

О.В.Градов^{1,3,4}
О.В.Нотченко^{1,2}

¹ Лабораторія нейронної структури мозку Наукового Центру Неврології РАМН, Москва, РФ

² МДТУ ім. Н.Е.Баумана, Москва, РФ

³ Institute of Mathematical Statistics, Maryland, USA

⁴ SIAM Activity Group of Life Science, Philadelphia, USA

Ключові слова: лабораторія на чипі, гемоцитометр, гематиметр, математична морфологія, комп'ютерна морфометрія, профіль люмінанса, цифровий морфогенез.

Надійшла: 29.01.2012

Прийнята: 14.03.2012

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2012.1.5-19>

ЗАГАЛЬНОДОСТУПНІ МОРФОГІСТО-ХІМІЧНІ ЛАБОРАТОРІЇ НА ЧИПІ НА БАЗІ СІТОК РАХУНКОВИХ КАМЕР РІЗНИХ ТИПІВ: МІКРОФЛЮЇДНІ МОРФОДИНАМІЧНІ РОБОЧІ СТАНЦІЇ

Резюме. Запропонована загальнодоступна конструкція автономних (не потребуючих спеціального обладнання для зчитування) лабораторій на чипі з використанням для секціонування клітин, що детектуються, виділених за допомогою апарата Сайка, сітчастих рахункових камер гемоцитометричного типу. Запропонована система їх автоматизованої радіочастотної ідентифікації в умовах тривалого зберігання, що супроводжується одержанням нових морфометричних даних на різних стадіях культивування або біомоніторингу. Описана дифракційна методика підрахунку й фінгерпринтинга клітинних утворень у варійованих умовах середовища. Наведені експериментальні дані по апробації для її реалізації камер Фукса-Розенталя, Бюркера, Нейбауера, Маклера й Тома-Цейса. Показана застосовність даних пристроїв у когерентно-денситометричній індикації концентраційної динаміки в клітинній культурі або суспензії й морфогенетичних процесів у них для ламінарних умов середовища. Продемонстрована навчальна програма для розпізнавання патернів клітин і реляційної цитоморфометрії на базі лабораторії на чипі з об'єктно-мікрометричним калібруванням по сітці камери. Введено в практику гібридний *in vitro/in silico* принцип моніторингу морфогенезу культур.

Морфологія. – 2012. – Т. VI, № 1. – С. 5-19.

© О.В.Градов, О.В.Нотченко, 2012

Gradov O.V., Notchenko A.V. Accessible morphohistochemical labs-on-a-chip based on different counting chambers' grids: microfluidic morphodynamical workstations.

Summary. An accessible design of autonomous labs on the chip which do not require a special reader is developed. The proposed device uses hemocytometric counting chambers for determination of concentration of cells, isolated by a special device for cell sedimentation. A system of automated Rf-identification of chambers in the long-term storage is proposed which provides new morphometric data at various stages of cultivation or biomonitoring. A new diffraction method of calculation and fingerprinting of cellular structures in varying environmental conditions is described. Experimental data on the pilot testing of Fuchs-Rosenthal, Buerker, Neubauer, Makler and Thoma chambers for the described technique is given. The applicability of these devices for coherent-densitometric indication either of concentration dynamics in cell culture or suspension or morphogenetic processes in them for laminar conditions is shown. A self-learning program for cellular pattern recognition and relational cytophotometry based on lab on the chip with an object-micrometric calibration relative to the counting net is demonstrated. A hybrid *in vitro / in silico* method of morphogenesis monitoring in cell cultures is introduced.

Key words: lab-on-a-chip, haemocytometer, counting chambers, hematimeter, mathematical morphology, computer morphometry, 3D luminance surface, digital morphogenesis.

Вступ

У теперішній час у біомедичній практиці цивілізованих країн широко використовуються технології Lab-on Chip або інакше – «лабораторії на чипі» (Ghallab Y.H., Badawy W., 2010). Крім біохімічної мікрофлюїдики, одним з основних напрямків використання лабораторій на чипі є культивування клітин (Walker G.M. et al., 2004; Pagnirigan A, Beebe D.J., 2008; Hufnagel H. et al., 2009; Barbulovic-Nad I. et al., 2010) і мікроскопічний моніторинг метаболізму організмів (Dome-

nech M. et al., 2009; Satoh W. et al., 2009; Jebrail M.J., Wheeler A.R., 2010). Трендом культивування клітин на чипах є створення нейронних мереж *in vitro* на базі культур нервової тканини (Wheeler B.C., Brewer G.J., 2010; Hardelauf H. et al., 2011; Vishwanathan A. et al., 2011) і їхній комплексний аналіз, що включає в себе біохімічні й електрофізіологічні вимірювання на чипі (Pedersen S. et al., 2003; Ionescu-Zanetti C. et al., 2005; Ulhaque A. et al., 2007; Mohammed J.S. et al., 2008; Wang C.J. et al., 2008). Одним зі способів реєстрації цитохімі-

чних і гістохімічних параметрів у чипах є застосування багатоелементних фоточутливих матриць на базі приладів із зарядовим зв'язком або їх аналогів (Liu Y. et al., 2004; Eltoukhy H. et al., 2006; Lee H., 2007; Ghafar-Zadeh E. et al., 2008; Ozawa T. et al., 2009; Balsam J. et al., 2011). Мікрофотометричні й флуориметричні методи застосовуються в лабораторіях на чипі поряд з електричним (біоелектрохімічним) детектуванням, що забезпечує високу евристичну цінність результатів використання подібних технологій (Muhlberger H. et al., 2008). Так як вищевказані детектори дозволяють реєструвати сигнал на великій площі з високою просторовою роздільною здатністю, можливе сполучення біохімічних і кінетичних вимірів з морфометрією цитологічних і гістологічних структур у рідкій фазі.

Конструкція елементарної лабораторії на чипі складається з детектуючої матриці й мікронних борозенок для реалізованої на чипі мікрофлюїдики (капілярів для капілярного електрофорезу, лунок для імунологічних досліджень, борозенок для культивування клітин і т.і.) і може бути легко відтворена в лабораторних умовах. Для конкретних застосувань оптимізовані різні топології чипів і мікрофлюїдики. Разом з тим, у силу вузької спеціалізації топології, малосерійного або штучного виготовлення відповідних зразків лабораторій на чипі, які мають у результаті високу вартість, рутинне повсякденне застосування лабораторій на чипі є, скоріше, екзотикою, ніж правилом, яке впливає із завдань цитоморфологічних і гістоморфологічних колективів. Для подолання відставання лабораторної практики пострадянської морфології від трендового методичного напрямку закордонної науки пропонується спрощена версія лабораторії на чипі зі змінним типом мікроборозенок, що базується на застосуванні рахункових камер і придатна для комп'ютерного цифрового аналізу даних без використання додаткових зчитувальних приладів. Система, зображена в статті, може бути легко відтворена в умовах будь-якої лабораторії.

Екскурс в історію

Пропонуючи дану конструкцію, ми не впроваджуємо новий метод у гістологію, а лише відворюємо в цифровій формі стандартну конструкцію гематиметра Hayem G. і Nacet A. XIX ст., яка передбачає контактне поєднання детектуючої оптики із предметним склом і відсутність необхідності додаткового мікроскопічного устаткування для оптичної візуалізації мікропрепарату, коли тубус з'єднується з предметним столиком, на якому розташовується предметне скло. На рис. 1 наведений фрагмент першої сторінки посібника з експлуатації гематиметра, на якій прямо вказується на цю особливість конструктивного

рішення, а на рис. 2 – ескіз гематиметра Nacet¹ кінця XIX століття.

Hématimètre de M. le Prof. G. HAYEM et de A. NACHET

DESCRIPTION ET USAGE DU NOUVEAU MODÈLE

POUR LA

NUMÉRATION RAPIDE DES LEUCOCYTES

La disposition particulière de ce nouvel appareil permet d'examiner une préparation de sang plus facilement qu'avec les autres modèles, et de compter plus méthodiquement dans différentes régions de la préparation les globules qui s'y trouvent. On peut ainsi établir une moyenne d'autant plus exacte qu'elle porte sur un plus grand nombre d'observations.

Au moyen d'une vis placée sur le côté de l'appareil, on peut déplacer transversalement (droite à gauche) la cellule contenant la dilution de sang, de façon à examiner successivement et compter régulièrement dans une rangée de carrés. Pour éviter qu'on ne compte deux fois les globules dans le même endroit de la préparation, un petit déclic agissant sur la vis latérale indique, pour chaque demi-tour, qu'un nouveau point de cette préparation se présente dans le champ de vision.

