©Коллектив авторов

МЕТОД ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА РЕКОНСТРУИРОВАННОГО ЭПИДЕРМИСА

К.В. Находʲ[1], А.Л. Русанов[2]*, Е.Д. Лузгина[2], Д.С. Дружиловский[1], Н.Г. Лузгина[1], А.В. Лисица[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва
[2]ООО НПО "Перспектива",
630111, Новосибирск, ул. Кропоткина 271; эл. почта: alexander.l.rusanov@gmail.com

Для аннотирования микроскопических изображений клеток линии HaCaT двумя независимыми экспертными группами была использована платформа OMERO. Изображения были получены в процессе получения ткане-инженерного эпителия, состоящего из нескольких слоёв кератиноцитов. Оценку экспертных заключений проводили путём расчета специфичности, чувствительности и точности. Наилучшая сходимость мнений экспертов (91%) была достигнута при оценке конфлюэнтности монослоя клеток. Точность 70% наблюдалась при определении степени дифференциации клеток после 10 дней инкубации. Обсуждается полезность платформы OMERO для динамической перекрестной проверки качества при разработке и стандартизации клеточных препаратов.

Ключевые слова: OMERO, модель кожи, реконструированный эпидермис человека, кератиноциты HaCaT

DOI: 10.18097/PBMC20186401010

ВВЕДЕНИЕ

OMERO – это программное обеспечение, предназначенное для хранения и работы с многомерными (охватывающими пространство, время и т.д.) изображениями в области клеточной биологии, характеризующимися множеством форм и метаданных [1]. Для проблемы гетерогенности изображений и получения интегральных метрик надежным подходом служит так называемая краудсорсинговая аннотация – проведение экспертной оценки различными людьми, имеющее целью составление достоверного коллективного мнения [2].

Аннотация изображений гистологических срезов и клеток с успехом использовалась при составлении "Атласа белков человека" [3]. При реализации этого проекта получение изображений осуществлялось с помощью световой микроскопии, конфокальной микроскопии, флуоресцентно-меченых срезов и Вестерн-блоттинга. Аннотацию изображений проводила команда экспертов из Индии, а срезы тканей были подготовлены в Швеции. Такое взаимодействие производителей изображений и экспертов было ключевым достижением этого проекта [4].

Подобно "Атласу белков человека", возможности платформы OMERO предназначены для поддержки научных открытий посредством обмена изображениями. Доступность изображений для учёных создала прочную основу для оценки качества результатов, аналогично тому, как это было установлено в транскриптомике. Однако внутреннее различие изображений среди других источников информации ограничивает возможность автоматизированной обработки [5].

OMERO предоставляет инфраструктуру обмена данными для объединения мнений нескольких экспертов. Поэтому было интересно выяснить, можно ли использовать это приложение для стандартизации в тканевой инженерии [6]. OMERO может быть полезна для оценки и поддержания качества производства стандартизированных клеточных продуктов. Такая функция очень важна при изготовлении тканевых эквивалентов в контексте проверки эффективности и прогнозирования безопасности новых видов продукции [7, 8]. Наиболее успешно в настоящее время разрабатываются реконструированные эквиваленты кожи человека. Например, такие коммерчески доступные модели как EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ RHE и epiCS® широко используются для оценки специфической в отношении здоровья человека токсичности химических веществ и их смесей, фармацевтических препаратов, а также некоторых видов косметических продуктов [9]. Тесты *in vitro* на таких моделях одобрены Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), включая исследования коррозии и раздражения кожи, абсорбции веществ через кожу и другие.

Существуют особые требования к тому, чтобы клеточные модели соответствовали нормам ОЭСР. Во-первых, эти модели должны быть стандартизированы с точки зрения описательных, структурных и функциональных характеристик клеток. Во-вторых, существует требование воспроизводимости количественных параметров, имеющих отношение к цели теста. Узким местом для выполнения требований ОЭСР является чрезвычайно короткий срок (несколько дней) между производством и использованием модели кожи человека на основе клеток для проведения достоверного теста. Временные ограничения приводят к серьезным трудностям, связанным с транспортировкой и контролем качества *in-situ*, особенно если производитель и потребитель географически разделены. Поскольку удалённость производителя и потребителя является частым случаем, мы исследовали возможность использования среды обмена изображениями OMERO для проведения двуцентровой краудсорсинговой экспертизы качества реконструированного эпителия человека.

