

МНОГОМАСШТАБНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНОБИОЛОГИИ И ГОМЕОСТАЗА ОПУХОЛЕЙ*

Е.И. Герасимова-Чечкина, *Институт механики сплошных сред УрО РАН*

А.С. Никитюк, *Институт механики сплошных сред УрО РАН*

Е.А. Ляпунова, *Институт механики сплошных сред УрО РАН*

О.С. Гилева, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

О.Б. Наймарк, *Институт механики сплошных сред УрО РАН*

На основе развитых теоретических представлений о закономерностях развития поврежденности в клеточных и тканевых комплексах живых организмов, исследований пространственно-временных флуктуаций фазовых толщин (данные когерентной фазовой микроскопии клеток) и температуры (данные инфракрасной термографии тканей – молочных желез) установлены признаки мультифрактальности биологических структур «в норме» и монофрактальности при их опухолевой трансформации.

Ключевые слова: механобиология, опухоль, мультифрактальный анализ.

В настоящее время актуальны исследования закономерностей роста опухолей и их структуры на различных масштабных уровнях (клетка, клеточные сопряжения, локализованные клеточные популяции, опухолевая ткань). Экспериментальные и теоретические разработки этого направления составляют актуальную медико-биофизическую проблему. Настоящее исследование проведено с соблюдением необходимых этических принципов Хельсинкской Декларации ВМА (2013).

Анализ данных тепловизионного и рентгеновского исследований молочных желез у женщин

По данным тепловизионного обследования были изучены особенности динамики поверхностной температуры молоч-

ных желез у женщин с онкопатологией (33 женщины с диагнозом «инвазивный протоковый и/или дольковый рак молочной железы») и не имеющих заболеваний молочной железы (14 женщин) для выявления объективных термографических критериев, характеризующих наличие опухолевого процесса. Термограмму молочной железы разбивали на квадратные ячейки 1 кв. см и анализировали флуктуации поверхностной температуры методом мультифрактального анализа на основе вейвлет-преобразования (метод максимумов модулей вейвлет-преобразования (ММВП) 1D). Было показано, что температурные сигналы непораженных областей молочной железы характеризуются мультифрактальностью, тогда как сигналы из пораженных раком областей молоч-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Пермского края (грант № 13-01-96044).

ной железы являются монофрактальными. На рис. 1, *a* и *г* ячейки с монофрактальными флуктуациями температуры выделены красным цветом, с мультифрактальными флуктуациями температуры – синим, ячейки, в которых скейлинг отсутствует – белым. На заключительном этапе анализа определяли долю «монофрактальных» ячеек и формулировали заключение о наличии опухоли молочной железы при обнаружении не менее 25% ячеек с обозначенной шириной спектра. Разработанная методика обнаружения злокачественной опухоли в молочной железе обеспечила специфичность и чувствительность, равные 86% и 76% соответственно.

«Золотым стандартом» оценки состояния молочной железы на сегодняшний день является рентгеновская маммография. Однако, несмотря на свою эффективность, рентгеновская маммография имеет ряд ограничений в определенных клинических ситуациях и у определенной группы пациенток. Поэтому актуальным является применение современных методов для анализа рентгеновских изображений молочной железы с целью повыше-

ния диагностической чувствительности рентгеновской маммографии.

Для анализа была сформирована база данных цифровых маммограмм (в краниокаудальной и медиолатеральной проекциях) 30 пациенток (из 33, принимавших участие в тепловизионном обследовании). Пространственное разрешение полученных цифровых изображений 200 пикселей на 1 см.

Разработана методика анализа маммограмм с помощью метода ММВП 2D [2]. Исходное рентгеновское изображение молочной железы рассматривали как монофрактальную шероховатую поверхность, профиль которой определяется интенсивностью цвета изображения и может быть охарактеризован показателем Херста H [3]. Далее изображение разбивали на квадратные подобласти (ячейки) размером 256×256 пикселей и проводили анализ каждой ячейки методом ММВП 2D. В зависимости от полученного результата ячейку маркировали цветом (рис. 1, *б*, *в*, *д*, *е*). Цвета ячеек обозначают следующее: красный – $H > 0,55$; желтый – $0,45 \geq H \geq 0,55$; синий – $H < 0,45$; розовый – скейлинг отсутствует. Далее производили подсчет