De plus, afin que l'on puisse répéter cette même opération dans plusieurs régions de la préparation, c'est-à-dire compter les leucocytes dans plusieurs rangées parallèles de carrés pour avoir, comme nous le disions plus haut, une moyenne plus exacte, l'appareil est muni d'un petit levier-poussoir placé en avant de la cellule. On peut ainsi la déplacer dans le sens antéro-postérieur, de millimètre en millimètre de façon à faire facilement le dénombrement dans quatre ou cinq rangées de carrés.

Ce modèle d'hématimètre est celui qui fait partie de notre nouveau microscope hématimétrique portable renfermé avec tous les accessoires nécessaires dans un petit coffret de maroquin.

N. B. — Pour le mode d'emploi, prise de sang, mélanges, tableaux des dilutions, etc., consulter l'instruction qui est jointe à chaque hématimètre.

Рис. 1. Посібник з експлуатації гематиметра.

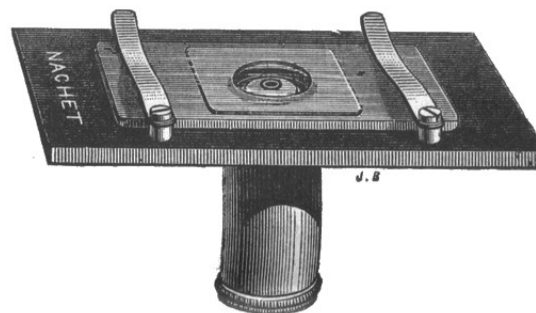


Рис. 2. Конструкція гематиметра: тубус контактно пов'язаний із предметним столом.

¹ Jean Alfred Nacet (1831-1908) – один із засновників сучасної мікроскопії. Вироби його розробки зазначені в каталогах "Catalogue descriptif des instruments de micrographie construits par A. Nacet", 37 p., Paris, 1881; "Instruments de micrographie construct par Nacet & Fils", 82 p., Paris, 1898; "Collection Nacet: instruments scientifiques et livres anciens", 1929, Petit G., 145 p. / 1976, Brioux A., 145 p. і включені в списки колекційних матеріалів в Harvard's Collection of Historical Scientific Instruments (Dep. Hist. Sci., Harvard University).

Конструкція лабораторії на чипі

Нами пропонується наступна конструкція лабораторії на чипі. У якості пристрою для реєстрації використовується ПЗЗ чи КМОП² матриця без теплового інфрачервоного фільтра (остання обставина дає можливість використовувати надалі лабораторію на чипі також як мікро-тепловізор-термовізіограф³). У якості розділюючих борозенок для рутинних клітинних вимірів пропонується використовувати стандартні камери із сітками Фукса-Розенталя, Бюркера, Нейбауера або Тома-Цейса⁴. Для цього слід розташувати їх штрихуванням униз над поверхнею ПЗЗ-матриці так, щоб рідке середовище стикалося з матрицею (що дає можливість використовувати імерсійні методи). Розташування камер сіткою над матрицею або матрицею над сіткою визначається типом мікроскопії, що заміщається лабораторією на чипі методом, аналогічно розрізності між прямим і інверсним мікроскопами. Якщо не використовувати антиліасну фільтрацію на матриці, забравши відповідний фільтр, то буде можливо одержувати за допомогою даної лабораторії на чипі муарограми мікроструктур. Залежно від дослідницьких потреб можна використовувати різні ПЗЗ-системи. Для мультиспектральних і спектрозональних досліджень, ймовірно, потрібні різні матриці; цейтраферні й надвисокошвидкісні режими реєстрації вимагають різної електронної "начинки", тому також не можуть бути ефективно поєднані за часом експозиції. Слід зазначити залежність швидкості реєстрації від обсягу даних, тобто – від роздільної здатності матриці. Так як фізичний розмір окремих пікселів матриці (0,005-0,006 мм) менше сторони малого квадрата рахункових камер (0,05-0,25 мм), питома кількість пікселів на квадрат рахункової камери достатня для реєстрації роздільного на клітинному рівні відеосигналу. Нами рекомендується використання високороздільних матриць великого формату, що покривають решітку гемоцитометра цілком або значною мірою. В ідеальному випадку логічно використовувати детектори форматів типу APS-H (28,1×18,7 мм) або APS-C (20,7×13,8 мм-25,1×16,7 мм). Роздільна здатність сучасних APS-H сягає 120 мегапікселів (13280×9184). Мо-

² ПЗЗ-матриця – прилад із зарядовим зв'язком, аналогова інтегральна мікросхема, яка складається зі світлочутливих діодів. КМОП – світлочутлива матриця метал-оксид-напівпровідникових транзисторів з ізолюваним затвором і каналами різної провідності.

³ У такому випадку слід розглянути можливість охолодження чипа ПЗЗ елементом Пельтьє до оптимуму температур, що не спотворює сигнал з одного боку, і нативний стан біоструктур, з іншого боку.

⁴ Ніщо не заважає використанню сіток Тюрка, Предтеченського, Горяєва й ін., що відрізняються від зазначених кількісно, але не якісно. Від цього буде залежати тільки мікрометрична юстировка по них.

жливність використання таких матриць у дослідженнях визначається параметрами обчислювальної техніки для обробки даних, так, як приклад, 200-мегапіксельна реєстрація Hasselblad H4D-200MS дає файли 2D-зображень розміром ≈ 600 Мб із досить високим машинним часом математичної обробки. Але, оскільки мова в цій статті піде про універсальну систему, яка загальнодоступна для зборки в умовах лабораторій з низьким бюджетом, можливості їх використання тут не обговорюються.

Матеріали та методи

Нами були використані монохромні модульні камери типу SK-1004CMAI/SO (Sunkwang) і ACE-S360CM (KT&C), що підключалися через професійну зовнішню плату АЦП, що не реєстрували дані про екстинкцію в спектрозональному режимі, а також кольорові (з фільтрацією за Байєром) цифрові матриці камер St-lab, Microlab і U.S.Robotics із власною електронікою й інтерфейсом USB. Останні були юстовані за методикою ФІАН (Васин Б.Л. і др., 2007) і продемонстрували однотипні параметри чутливості в спектрозональних каналах.

Конструкція елементарної цитологічної лабораторії на чипі, відтворена в лабораторних умовах, наведена на рис. 3.

Вона складається із ПЗЗ-матриці з фільтрами Байєра й мікролінзами, рахункової камери одного із зазначених типів, системи цифрової обробки зображення (АЦП) зі схемою компресії й інтерфейсу, що виводить сигнал на комп'ютер. Обробка сигналу проводилася за допомогою програмного забезпечення, яке давало фотометрію й флуориметрію у вибраних точках зразка, ізольоване картування оптичної щільності (побудова ізофот), будову профілів люмінанса при флуоресцентному фарбуванні, морфометрію й кутові виміри окремих областей, спектрозональні виміри концентрацій кольорових вітальних барвників, 3D реконструкцію міжфазної межі й кореляційно-спектральний аналіз інтерфейсу «детектор – рідке середовище».

Також, з метою мікромініатюризації «лабораторій на чипі», були апробовані варіанти радіопередаючих «чипів», аналоговий сигнал яких сприймався ресивером ENC (частота 1,2/2,4 Гц, передавачі PK-B81W, WS-007AS, ES-8007, NW-1207AS). Для цифрової реєстрації використовувався чотириканальний блок-ресивер системи P-817GA (або ZT-901GA) з діапазоном перетворення 2,4-2,483 Гц, що транслював дані на ПК через інтерфейс USB. Це дозволило позбавити конструкцію від зайвих провідників.

Схема лабораторної установки на базі чипа з радіочастотною трансляцією наведена на рис. 4. Вихідний сигнал плати з матрицею надходить по радіохвильовому каналу з передавальної антени на прийомні антени ресиверів, розташованих на дистанції до 50 м від джерела сигналу, й виво-

диться через перехідник стандарту BNC на відеомонітор JVC, а також через універсальну серійну шину на ЕОМ. При цьому відеосигнал від монітора розгалужується на осцилограф Tektronix 1740 або будь-який функціональний аналог, що дозволяє досліджувати мікрогідродинаміку на чипі й, отже, у культурі, по змінам форми хвилі компонентного сигналу. Сигнал, що реєст-

рувався, використовувався одночасно і як джерело інформації про стан досліджуваної субстанції (зокрема, припустимі денситометрія за рівнем сигналу й спектральний аналіз сигналу з метою встановлення розподілу структур по розмірах/дисперсності), і як аналог RFID-ідентифікації даного чипа (див. нижче).

