20

Анализ времени затухания флуоресценции единичных клеток с использованием модели Segment Anything для оценки биосовместимости пептидных гидрогелей

© Т.Н. Тихонова[1], А.М. Можеров[2], А.В. Барковая[1], Ю.М. Ефремов[2], Д.С. Кузнецова[2], П.С. Тимашев[2,3], В.И. Щеславский[4], В.В. Фадеев[1], Б.П. Якимов[1,2¶]

[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия
[2] Институт регенеративной медицины, Сеченовский университет, Москва, Россия
[3] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
[4] НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий, Нижний Новгород, Россия
e-mail: tikhonova@physics.msu.ru, ¶ bp.jakimov@physics.msu.ru

Поступила в редакцию 22.01.2025 г.
В окончательной редакции 31.01.2025 г.
Принята к публикации 07.04.2025 г.

На примере клеток молочной железы человека MCF-7 исследована возможность оценки изменений метаболизма клеток при их культивации на мягких самоорганизующихся гидрогелях различного уровня биосовместимости, выполненных из пептида Fmoc-FF и хитозана. Продемонстрировано, как по данным микроскопии визуализации времени затухания флуоресценции с использованием современных методов сегментации на основе универсальной модели zero-shot Segment Anything метаболический статус клеток может быть оценен на уровне единичных клеток на выборке большой численности. Представленный метод позволяет выявлять и отслеживать изменения метаболизма клеток, адгезированных на мягких гидрогелях, и на ранней стадии выявлять биосовместимость скаффолдов с клетками тканей, что является перспективным для задач регенеративных технологий.

Ключевые слова: гидрогель, микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции, клетка, метаболизм.

DOI: 10.61011/OS.2025.05.60791.28-25

Введение

Исследование характеристик клеток, адгезированных на гидрогелях, является важным элементом регенеративной медицины [1–5]. Понимание взаимодействия клеток с окружающей средой играет ключевую роль в создании новых биоматериалов, совершенствовании методов тканевой инженерии и разработке более эффективных систем доставки лекарств. В настоящее время в регенеративной медицине наблюдается увеличивающийся интерес к гидрогелям на основе пептида Fmoc-FF [6–8]. Эти гидрогели, состоящие из самособирающихся пептидных нановолокон, представляют собой перспективные платформы для клеточного культивирования благодаря своим уникальным характеристикам [9,10]. Мягкость гидрогеля Fmoc-FF способствует точному воспроизведению механических свойств естественных тканей, что делает его привлекательным для различных применений в области тканевой инженерии.

Одной из ключевых проблем, возникающих при создании новых гидрогелей для задач регенеративных технологий, является быстрая, точная и надежная оценка жизнеспособности клеток на искусственных тканеинженерных конструкциях, не требующая дополнительных манипуляций с образцом. Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) клеток и тканей зарекомендовала себя как мощный инструмент в биологических исследованиях благодаря возможности изучать морфологические и биофизические детали исследуемых структур, а также благодаря малой инвазивности. С помощью специфических красителей можно маркировать клеточные компоненты и исследовать функциональность отдельных органелл, однако многие клетки сами по себе содержат эндогенные флуорофоры, которые могут быть использованы для получения информации о клеточном метаболизме [11–14]. Одним из эндогенных флуорофоров тканей является никотинамидадениндинуклеотид (НАД, NAD). Будучи важным кофактором в клеточном дыхании, НАД играет значительную роль в производстве энергии и метаболических путях и находится в клетках в восстановленной (НАДН), окисленной (НАД+) и фосфорилированной формах (НАД(Ф)Н или НАДФ+). Среди них НАДН и НАД(Ф)Н являются автофлуоресцентными, при этом НАДН демонстрирует наибольшую

интенсивность флуоресценции в клетках [15]. Присутствующие в свободной форме (например, в цитоплазме) или связанные с белками (например, в митохондриях) эти пигменты демонстрируют характерное время жизни, указывающее на их участие в гликолизе или окислительном фосфорилировании. Время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н служит важным параметром для различения этих двух форм. Свободный НАД(Ф)Н обычно имеет более короткое время жизни флуоресценции, примерно 0.4 ns, в то время как связанный с белками НАД(Ф)Н имеет более длительное время жизни, обычно в диапазоне от 1.8 до 5.7 ns, что отражает его взаимодействие с различными клеточными белками [16]. Используя FLIM, можно количественно оценить распределение и динамику свободного и связанного НАД(Ф)Н в клетках, что может улучшить понимание клеточного метаболизма и его регуляции в различных физиологических и патологических условиях [17–19].

При оценке метаболического статуса с помощью метода FLIM важным является оценка статуса по отдельным единичным клеткам, а не по макроскопическому участку ткани, так как даже близко расположенные клеточные субпопуляции могут проявлять гетерогенность метаболизма [20]. При этом ручное выделение связанных областей изображения, принадлежащих отдельным клеткам, — трудоёмкая процедура. Так, на одном изображении могут присутствовать до нескольких сотен отдельных клеток. С учётом того, что для проверки воспроизводимости и различных влияний на параметры затухания флуоресцентного отклика типично измеряются несколько десятков или даже сотни изображений, ручная сегментация единичных клеток становится „бутылочным горлышком“ в анализе экспериментальных данных FLIM.

Для автоматической сегментации единичных клеток на изображениях микроскопии, в том числе на изображениях FLIM, могут быть применены различные архитектуры нейронных сетей, ставящие в соответствие каждому пикселю изображения метку соответствия отдельной клетке либо фона [20,21]. Однако и этот подход в большинстве случаев требует предварительно собранного большого набора обучающих данных с известными сегментированными областями, на которых модель должна быть обучена. Одним из подходов, позволяющих избежать разметки данных и обучения модели перед её применением, является так называемый подход „zero-shot“ (перенос без дообучения). Zero-shot-модели предварительно обучаются на широком и разнородном наборе данных для задач семантической сегментации так, чтобы модель обладала высоким качеством сегментации на изображениях, не похожих на те, что были представлены в обучающем наборе данных. Одной из наиболее популярных zero-shot-моделей последних двух лет стала модель Segment Anything Model (SAM) [22, 23], показывающая высокое качество как на бытовых фотографических снимках, так и на медицинских изображениях [24]. При этом указанная модель не применялась для анализа изображений FLIM для анализа единичных клеток.

