

Федеральное государственное бюджетное автономное образовательное учреждение высшего образования “Новосибирский национальный исследовательский государственный университет”  
Институт цитологии и генетики СО РАН  
Кафедра информационной биологии

# **Оценка эффектов стимуляции аутофагии и стресса ЭПР на структурный гомеостаз клеток меланомы кожи мыши на основе анализа микроизображений методами компьютерного зрения**

Гогаева И. С. гр. 18410, ФЕН НГУ

**Научные руководители:**

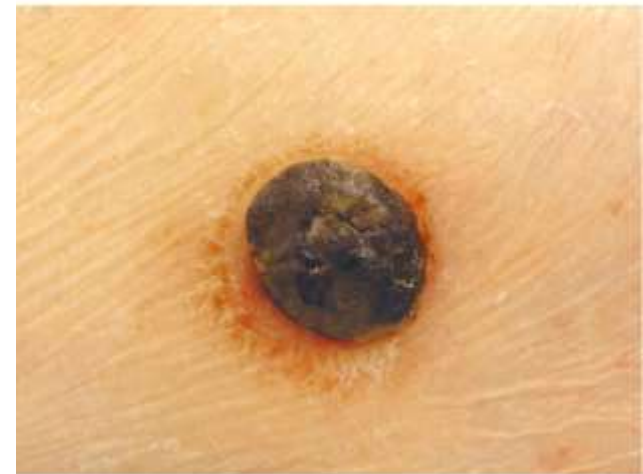
Таскаева Ю. С., к.м.н., н.с., лаб. ультраструктурных исследований, НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН

Генаев М. А., к.б.н., с.н.с., лаб. эволюционной биоинформатики и теоретической генетики ИЦиГ СО РАН

Новосибирск  
2022

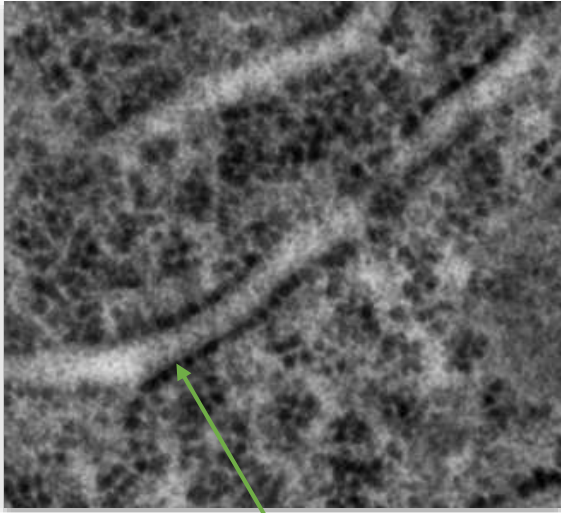
# Меланома – агрессивная злокачественная опухоль

- **Смертность от меланомы составляет 80% среди всех разновидностей рака кожи. Клетки меланомы кожи характеризуются активным ростом и ранним метастазированием.**
- **Последние данные указывают на то, что нарушения регуляции аутофагии и стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) могут представлять собой ключевые сигнальные пути, вовлеченные в рост, прогрессирование и химиорезистентность меланомы.**

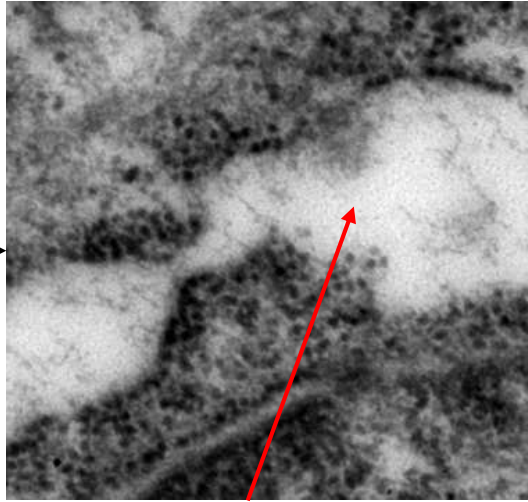


*Geisler et al., 2013*

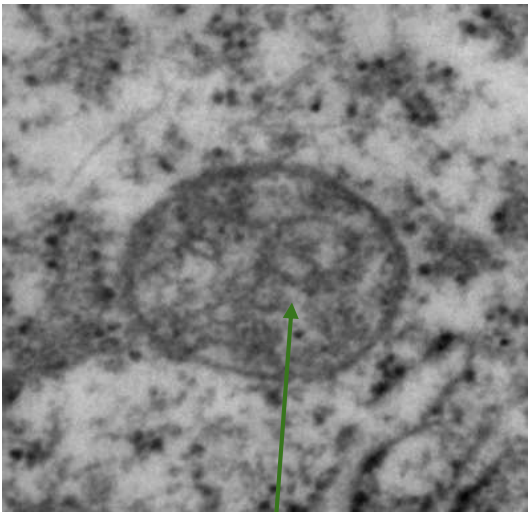
# Морфологические изменения клеток при стрессе



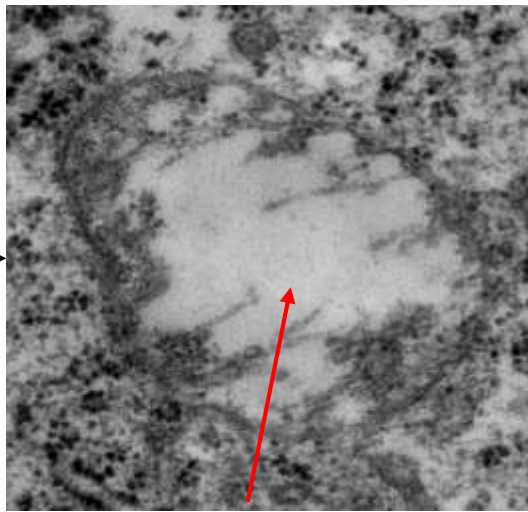
гЭПР в норме



гЭПР при стрессе ЭПР



митохондрия в  
норме



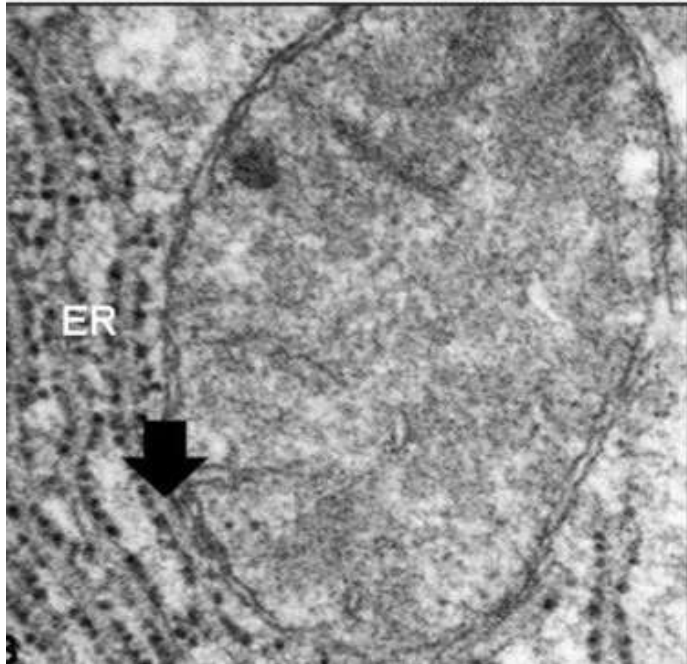
митохондрия при  
окислительном  
стрессе

В связи с высокой пролиферацией опухолевые клетки характеризуются недостатком нутриентов и кислорода.