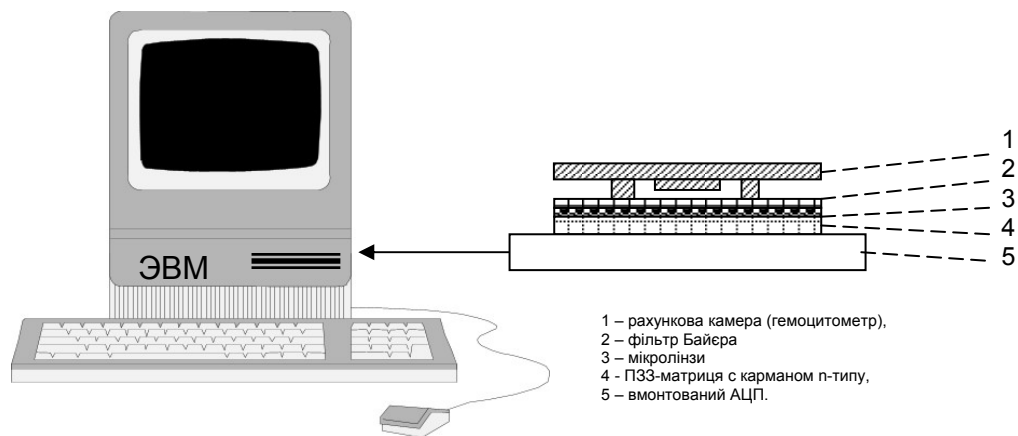


Рис. 3. Спрощена схема елементарної комп'ютеризованої лабораторії на чипі.

СХЕМА УСТАНОВКИ:

- 1 – камера Бюржера, Нейбауєра, Тома-Цейса или Фукса-Розенталя,
- 2 – фільтр Байєра
- 3 – мікролінзи
- 4 – ПЗС-матриця с карманом n-типа,
- 5 – усилитель-преобразователь,
- 6 – передающая антенна 2,4 ГГц
- 7 – ресивер четырёхканальный цифровой
- 8 – ресивер аналоговой системы
- 9, 10 – антенны ресиверов
- 11 – осциллограф,
- 12 – видеомонитор,
- 13 – ЭВМ.

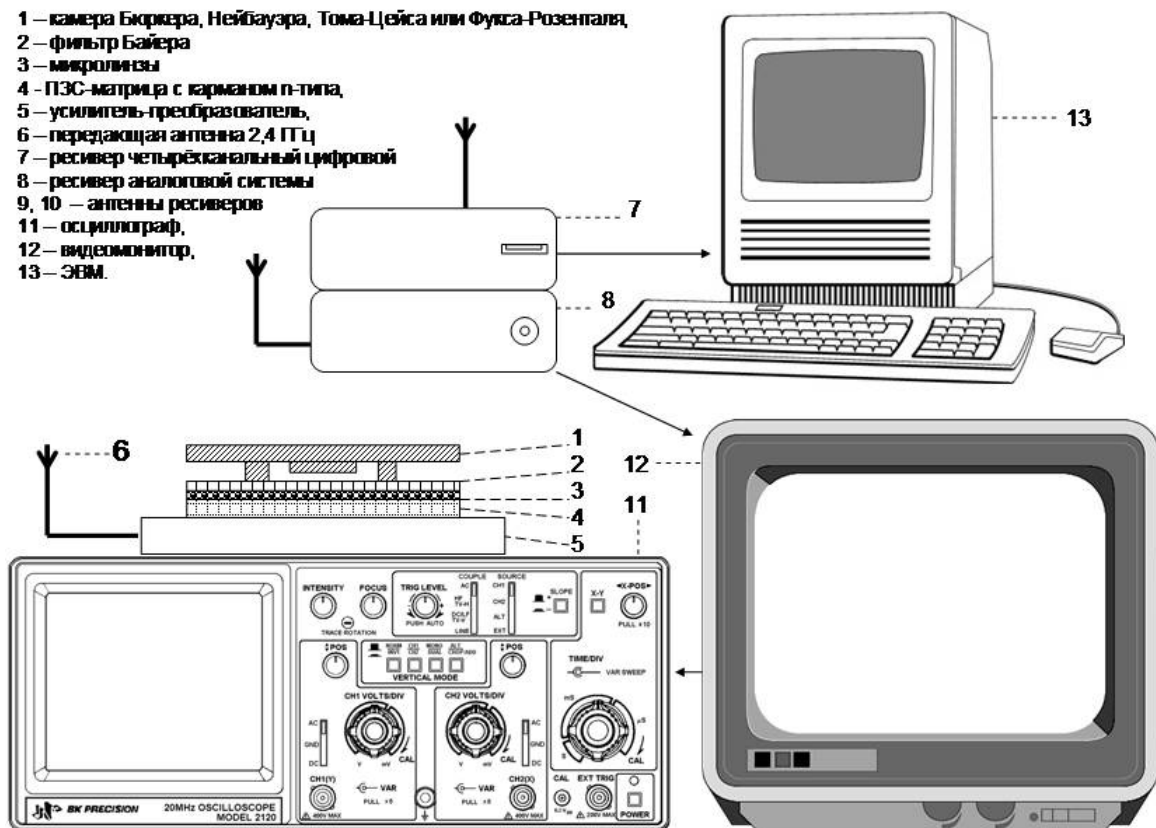


Рис. 4. Схема установки для реєстрації сигналу радіочастотних лабораторій на чипі.

У якості направляючих каналів використовувалися рахункові камери «Arial Bürker», «Neubauer-improved», «Thoma-new» і стандартні версії фірми Hirschmann Laborgerate. Камери Маклера фірми Sefi Medical Instruments, які тестувались, показали негативні результати при використанні в системі із чипом і тому в роботі не використовувалися.

Як тестові об'єкти використовувалися дисоційовані культури тканин і модельні дисперсні системи (суспензії), а також морфогенетичні біомиметики з їхнім використанням.

У випадку дистанційної трансляції сигналу лабораторій на чипі ПЗЗ заживлювалися від 9В батарей типорозміру 48,5 мм×26,5 мм×17,5 мм (625 мА·год) і могли зберігатися в термостатуючих умовах або в кліматичній камері в бездротовому стані, при цьому передаючи сигнал на частоті, що "пеленгується" ресивером. У підсумку, розташування чипів у кожному з боксів зберігання можна було з достатньою точністю виявити за формою сигналу джерела, не використовуючи пошук вручну або по картотеці. В аналогічному режимі можна було вести тривалий моніторинг стану структур у лабораторії на чипі при реєстрації із заданим проміжком часу змін форми й параметрів сигналу. За рахунок застосування різних камер-джерел ПЗЗ можна було реєструвати їхні сигнали за допомогою єдиного ресивера послідовно у відомому (див. вище) діапазоні частот, що забезпечувало швидке перемикання від передавача до передавача. Крім того, сигнал міг бути детектований безліччю ресиверів і, як наслідок, обмірюваний або візуалізований за допомогою безлічі комутуючих з ними функціонально різних вимірювальних приладів, що характеризують різні параметри досліджуваної структури й її морфобіохімічної динаміки.

Застосовувані для цього прилади можуть бути цілком замінені віртуальними USB-комутуючими агрегатами, ("лабораторіями"⁵), які містять у собі весь необхідний для багатопараметричного виміру сигналів подібних лабораторій на чипі. Опції, які необхідні для цього, зазначені в тексті статті.

Тестування системи

Тестування лабораторії проходилося в кілька етапів по ряду параметрів:

Денситометричний тест. Оцінювалося співвідношення сигнал/шум. Юстувалася частина, що реєструє, за методикою (Васин Б.Л. і др., 2007). Оцінювався контраст відображення. За допомогою колориметрії визначалася інтенсивність сигналу в спектрально-зональних областях (тоді й тільки тоді, коли сигнал знімався з використанням фільтрів Байера). Аналітичним шляхом – порівнянням зі зразками з відомої екстинкцією

⁵ Розрізняють USB-лабораторії, PCI-лабораторії і т.і. в залежності від типу входів-виходів на ЕОМ.

калібровалась крива відгуку⁶.

Резольвометричний тест. Звіряли результати сканування прогресивним і порядковим розгорненням поверхонь гемоцитометра й (у якості контролю) кварцового предметного скла з нанесеними на них дисперсіями. Були зроблені заміри зразків різної оптичної щільності й питомої концентрації часток, що показали межі реєстрації мікрооб'єктів лабораторіями на чипі з різною роздільністю ПЗЗ. На рис. 5 (а, б) наведені приклади рядкового сканування чипа й кварцового скла із суспензіями дисперсних часток, розмірно-моделюючих клітинних структур, що розділяються чипом. Використовуючи камеру як еталон, еквівалентний об'єкт-мікрометру, можна юстувати лабораторію на чипі для розмірних вимірів. Для цього використовується перетворення звичайного вираження для виміру збільшення мікроскопа по рахунковій камері: якщо прийняти, у силу взаємно однозначної відповідності, що накладаються один на одного лабораторії на чипі й детектора, збільшення рівним одиниці, $(x_1 - x_2) / r * N = 1$, де x_1, x_2 – положення меж клітин камери, N – кількість клітин між межами, що вимірюються, r – розмір клітин камери, одержимо $(x_1 - x_2) = r * N$ або $r = N / (x_1 - x_2)$. Ця процедура виконується за допомогою ЕОМ, яка управляє установкою лабораторії на чипі (див. нижче).