В данной работе продемонстрирована возможность использования метода FLIM с эндогенным флуоресцентным контрастом НАД(Ф)Н для анализа метаболизма клеток MCF-7 при их взаимодействии с тканеинженерными конструкциями из самособирающихся короткого пептида Fmoc-FF и гидрогеля из смеси Fmoc-FF с добавлением хитозана. Мы демонстрируем, что метод FLIM позволяет обнаруживать изменения метаболического статуса клеток при его взаимодействии с гидрогелем, при этом более чувствительной оказывается методика оценки параметров по единичным клеткам с использованием разработанного нами подхода с применением zero-shot-модели SAM для сегментации изображений FLIM. Представленный метод позволяет выявлять и отслеживать изменения метаболизма клеток, адгезированных на мягких гидрогелях, и на ранней стадии выявлять биосовместимость скаффолдов с клетками тканей, что является перспективным для задач регенеративных технологий.

1. Материалы и методы

1.1. Приготовление образцов

Реактивы. Пептид N-фторенилметоксикарбонилдифенилаланин (Fmoc-Phe-Phe-OH, Fmoc-FF) был приобретен у Sigma-Aldrich (США), модифицированная среда dulbecco's modified eagle medium (DMEM) была приобретена у Gibco (США).

Гидрогели. Гидрогель Fmoc-FF был приготовлен методом смены растворителя. Гидрогели по методу смены растворителя готовили следующим образом: пептиды растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения исходного раствора, $C_{\text{Fmoc-FF}}$ (исходный) $= 10\%$, затем исходный раствор растворяли в mQ-воде до конечной концентрации $C_{\text{Fmoc-FF}} = 0.6\,\%$. После приготовления гидрогелей их тщательно промывали раствором буфера PBS в течение 2 дней, чтобы обеспечить полное удаление ДМСО [15] (для метода замены растворителя), а также для достижения pH гидрогеля 7.3 вместо pH 4. Гидрогели Fmoc-FF с добавлением низкомолекулярного хитозана (Fmoc-FF + хитозан) ($M = 190\,\text{kDa}$) готовили следующим образом: пептиды растворяли в ДМСО для получения исходного раствора, $C_{\text{Fmoc-FF}}$ (исходный) $= 10\%$, хитозан растворяли в HCl (1 M), $C_{\text{хитозан}}$ (исходный) $= 1\%$. Хитозан добавили в воду до конечной концентрации 0.6%, $C_{\text{хитозан}}$ (итоговый) $= 0.06\%$, после чего смешали с ним исходный раствор $F_{\text{moc-FF}}$ так, чтобы получить $C_{\text{Fmoc-FF}}$ (итоговый) $= 0.6\%$, таким образом, $C_{\text{Fmoc-FF}}/C_{\text{хитозан}} = 10:1$. Гидрогель промывали в течение нескольких часов буфером PBS, чтобы получить конечный pH гидрогеля 7.3.

Культивирование клеток. Клеточные линии рака молочной железы MCF-7 выращивали в полной культуральной среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% сыворотки (FBS) (Gibco, США), 1x PenStrep (Gibco,

США) и 1x GlutaMax (Gibco, США) в стандартном культуральном инкубаторе с 5% CO_2 при температуре 37°C. Клетки высеивали на гели, сформированные на конфокальных чашках, в количестве 300 000 на чашку и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 h. Клетки, высеянные на конфокальные чашки без геля, использовались в качестве контроля.

1.2. Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции

Для получения изображений интенсивности и времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н в монослойных культурах клеток использовался микроскоп NikonTi2-U, оснащенный модулем FLIM: SPC-180NX TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия), гибридным фотодетектором GaAsP для счета фотонов 300–720 nm HPM-100-40 (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для съемки изображений применялся иммерсионный объектив CFI Apochromat LWD Lambda S 40XC WI NA = 1.15. Двухфотонная флуоресценция возбуждалась фемтосекундным Ti:Sa-лазером Toptica Femto Fiber Ultra (частота повторения 80 MHz, длительность импульса 140 fs) на длине волны 780 nm и регистрировалась в диапазоне 420–470 nm. Средняя мощность, подаваемая на образцы, составляла 5–10 mW. Примерная скорость счета фотонов была $(1-2)\cdot 10^5$ фотонов в секунду. Время накопления сигнала составляло 120 s. Измерения проводились при комнатной температуре.

Кривые затухания флуоресценции на полученных FLIM-изображениях обрабатывались попиксельно с использованием двухэкспоненциальной модели затухания с учётом свёртки с гауссовой функцией отклика детектора. Для повышения соотношения сигнал–шум кривые затухания пространственно усреднялись по области 11×11 пикселей („биннинг“ = 5). Для уменьшения числа свободных параметров время затухания короткой компоненты τ_1 было зафиксировано и равно 400 ps. Свободными параметрами аппроксимации были: длинная компонента времени жизни τ_2, амплитуды короткоживущей и долгоживущей компонент α_1 и α_2 соответственно. В качестве дополнительного „интегрального“ параметра было рассчитано среднее время затухания флуоресценции $(\tau_m = (\alpha_1\tau_1 + \alpha_2\tau_2)/(\alpha_1+\alpha_2))$ и отношение амплитуд компонент α_1/α_2. Качество аппроксимации, χ_2, находилось в диапазоне 0.8–1.2. Обработка FLIM-изображений производилась с использованием программного обеспечения SPCImage 8.6 (Becker & Hickl GmbH, Германия).