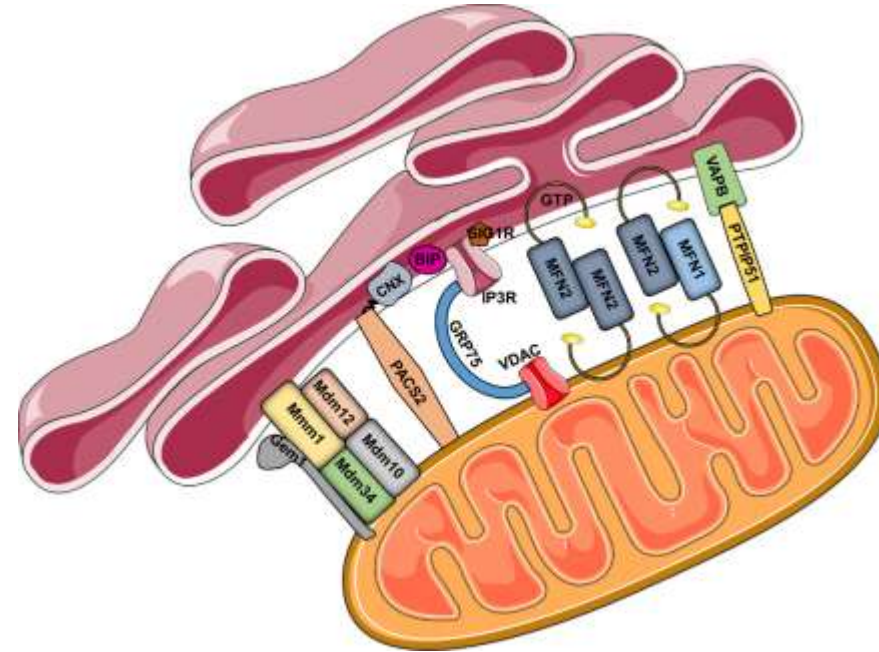
При нехватке питательных веществ в клетках опухоли индуцируется **стресс ЭПР**, который далее может запускать **аутофагию** и **окислительный стресс**.

# Роль митохондриально - ассоциированных мембран

- Сигналы, вызванные стрессом ЭПР проходят через **митохондриально - ассоциированные мембраны (MAMs – mitochondria-associated membranes)** - специализированные места контакта ЭПР и митохондрий.
- MAMs являются транспортными узлами для передачи  $\text{Ca}^{2+}$ , липидов, активных форм кислорода, а также опосредуют множество клеточных процессов, в том числе и аутофагию.
- Дисфункция MAMs связана с различными патологическими состояниями: от диабета до рака и нейродегенеративных заболеваний.
- Роль MAMs при меланоме кожи мало изучена.



Stacchiotti et al., 2018



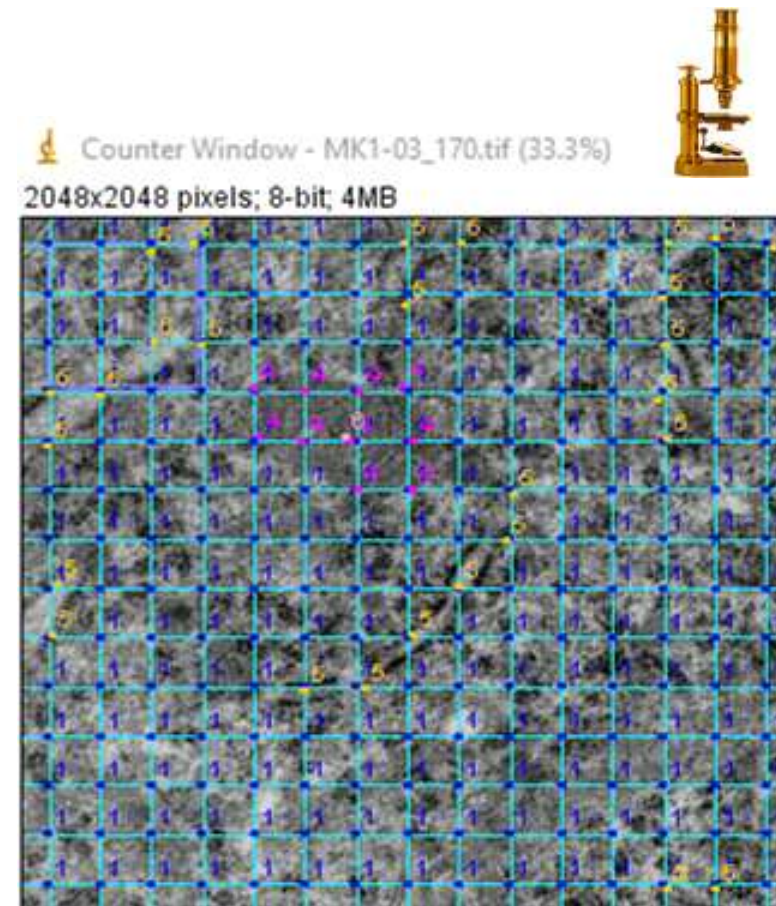
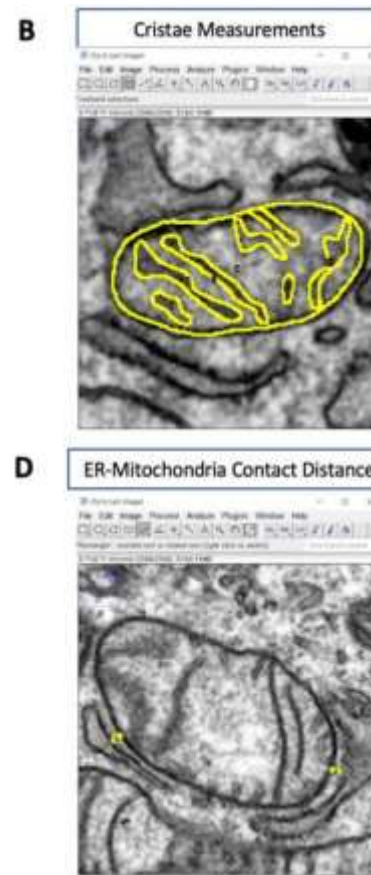
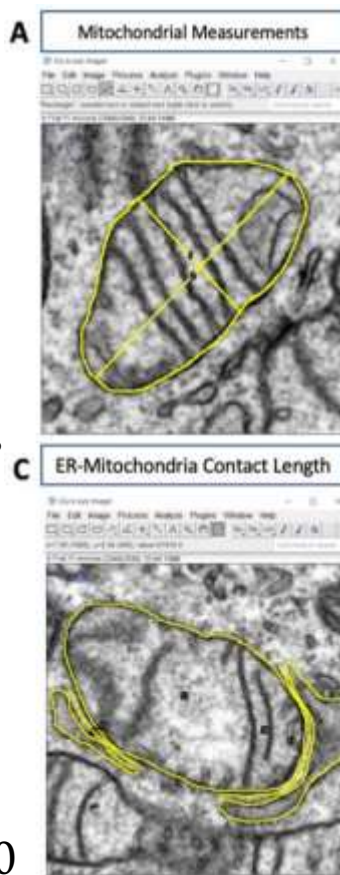
Veeresh et al., 2019

# Морфометрия ультраструктуры клеток с помощью ТЭМ

- Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) позволяет получать изображения высокого разрешения под большим увеличением.