"Градентометричний" тест. У точному значенні, пошук меж при картуванні градієнта, здійснюваний з використанням крапок юстировки по лініях. Рефлекси на межах клітин рахункової камери можуть бути критерієм правильності її установки на детектуючому чипі: якщо на автоматично розпізнаваній градієнтній межі потоку (фронт) часток мають місце крапки, що лежать на осях координат або на паралельних їм лініях юстировочної сітки графіка, яка корелює з розташуванням сітки камери, то камера встановлена вірно й аналіз поширення й картирування градієнта коректні для даного положення лабораторії на чипі. У якості кутової юстировки по рідині можна також застосовувати ватерпасний ефект (утворення пухирця й рідинно-газофазної межі в борозенках лабораторії на чипі). На рис. 6 наведені приклади картирування градієнта з автоматичним покращуваним розпізнаванням меж. Можна бачити, що чип з борозенками рахункової камери (рис. 6 а) виявляє наявність крапок на осі абсцис і прямих, ортогональних один одному в районі 481 у.о. по ординаті F (від "Front") і 1.682 по абсцисі, у той час як для предметного скла характерна неупорядкована динаміка з повною відсутністю ефектів гидування біогіродинаміч-

⁶ За ідеал був прийнятий ПЗЗ Princeton Instruments LN/CCD-1100-PB/UVAR/1, охолоджуваний рідким азотом. У разі КМОП охолоджуваного еквівалента не було потрібно і юстирування велася в цифровому режимі.

ного потоку. Разом з тим, кути між віссю абсцис і трендом, що апроксимує фронт потоку, який поширюється, для лабораторії на чипі й для детектування мікрофлюїдики на поверхні пластини (кварцового скла) за допомогою тієї ж матриці,

різні, що говорить про переваги розробленої лабораторії на чипі по регулярності й упорядкованості поширення потоку, який аналізується перед стандартними технологіями підрахунку клітин на планарних підложках.

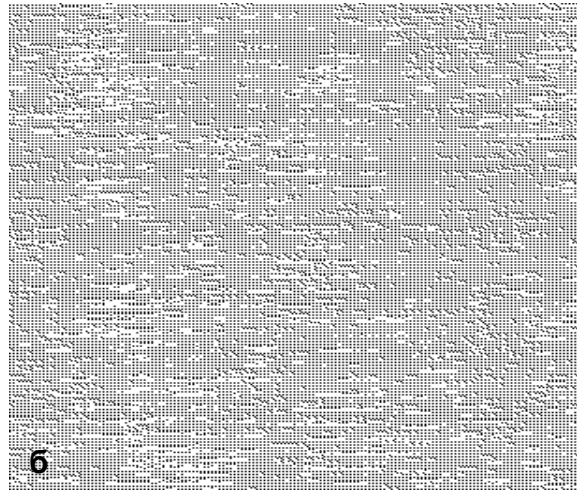
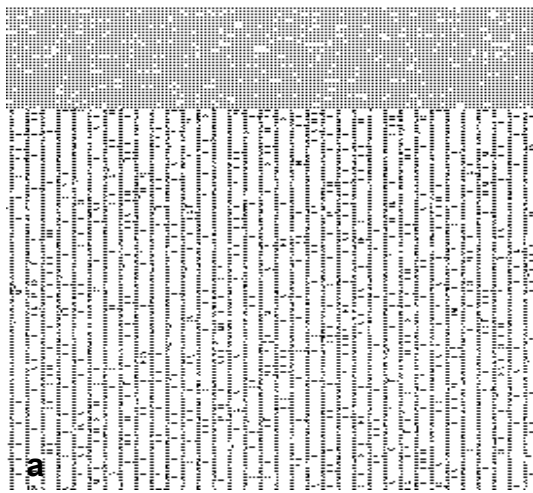


Рис. 5. А – порядкове сканування чипа. Б – аналогічне для кварцового скла.

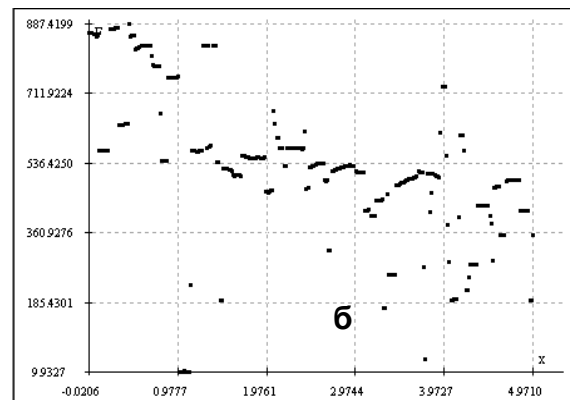
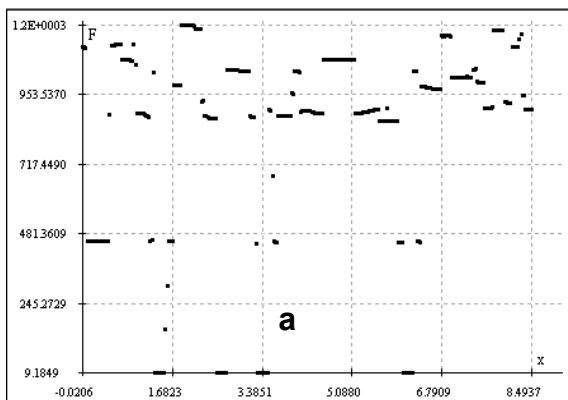


Рис. 6. Мікроденситометричний тест: візуалізація градієнтної межі біохімічних фаз, що погано змішуються, на поверхні чипа (а) і предметного скла (б).

Мікрогідродинамічний (мікрофлюїдний) тест. За допомогою осцилографії або моніторингу форми хвилі, доступного у вигляді цифрової емуляції в Adobe Premier або в аналоговому вигляді за допомогою апаратного Waveform Monitor'a, можна характеризувати по оптичній щільності хвилі, що поширюється, мікрогідродинамічні зміни, які відбуваються в середовищі, і реконструювати пересування клітин у ході морфогенезу. В останньому випадку доцільно, використовуючи GFP або аналогічні флуорохроми, будувати спектрональну карту їх розподілу за допомогою осцилографії відповідного каналу монітора або (у випадку монохромної реєстрації) вивчати параметри світлості об'єктів (Luma), що підраховуються. На рис. 7 наведений приклад мікрогідродинамічного тесту монохромної лабо-

раторії на чипі за допомогою Waveform Monitor'a: можна бачити, що візуалізований профіль хвилі не має, судячи з векторограми, спектрональної хроматичної складової (відповідних векторів у колірному просторі немає).

Центрування рахункової камери

Використання світлочутливих детекторів типу КМОП, ПЗЗ передбачає використання опромінення або власної флуоресценції для реєстрації об'єктів. Для цього необхідна наявність високоінтенсивних джерел для проєкції форм клітин на чип (з поверхні, дещо віддаленої від нього в силу конструкції рахункових камер) або збудження флуоресценції пофарбованих клітин. У такому випадку це джерело може й повинно бути використано для центрування камери щодо матриці, яка реєструє.

Використовуючи лазерну систему для центрування, можна використовувати це саме джерело при позиційно-чутливій реєстрації. Так як в кожній з лунок рахункової камери можна локалізувати флуоресцентний аналіт, що реєструється, або субпопуляцію клітин, взаємодія лазерного пучка з кожною з гемоцитометричних осередків може бути досить специфічною для ідентифікації. Так як кожному квадратному осередку можна зіставити певне усереднене значення оптичної щільності або світлості, при лазерно-дифракційному типі реєстрації можна обмежити дискретизацію камери, зіставивши кожному осередку гемоцитометра один піксель із усередненим по пропущенню значенням на грубо дискретній карті градієнта. Аналогічна процедура застосовується в автоматизованому секвенуванні з електрофоретичною сепарацією. У такому випадку переломлення й відбиття пучка від клітин буде ідентифікацією їх наявності з даними параметрами в пункті, відповідному до даного пікселя. На рис. 9 наведений приклад ідентифікації невеликого рефрагуючого скупчення клітин на поверхні рахункової камери з проведенням у програмному пакеті Origin злиттям пікселів⁷. Цей тип морфологічної візуалізації характерний тим, що дозволяє картирувати клітини в культурі не по їхній власній оптичній щільності, а по інших оптичних властивостях пучка на виході із препарату (зокрема, при певних доробках, пов'язаних із впровадженням поляризаційного світлофільтра в систему, можна картирувати оптичне обертання, заміщаючи тим самим поляризаційну мікроскопію для лабораторій на чипі; аналогічно, введенням поляризованих елементів, можна відтворити методи кругової поляризації флуоресценції колового дихроїзма, наскільки це дозволяє техніка для денситометричних і спектрональних, а не спектральних вимірів у мікроскопії та методах, що її заміщають, яким є принцип лабораторій на чипі).