1.3. Автоматическая сегментация единичных клеток на изображениях FLIM

Для автоматического выделения клеток на изображениях FLIM была использована следующая процедура. Для анализа использовались карты интенсивности флуоресцентного отклика — интегрального числа фотонов, задетектированных под кривой затухания флуоресценции в каждом пикселе изображения — размером 512×512 пикселей. На первом шаге для устранения экстремально высоких и экстремально низких значений интенсивности все значения интенсивности ограничивались снизу значением квантиля 0.01 и сверху значением квантиля уровня 0.99. После этого для устранения неоднородности распределения интенсивности изображение контрастировалось с помощью алгоритма адаптивной эквализации гистограммы с ядром 64×64 пикселя и подавалось на вход модели SAM (версия ViT-L) [25], работающей в режиме „Everything“, т. е. возвращающей все возможные объекты, которые модель распознала на изображении.

После получения масок отдельных объектов сегментированные области отбирались по площади и интенсивности изображения: по интенсивности отбирались области, обладающие средним значением интенсивности более 10% от максимального уровня интенсивности на изображении; по площади отбирались области с размером более 300 и менее 1000 пикселей. Для указанных областей сегментации далее рассчитывались средние значения параметров затухания флуоресценции по области — амплитуд α_1 и α_2, времён затухания τ_1 и τ_2, среднего времени затухания τ_m и отношения амплитуд α_1/α_2. Всего указанным способом было проанализировано 5 изображений для группы контроля, 8 изображений, полученных для клеток, культивированных на гидрогеле Fmoc-FF, и 7 изображений клеток, полученных для клеток, культивированных на гидрогеле, выполненном из Fmoc-FF и хитозана. Выборка составила 386 клеток группы контроля, 826 клеток группы „Fmoc-FF“, 245 клеток группы „Fmoc-FF + хитозан“.

1.4. Статистический анализ данных

Сравнение параметров затухания флуоресцентного отклика производилось с использованием статистического критерия Краскелла с использованием поправки Бонферрони на множественные сравнения. Обработка данных и статистический анализ проводились с помощью программных скриптов, реализованных на языке Python3 с использованием библиотек Pandas, Scipy, Matplotlib, Pytorch, Sam.

2. Результаты

2.1. Попиксельная оценка изменения метаболизма клеток MCF-7, адгезированных на мягком гидрогеле Fmoc-FF

Для исследования метаболизма клеток при их адгезировании на гидрогеле изначально самособирающийся гидрогель Fmoc-FF формировался на чашке Петри методом смены растворителя (разд. 1). Гидрогель Fmoc-FF —

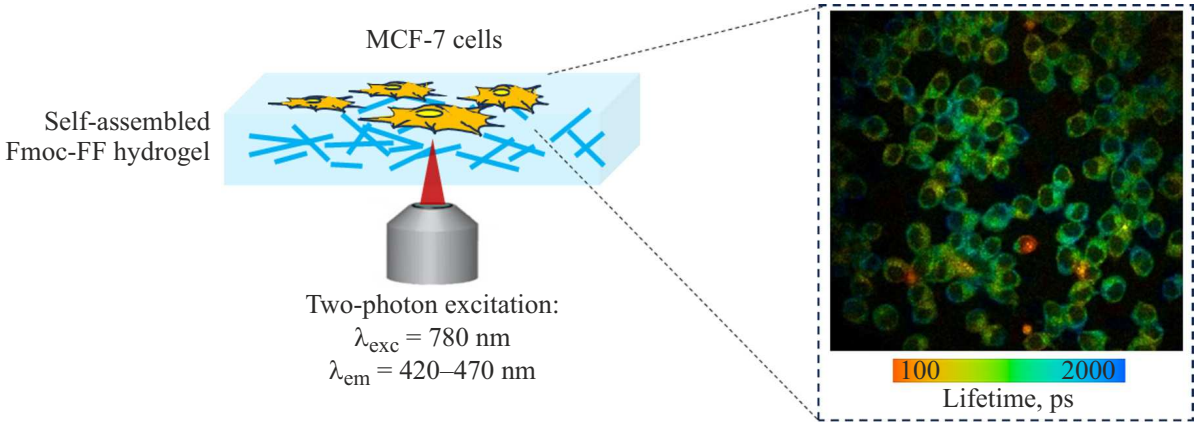

Рис. 1. Схема проведения эксперимента по исследованию метаболизма живых клеток, адгезированных на гидрогеле, методом FLIM.