Параметры, значимые для оценки структурного гомеостаза клетки:

- Численная и объемная плотность митохондрий
- Объемная плотность гЭПР
- Численная плотность МАМs их длина



Lam et al., 2021

- **Количество измерений:** около 100 изображений на группу.
- Одно изображение – **10-20 мин.**

Ручная разметка такого количества данных является чрезмерно трудоемкой и времязатратной для исследователя. В связи с этим **требуется разработка методов автоматизации.**

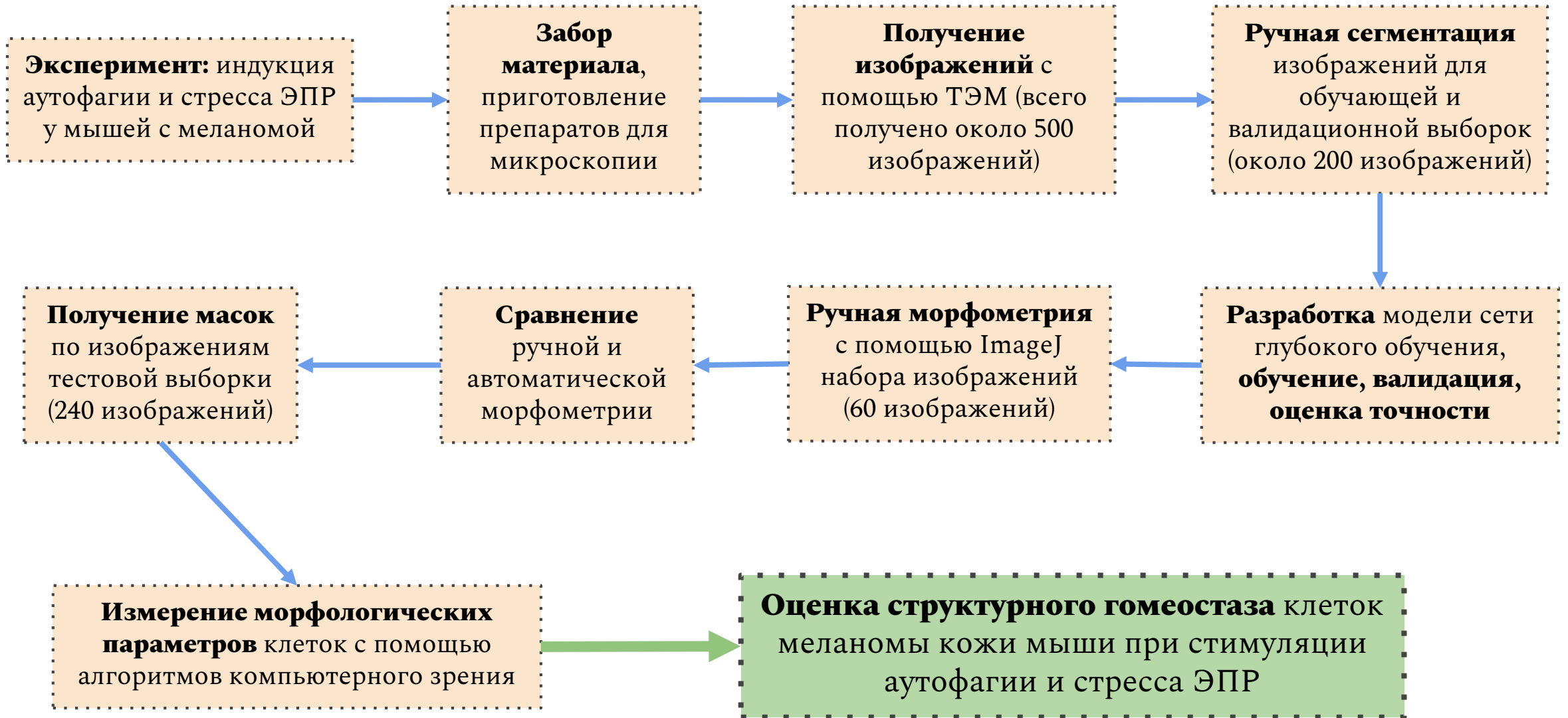
# **Цель исследования**

**Оценка эффектов стимуляции аутофагии и стресса ЭПР на структурный гомеостаз клеток меланомы кожи мыши на основе анализа изображений ТЭМ методами компьютерного зрения.**

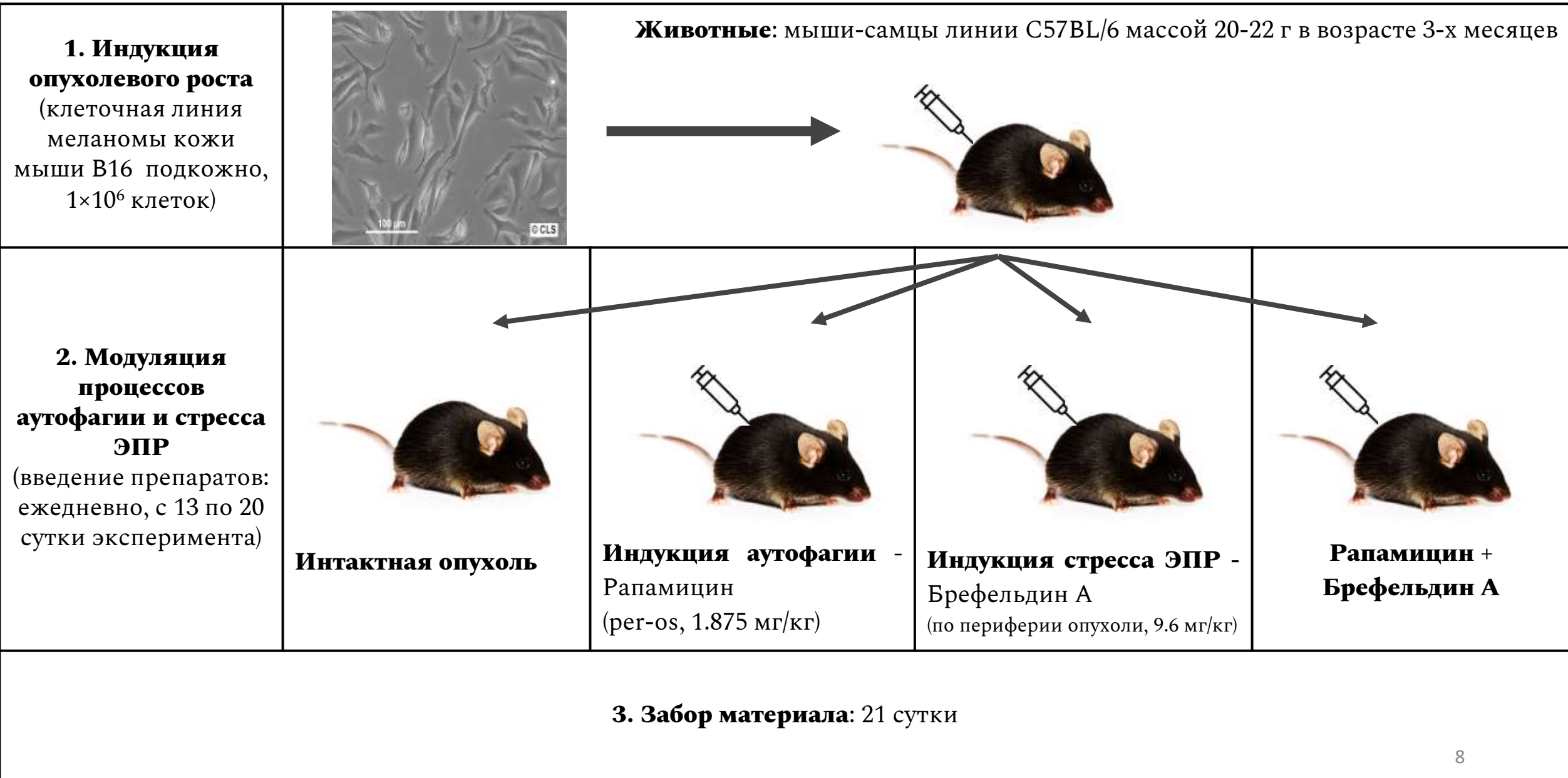
## **Задачи**

- 1. Получение выборки изображений клеток меланомы кожи мыши методом ТЭМ и их структурная разметка.**
- 2. Разработка модели сети глубокого машинного обучения для распознавания и сегментации гЭПР, митохондрий и МАМs.**
- 3. Выявление морфологических особенностей организации гЭПР, митохондрий и МАМs в опухолевых клетках меланомы кожи мыши.**