⁷ Прикладом еквівалентної "ручної" процедури може служити веб-сервіс, з усередненням клітин які вводяться в віртуальний сортувальний лічильник (<http://www.currentprotocols.com/tools/hemacytometer-calculation-tool>) значень кількості мікрооб'єктів, підрахованих на площі осередків (в умовах неавтоматичної класифікації їх по групах).

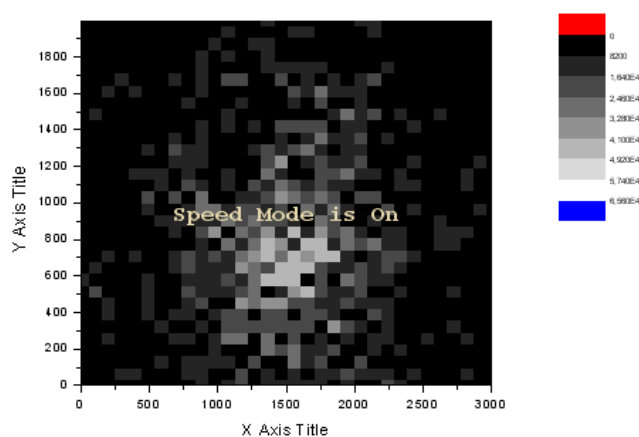
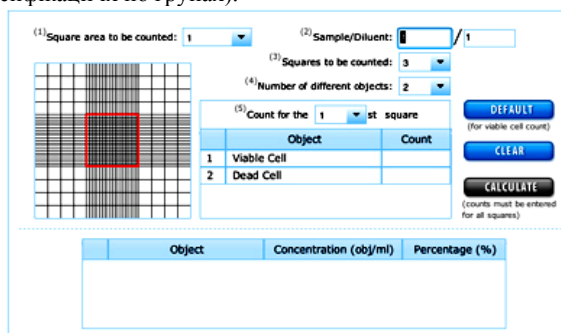


Рис. 9. 10-розрядна карта градієнта з інтегрованими пікселями.

Використання лабораторії на чипі для спостереження морфогенезу

Проектуючи випромінювання на детектор у системі, що володіє активною гідродинамікою, ми, по суті, відтворюємо метод лазерної доплерівської велосиметрії (LDV) або флоуметрії (LDF), активно використовуваний у сучасних біомедичних дослідженнях, у варіанті лабораторії на чипі. Як наслідок, виникає можливість дослідження при інтерпретації у лабораторії на чипі явищ, принципів морфодинаміки (або, що вірніше, морфо-гідродинаміки) проліферуючих культур на чипі.

Це, у свою чергу, дає можливість моделювання морфогенезу за допомогою лабораторій на чипі з візуалізацією реальних "морфогенетичних полів" і "градієнтів"⁸, утворених фізичними агентами, візуалізованими методами будови векторних полів і карт градієнта шляхом цифрової обробки сигналу, що надходить із лабораторії на чипі. Це можна пояснити на елементарному прикладі. Розглянемо розташовану під деяким невеликим кутом до поверхні тканину в умовах лабораторії на чипі. Внаслідок кутового розташування, що сприяє стіканню по поверхні, формується градієнт, який тягне донизу й у центр камери потоки міжклітинної речовини, що містять у собі клітини тканини, прийняті за частки. Тоді, у кінцевому результаті, повинні утворюватися оптичні градієнти, відповідні морфологічним скривленням і концентраційним градієнтам, що виникають внаслідок цього процесу. Приклад перебігу подібного процесу, зареєстрованого за допомогою лазерної візуалізації, наведено на рис. 10.

⁸ Використовуючи ці поняття, автори не вносять до них нефізичний зміст, розуміючи, аналогічно генетику Н.К.Кольцову, що в процесі морфогенезу змінюється розподіл структурних компонентів тканини, при якому "потенціали в полюсах силового поля можуть бути електричні, гравітаційні, механічні, капілярно-активні, хімічні" (Кольцов Н.К. Организация клетки / Н. К. Кольцов. – М. – Л. : Биомедгиз, 1936, с. 564).

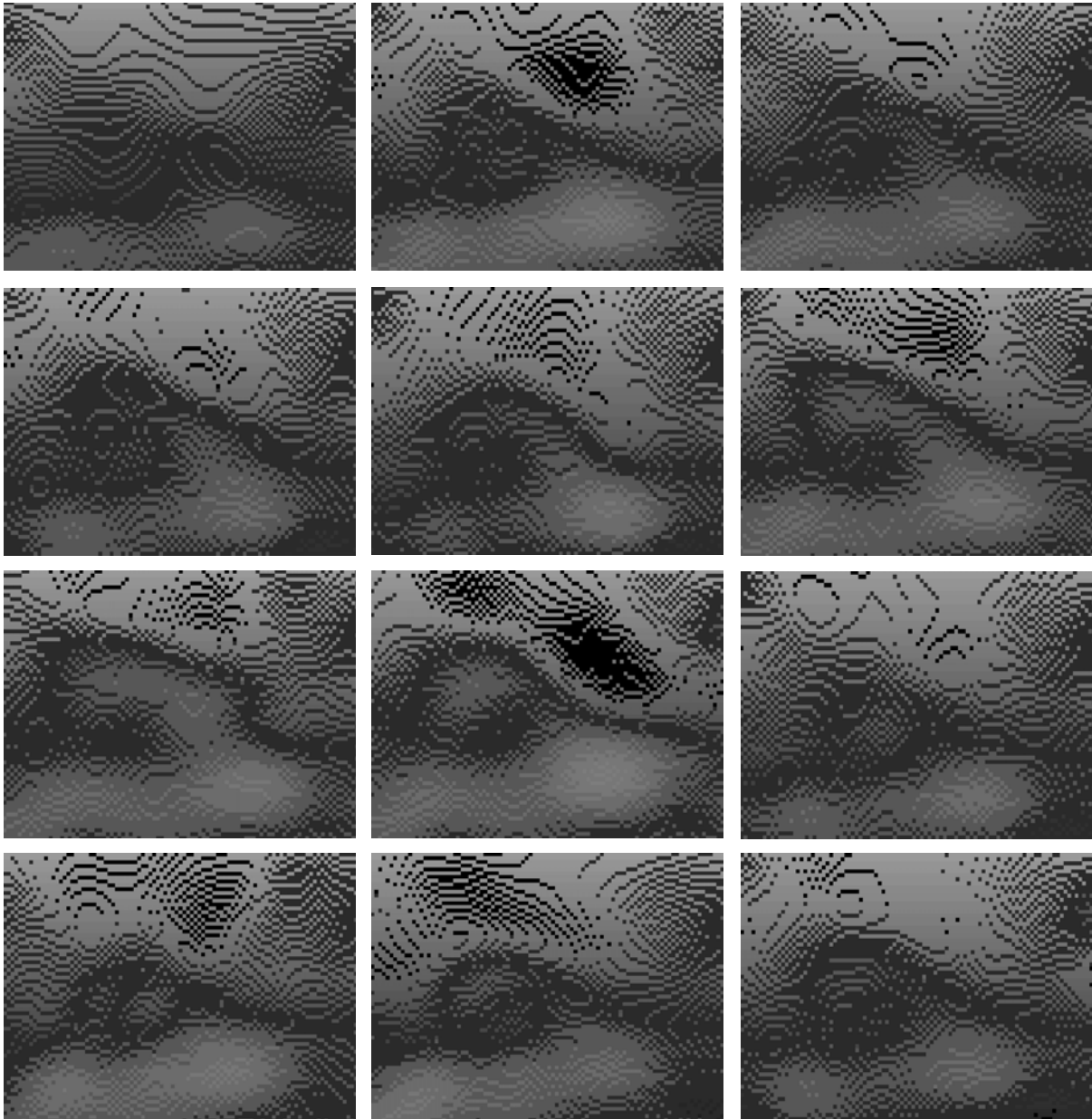


Рис. 10. Формування складки в культуральній моделі ембріонального морфогенезу. Візуалізація: ізолінійне картування градієнта (тіньовий гідродинамічний метод) і побудова векторів оптичного потоку за даними цейтраферної реєстрації чипа.