* - адресат для переписки

Для проверки данного подхода мы применили протоколы биоинженерии с использованием иммортализованной клеточной линии кератиноцитов HaCaT. Результаты каждого эксперимента регистрировали с помощью микроскопии и распределяли между двумя группами независимых экспертов. Экспертные мнения сравнивались как в группе, так и между группами через 3 месяца.

МЕТОДИКА

Инсталляция OMERO

Мы использовали OMERO в качестве программной веб-платформы, обеспечивающей единую унифицированную систему управления изображениями, используемыми в области клеточной биологии. Функциональные особенности OMERO включают в себя возможность хранения, редактирования, передачи данных посредством клиент-серверной реализации программной платформы с учётом интерфейса прикладного программирования (API). Клиент-серверное программное обеспечение разработано с использованием Python, Java и C++ [10]. Текущая версия платформы OMERO.server x64 v.5.2.1 [11] развернута на облачной виртуальной машине под управлением MS Windows 2008 R2. Данные изображений размещены на СХД HP 3PAR с выделенным посредством SMB виртуальным пространством объёмом 16 ТБ. Сервер подключен к частной сети с пропускной способностью 10 Гбит/с. Для серверной части OMERO были выделены 16-ядерный процессор с частотой 2,1 Гц и 64 ГБ RAM. Процедура аутентификации серверной части OMERO осуществляется посредством взаимодействия с LDAP-сервера.

Программная веб-платформа OMERO была использована как инструмент для проведения двухступенчатой экспертизы с шагом в 3 месяца, с целью анализа различий полученных аннотаций, притом, что исходные данные по изображениям были идентичны. Для этого был создан новый проект с идентичными полями для заполнения аннотаций. По завершению процедуры аннотирования изображений, был использован функционал OMERO API с целью извлечения аннотаций в формате CSV для дальнейшей обработки в виде электронной таблицы.

Экспертные мнения

В исследовании принимали участие две группы экспертов: группа №1 “производители” (ООО НПО “Перспектива”, г. Новосибирск), которые были задействованы в экспериментальной работе по получению реконструированного эпителия человека, и группа №2 “клиенты” (ИБМХ им. В.Н. Ореховича, г. Москва), которые выражали свое мнение о качестве результатов группы №1. Каждая группа включала в себя двух кандидатов наук и одного аспиранта. Участники имели 1,5-6,5 лет опыта исследований в области клеточной биологии, в том числе с использованием микроскопических методов. Участники зарегистрировались как пользователи сервера OMERO, с полным доступом к изображениям и аннотациям данного проекта.

Изображения были получены группой №1 в ходе их экспериментальной работы и размещены на сервере OMERO. Члены группы №1 предоставили персонализированные аннотации для каждого изображения в соответствии с онтологией категорий, описанной ниже. Было принято решение, что в рамках группы №1 эксперты могут вести переговоры друг с другом при создании аннотаций для одного и того же изображения.

Задачи для группы №2 были созданы путём случайного разбиения загруженных изображений среди экспертов. Эксперты из группы №2 также могли обсуждать результаты, но в отношении разных (случайно выбранных) изображений. Для группы №2 были доступны следующие аннотации: “Согласен” или “Не согласен” с аннотациями, указанными группой №1. Также были доступны варианты “Частично согласен”, “Частично не согласен” или “Неопределённый”.

Вторая часть эксперимента была проведена три месяца спустя. Группы №1 и №2 “поменялись ролями”. При использовании одного и того же набора изображений группа №2 предоставила первичные аннотации, тогда как группа №1 выражала согласие/несогласие с этими аннотациям. Если мнения экспертов совпадают в положительной оценке (например, оба эксперта предположили, что изображение подтверждает, что искусственная ткань имеет высокое качество), такие случаи рассматривались как истинно-положительные результаты. Истинно-отрицательными считали случаи, когда эксперты приходили к согласию о низком качестве исследуемого образца. Несовпадающие мнения рассматривали как ложно-положительные или ложно-отрицательные при сравнении результатов аннотации между группами и внутри групп в начальный момент времени и три месяца спустя путём вычисления чувствительности, специфичности и точности обычным способом:

Чувствительность = ИП/(ИП+ЛО);

Специфичность = ИО/(ИО+ЛП);

Точность = (ИП+ИО)/(ИП+ИО+ЛП+ЛО);

где ИП – истинно-положительные, ИО – истинно-отрицательные, ЛП – ложно-положительные, ЛО – ложно-отрицательные.