# Схема работы



# Дизайн эксперимента



# Методы и программные средства

- Изображения получали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония).

- Ручную морфометрию производили с помощью ImageJ (Wayne Rasband, США).



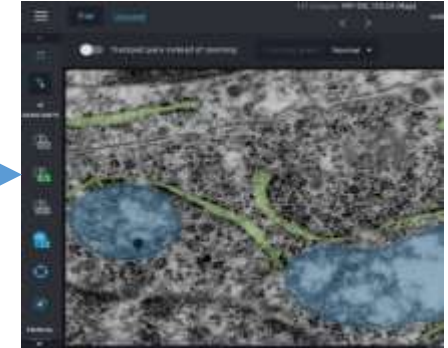
- Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с помощью Statistica 6.0 (StatSoft, США).



- Для измерения параметров по маскам изображений использовали библиотеку компьютерного зрения с открытым кодом OpenCV



- Для ручной сегментации обучающего набора изображений использовали сервис Hasty.ai (Германия).



- Для создания модели сети использовали PyTorch - фреймворк машинного обучения для языка Python с открытым исходным кодом.

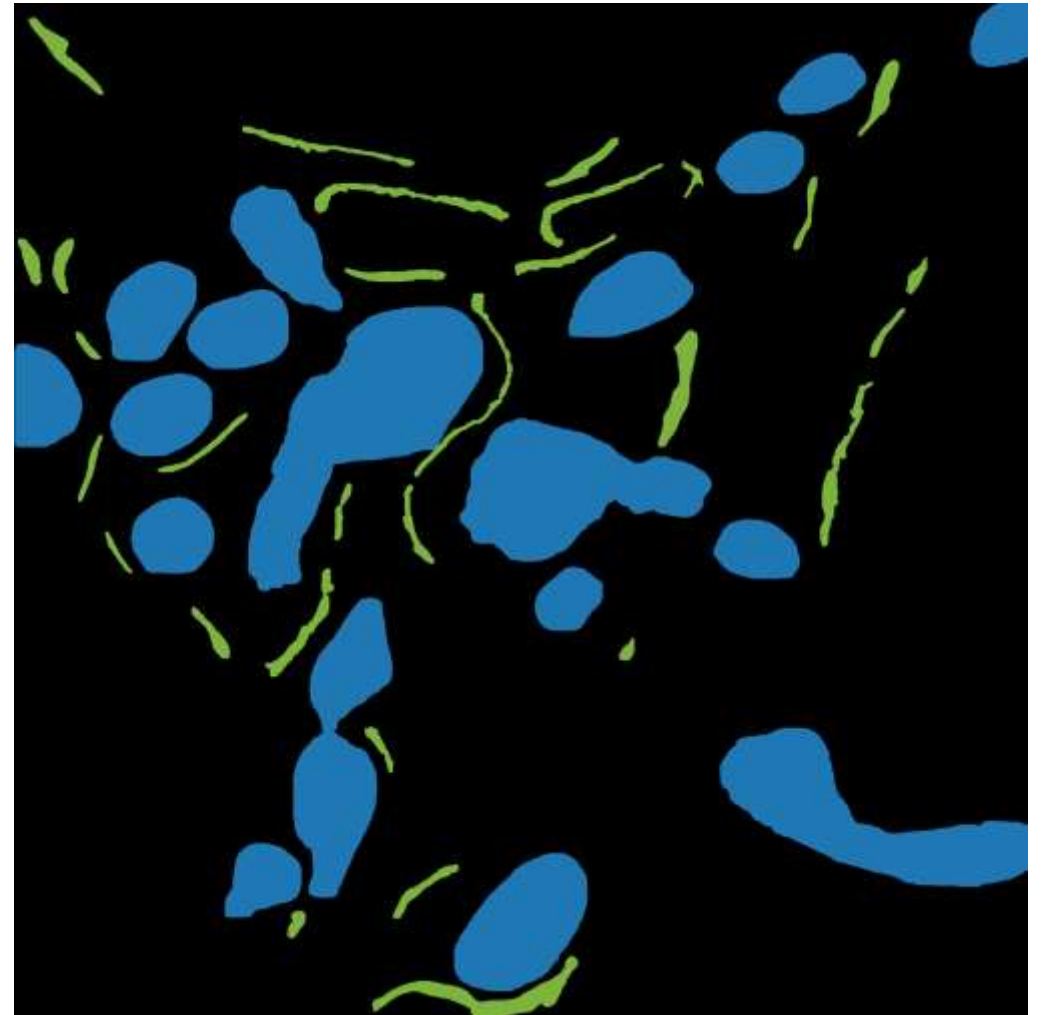
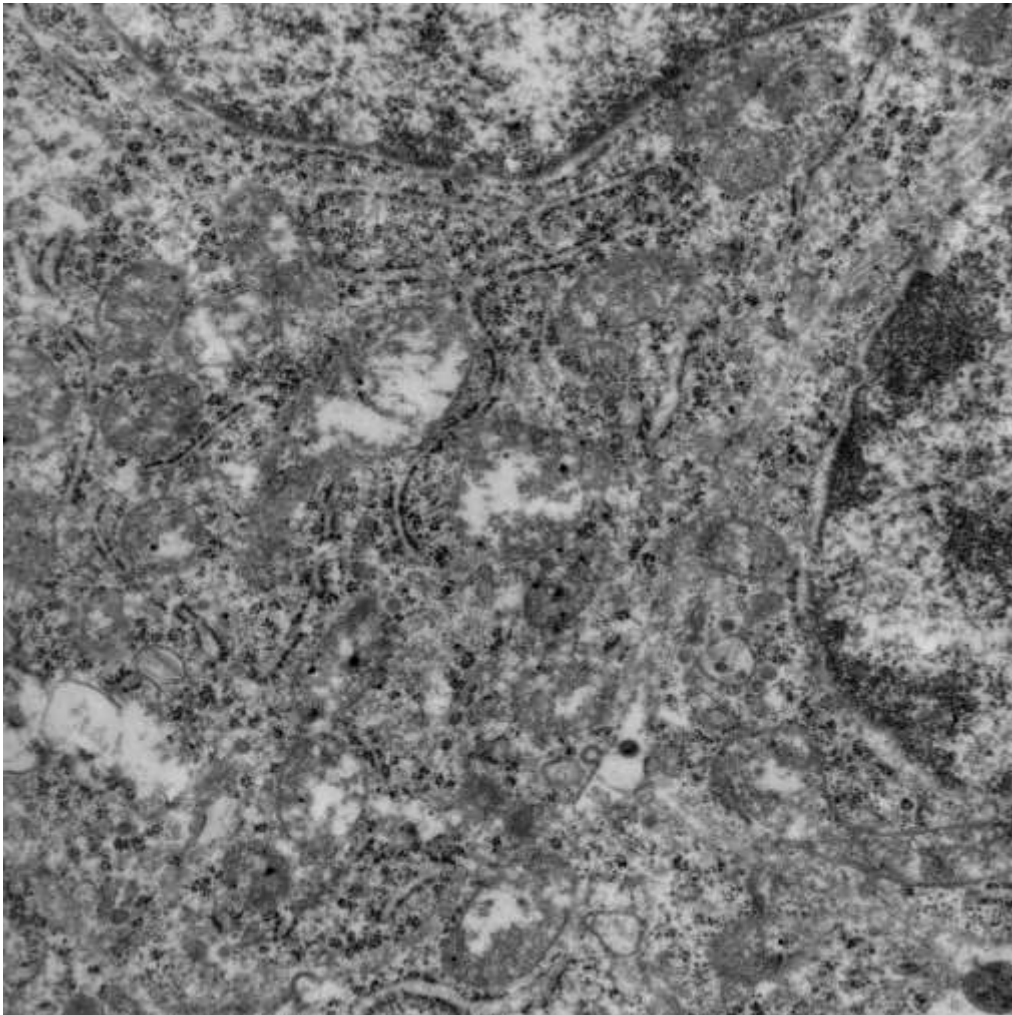