На рисунку наведена послідовність стану поверхонь лабораторії на чипі зі складкою на межі моношару, що самоорганізується на ній (за рахунок реакційно-дифузійних процесів та відповідного концентраційного градієнту), коректно детектуємих при спекл-проекуванні на ПЗЗ структури, розташованій на чипі. З позиції ембріології, на даному цейтрафері, очевидно, спостерігається формування свого роду аналога деформації ектодермального зародкового листка. Так як дана стаття носить чисто технічний характер, автори не зупиняються на біологічних питаннях досить докладно, однак очевидно, що можливість одержання за допомогою лабораторій на чипі інформації про протікання гістогенезу культур тканин і клітин при їхній культивуванні

в динаміці й використання форми відеосигналу лабораторії на чипі як ідентифікаційної ознаки для даного функціонального типу клітинних і більш високоорганізованих систем є в сукупності новим методом таксономії й порівняльної гістології.

За рахунок можливості комп'ютерного моделювання гідродинаміки культсередовища й клітинних структур у ній на базі принципів механіки гетерогенно-структурованого середовища був запропонований новий підхід до моніторингу активності в лабораторії на чипі (*in vivo/in silico*), який дозволяє поєднувати прогнозування стану культури в різних умовах з моніторингом і цифровою обробкою реєстрованих даних, які використовуються потім у верифікації вихідного про-

гнозу.

Програмне забезпечення

Для автоматизованої морфометрії й класифікації клітин одним з авторів (Нотченко О.В.) була створена навчальна програма, робота якої апробована на пофарбованих зрізах нервової тканини. Задаючи вагові коефіцієнти спектрально-нальних каналів (R, G, B), можна класифікувати пофарбовані або нативно пігментовані клітини не тільки морфометрично, але й фотоколориметрично – тобто, здійснювати за її допомогою стандартні операції візуальної гістохімії. За її допомогою ефективно розпізнаються препарати, пофарбовані за: Ван-Гізона (сполучна тканина), Леффлером й Цилем-Нільсоном (гриби), Гольджі й Нісслем (нейрони/глія), Гинсом-Буррі (капсули мікроорганізмів), Марцеллі (ендоспори), Гоморі (м'язи), Гіменезом (бактерії), Грамом (бактеріальна клітинна стінка), трихроматичним методом Ліллі й Масона, Моват (серцево-судинна система), Grosott (зелене фарбування біопсії на гістоплазму), Шеффером-Фултоном (бактеріальні ендоспори), GFP (зелений флуоресцентний білок), Фельгеном й Браше (ДНК, РНК)⁹. Можливість керування ваговими коефіцієнтами в програмі можна розцінювати як альтернативу калібруванню спектрально-нальних каналів до початку моніторингу. Внаслідок явищ колірної метамерії людського сприйняття даний метод значно коректніший візуальної або ж адитивної фотометричної оцінки фарбування й підрахунку пофарбованих елементів у кадрі. Можливість роботи з кадром в ргевіу-режимі, тобто до його реєстрації, дозволяє "навчати" програму, запам'ятовуючи еталонні формені елементи або типи клітин у базі в режимі реального часу, але ця функція може бути також використана й при навчанні програми по вже готових цифрових мікрофотографіях.

Інтерфейс, скріншоти якого наведено на рис. 11, складається з візуалізаційних дисплеїв для відображення вихідного зображення й карти градієнта з морфометрією й класифікацією результатів контурного аналізу мікрооб'єктів (Фурман Я.А. и соавт., 2003), кнопок класифікації й збереження результатів аналізу у файл автоматичного звіту, вікна скролінга файлів, кнопки запуску сканування, задатчика ширини контуру й вибору папки локалізації вихідного зображення (у випадку, якщо він береться із заданої папки; на рис. 11 наведений приклад захоплення файлу зображення з портфеля віртуального сховища даних у системі Dgorbox).

Таким чином, будучи пристосованою для роботи з лабораторіями на чипі, описаними в цій статті, і носячи найменування "lab-on-a-chip morphometer", дана програма, проте, може бути

використана для обробки сторонніх фотофайлів – у тому числі, що перебувають у дистанційному доступі та доступних через віртуальні ресурси. З позиції віддаленого користувача лабораторій на чипі це дає можливість досить ефективної роботи програми як засобу телемедицини при обробці даних клінічних, гістохімічних і специфічних (або патогномонічних) індикаторів. У зв'язку із простотою навчання програми, у рамках наведеного графічного інтерфейсу користувача матричної лабораторії (GUI), що обмежується натисканням відповідної клавіші для збереження, яка перебуває в лівій частині вікна, використання програми можливо й без участі фахівців в області обробки цифрових зображень.

Особливості застосування FITS-Формату

Загальновідомо, що формат FITS, оптимальний для професійних матриць при наукових застосуваннях, містить у собі метадані фотометричного калібрування. Це дає незаперечні зручності при його використанні в реєстрації даних з лабораторій на чипі із причин, зазначених вище. Разом з тим, так як зв'язування блоків даних в FITS дозволяє представляти дані файли як повнофункціональні реляційні бази даних, виникають додаткові зручності при звертанні до них при віртуальній формі зберігання даних і при використанні віддалених баз. Одночасно у файл користувач може занести будь-яку пояснювальну координату, що позбавляє від необхідності в спеціалізованих каталогах із супровідною інформацією. Це особливо зручно у випадку потокових або скринінгових досліджень. Нами були апробовані конвертери FITS і утиліти, що зберігають 2 D-дані у форматі FITS, для досягнення цієї мети. У лістингах 1, 2 наведені приклади видачі даних лабораторією на чипі в FITS-форматі. Можна бачити підвищену інформативність формату щодо стандартних форм порозрядного подання графічних даних. Так як, завдяки тому, що у форматі FITS можуть бути змінені параметри форматів двійкових таблиць і ASCII-символіки, а кожний стовпець може мати формат відмінний від іншого, можливо зробити картирування будь-якого параметра, пов'язаного з оптичними характеристиками, які подані в аналізованому зображенні. Зручні можливості для цього містяться також у парах ключ-значення, в які лаборант може внести дані про гістохімічну процедуру й методи цифрової обробки (мепінга), застосованих при роботі з кінцевим файлом.

Використання як еквівалент RFID

Відповідно до ISO-стандартів RFID для біологічної ідентифікації¹⁰ та ISO-стандартів керування об'єктами й товарами¹¹, що переносяться,

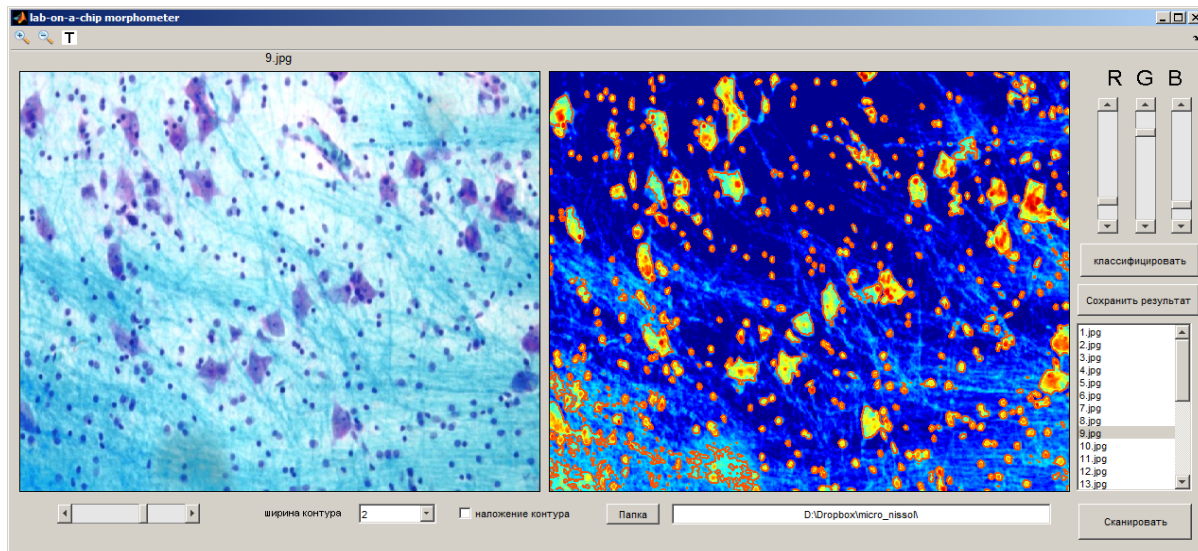
⁹ Для тестування ПО були, зокрема, використані мікрофотографії із закордонних баз даних.