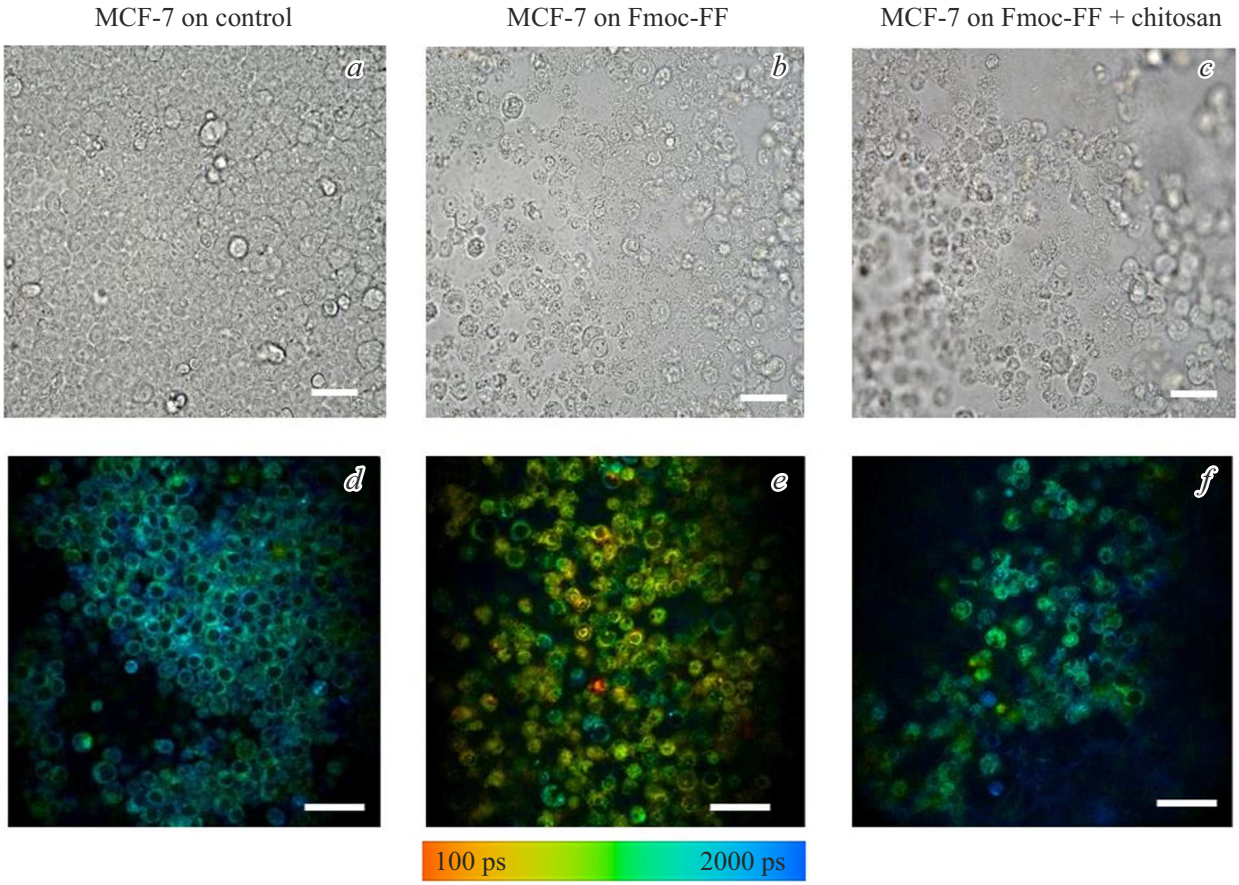

Рис. 2. Оптические изображения клеток MCF-7, помещенные на (*a*) чашку Петри (контроль), (*b*) гидрогель Fmoc-FF, (*c*) гидрогель Fmoc-FF+хитозан. Карты затухания среднего времени флуоресценции для клеток MCF-7, помещенных на (*d*) контроль, (*e*) на гидрогель Fmoc-FF и (*f*) на гидрогель Fmoc-FF+хитозан. Масштабная метка 45 μm.

это мягкий полимер, характеризующийся фибриллярной структурой и высоким содержанием воды (70–95%) [26]. После чего клетки инкубировались на нем и исследовались с помощью FLIM. В результате проведенных измерений строилась карта среднего времени затухания флуоресценции, из которой можно было получить среднее время жизни, а также другие параметры затухания флуоресценции областей, соответствующих единичным клеткам (рис. 1).

На рис. 2 приведены оптические изображения клеток MCF-7, помещенных на чашку Петри (контроль) (рис. 2, *a*), на гидрогель Fmoc-FF (рис. 2, *b*) и на гидро-

