 12. — № 10. — P. 1347–1360. — DOI: 10.1517/14712598.2012.707181.
3. Hirschhaeuser F. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again / F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld [et al.] // Journal of biotechnology. — 2010. — Vol. 148. — № 1. — P. 3–15. — DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012. — EDN NWLKZX.
4. Gilazieva Z. Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine / Z. Gilazieva, A. Ponomarev, C. Rutland [et al.] // Cancers. — 2020. — Vol. 12. — № 10. — 2727 p. — DOI: 10.3390/cancers12102727. — EDN JIYSJN.

5. Lin S. Image-based high-content screening in drug discovery / S. Lin, K. Schorpp, I. Rothenaigner [et al.] // *Drug Discovery Today*. — 2020. — Vol. 25. — № 8. — P. 1348–1361. — DOI: 10.1016/j.drudis.2020.06.001.
6. Rodday B. Semiautomatic growth analysis of multicellular tumor spheroids / B. Rodday, F. Hirschhaeuser, S. Walenta [et al.] // *Journal of Biomolecular Screening*. — 2011. — Vol. 16. — № 9. — P. 1119–1124. — DOI: 10.1177/1087057111419501.
7. Monazzam A. A new, fast and semi-automated size determination method (SASDM) for studying multicellular tumor spheroids A.A. Monazzam // *Cancer Cell International*. — 2005. — Vol. 5. — P. 1–6. — DOI: 10.1186/1475-2867-5-32. — EDN XLVMUV.
8. Lacalle D. SpheroidJ: An Open-Source Set of Tools for Spheroid Segmentation / D. Lacalle, H. A. Castro-Abril, T. Randelovic [et al.] // *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. — 2020. — Vol. 200. — 105837 p. — DOI: 10.1016/j.cmpb.2020.105837. — EDN RWBRDM.
9. Domínguez C. IJ-OpenCV: Combining ImageJ and OpenCV for processing images in biomedicine / C. Domínguez, J. Heras, V. Pascual // *Computers in Biology and Medicine*. — 2017. — Vol. 84. — P. 189–194. — DOI: 10.1016/j.combiomed.2017.03.027.
10. Van Rossum G. Python 3 Reference Manual / G. Van Rossum, F.L. Drake. — Scotts Valley, CA : CreateSpace, 2009.