¹⁰ ISO 11784, ISO 11785, ISO 14223

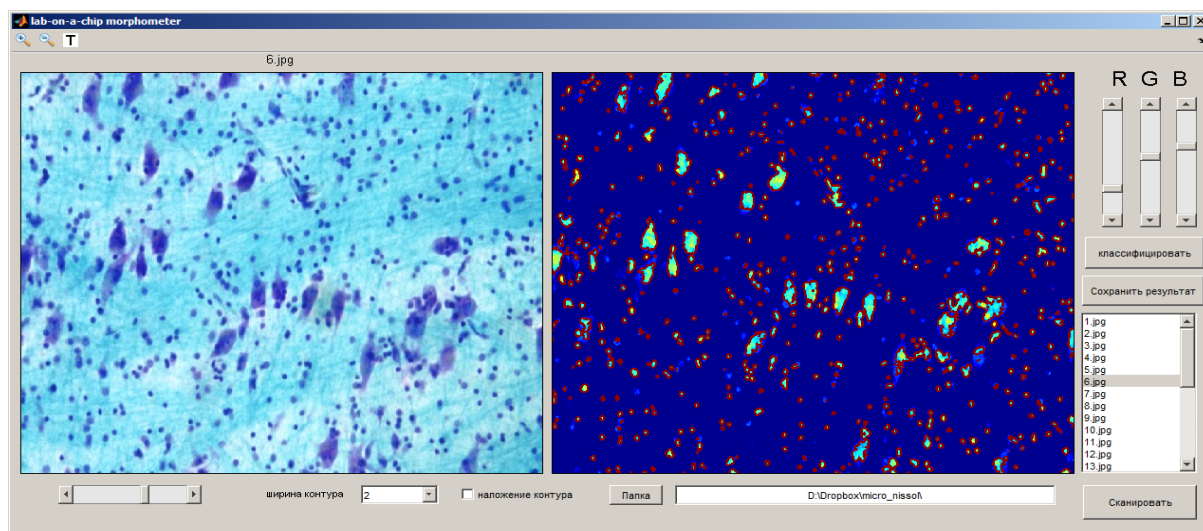
¹¹ DIN/ISO 69873, ISO/IEC, VDI 4470, ISO 15961, ISO 15962, ISO 18000, ISO 18001

існують діапазони частот, оптимальні для RFID-ідентифікації на певних відстанях. Частково ці діапазони перекриваються із частотами прийомопередачі радіочастотних лабораторій на чипі. Так, наприклад, як вказувалося вище, ресивери ENC і P-817GA або ZT-901GA, які використовуються при роботі з лабораторіями на чипі, детектують частоти 1,2/2,4 ГГц і 2,42/2,483 ГГц, у той час як RFID-рідер типу 217001 працює в діапазо-

ні частот 2,4-2,5 ГГц, а радіочастотний підсилувач для RFID-ідентифікації UPC2792TB-E3 має смугу, що включає частоту 1,2 ГГц. Тому, при досить незначних доробках, системи RFID-детектування й трансляції відеосигналу лабораторії на чипі можуть бути сполучені. Таким чином, може бути подолана "штучність" RFID-мітки стосовно належного їй об'єкту – лабораторії на чипі.



а



б

Рис. 11. Графічний інтерфейс користувача програми "lab-on-a-chip morphometer" у процесі розпізнавання клітинних елементів на серії зрізів, пофарбованих за Нісслем.

Дійсно, логічно робити ідентифікацію не за "абстрактним" сигналом мітки RFID, а шляхом фінгерпринтінга сигналу, що прямо корелює зі станом вмісту лабораторії на чипі. Зокрема, доцільно характеризувати спектри, фотоколориметричні показники, періодограми, динамічні характеристики. Про все це планується розповісти в наступних статтях. Про те, наскільки патогномо-

нічною і специфічною евристичною цінністю може володіти відеосигнал лабораторії на чипі, можна судити в порівнянні сигналів двох желатин-утримуючих середовищ із різними мікоструктурами, що утворювалися при різних температурах і вологості. Приклад подібного експерименту з осцилографією низькочастотного компонента сигналу наведено на рис. 12. Спектр черво-

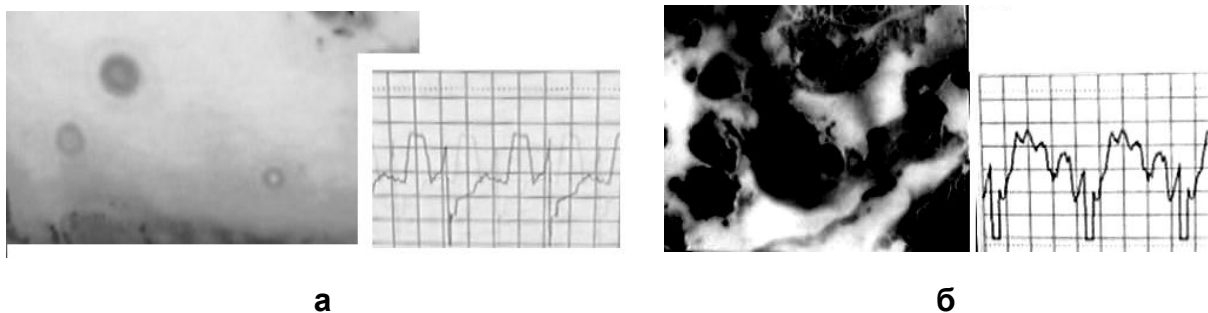


Рис. 12. Осцилографія відеосигналу двох Gel-утримуючих носіїв: а – культура з малою оптичною щільністю й питомою концентрацією клітинних елементів; б – з високою оптичною щільністю й підвищеною концентрацією клітинних елементів.

Практичні рекомендації при UV-реєстрації

При використанні декамікронних або полторадекамікронних матриць зі зворотнім засвіченням, що забезпечують високу ефективність фотоэффекта в короткохвильовій і, зокрема, в ультрафіолетовій області спектра, можливо спектрохімічно розширити можливості описаної системи, допустивши ультрафіолетове опромінення бактерицидної дії в якості детектуемого фактора стерильності культуральних середовищ і чашок, а також у якості джерела збудження люмінесценції флуорохромів, які використовуються при фарбуванні гістохімічних препаратів або ж у якості вітальних барвників. У такому випадку передаватися й оброблятися на ЕОМ буде і сигнал люмінесценції з одержанням профілів люмінанса, і профіль УФ-пучка, візуалізований ізофотами або картою градієнта в псевдокольорі. Під-

вищення роздільної здатності з використанням субпіксельно зміщених лінійок, доцільне при використанні короткохвильового випромінювання, для конструкцій лабораторій на чипі не є досяжним внаслідок контактного типу реєстрації, тому від початку має сенс зів'язати необхідність у тому або іншому методі флуоресцентного детектування з роздільною здатністю матриці (без обліку інтерполяції). Використання багатояричних матриць типу Foveon X3 при роботі з ультрафіолетовими випромінювачами небажане, тому що в силу високої оптичної щільності фільтрів і їх колориметричних характеристик, пропускання в УФ-діапазоні надзвичайно мале, що очевидно перешкоджає коректному зіставленню 3D-профілів люмінанса з профілем збудливого люмінесценцію пучка (приклад профілювання люмінанса наведено на рис. 13).

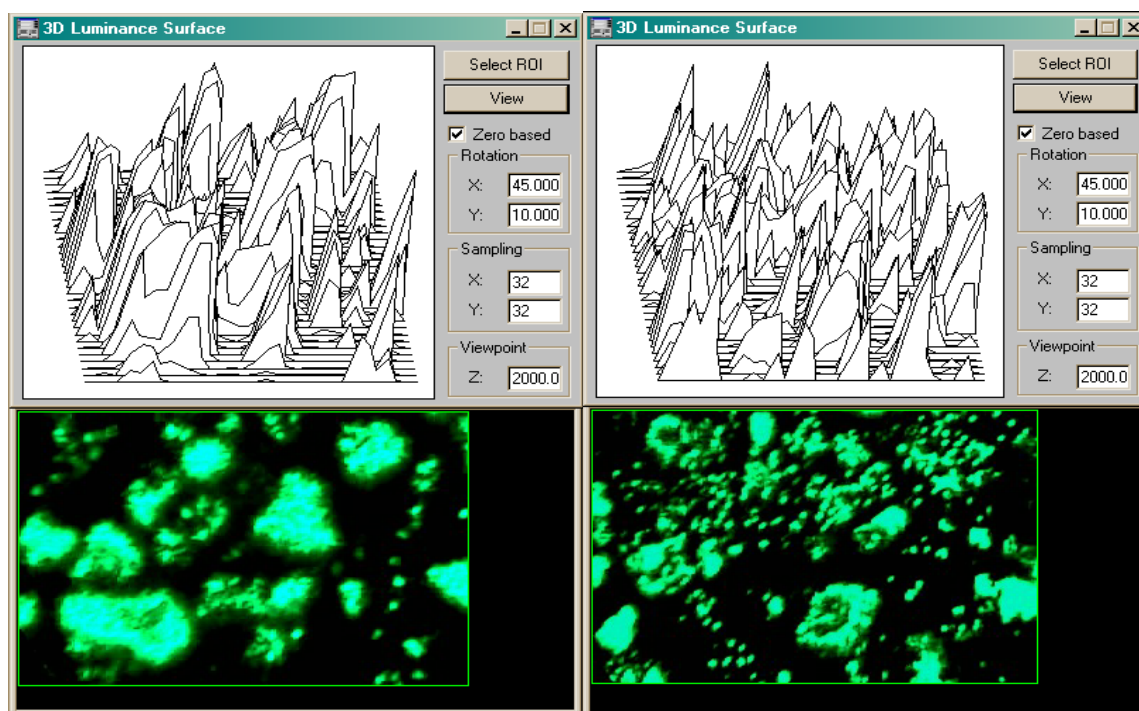


Рис. 13. Будова тривимірних профілів люмінанса (світлості) у ПЗ "Optimas". При різних збільшеннях і роздільній здатності точність 3 D-профілювання змінюється.