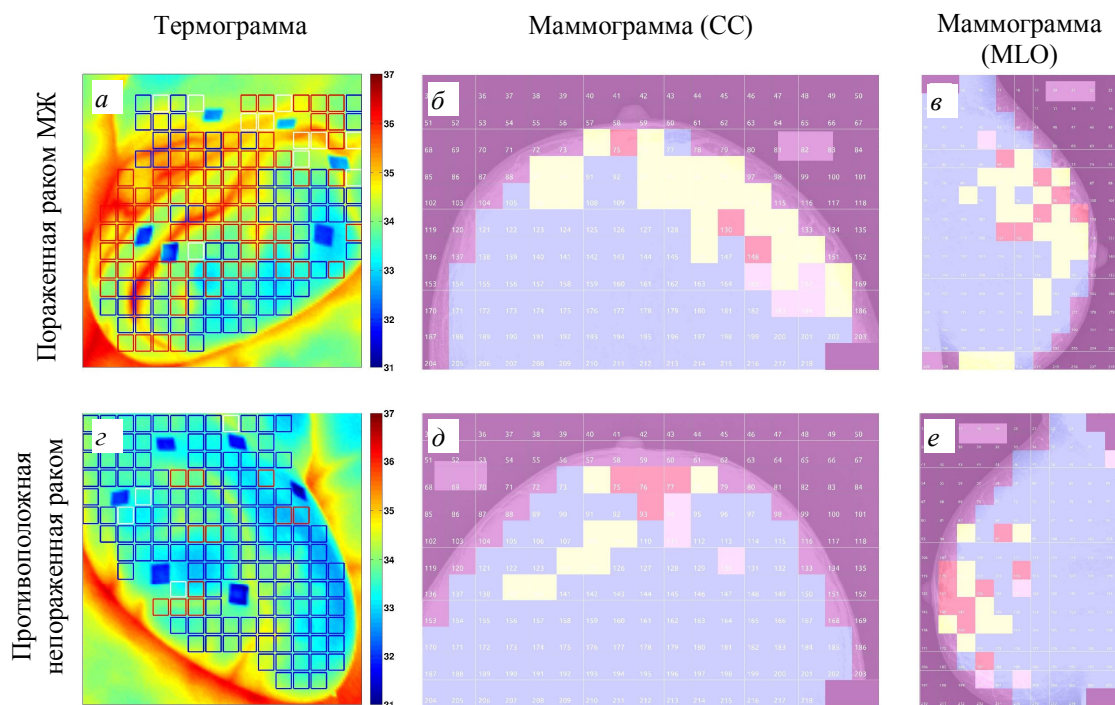


Рис. 1. Результаты анализа термограмм и маммограмм методом ММВП (адаптировано из [1–2])

количества ячеек каждого цвета для каждой маммограммы, определяли наличие конгломератов (кластеров) ячеек с дезорганизацией структуры (желтых ячеек) рентгенографического изображения, количество и размер этих кластеров, их расположение по отношению к опухоли.

Области не пораженных опухолью тканей на маммограмме в терминах мультифрактального формализма характеризуются коррелированной структурой изображения (многомасштабная корреляция характерна, как правило, для железистой ткани, антикорреляция – для жировой ткани). Рентгеновские изображения пораженных раком областей молочной железы также монофрактальны, для них наблюдается отсутствие коррелированности изображения и дезорганизация его структуры. Данный переход – от коррелированности к отсутствию корреляции в структуре ткани на маммограмме, может в дальнейшем послужить диагностическим признаком для раннего выявления патологии в молочной железе.

Атомно-силовая микроскопия клеток

Исследовалась группа нормальных (S747) и раковых (S277) клеток из тканей щитовидной железы. Клетки культивировали в чашках Петри и высевали за 24–48 ч до проведения исследований при начальной плотности 2000 клеток/см². В работе использовали атомно-силовой микроскоп MFP3D (Asylum Research, Santa

Barbara, CA, USA), Университет г. Бремена, с применением кантеливеров DC MLCT-Bio, Bruker с низкой жесткостью (0,01 Н/м). Чашка Петри с культурой клеток устанавливалась на приборный столик микроскопа в самодельной камере из ПММА для поддержания атмосферы с постоянной концентрацией углекислого газа 5%.