Экспериментальный протокол

Группе №1 (“производители”) была поставлена задача адаптации разработанного протокола получения реконструированного эпидермиса [11] к используемым условиям. С целью оптимизации среды для клеточной пролиферации клетки линии HaCaT в количестве 5×10^5 высевали в 25 см^2 флаконы (“Corning”, США) и культивировали в течение 96 ч в бессывороточной среде Keratinocyte-SFM, DMEM или RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), добавку Glutamax™ и антибиотики (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина).

Компоненты сред были приобретены в “Gibco” (США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C и в увлажненной атмосфере 5% CO_2. Среду заменяли раз в два дня. Изображения получали с использованием системы визуализации клеток EVOS (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Модель многослойной кожи была получена с использованием мембранных вставок трансвелл (полиэфирная мембрана, диаметр пор 1 мкм, 24-луночный формат) (“Corning”). Клетки HaCaT высевали в трансвеллы в среде DMEM, содержащей 10% ФБС, добавку Glutamax™ и антибиотики (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и культивировали в течение 24 ч. Затем среду из апикального отсека трансвелла отбирали и далее клетки выращивали на границе раздела воздух-жидкость. Среду в базолатеральном отсеке меняли через день [12].

После 10 дней культивации клетки трижды промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS), фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS, пермеабилизовали 0,1% раствором тритона X-100 и блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS. После инкубации с первичными антителами против цитокератина CK10 в течение ночи при +4°C (в 1% БСА в PBS) во влажной камере клетки трижды промывали PBS 3 раза и инкубировали с AlexaFluor488 – конъюгированными вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Для обнаружения пролиферирующей активности клеток антитела против Ki67, конъюгированные с ФИТЦ (“Thermo Fisher Scientific”), наносили в течение ночи при 4°C (в 1% БСА в PBS). Затем образцы заключали в среду AquaPolymount (“Invitrogen”, США), содержащую DAPI, и исследовали с использованием конфокального микроскопа LSM880 (“Carl Zeiss”, Германия) для характеристики степени дифференцировки или пролиферативной активности.

Типы аннотаций

Словарь аннотаций изображений был ограничен следующими категориями (рис. 1). Конфлюэнтность (да/нет) характеризовала способность клеток формировать единый монослой. Количество слоёв клеток характеризовали как 1-2, либо 3 или более. Степень пролиферации оценивали как отношение клеток, позитивных по маркеру Ki67, к общему

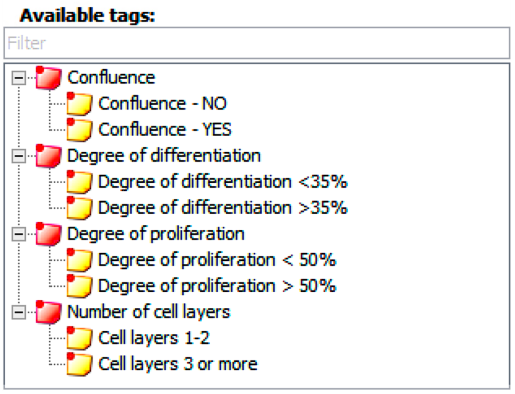

Рисунок 1. Типы аннотаций в системе OMERO.

количеству клеток: 0-50% или выше 50%. Степень дифференцировки оценивали в отношении доли положительных кератиноцитов CK10 с использованием вариантов: менее 35% и более 35%. Эксперту было рекомендовано усреднить наблюдения в 5 областях зрения [13]. Экспертам был предоставлен доступ к специализированному программному обеспечению обработки изображений imageJ [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего было группой №1 получено и передано через сервис OMERO 63 изображения. Структура полученных результатов приведена в таблице 1. Данные этой таблицы представляют собой двухэтапную оптимизацию роста клеток путём изменения среды и условий инкубации в трансвеллах. Результаты оптимизации среды были загружены в виде фазово-контрастных оптических изображений с увеличением ×10/×20. Эксперименты с применением трансвеллов были проведены для визуализации трёхмерной структуры ткани с помощью конфокальной микроскопии. Ожидалось, что через три дня роста клетки будут организованы в один слой, а через 10 дней должно образоваться как минимум три слоя. Изображения, которые соответствуют этим ожиданиям, были обозначены как положительные при оценке точности экспертных заключений.