- Разработку вели в среде Google Colaboratory



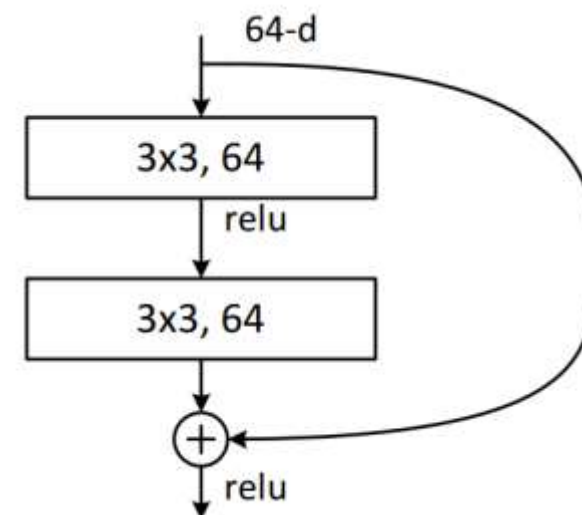
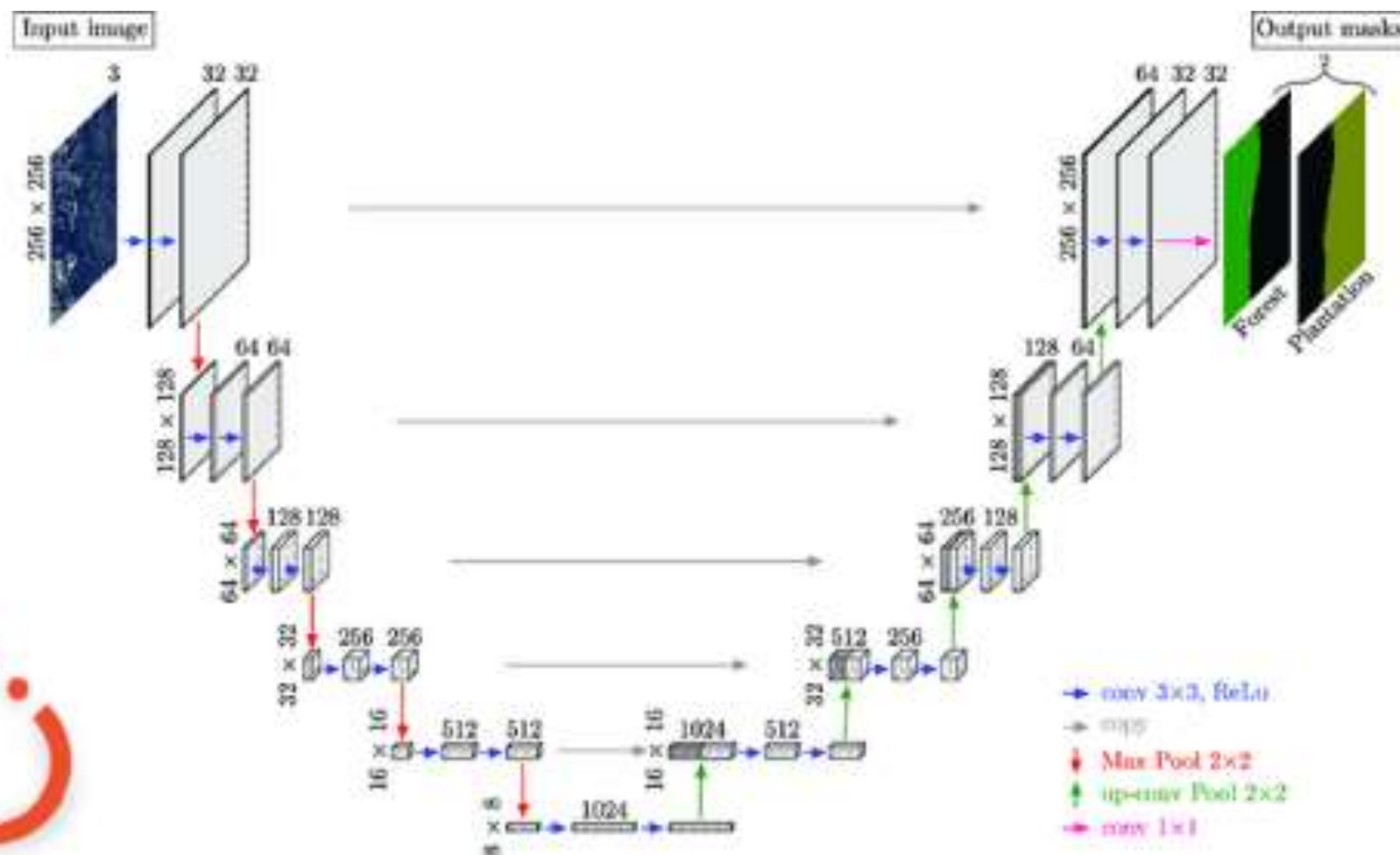
# Результаты

С помощью сервиса Nasty.ai были созданы маски с сегментированными митохондриями и гЭПР. Сформированы обучающая, валидационная и тестовая выборки.