Висновок

Таким чином, конструктивно елементарна система, яка базується на найпростіших властивостях приладів із зарядовим зв'язком і здатна бути реалізованою неспеціалістом, виконує функцію лабораторії на чипі й гемоцитометра/гематиметра.

Подяка

Ми висловлюємо подяку співробітникам НЦН РАМН В.В.Панову й М.В.Іванову за тестування програмного забезпечення, описаного в роботі. Для безоплатного одержання коду для MATLAB описаної програми можна звертатися за адресою neurobiophys@gmail.com.

Літературні джерела

Введение в контурный анализ и его приложения к обработке изображений и сигналов / Я. А. Фурман, А. В. Кревецкий, А. К. Передреев [и др.]. – М. : Физматлит, 2003. – 297 с.

Методика измерения спектральной чувствительности ПЗС-матрицы / Б. Л. Васин, С. В. Малькова, М. В. Осипов [и др.] // Препринт ФИАН. – 2007. – № 18. – С. 20.

A microfluidics-based turning assay reveals complex growth cone responses to integrated gradients of substrate-bound ECM molecules and diffusible guidance cues / C. J. Wang, X. Li, B. Lin [et al.] // *Lab Chip*. – 2008. – Vol. 8. – P. 227-237.

An electrophysiological lab on a chip / S. Pedersen, J. Kutchinsky, S. Friis [et al.] // *Transducers, Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*. – [12th Int. Conf.]. – 2003. – Vol. 2. – P. 1059-1062.

An integrated cell culture lab on a chip: modular microdevices for cultivation of mammalian cells and delivery into microfluidic microdroplets / H. Hufnagel, A. Huebner, C. Gülich [et al.] // *Lab. Chip*. – 2009. – Vol. 9. – P. 1576-1582.

Barbulovic-Nad I. A microfluidic platform for complete mammalian cell culture / I. Barbulovic-Nad, S. H. Au, A. R. Wheeler // *Lab. Chip*. – 2010. – Vol. 10. – P. 1536-1542.

Cell-lab on a chip: a Cmos-based microsystem for culturing and monitoring cells / Y. Liu, E. Smela, N. M. Nelson, P. Abshire // *IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* – 2004. – Vol. 4. – P. 2534-2537.

Cellular observations enabled by microculture: paracrine signaling and population demographics / M. Domenech, H. Yu, J. Warrick [et al.] // *Integrative Biology*. – 2009. – Vol. 1. – P. 267-274.

Eltoukhy H. A 0.18- μm CMOS bioluminescence detection lab-on-chip / H. Eltoukhy, K. Salama, A. E. Gamal // *Solid-State Circuits IEEE*. – 2006. – Vol. 41, № 3. – P. 651-662.

Ghafar-Zadeh E. A 0.18- μm CMOS capacitive sensor lab-on-chip / E. Ghafar-Zadeh, M. Sawan, D. Caicedo, C. P. Fall, D. T. Eddington // *Lab Chip*. – 2008. – Vol. 8. – P. 1048-1055.

On-chip culturing of hepatocytes and monitoring their ammoniametabolism / W. Satoh, S. Takahashi, F. Sassa [et al.] // *Lab. Chip*. – 2009. – Vol. 9. – P. 35-37.

Paguirigan A. Microfluidics, meet cell biology: bridging the gap by validation and application of

Therriault // *Sensors and Actuators A: Physical*. – 2008. – Vol. 141, № 2. – P. 454-462.

Ghollab Y. H. Lab-on-a-chip: techniques, circuits, and biomedical applications / Y. H. Ghollab, W. Badawy. – Norwood : Artech House, 2010. – 220 p.

High fidelity neuronal networks formed by plasma masking with a bilayer membrane: analysis of neurodegenerative and neuroprotective processes / H. Hardelauf, J. Sisnaiske, A. A. Taghipour-Anvari [et al.] // *Lab. Chip*. – 2011. – Vol. 11. – P. 2763-2771.

Integrated cell manipulation system-cmos/microfluidic hybrid / H. Lee, Y. Liu, D. Ham, R. M. Westervelt // *Lab. Chip*. – 2007. – Vol. 7. – P. 331-337.

Jebrail M. J. Let's get digital: digitizing chemical biology with microfluidics / M. J. Jebrail, A. R. Wheeler // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2010. – Vol. 14, Issue 5. – P. 574-581.

Lensless Ccd-based fluorometer using a micromachined optical Söller collimator / J. Balsam, M. Ossandon, Y. Kostov [et al.] // *Lab. Chip*. – 2011. – Vol. 11. – P. 941-949.

MAC-CCD system: a novel lymphocyte microarray chip system equipped with CCD scanner to generate human monoclonal antibodies against influenza virus / T. Ozawa, K. Kinoshita, S. Kadowaki [et al.] // *Lab Chip*. – 2009. – Vol. 9. – P. 158-163.

Mammalian electrophysiology on a microfluidic platform / C. Ionescu-Zanetti, R. M. Shaw, J. Seo [et al.] // *PNAS*. – 2005. – Vol. 102, № 26. – P. 9112-9117.

MEMS fabricated cell electrophysiology biochip for in silico calcium measurements / A. Ulhaque, M. Rokkam, A. R. De Carlo [et al.] // *Sensors and actuators*. – 2007. – Vol. 123, № 1. – P. 391-399.

Microfluidic add-on for standard electrophysiology chambers / J. S. Mohammed, H. H. microscale techniques for cell biological assays / A. Paguirigan, D. J. Beebe // *Bioessays*. – 2008. – Vol. 30. – P. 811-821.

Polymer lab-on-a-chip system with electrical detection / H. Muhlberger, W. Hwang, A. Guber [et al.] // *IEEE Sensors J*. – 2008. – Vol 8. – P. 572-579.

Vishwanathan A. Ring-shaped neuronal net-

works: a platform to study persistent activity / A. Vishwanathan, G. Q. Bi, H. C. Zeringue // Lab. Chip. – 2011. – Vol. 11. – P. 1081-1088.

Walker G. M. Microenvironment design considerations for cellular scale studies / G. M. Walker,

H. Zeringue, D. J. Beebe // Lab. Chip. – 2004. – Vol. 4. – P. 91-97.

Wheeler B. C. Designing neural networks in culture / B. C. Wheeler, G. J. Brewer // Proceedings of the IEEE. – 2010. – Vol. 98, № 3. – P. 398-406.

Градов О.В., Нотченко А.В. Общедоступные морфогистохимические лаборатории на чипе на базе сеток счетных камер разного типа: микрофлюидные морфодинамические рабочие станции.

Резюме. Предложена общедоступная конструкция автономных (не требующих специального устройства для считывания) лабораторий на чипе с использованием для секционирования детектируемых клеток, выделяемых с помощью аппарата Сайка, сетчатых счетных камер гемоцитометрического типа. Предложена система их автоматизированной радиочастотной идентификации в условиях длительного хранения, сопровождающейся получением новых морфометрических данных на различных стадиях культивирования или биомониторинга. Описана дифракционная методика подсчета и фингерпринтинга клеточных образований в варьируемых условиях среды. Приведены экспериментальные данные по апробированию для её реализации камер Фукса-Розенталя, Бюркера, Нейбауэра, Маклера и Тома-Цейсса. Показана применимость данных устройств в когерентно-денситометрической индикации концентрационной динамики в клеточной культуре или суспензии и морфогенетических процессов в них для ламинарных условий среды. Продемонстрирована самообучающаяся программа для распознавания паттернов клеток и реляционной цитоморфометрии на базе лаборатории на чипе с объектно-микрометрической калибровкой по сетке камеры. Введен в практику гибридный *in vitro/in silico* принцип мониторинга морфогенеза культур.

Ключевые слова: лаборатория на чипе, гемоцитометр, гематиметр, математическая морфология, компьютерная морфометрия, профиль люминанса, цифровой морфогенез.