В эксперименте регистрировались флуктуации кантеливера в контакте с нормальными и раковыми клетками до и после их химической обработки препаратом ML7 (0,5 мМ), подавляющим активность миозина *myosin light chain-kinase* (MLCK) и приводящим к размягчению актина в цитоскелете клетки. Первоначально клетки исследовались в их физиологических условиях (без применения препарата), затем в чашку Петри добавляли препарат ML7 и проводилась серия измерений флуктуаций кантеливера в контакте с клеткой с интервалом в несколько минут для оценки динамики изменения отклика клетки на химическое воздействие [4]. Флуктуации кантеливера в контакте с клеткой регистрировались при различных усилиях, действующих на клетку, от 500 пН до 1,5 нН, и временах выдержки от 0,4 до 6,4 с. Регистрируемый экспериментальный сигнал вследствие вязкоупругого поведения клетки имеет значительный экспоненциальный тренд, который удаляли перед анализом (рис. 2).

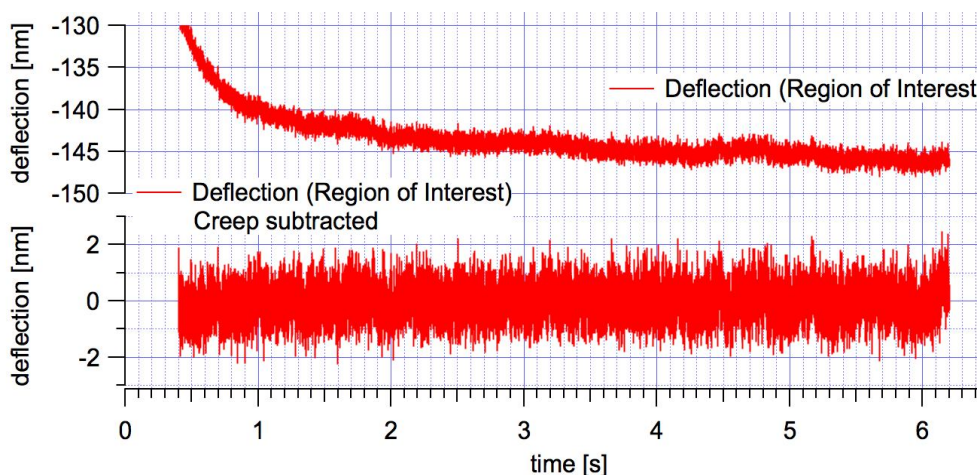


Рис. 2. Типичный экспериментальный сигнал флуктуаций кантеливера в контакте с клеткой: исходный сигнал (сверху) и после удаления тренда (снизу)

Количественный анализ данных флуктуации кантеливера в контакте с нормальными и раковыми клетками осуществлялся на базе метода MF-DFA, успешно применяющегося для анализа стационарных и нестационарных временных сигналов [5, 6]. Результатом применения данного метода является спектр значений параметра Херста $H(q)$, характеризующего фрактальность сигнала. Анализ экспериментальных сигналов выявил их монофрактальный характер, вследствие чего для оценки и сравнения разных типов клеток использовали одно значение параметра Херста $H(q=0)$. Зависимость вычисленного параметра Херста от величины приложенной к клетке силы представлена на рис. 3, а. Для экспериментов с использованием химического препарата ML7 прослеживалась временная эволюция параметра Херста (рис. 3, б). В этом случае контрольное значение параметра Херста, вычисленное до добавления препарата, отложено для времени $t=0$.

Видно, что для необработанных препаратом ML7 клеток значения параметра $H(q=0)$ растут с увеличением действующей на клетки силы (см. рис. 3, а). Разброс значений параметра $H(q=0)$ при этом настолько высок, что экспериментальные данные для раковых и нормальных клеток не поддаются дифференциации.

В случае обработки клеток препаратом

разница между значениями параметра $H(q=0)$ для раковых и нормальных клеток становится несколько более заметной (см. рис. 3, б). При этом на графике $H(q=0)$ от времени виден волнообразный характер изменения данного параметра: известно, что эффект от препарата ML7 наступает не мгновенно, пик эффекта от его добавления происходит спустя 1–2 часа.

Проведен анализ экспериментальных данных по пролонгированной регистрации свободных флуктуаций нормальных и раковых клеток в контакте с зондом атомно-силового микроскопа и их изменений при воздействии на клетку препарата ML7, подавляющего активность цитоскелета на уровне белков (миозина). Продемонстрирована перспективность использования химического воздействия на клетки для облегчения их дифференциации по данным количественного анализа.