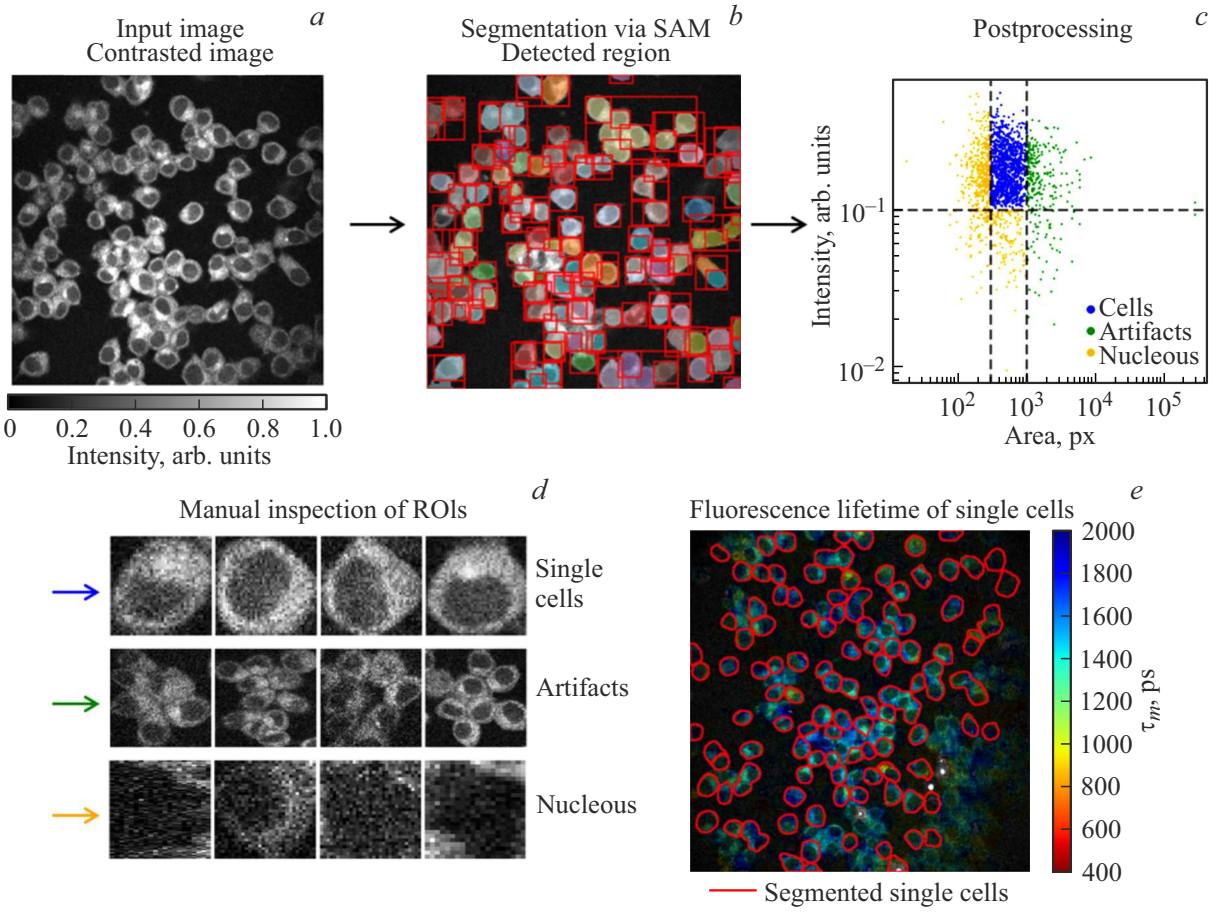

Рис. 3. (*a*) Пример входной отконтрастированной карты интенсивности флуоресценции, используемой для сегментации единичных клеток. (*b*) Неотфильтрованные результаты сегментации клеток, полученные с помощью SAM; красными прямоугольниками выделены отдельные области сегментации (отдельные цвета заливки на изображении). (*c*) Распределение площади сегментированных областей и средней интенсивности флуоресценции в соответствующих областях; штриховые линии определяют зоны, отделяющие области клеток (синие точки) от области отдельно сегментированных ядер клеток (зеленые точки) и других артефактов (оранжевые точки). (*d*) Примеры областей сегментированных клеток, артефактов и отдельных ядер. (*e*) Пример наложения границ сегментированных областей (красные линии) с картой среднего времени затухания флуоресценции.

гель Fmoc-FF + хитозан (рис. 2, *c*). Хитозан, являющийся полисахаридом, полученным из природного хитина, привлекает внимание в области тканевой инженерии благодаря способности повышать жизнеспособность клеток, биосовместимости и биодеградируемости [27,28].

По картам среднего времени затухания флуоресценции для клеток, помещенных на контроль (рис. 2, *d*), на гидрогель Fmoc-FF (рис. 2, *e*) и на гидрогель Fmoc-FF + хитозан (рис. 2, *f*), видно, что метаболизм клеток, находящихся на контроле и гидрогеле Fmoc-FF отличается, при этом добавление хитозана в гидрогель приводит к тому, что система клетка на гидрогеле по своих характеристикам становится более похожа на контроль. Попиксельное сравнение кинетик затухания флуоресценции для всех исследуемых систем показало, что для клеток, находящихся на чашке Петри, среднее время жизни $\tau_{\mathrm{m(control)}} = 1410$ ps больше времен жизни для клеток, находящихся на гидрогеле Fmoc-FF и гидрогеле Fmoc-FF + хитозан, $\tau_{\mathrm{m(Fmoc\text{-}FF)}} = 1190$ ps и $\tau_{\mathrm{m(Fmoc\text{-}FF+chitosan)}} = 1240$ ps соответственно.

Как отмечалось ранее, для флуоресценции НАД(Ф)Н короткая компонента (α_1) соответствует свободной форме НАД(Ф)Н, а длинная — форме, связанной с белком (α_2). Уменьшение среднего времени жизни флуоресценции НАД(Ф)Н при адгезии клеток на мягком гидрогеле Fmoc-FF связано с увеличением вклада свободной формы α_1 с 63 до 68, в то время как время жизни свободной компоненты τ_1 уменьшается с 600 до 430 ps. Такое изменение может свидетельствовать о том, что в клетках, помещенных на гидрогель, больший вклад в метаболизм начинает давать анаэробный гликолиз, что может вести к ухудшению выживаемости клеток на таких гидрогелях по сравнению с контролем [17–19]. Причинами таких изменений может служить как изменение механических свойств подложек, так и их химический состав. Добавление к гидрогелям хитоза-

на приводит к увеличению среднего времени жизни $\tau_{\mathrm{m(Fmoc\text{-}FF+chitosan)}} = 1240\,\mathrm{ps}$, что коррелирует со способностью хитозана повышать жизнеспособность клеток и улучшать биосовместимость гидрогелей [27,28].

2.2. Автоматическая сегментация единичных клеток на изображениях FLIM с помощью моделей zero-shot

Как видно, на картах среднего времени затухания флуоресценции наблюдаются изменения среднего времени жизни, а также других параметров затухания флуоресценции (амплитуд и времён τ_1 и τ_2) областей, соответствующих единичным клеткам. Однако попиксельное сравнение карт затухания флуоресценции не является корректным при анализе изображений клеток — на определяемые параметры затухания флуоресценции может влиять флуоресцентный отклик фона, вклад от „клеточного мусора“ и других артефактов. Более корректным и более чувствительным при анализе является поклеточный анализ, в котором анализируются параметры затухания, усредненные по областям, соответствующим единичным клеткам.

В данной работе нами был разработан и апробирован метод, использующий zero-shot-модель Segment Anything Model (SAM), для сегментации единичных клеток на изображении. Подробно применение метода описано в разд. 1.3. Кратко укажем, что в качестве входных изображений использовались изображения интенсивности флуоресценции, отфильтрованные так, чтобы устранить яркие и темные артефакты на изображениях и устранить неоднордность засветки (рис. 3, *a*). Изображения сегментировались с использованием архитектуры SAM, ставящей в соответствие каждому пикселю метку соответствия одному или нескольким объектам на изображении.