# Результаты

Модель сети глубокого обучения была разработана на основе архитектуры U-Net с энкодером ResNet34  
Количество эпох обучения – 346

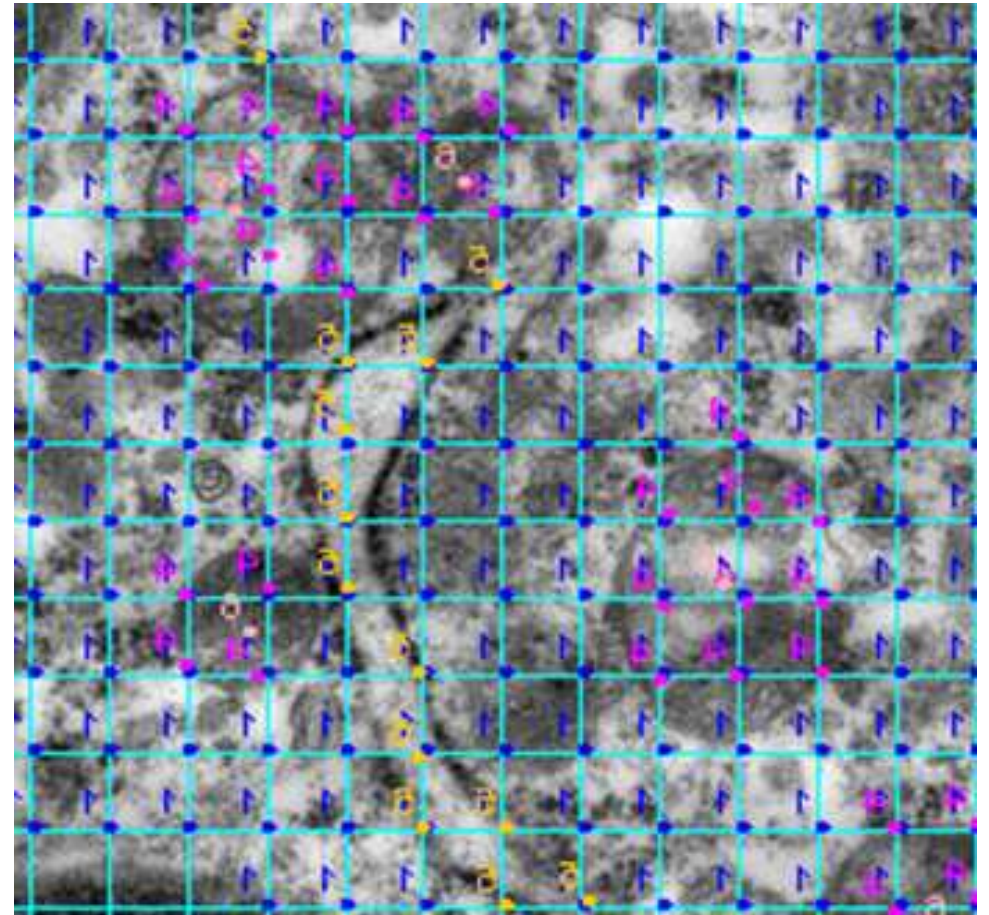


Остаточный блок сети ResNet

Архитектура U-Net

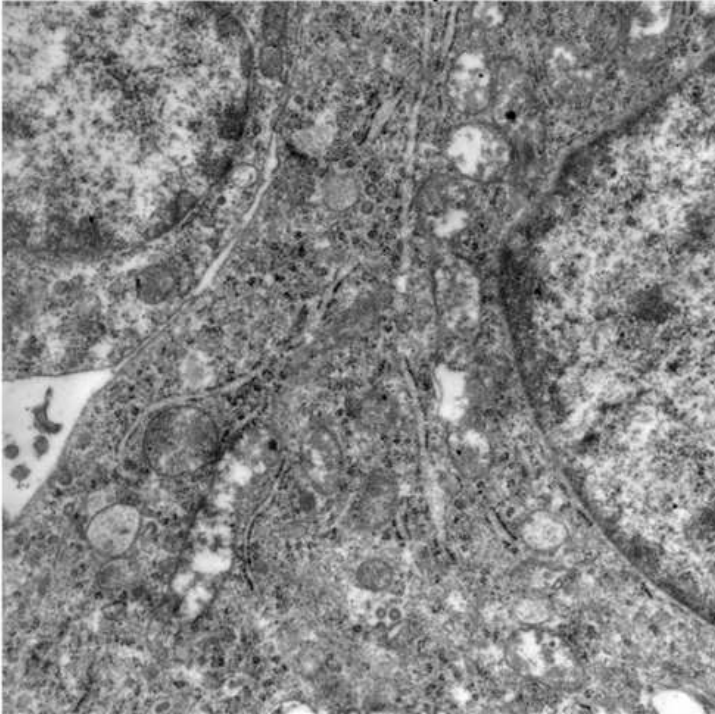
# Результаты

После обучения и валидации применимость модели на практике оценивалась в сравнении с ручным методом морфометрии. Для этого 60 изображений (по 15 на группу) были проморфометрированы вручную с помощью программы ImageJ.

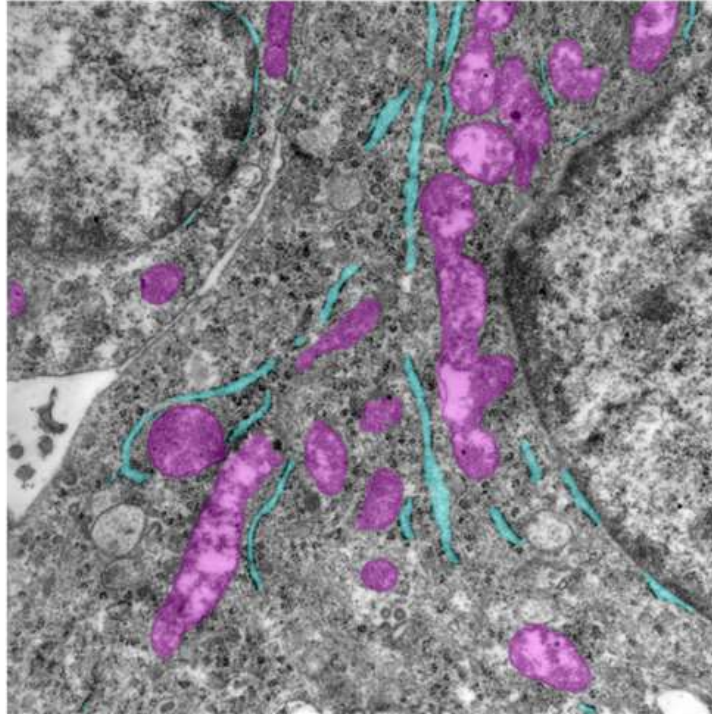


# Результаты

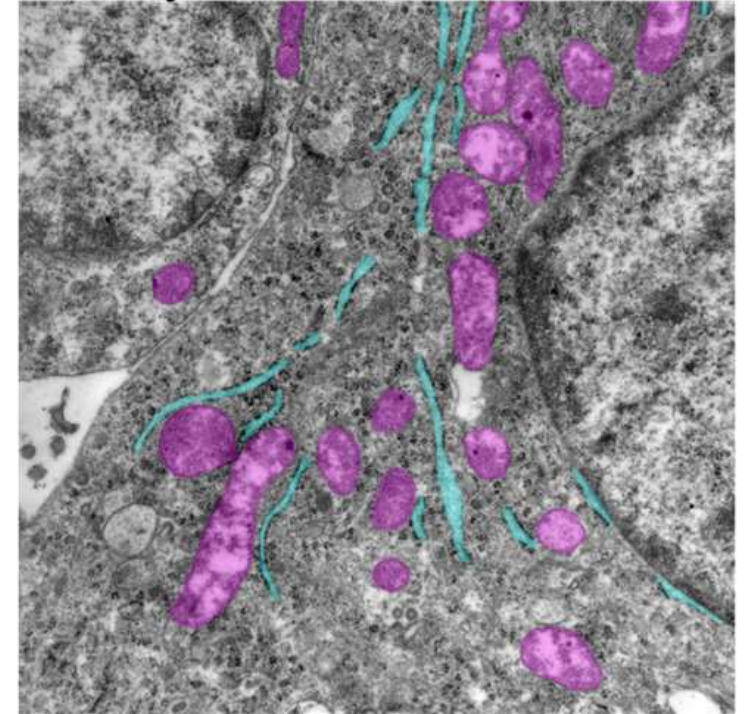
Исходное изображение



Сегментация нейросетью



Ручная сегментация



IoU (Intersection over union):