Мультифрактальный анализ данных когерентной фазовой микроскопии раковых клеток и клеток в норме

Проведено экспериментальное исследование клеток методом когерентной фазовой микроскопии, основными преимуществами которой являются неинвазивность, высокое пространственное и временное разрешение. В качестве объекта исследования использованы 44 препарата клеток различной локализации (толстая

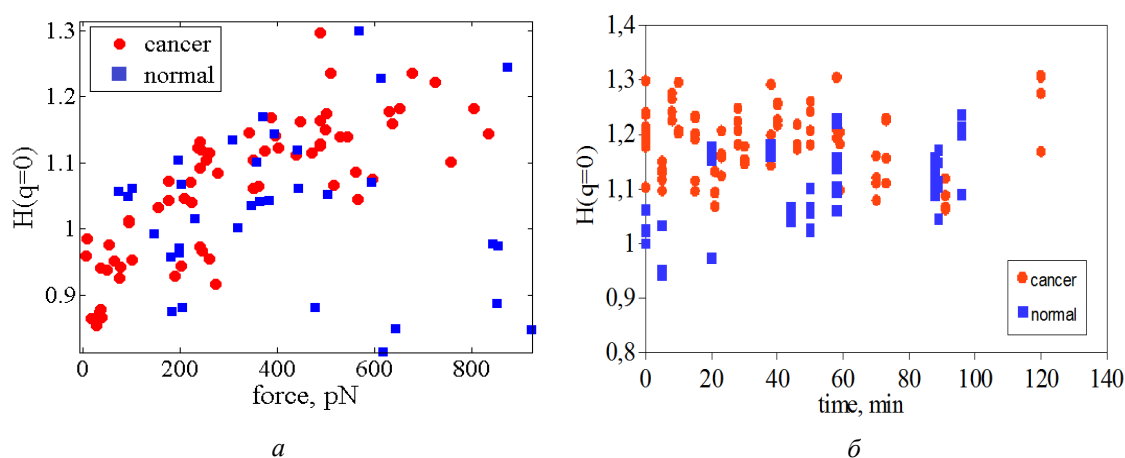


Рис. 3. Зависимость параметра $H(q=0)$ от приложенной силы для нормальных и раковых клеток без химического воздействия (а) и изменение параметра $H(q=0)$ на разных стадиях после добавления препарата ML7 (б)

кишка, почка, молочная железа), подготовленные сотрудниками Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена. Из них 22 препарата были представлены опухолевыми клетками, а оставшиеся 22 – «здоровыми» (т.е. не пораженными опухолевым процессом) клетками.

Измерения прижизненной динамики клеток проводились на базе лаборатории Когерентной фазовой микроскопии с помощью когерентного фазового микроскопа «Aigyscan», разработанного в Московском государственном техническом университете радиотехники, электроники и автоматики под руководством профессора В.П. Тычинского [7–8]. В результате измерений получены фазовые изображения раковых клеток, а также клеток в норме, на основании чего были выделены оптически наиболее плотные области (т.е. области, соответствующие ядрышку клетки), и для них в дальнейшем производились динамические измерения (рис. 4, а–б).

На рис. 4 приведены трек-диаграммы флуктуаций фазовых толщин «здоровой» клетки (а), выделенной из тканей толстой кишки, и раковой клетки (б), которая была выделена из искусственно выращенной культуры НСТ116. По оси абсцисс отложено время фиксации когерентных фазовых сигналов, по оси ординат – пространственная развертка клеток.

Из каждой трек-диаграммы были выделены одномерные временные сигналы, соответствующие флуктуациям фазовой толщины клетки в заданной пространственной точке. В ходе предварительной обработки был осуществлен переход от исходных данных к точечным процессам – последовательностям временных интервалов между локальными максимумами динамического сигнала клетки (для клетки в норме – рис. 1, в, для раковой клетки – рис. 1, г). Далее эти последовательности обрабатывались методом мультифрактального анализа на основе одномерного непрерывного вейвлет-преобразования [7] для выявления индуцирован-