На рисунке 2 показаны примеры изображений, которые были аннотированы как истинно-положительные как для начальных, так и для заключительных (через 3 месяца)

Таблица 1. Коллекция изображений клеток линии HaCaT

Задача	Критерий	Количество изображений	Оборудование	Измерения
Среда для культивирования	Конфлюэнтность	23	EVOS Cell Imaging	Фазовый контраст ×10/×20
Культивирование в трансвелле в течении 10 дней	Число слоев	40	LSM 880, Carl ZEISS	Конфокальные изображения ×10, окраска DAPI
	Степень пролиферации	20		Конфокальные изображения ×40, окраска Ki67
	Степень дифференцировки	20		Конфокальные изображения ×40, окраска CK10

сессий экспертного анализа. При культивировании во флаконе клетки HaCaT образовывали плотный гомогенный монослой за 96 ч и имели морфологию, характерную для кератиноцитов (рис. 2А). При культивировании на трансвелле на десятый день наблюдалось минимум три слоя клеток при регистрации с помощью конфокальной микроскопии в режиме 3D (Z-стек) (рис. 2Б). Изображение на рисунке 2В позволило эксперту оценить дифференцировку клеток с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к цитокератину 10 (рис. 1).

Набор данных, указанный в таблице 1, и пример которого приведён на рисунке 2, был представлен для аннотации двумя группами экспертов, работающих отдельно. Первая группа, которая получала образцы и изображения, работала в Новосибирске, вторая – в Москве. Процесс аннотации был структурирован с использованием настроенного OMERO-сервиса таким образом, что эксперты в обеих группах (“клиенты” и “производители”) могли свободно делиться своими мнениями. Однако, поскольку учёные разных групп лично не были знакомы друг с другом, они не обсуждали аннотации, до загрузки их на сервер.

В 4% случаев эксперт из группы №2 – “клиент” – не был уверен в аннотации, предоставленной “производителем”. При получении значений для таблицы 2, мы рассматривали эти мнения как “Частично не согласны”. Через три месяца степень неопределенности уменьшилась, поэтому точность увеличилась на 5-14%. Это указывало на сближение экспертных заключений после того, как один и тот же набор изображений был представлен дважды.

Значения чувствительности, специфичности и точности в таблице 2 были получены путём рассмотрения мнения группы №1 как “золотого” стандарта. Через три месяца такой статус, наоборот, был присвоен мнению экспертов из группы №2. Такая схема перекрестной проверки позволила оценить смещение мнений экспертов. Следует отметить, что неудачные эксперименты и неоднозначные изображения были отброшены “производителями” и вообще не загружены в систему обмена данными. Поэтому мы наблюдали сильную представленность истинно-положительных результатов по сравнению с истинно-отрицательными, из-за чего в таблице 2 значения чувствительности выше, чем специфичности.

Внутригрупповую надежность мнений проверяли путём сравнения аннотаций, предоставленных для тех же изображений, через три месяца. Несоответствие имело место, когда участник 1-й группы первоначально аннотировал изображение, но через 3 месяца изменил свое мнение. Расхождение между повторной аннотацией было ниже 6% для обеих групп.

Согласно значениям таблицы 2, вклад в специфичность и селективность зависел от типа аннотации. Например, мнения о конфлюэнтности монослоя совпали между группами №1 и №2 в 96% случаев. Суждения о распределении маркеров дифференцировки дали наименьшую специфику (29-33% случаев).

