

DOI: 10.15593/RZhBiomeh/2020.3.04
УДК 576.3/.7, 57.087.3, 51-76

АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ И ФРАКТАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ФАЗОВО-КОНТРАСТНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ НАТИВНЫХ И АПОПТОТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ КЛЕТОК MCF-7

**Ю.В. Баяндин¹, А.С. Никитюк¹, А.О. Воронина², Ю.А. Белоглазова²,
О.Н. Гагарских², В.В. Гришко², О.Б. Наймарк¹**

¹ Институт механики сплошных сред Уральского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 1, e-mail: buv@icmm.ru

² Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 614013, Пермь, ул. Академика Королева, 3, e-mail: grishvic@gmail.com

Аннотация. Определены морфометрические и фрактальные характеристики нативных и апоптотических клеток MCF-7 на основе анализа фазово-контрастных изображений, полученных с использованием лазерной интерференционной микроскопии. Клетки MCF-7 культивировались в стандартных условиях. Фазовые изображения клеток получены с использованием лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук. Исследовано 30 нативных и 30 апоптотически измененных под действием доксорубина клеток MCF-7. В результате обработки полученных фазовых изображений выделен контур клеток, по которому определены морфометрические показатели и фрактальная размерность контура фазового изображения клеток. В качестве геометрических характеристик фазового изображения клетки выбраны максимальный и минимальный диаметры, периметр и объем фазового изображения клетки. Вычислена фрактальная размерность контура фазового изображения как масштабно инвариантный показатель, характеризующий изрезанность контура клетки. Сравнительный анализ морфологии нативных и апоптотических клеток MCF-7 позволил дифференцировать исследуемые клетки с использованием двухвыборочного непараметрического теста Уилкоксона–Манна–Уитни.

Ключевые слова: клетка, апоптоз, фазово-контрастное изображение, морфометрические показатели, фрактальная размерность.

ВВЕДЕНИЕ

Живые биологические объекты представляют собой иерархически организованные системы с признаками самоподобия. Для описания и определения морфологических характеристик самоорганизующихся биологических систем различного масштабного уровня, способных к изменению формы в условиях структурно-

© Баяндин Ю.В., Никитюк А.С., Воронина А.О., Белоглазова Ю.А., Гагарских О.Н., Гришко В.В., Наймарк О.Б., 2020

Баяндин Юрий Витальевич, к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории физических основ прочности, Пермь

Никитюк Александр Сергеевич, м.н.с. лаборатории физических основ прочности, Пермь

Воронина Анна Олеговна, м.н.с. лаборатории биологически активных соединений, Пермь

Белоглазова Юлия Александровна, м.н.с. лаборатории биологически активных соединений, Пермь

Гагарских Ольга Николаевна, м.н.с. лаборатории биологически активных соединений, Пермь

Гришко Виктория Викторовна, к.х.н., заведующая лабораторией биологически активных соединений, Пермь

Пермь

Наймарк Олег Борисович, д.ф.-м.н., заведующий лабораторией физических основ прочности, Пермь

фазовых переходов [13], все чаще применяются методы фрактальной геометрии, обеспечивающей корректное и сжатое описание структур и процессов [1]. В частности, методы мультифрактального анализа на основе метода максимумов модулей вейвлет-преобразования использованы для интерпретации данных инфракрасной термографии и маммографии патологически измененных молочных желез человека [10–12], другими авторами разработана методика дифференциальной диагностики инвазивной протоковой карциномы на основе оценки выраженности полиморфизма ядер клеток с использованием вейвлет-фильтрации [5].

В природе вполне определенная (из множества вариантов) форма клеток, обусловленная реакцией на физико-химические факторы и влияние окружения, является критическим детерминантом функций клетки [16]. При этом фрактальная размерность может рассматриваться как фактор морфологической сложности и в термодинамическом смысле может быть ассоциирована с «эффективной температурой» неравновесной биофизической системы [21]. С этой точки зрения изменение морфологии поверхности клетки отражает признаки критического поведения, сопровождающегося переходами между метастабильными состояниями [14]. Согласно [15], негенетические механизмы допускают временный отбор метастабильного, «ожидającego» соответствующей случайной генетической мутации эпигенетически закодированного фенотипа и способствуют ускорению эволюционных изменений.

Принципиальное значение имеет разработка теоретического подхода, устанавливающего корреляции между динамическими и морфологическими свойствами клетки, обуславливающими взаимодействие клеток и формирование надклеточных структур [7]. Лазерная интерференционная микроскопия прижизненной динамики и морфологии клеток – это уникальный метод идентификации морфогенеза и его качественных изменений. Изменения прижизненной динамики клеток связывают в работе [19] с нелинейной динамикой автомодельных коллективных мод экспрессии генов («открытых комплексов»), определяющих пластичность клеток в процессе реализации их естественного эволюционного развития или неконтролируемого деления в качестве признака аномального повышения хрупкости цитоскелета при развитии злокачественных патологий. Фазовые пространства состояний, соответствующие коллективным модам экспрессии, определяют размерности аттракторов с мультифрактальными спектрами в случае нормального эволюционного цикла и монофрактального – при онкологических патологиях. Так, злокачественность процесса связывают в работе [20] с ростом фрактальной размерности клеток, что позволяет интерпретировать фрактальную размерность формы клеток как голографический образ процессов, обусловленных качественной реорганизацией цитоскелета при патологических процессах (например, прогрессии опухолевого новообразования) или при воздействии противоопухолевых препаратов, инициирующих апоптоз клетки. Отметим, что в норме процесс апоптоза обеспечивает гибель клеток, претерпевших неопластическую трансформацию либо имеющих генетические или иные нарушения, которые могут привести к развитию рака.