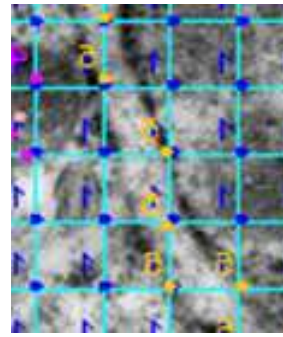
- 0,814 – митохондрии
- 0,689 – цистерны гЭПР

$$\text{IoU} = \frac{\text{Area of Overlap}}{\text{Area of Union}}$$

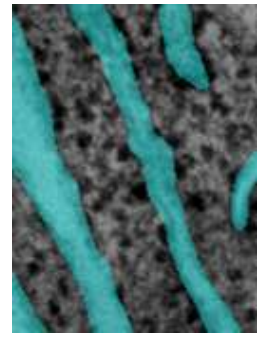
# Результаты

Графики рассеяния

S, ручная морфометрия (ImageJ)

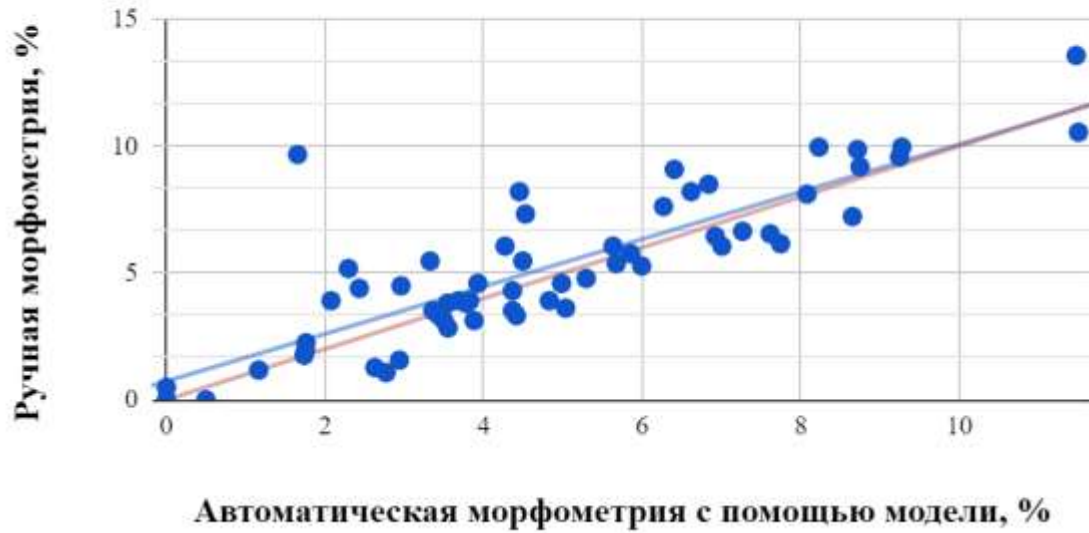


S, автоматическая морфометрия



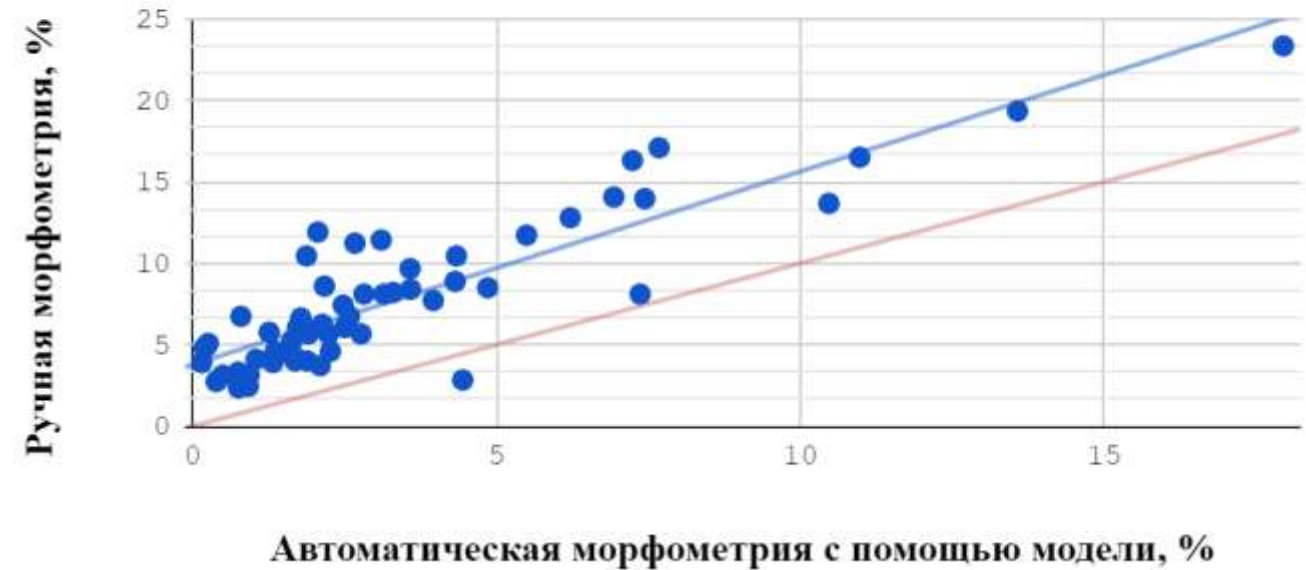
S, Митохондрии

● - 0,934\*x + 0,73    ● - y = x



S, гЭПР

● - 1,19\*x + 3,78    ● - y = x



$r = 0,84^*$

r - коэффициент корреляции Пирсона

\* - P-value < 0,0005

$r = 0,88^*$

# Результаты

## Алгоритм постобработки масок для извлечения количественных параметров

Расчет площади гЭПР, площади и количество митохондрий по маскам изображений



Поиск контуров митохондрий и гЭПР



Поиск мест сближения митохондрий и гЭПР (расстояние < 80 нм)



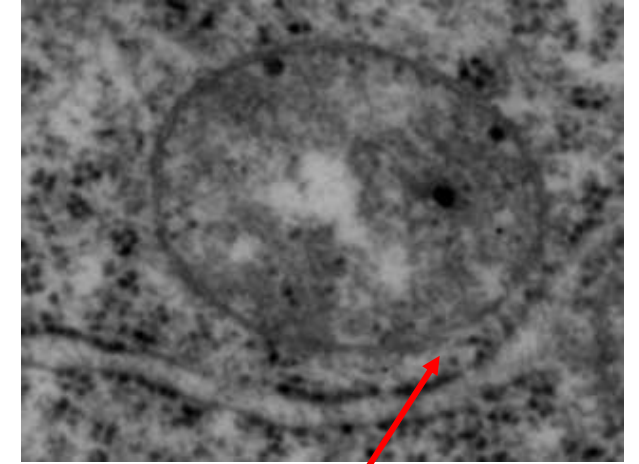
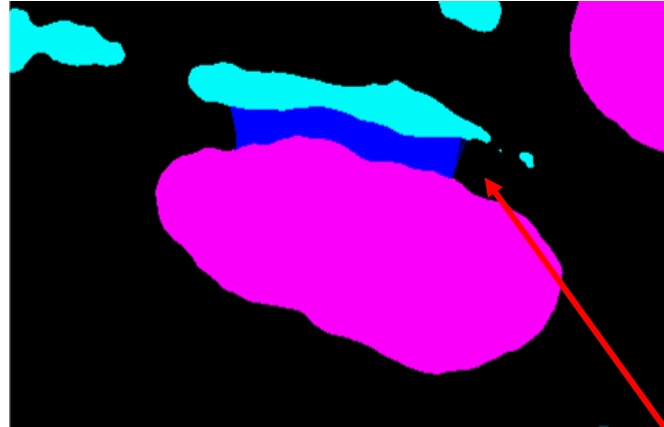
Да