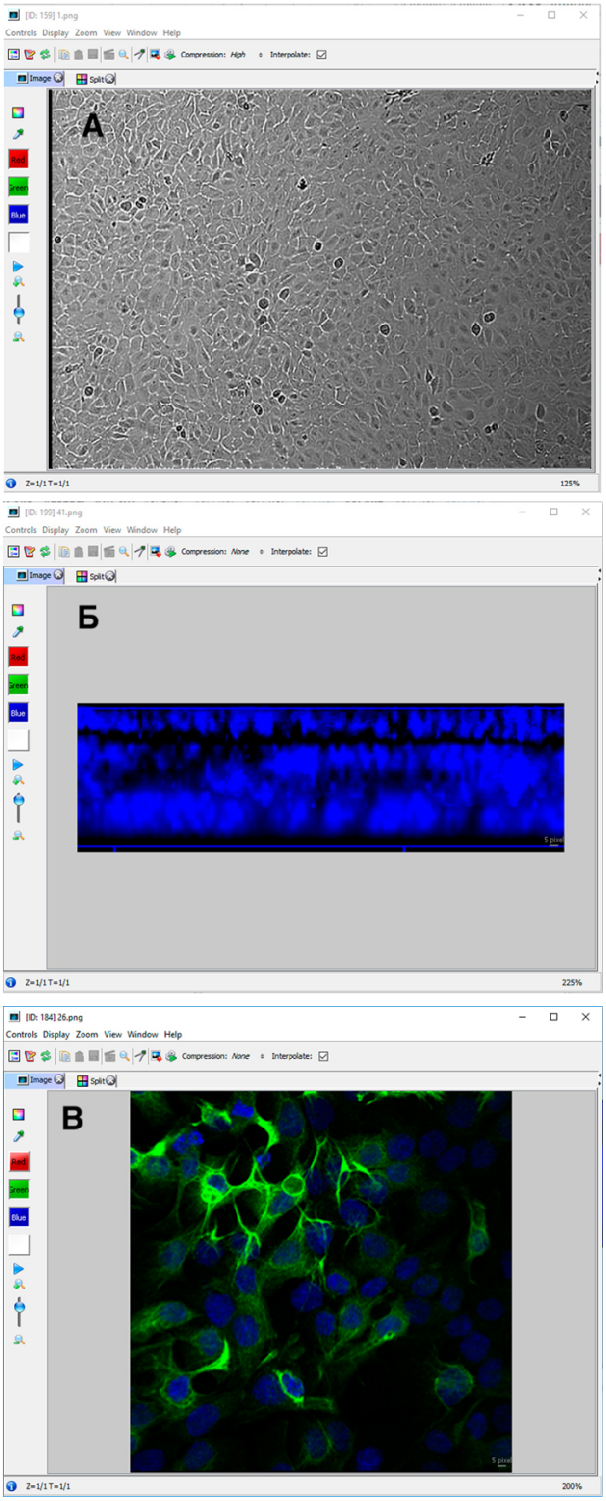

Рисунок 2. Изображения, размещённые в системе OMERO. (А) Конфлюэнтность клеток линии HaCaT в DMEM + 10% ФБС, 96 ч культивирования (световой микроскоп, увеличение ×10). (Б) Культивирование кератиноцитов на мембранной вставке трансвелл в течение 10 дней (толщина среза 20 мкм, ядра окрашены DAPI (синий), Z-стек). (В) Культивирование кератиноцитов на мембранной вставке трансвелл в течение 10 дней (окрашивание антителами к цитокератину 10 (зелёный, конфокальный микроскоп, увеличение ×40).

Таблица 2. “Производители” (Группа №1) vs “Клиенты” (Группа №2), и перекрёстная проверка аннотаций через 3 месяца

Тип аннотации	Группа №1 *vs* Группа №2			Группа №2 *vs* Группа №1*		
	Чувствительность	Специфичность	Точность	Чувствительность	Специфичность	Точность
Конфлюэнтность	0.93	0,63	0,83	1,00	0,80	0,91
Число слоёв клеток	0,80	0,60	0,75	0,92	0,71	0,85
Пролиферация	0,92	0,57	0,80	0,93	0,60	0,85
Диференцировка	0,85	0,29	0,65	0,86	0,33	0,70
Среднее	0,86	0,52	0,75	0,92	0,61	0.82

Примечание: * - через три месяца.

Чувствительность для экспертных мнений по количеству слоев клеток составила 0,80, а для степени дифференцировки – 0,85. Через три месяца чувствительность метки “количество слоёв” выросла до 0,92, а чувствительность метки “дифференцировка” осталась на том же уровне – 0,86. Незначительные различия в аннотациях указывают на сходимость экспертных мнений. Таким образом, краудсорсинговая среда может применяться для стандартизации в клеточной биологии, что уже используется в масштабном проекте Zooneverse [2].

Основное расхождение в экспертных оценках наблюдалось для доли CK10-положительных клеток, что приводило к низким значениям точности (табл. 2): 0,65 и 0,71. Белок CK10 накапливается в цитоплазме по мере дифференцировки клетки. Плавное изменение интенсивности флуоресцентного сигнала осложняет экспертную оценку в отношении слабо окрашенных клеток. Автоматические инструменты специализированных продуктов (например, ImageJ) не всегда верно оценивают случаи неоднозначного слабого окрашивания. На начальном этапе дифференцировки многослойного эпителия доля кератинизированных клеток была низкой. Поэтому при оценке качества реконструированного эпителия человека критерий “дифференцировки” вполне информативен.