Было установлено, что большая часть клеток таким образом сегментируется на входных изображениях FLIM, однако присутствуют артефакты сегментации (рис. 3, *b*): модель выделяла области, соответствующие нескольким клеткам, модель отдельно выделяла ядра, выделяла части фона. Для того чтобы устранить указанные артефакты разметки, была применена следующая процедура постобработки результатов сегментации (рис. 3, *c*): считалось, что клетками являются области, обладающие площадью от 300 до 1000 пикселей и средней интенсивностью не менее 10% от максимальной интенсивности на изображении. Действительно, визуальная инспекция показала, что большая часть клеток принадлежит этой области параметров сегментации (рис. 3, *d*).

Примеры областей сегментации на картах затухания флуоресценции представлены на рис. 3, *e*. Всего предложенным методом было проанализировано 5 изображений для группы контроля, 8 изображений, полученных для клеток, культивированных на гидрогеле Fmoc-FF, и 7 изображений клеток, полученных для клеток, культивированных на гидрогеле, выполненном из Fmoc-FF и хитозана. Для каждой сегментированной области рассчитывались средние значения параметров затухания флуоресценции, которые затем использовалось для статистического анализа.

2.3. Анализ параметров затухания флуоресценции единичных клеток в присутствии самособирающихся гидрогелей

С использованием разработанного метода сегментации была получена выборка параметров затухания флуоресценции для 386 клеток группы контроля, 826 клеток „группы“ Fmoc-FF, 245 клеток группы „Fmoc-FF + хитозан“. Распределение отношения амплитуд быстрой и медленной компонент α_1/α_2, времени затухания τ_2, а также среднего времени затухания τ_m представлены на рис. 4, *a–c*. Как видно, в сравнении с контролем для клеток, высаженных на Fmoc-FF, наблюдается существенное изменение параметров затухания флуоресценции: отношение амплитуд компонент α_1/α_2 увеличивается с 1.70 до 1.98 ($p < 10^{-4}$), медианное время затухания долгоживущей компоненты τ_2, ассоциированное со связным НАД(Ф)Н, слабо, однако статистически значимо снижается с 2310 до 2270 ps ($p < 10^{-2}$), что в результате приводит к уменьшению среднего времени затухания τ_{m} с 1160 до 950 ps ($p < 10^{-4}$). Добавление хитозана в гидрогель Fmoc-FF значительно менее выраженно влияет на изменения параметров затухания флуоресценции. Так, в отличие от группы клеток Fmoc-FF не наблюдается статистически значимого сдвига медианного значения отношения амплитуд α_1/α_2 и времени жизни долгоживущей компоненты τ_2 ($p > 0.05$), однако при этом медианное среднее время затухания оказывается статистически значимо ниже — 1080 ps для группы „Fmoc-FF + хитозан“ против 1160 ps в группе контроля ($p < 10^{-4}$). Наблюдаемые сдвиги свидетельствуют в пользу существенного влияния гидрогеля из Fmoc-FF на метаболическую активность клеток. Добавление хитозана в гидрогель из Fmoc-FF при этом приводит к меньшим изменениям параметров FLIM. При этом оказывается, что для оценки изменения метаболического статуса наиболее чувствительным оказывается параметр среднего времени затухания флуоресценции τ_m — при сравнении групп контроля и „Fmoc-FF+хитозан“ статистически значимые отличия проявляются только в этом параметре. Полученные данные коррелируют с динамикой изменения параметров затухания флуоресценции, выявленной путем попиксельного сравнение карт затухания флуоресценции для исследуемых образцов, позволяя при этом отследить изменения параметров на уровне единичных клеток.

Одновременно с изменениями параметров затухания флуоресценции поклеточная сегментация позволяет оценить изменения морфологии клеток. На рис. 4, *d, e* пред-