Расстояние < 15 нм

Нет

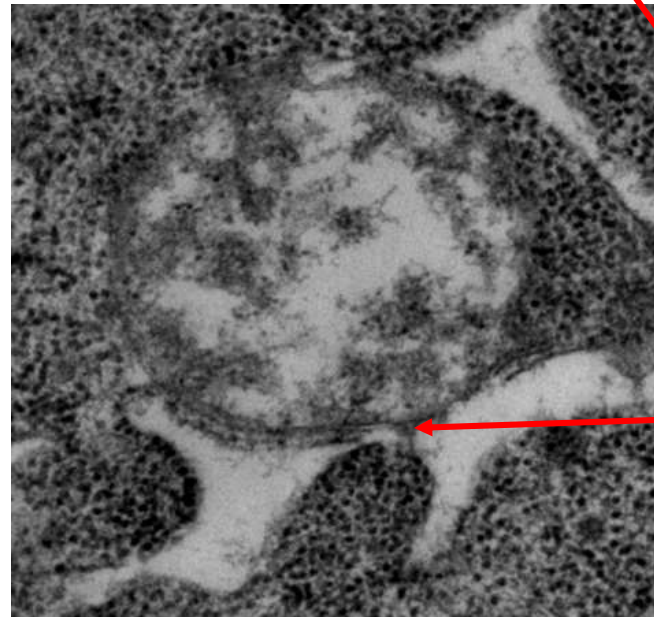
Тесный контакт

Свободный контакт



Свободный контакт (от 15 до 80 нм)

- ↓ потока  $\text{Ca}^{2+}$



Тесный контакт (< 15 нм)

- ↑↑ потока  $\text{Ca}^{2+}$

# Результаты

С помощью модели сети были оценены морфологические параметры меланомы кожи мыши в 4 группах

Группа/Параметр	Мтх, $N_A$	Мтх, $S$ , $\mu\text{км}^2$	гЭПР, $S$ , $\mu\text{км}^2$
Контроль	5,95±4,63	0,97±0,81	0,48±0,43
Рапамицин	7,33±4,52*	1,16±0,82	0,59±0,36
Брефельдин А	7,09±4,15	1,23±0,82	2,16±1,22***
Рапамицин + Брефельдин А	7,54±5,27*	1,09±0,99	0,49±0,32

\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0005$ ; в сравнении с контрольной группой

$P$ -value рассчитан по критерию Манна-Уитни,

Мтх – митохондрии, гЭПР – цистерны гранулярного ЭПР,  $N_A$  – численная плотность

# Результаты

Группа/Параметр	МАМs (< 15 нм)		МАМs (от 15 до 80 нм)	
	$N_A$	Длина, нм	$N_A$	Длина, нм
Контроль	0,18±0,53	614±722	1,51±2,21	4781±4361
Рапамицин	0,53±0,91	533±543	3,01±3,48	5827±6010
Брефельдин А	2,44±2,38***	368±460	7,00±5,64***	2491±3179
Рапамицин + Брефельдин А	0,95±1,12**	877±728	0,97±0,81***	4674±4830

\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\* $P < 0,0005$ ; в сравнении с контрольной группой

$P$ -value рассчитан по критерию Манна-Уитни,

МАМs – митохондриально-ассоциированные мембраны,  $N_A$  – численная плотность.

# Выводы

1. Созданы и размечены выборки изображений клеток меланомы кожи мыши, полученные методом трансмиссионной электронной микроскопии.
2. Разработана модель сети глубокого машинного обучения для распознавания и сегментации гЭПР, митохондрий и митохондриально-ассоциированных мембран. Точность сегментации, оцененная по метрике IoU на тестовом наборе данных, составила 0,814 для класса митохондрий и 0,689 для класса цистерн гЭПР.
3. Индукторы стресса ЭПР и аутофагии влияют на морфологию клеток меланомы кожи мыши. В условиях индукции стресса ЭПР наблюдается увеличение объемной плотности цистерн гЭПР и количества митохондриально-ассоциированных мембран. В группе с рапамицин-индуцированной аутофагией отмечается увеличение количества митохондрий без изменения их средней площади, из чего следует, что длительная стимуляция аутофагии, запускает усиленное деление митохондрий для удовлетворения повышенных энергетических потребностей клетки.
4. Одновременная стимуляция аутофагии и стресса ЭПР в опухолевых клетках не влияет на объемную плотность цистерн гЭПР, но сопровождается увеличением количества тесных и уменьшением количества свободных митохондриально-ассоциированных мембран, что свидетельствует о возможном развитии цитопротективной селективной аутофагии (ретикулофагии) направленной на разрешение стресса ЭПР.

# Литература

1. Geisler J, Bachmann IM, Nyakas M, Helsing P, Fjøsne HE, Mæhle LO, Aamdal S, Eide NA, Svendsen HL, Straume O, Robsahm TE, Jacobsen KD, Akslen LA. Malignant melanoma--diagnosis, treatment and follow-up in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2013 Oct 29;133(20):2154-9. English, Norwegian. doi: 10.4045/tidsskr.12.1416. PMID: 24172628.
2. American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2016. American Cancer Society: Atlanta, GA, 2016.
3. Giglio P, Fimia GM, Lovat PE, Piacentini M, Corazzari M. Fateful music from a talented orchestra with a wicked conductor: Connection between oncogenic BRAF, ER stress, and autophagy in human melanoma. *Mol Cell Oncol*. 2015 Jan 26;2(3):e995016. doi: 10.4161/23723556.2014.995016. PMID: 27308477; PMCID: PMC4905314.
4. Cannavò SP, Tonacci A, Bertino L, Casciaro M, Borgia F, Gangemi S. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. *Pathol Res Pract*. 2019 Jan;215(1):21-28. doi: 10.1016/j.prp.2018.11.020. Epub 2018 Nov 24. PMID: 30501931.
5. Veeresh P. et al. Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk: From junction to function across neurological disorders //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2019. – T. 1457. – N°. 1. – C. 41-60.
6. Stacchiotti A, Favero G, Lavazza A, Garcia-Gomez R, Monsalve M, Rezzani R. Perspective: Mitochondria-ER Contacts in Metabolic Cellular Stress Assessed by Microscopy. *Cells*. 2018 Dec 21;8(1):5.
7. Lam J, Katti P, Biete M, Mungai M, AshShareef S, Neikirk K, Garza Lopez E, Vue Z, Christensen TA, Beasley HK, Rodman TA, Murray SA, Salisbury JL, Glancy B, Shao J, Pereira RO, Abel ED, Hinton A Jr. A Universal Approach to Analyzing Transmission Electron Microscopy with ImageJ. *Cells*. 2021 Aug 24;10(9):2177.

# Результаты

- Выбор сервиса для ручной сегментации

## Функции



labelme



SuperAnnotate



Hasty

<b>Полигон</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Кисть</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Обучение по размеченным данным</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Поддержка формата «tiff»</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Поддержка разрешения 2048*2048</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>