Цель настоящей работы – разработка методики идентификации апоптотически измененных опухолевых клеток на основе анализа морфометрических и фрактальных характеристик клеток по данным лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). В рамках исследования выполнены измерения морфометрических параметров и фрактальной размерности контура фазово-контрастных (фазовых) изображений нативных и апоптотических клеток рака молочной железы линии MCF-7 методом ЛИМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика и условия культивирования клеточной линии MCF-7

Клеточная линия MCF-7 (эпителиоподобная аденокарцинома молочной железы человека) получена из Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва). Культивирование клеток MCF-7 осуществляли в питательной среде *DMEM* (ПанЭко, Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (*PAА Laboratories*, Австрия), 2 мМ L-глутамина и смеси 1%-ного пенициллина/стрептомицина (1000 ЕД/мл; 10 мг/мл) (ПанЭко, Россия). Культивирование клеток MCF-7 проводили в CO₂-инкубаторе (*Thermo Fisher Scientific*, США) при (+37,0±1,0) °С и (5,0±0,5) % CO₂ во влажной атмосфере.

Характеристика противоопухолевого проапоптозного агента

В качестве проапоптозного агента использовали синтетический противоопухолевый препарат доксорубин гидрохлорид (M_r 579,98) – C₂₇H₃₀ClNO₁₁ (*Tocris Bioscience*, США).

Доксорубин гидрохлорид растворяли в 100%-ном ДМСО, далее разводили в среде *DMEM*. Полученный раствор добавляли к монослою клеток MCF-7 до заданной конечной концентрации IC₅₀ = 0,3 мкМ. Концентрацию IC₅₀ (значение 50%-ной ингибирующей концентрации) определяли при помощи МТТ-теста [18] на основе дозозависимых кривых с использованием программного обеспечения *GraphPad Prism 6.0*.

Подготовка препаратов клеток для измерений методом лазерной интерференционной микроскопии

Подготовку образцов клеток MCF-7 осуществляли следующим образом. Предварительно выращенный монослой клеток MCF-7 открепляли с поверхности культурального флакона методом трипсинизации с использованием смеси растворов 0,25%-ного Трипсина (*MP Biomedicals*, США) / Версена (0,2%-ного ЭДТА в фосфатном буфере; ПанЭко, Россия) (1:4). Полученную клеточную суспензию центрифугировали (1500 об/мин, 3 мин), затем супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 3 мл среды *DMEM*. Подсчет количества клеток осуществляли в камере Горяева при помощи оптического микроскопа *Meiji Techno TC5200* (Япония) при увеличении ×200. Далее в асептических условиях в чашку Петри диаметром 60 мм, с предварительно внесенным стерильным стеклом 24×50 мм, добавляли 6 мл среды *DMEM* с последующим внесением клеточной суспензии до конечной концентрации 3×10⁵ клеток/мл. Клетки MCF-7 инкубировали при температуре (+37,0±1,0) °С во влажной атмосфере (5,0±0,5) % CO₂. Через 24 ч к клеткам MCF-7 в чашке Петри добавляли раствор доксорубина и продолжали инкубирование клеток в течение 18 ч при указанных выше условиях. В качестве контроля использовали клетки MCF-7 без воздействия доксорубина (нативные клетки).

Препараты клеток для микроскопии готовили путем нанесения по периметру диэлектрического предметного стекла с зеркальным напылением тонкого слоя силиконовой смазки (спейсер) и последующего переноса покровного стекла с закрепленными клетками на подготовленный спейсер таким образом, чтобы клетки находились в буферной зоне в питательной среде. Полученные препараты клеток исследовали при помощи лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 (Швабе, Россия).

Измерения оптической толщины апоптотических клеток методом лазерной интерференционной микроскопии

Оптическая толщина представляет собой локальные задержки фазы промодулированного клеткой пучка лучей лазера. Измерения оптической толщины нативных и апоптотических клеток выполняли с помощью лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 на базе центра коллективного пользования «Исследования материалов и вещества» Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук [3]. В работе использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 655 нм в качестве источника когерентного излучения и объектив с увеличением $\times 10$. На рис. 1 представлен внешний вид данного прибора. Всего было измерено 60 нативных и апоптотических клеток MCF-7, в том числе нативных клеток – 30, под действием доксорубина – 30.