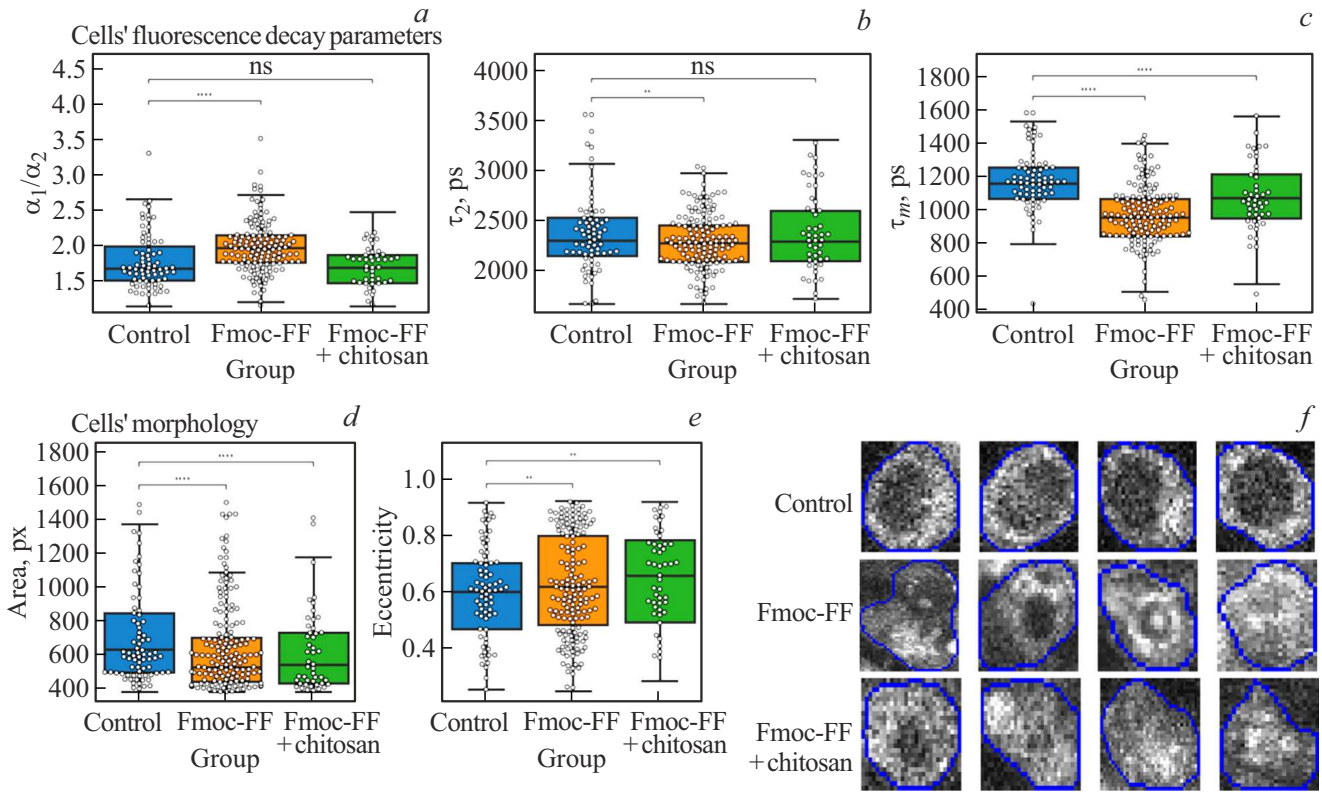

Рис. 4. Распределение параметров (*a*) отношения амплитуд быстрой и медленной компонент α_1/α_2, (*b*) времени затухания τ_2, (*c*) среднего времени τ_m, (*d*) площади и (*e*) эксцентриситета маски сегментации для клеток MCF-7 на чашке Петри (контроль) (синие столбцы), на гидрогеле Fmoc-FF (оранжевые столбцы) и MCF-7 на гидрогеле Fmoc-FF+хитозан (зеленые столбцы). (*f*) Характерные примеры сегментированных клеток групп контроля, Fmoc-FF и „Fmoc-FF+хитозан".

ставлены распределения площади и эксцентриситета для областей сегментации клеток, полученные с помощью алгоритма сегментации. Эксцентриситет характеризует „вытянутость" клетки, нулевое значение соответствует форме маски сегментации, близкой к кругу, в то время как эксцентриситет, близкий к единице, соответствует клеткам, существенно вытянутым вдоль определенного направления. Как видно, в случае клеток контрольного образца, культивированных без добавления гидрогеля, клетки занимали большую площадь на анализируемых изображениях и имели более округлую форму. При этом в присутствии гидрогеля морфология клеток существенным образом изменялась — клетки уменьшались по площади ($p < 10^{-2}$), при этом изменялось значение эксцентриситета ($p < 10^{-2}$). Характерные примеры единичных клеток каждой из групп представлены на рис. 4,*f*. Обратим внимание, что помимо изменения площади клеток и значений эксцентриситета, клетки визуально отличались по соотношению площадей занимаемых ядром клетки и цитоплазмой (рис. 4,*f*) — такие визуальные отличия в морфологии также могут быть использованы для оценки статуса клетки при тестировании различных гидрогелей на биосовместимость.

Заключение

В данной работе был использован неинвазивный метод FLIM с эндогенным флуоресцентным контрастом НАД(Ф)Н для изучения метаболизма живых клеток MCF-7 при их адгезии на самособирающихся гидрогелях Fmoc-FF и Fmoc-FF + хитозан, которые могут служить потенциальными скаффолдами в области регенеративной медицины. Данный метод продемонстрировал, что для клеток, адгезированных на гидрогеле Fmoc-FF, выживаемость клеток уменьшается, что может быть объяснено процессами перехода от аэробного к анаэробному гликолизу при изменении субстрата. Добавление хитозана в гидрогель приводит к увеличению биосовместимости скаффолда. В работе показано, что методика оценки параметров по единичным клеткам с использованием разработанного подхода с применением zero-shot-модели SAM для сегментации изображений FLIM дает возможность более точной оценки метаболического статуса клеток по сравнению с данными, полученными путем попиксельного сравнение карт затухания флуоресценции для исследуемых образцов. Проведенная процедура может быть адаптирована для исследования любой системы клетка-мягкий гидрогель

с целью выявления наиболее биосовместимого мягкого гидрогеля для применения в регенеративной медицине.

Финансирование работы

Работа проводилась при финансовой поддержке РНФ (грант № 23-75-00007).