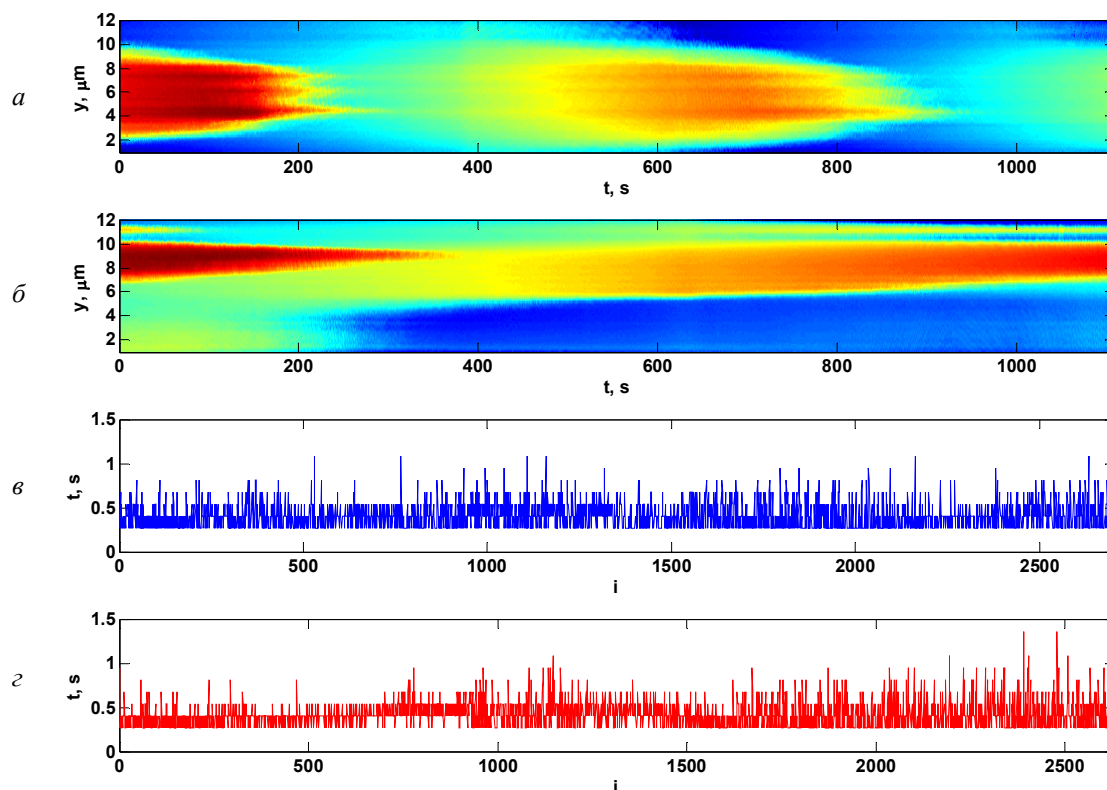


Рис. 4. Трек-диаграммы флуктуаций фазовой толщины клетки толстой кишки в норме (а) и раковой клетки (НСТ116) (б); последовательности временных интервалов между локальными максимумами динамического сигнала клетки в норме (в) и раковой клетки (г)

ных онкологической патологией измененной мультифрактальной структуры динамических процессов.

Была выдвинута гипотеза о том, что динамика клеток в норме характеризуется четко выраженной мультифрактальностью, а флуктуации оптической плотности раковых клеток обладают признаками монофрактальной природы. Обнаружено, что сигналы, соответствующие раковым клеткам, по результатам обработки демонстрируют линейную зависимость спектра скейлинговых экспонент, как следствие, это приводит к заметному уменьшению ширины спектра сингуляр-

ностей (рис. 5, графики красного цвета) в сравнении со спектрами клеток в норме и свидетельствует о монофрактальности сигнала, отвечающего изменениям оптических свойств раковой клетки. Возможно, полученные результаты обусловлены вырождением метаболических процессов в клетке. Для случая «здоровой» клетки была обнаружена противоположная тенденция (рис. 5, графики синего цвета) – ее сигнал оказался мультифрактальным. Таким образом, мера мультифрактальности может служить индикатором неопластических изменений на клеточном уровне.