Таким образом, использование платформы OMERO может быть полезно для проведения контроля качества в тканевой инженерии. OMERO позволяет формулировать различные задачи для аннотирования микроскопических изображений. Задачи были распределены между зарегистрированными экспертами, заключения которых были далее собраны и сопоставлены руководителем проекта. Было показано, что слабо формализованные, субъективные мнения о свойствах клеточных структур могут быть количественно охарактеризованы с точки зрения чувствительности, специфичности и точности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской федерации в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы” (Соглашение о предоставлении субсидии №14.607.21.0129, уникальный идентификатор RFMEFI60715X0129).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Burel J.-M., Besson S., Blackburn C., Carroll M., Ferguson R.K., Flynn H., Gillen K., Leigh R., Li S., Lindner D. et al.* (2015) Mamm. Genome, **26**, 441-447.
2. *Swanson A., Kosmala M., Lintott C., Packer C.* (2016) Conserv. Biol., **30**, 520-531.
3. *Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., Wernerus H., Bjorling L., Ponten F.* (2010) Nat. Biotechnol., **28**, 1248-1250
4. *Navani S.* (2016) Proteomics, **16**, 1266-1270.
5. *Hardy B., Douglas N., Helma C., Rautenberg M., Jeliazkova N., Jeliazkov V., Nikolova I., Benigni R., Tcheremenskaia O., Kramer S. et al.* (2010) J. Cheminformatics, **2**,7.
6. *Kolker E., Stewart E.* (2014) J. Proteome Res., **13**, 1783-1784.
7. *Rusanov A.L., Smirnova A.V., Poromov A.A., Fomicheva K.A., Luzgina N.G., Majouga A.G.* (2015) Toxicol. In Vitro, **29**, 1006-1011.
8. *Rusanov A.L., Luzgina N.G., Barreto G.E., Aliev G.* (2016) CNS Neurol. Disord. Drug Targets, **15**, 301-309.
9. *Qiu J., Zhong L., Zhou M., Chen D., Huang X., Chen J., Chen M., Ni H., Cai Z.* (2016) Int. J. Cosmet. Sci., **38**, 60-67.
10. *Allan C., Burel J.-M., Moore J., Blackburn C., Linkert M., Loynton S., MacDonald D., Moore W.J., Neves C., Patterson A. et al.* (2012) Nat. Methods, **9**, 245-253.
11. http://www.openmicroscopy.org/site/products/omero
12. *Mewes K.R., Fischer A., Zoller N.N., Laubach V., Bernd A., Jacobs A., van Rompay A., Liebsch M., Pirow R., Petersohn D.* (2016) Toxicology in Vitro, **36**, 238-253.
13. *Alepee N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M.-H., Doucet O., Pachot J., Meloni M., de Brugerolle de Fraissinette A*. (2010) Toxicol. In Vitro, **24**, 257-266.
14. *Fentem J.H., Botham P.A.* (2002) Altern. Lab. Anim., **30**, suppl. 2, 61-67.
15. *Hong Mu, Kai-Xuan Lin, Hong Zhao, Shu Xing, Cong Li, Fang Liu, Hai-Zhen Lu, Ze Zhang, Yu-Lin Sun, Xi-Yun Yan, Jian-Qiang Cai, Xiao-Hang Zhao* (2014) World J. Gastroenterol., **20**, 5826-5838.

Поступила: 04. 09. 2017.
Принята к печати: 27. 12. 2017.

QUALITY CONTROL STUDY OF ENGINEERED SKIN TISSUE

K.V. Nakhod[1], A.L. Rusanov[2], E.D. Luzgina[2], D.S. Druzhilovskiy[1], N.G. Luzgina[1], A.V. Lisitsa[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia
[2]Research and Manufacturing Association "Perspectiva",
271 Kropotkina str., Novosibirsk, 630111 Russia; e-mail: alexander.l.rusanov@gmail.com

OMERO service was used to annotate the cell line HaCaT microscope images by two independent expert groups. The images were obtained in the course of developing tissue-engineered epithelium which consisted of several layers of the keratinocytes. Evaluation of expert opinions was performed by calculation of specificity, sensitivity and accuracy. The best convergence of opinions (91%) was achieved for the confluence of the cell monolayers. Accuracy 70% was observed in determining the extent of cell differentiation after 10 days of incubation. The paper illustrates the usefulness of OMERO service for dynamic cross-validation of quality in the development and standardization of cell preparations.

Key words: OMERO, skin model, reconstructed human epidermis, HaCaT keratinocytes