Список литературы

[1] Z. Liu, M. Tang, J. Zhao, R. Chai, J. Kang. Adv. Mater., **30** (17), 1705388 (2018). DOI: 10.1002/adma.201705388
[2] S. Pina, V.P. Ribeiro, C.F. Marques, F.R. Maia, T.H. Silva, R.L. Reis, J.M. Oliveira. Mater., **12** (11), 1824 (2019). DOI: 10.3390/ma12111824
[3] Y. Tang, H. Wang, S. Liu, L. Pu, X. Hu, J. Ding, G. Xu, W. Xu, S. Xiang, Z. Yuan. Colloids Surf. B, **220**, 112973 (2022). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112973
[4] Y. Liang, J. He, B. Guo. ACS Nano, **15** (8), 12687 (2021). DOI: 10.1021/acsnano.1c04206
[5] B.C. Borro, R. Nordstr?m, M. Malmsten. Colloids Surf. B, **187**, 110835 (2020). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.110835
[6] V. Basavalingappa, T. Guterman, Y. Tang, S. Nir, J. Lei, P. Chakraborty, L. Schnaider, M. Reches, G. Wei, E. Gazit. Adv. Sci., 6 (12), 1900218 (2019). DOI: 10.1002/advs.201900218
[7] C. Diaferia, M. Ghosh, T. Sibillano, E. Gallo, M. Stornaiuolo, C. Giannini, G. Morelli, L. Adler-Abramovich, A. Accardo. Soft Matter., **15** (3), 487 (2019). DOI: 10.1039/C8SM02366B
[8] M. Vitale, C. Ligorio, B. McAvan, N.W. Hodson, C. Allan, S.M. Richardson, J.A. Hoyland, J. Bella. Acta Biomater., **138**, 144 (2022). DOI: 10.1016/j.actbio.2021.11.011
[9] T.N. Tikhonova, V.S. Kolmogorov, R.V. Timoshenko, A.N. Vaneev, D. Cohen-Gerassi, L.A. Osminkina, P.V. Gorelkin, A.S. Erofeev, N.N. Sysoev, L. Adler-Abramovich, E.A. Shirshin. Cells, **11** (24), 4137 (2022). DOI: 10.3390/cells11244137
[10] T.N. Tikhonova, D. Cohen-Gerassi, Z.A. Arnon, Y. Efremov, P. Timashev, L. Adler-Abramovich, E.A. Shirshin. ACS Appl. Mater. Interfaces, **14** (50), 55392 (2022). DOI: 10.1021/acsami.2c17609
[11] K. Suhling, L.M. Hirvonen, J.A. Levitt, P.H. Chung, C. Tregidgo, A. Le Marois, D.A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg, S. Poland, S. Coelh, R. Henderson, N. Krstajic. Med. Photonics, **27**, 3 (2015). DOI: 10.1016/j.medpho.2014.12.001
[12] S.R. Alam, H. Wallrabe, Z. Svindrych, A.K. Chaudhary, K.G. Christopher, D. Chandra, A. Periasamy. Sci. Rep., **7** (1), 10451 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-10856-3
[13] S. Kalinina, C. Freymueller, N. Naskar, B. von Einem, K. Reess, R. Sroka, A. Rueck. Int. J. Mol. Sci., **22** (11), 5952 (2021). DOI: 10.3390/ijms22115952
[14] M.C. Skala, K.M. Riching, A. Gendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K.W. Eliceiri, J.G. White, N. Ramanujam. Proc. Natl. Acad. Sci., **104** (49), 19494 (2007). DOI: 10.1073/pnas.0708425104
[15] O.I. Kolenc, K.P. Quinn. Antioxid. Redox Signal., **30** (6), 875 (2019). DOI: 10.1089/ars.2017.7451
[16] K. Blinova, S. Carroll, S. Bose, A.V. Smirnov, J.J. Harvey, J.R. Knutson, R.S. Balaban. Biochemistry, **44** (7), 2585 (2005). DOI: 10.1021/bi0485124
[17] D.K. Bird, L. Yan, K.M. Vrotsos, K.W. Eliceiri, E.M. Vaughan, P.J. Keely, J.G. White, N. Ramanujam. Cancer Res., **65** (19), 8766 (2005). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3922
[18] E. Stuntz, Y. Gong, D. Sood, V. Liaudanskaya, D. Pouli, K.P. Quinn, C. Alonzo, Z. Liu, D.L. Kaplan, I. Georgakoudi. Sci. Rep., **7** (1), 1041 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-01015-9
[19] J.M. Berthiaume, J.G. Kurdys, D.M. Muntean, M.G. Rosca. Antioxid. Redox Signal., **30** (3), 375 (2019). DOI: 10.1089/ars.2017.7415
[20] E.A. Shirshin, M.V. Shirmanova, A.V. Gayer, M.M. Lukina, E.E. Nikonova, B.P. Yakimov, G.S. Budylin, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, D.V. Komarov, V.V. Yakovlev, W. Becker, E.V. Zagaynova, V.I. Shcheslavskiy, M.O. Scully. Proc. Natl. Acad. Sci., **119** (9), e2118241119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2118241119
[21] T. Vicar, J. Balvan, J. Jaros, F. Jug, R. Kolar, M. Masarik, J. Gumulec. BMC Bioinformatics, **20**, 1 (2019). DOI: 10.1186/s12859-019-2880-8
[22] A. Kirillov, E. Mintun, N. Ravi, H. Mao, C. Rolland, L. Gustafson, T. Xiao, S. Whitehead, A.C. Berg, W.-Y. Lo, P. Dollar, R. Girshick. Proc. IEEE/CVF Int. Conf. Comput. Vis., 4015–4026 (2023).
[23] N. Ravi, V. Gabeur, Y.-T. Hu, R. Hu, C. Ryali, T. Ma, H. Khedr, R. R?dle, C. Rolland, L. Gustafson, E. Mintun, J. Pan, K.V. Alwala, N. Carion, C.-Y. Wu, R. Girshick, P. Doll?r, C. Feichtenhofer. arXiv preprint arXiv:2408.00714 (2024). DOI: 10.48550/arXiv.2408.00714
[24] Y. Huang, X. Yang, L. Liu, H. Zhou, A. Chang, X. Zhou, R. Chen, J. Yu, J. Chen, C. Chen, S. Liu, H. Chi, X. Hu, K. Yue, L. Li, V. Grau, D.-P. Fan, F. Dong, D. Ni. Med. Image Anal., **92**, 103061 (2024). DOI: 10.1016/j.media.2023.103061
[25] URL: https://github.com/facebookresearch/segment-anything
[26] C. Diaferia, G. Morelli, A. Accardo. J. Mater. Chem. B, **7** (34), 5142 (2019). DOI: 10.1039/C9TB01043B
[27] M. Boido, M. Ghibaudi, P. Gentile, E. Favaro, R. Fusaro, C. Tonda-Turo. Sci. Rep., **9** (1), 6402 (2019). DOI: 10.1038/s41598-019-42848-w
[28] T.T. Demirta?, G. Irmak, M. G?m??derelio?lu. Biofabrication, **9** (3), 035003 (2017). DOI: 10.1088/1758-5090/aa7b1d