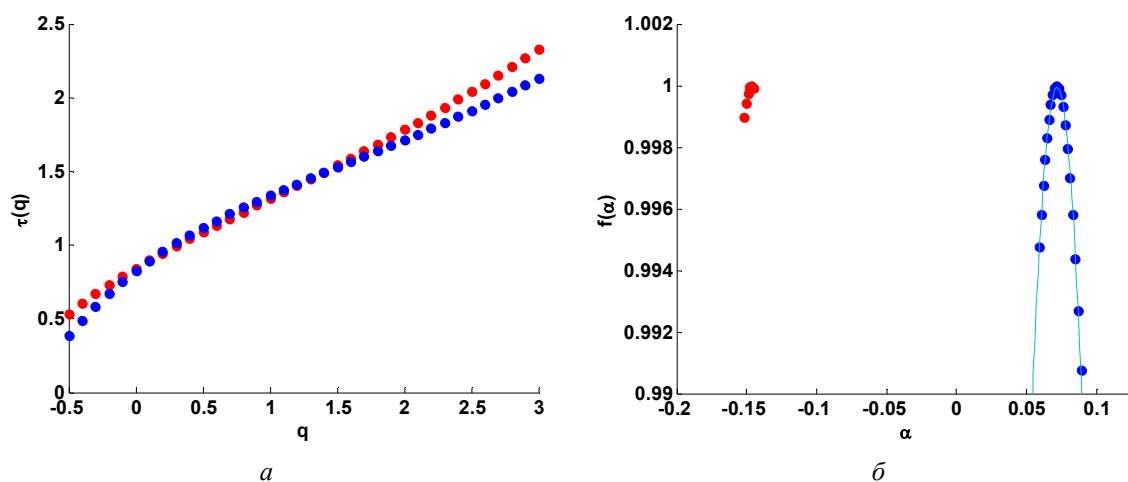


Рис. 5. Скейлинговые экспоненты (а) и спектры сингулярностей (б) для сигналов клетки в норме и раковой клетки

Библиографический список

1. Gerasimova E., Audit B., Roux S.G., Khalil A., Gileva O., Argoul F., Naimark O., Arneodo A. Wavelet-based multifractal analysis of dynamic infrared thermograms to assist in early breast cancer diagnosis // *Frontiers in physiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 176.
2. Gerasimova-Chechikina E., Toner B., Marin Z., Audit B., Roux S.G., Argoul F., Khalil A., Gileva O., Naimark O., Arneodo A. Comparative multifractal analysis of dynamic infrared thermograms and X-ray mammograms enlightens changes in the environment of malignant tumors // *Frontiers in physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 336.
3. Kestener P., Lina J.M., Saint-Jean P., Arneodo A. Wavelet-based multifractal formalism to assist in diagnosis in digitized mammograms // *Image Analysis and Stereology* – 2001. – Vol. 20. – P. 169–174.
4. Goeckeler Z.M., Wysolmerski R.B. Myosin light chain kinase – regulated endothelial contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization and myosin phosphorylation // *Journal of Cell Biology*. – 1995. – Vol. 130. – P. 613–627.
5. Kantelhardt J.W., Zschiegner S.A., Koscielny-Bunde E., Havlin S., Bunde A., Stanley H.E. Multifractal detrended fluctuation analysis of nonstationary time series // *Physica A*. – 2002. – Vol. 316. – P. 87–114.
6. Gulich D., Zunino L. A criterion for the determination of optimal scaling ranges in dfa and mf-dfa // *Physica A*. – 2014. – Vol. 397. – P. 17–30.
7. Тычинский В.П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // *Успехи физических наук*. – 2001. – Т. 171. – № 6. – С. 649–662.
8. Тычинский В.П. Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой // *Успехи физических наук*. – 2007. – Т. 177. – № 5. – С. 535–552.

9. *Arneodo A., Vaillant C., Audit B., Argoul F., d'Aubenton-Carafa Y., Thermes C.* Multiscale coding of genomic information: From DNA sequence to genome structure and function // *Physics Reports*. – 2011. – № 498. – P. 45–188.

**MULTISCALE EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDY
ON MECHANOBIOLOGY AND HOMEOSTASIS OF TUMORS**

E.I. Gerasimova-Chechkina¹, A.S. Nikitiuk¹, E.A. Lyapunova¹, O.S. Gileva², O.B. Naimark¹

¹ *Institute of Continuous Media Mechanics UB RAS*

² *Perm State Medical University named after E.A. Wagner*

We considered multifractality as a characteristic of biological systems in normal state while monofractality as a sign of its tumor transformation based on the theoretical information about the development of cell and tissue damage in biological structures and on the investigations of spatio-temporal fluctuations of phase thicknesses (coherent phase microscopy data of cells) and temperature (infrared thermography data of women's breasts).

Keywords: mechanobiology, tumor, oncogenesis, multifractal analysis.

Сведения об авторах

Герасимова-Чечкина Евгения Игоревна, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, Институт механики сплошных сред УрО РАН (ИМСС УрО РАН), 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 1; e-mail: egerasimova@icmm.ru

Никитюк Александр Сергеевич, аспирант, ИМСС УрО РАН; e-mail: nas@icmm.ru

Ляпунова Елена Аркадьевна, кандидат физико-математических наук, научный сотрудник, ИМСС УрО РАН; e-mail: lyapunova@icmm.ru

Гилева Ольга Сергеевна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний, Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера (ПГМУ), 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: ogileva@rambler.ru

Наймарк Олег Борисович, доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией физических основ прочности, ИМСС УрО РАН; e-mail: naimark@icmm.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.