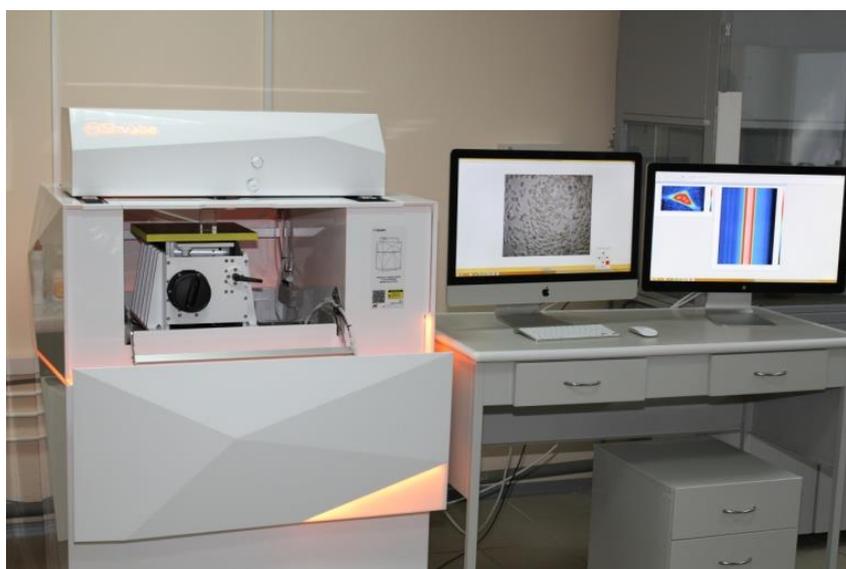


Рис. 1. Внешний вид лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340

Регистрация морфометрических показателей фазовых изображений апоптотических клеток методом ЛИМ

Под морфометрическими показателями фазового изображения клетки понимается набор геометрических показателей, соответствующих высоте, диаметру (минимальному и максимальному), периметру, площади и объему. Данные характеристики применительно к исследованиям биологических объектов на основе методов количественной фазовой микроскопии были впервые подробно описаны в работе [23], посвященной исследованию нормальных и патологически измененных эритроцитов человека.

Морфометрические показатели клеток рассчитываются по контуру фазового изображения согласно следующим соотношениям:

$$h = \Delta\varphi_{\max} - \Delta\varphi_{\min}, \quad (1)$$

$$P = l n_{\Omega}, \quad (2)$$

$$S = l^2 (n_{\Omega} + n_{\omega}), \quad (3)$$

$$V = \sum_{x \in \omega_x, \Omega_x} \sum_{y \in \omega_y, \Omega_y} l^2 \Delta\varphi(x, y), \quad (4)$$

где h – высота фазового изображения клетки; $\Delta\varphi_{\max}$, $\Delta\varphi_{\min}$ – максимальное и минимальное значения оптической толщины клетки соответственно; P – периметр

фазового изображения клетки; l – размер пикселя; n_{Ω} – количество точек, принадлежащих множеству точек контура Ω ; n_{ω} – количество точек внутри контура Ω ; S – площадь фазового изображения клетки; V – объем фазового изображения клетки; $\Delta\varphi(x, y)$ – значение оптической толщины клетки в точке (x, y) . Контур клетки определялся по фазовому изображению с помощью метода Кэнни [9].

Определение фрактальной размерности контура фазового изображения на основе морфометрических показателей

Для определения фрактальной размерности традиционно используется определение фрактала Б. Мандельброта: «Фракталом называется множество, для которого размерность Хаусдорфа–Безиковича строго больше его топологической размерности» [2]. Большинство биологических объектов обладают свойствами самоподобия, начиная от структуры ДНК, клетки, и заканчивая структурой тканей живых организмов. Поэтому целесообразно применение принципов фрактальной геометрии с целью выявления нелинейных закономерностей развития живых объектов. Например, такой подход может быть применен для определения фрактальной размерности контура клетки (фазового изображения клетки), для которого топологическая размерность равна единице, а фрактальная размерность r должна удовлетворять условию $1 < r < 2$. Кроме того, Б. Мандельбротом показано [2], что для любых фрактальных объектов выполняется связь между периметром и площадью в следующем виде:

$$P^{1/r} / S^{1/2} = \text{const.} \quad (5)$$

При этом формула (5) распространяется на классические геометрические объекты с целочисленной размерностью r , равной единице. Следовательно, равенство в выражении (5) будет выполняться и для изрезанного контура, и для описывающего его эллипса. Тогда фрактальная размерность контура фазового изображения клетки может быть вычислена с помощью морфометрических показателей для контура фазового изображения клетки и определяется следующими соотношениями

$$d_{avr} = (d_{\min} + d_{\max}) / 2, \quad (6)$$

$$P^* = \frac{4(0,25\pi \cdot d_{\max} \cdot d_{\min} + (0,5d_{\max} - 0,5d_{\min})^2)}{d_{avr}}, \quad (7)$$

$$S^* = 0,25\pi \cdot d_{\max} \cdot d_{\min}, \quad (8)$$

$$r = \frac{2 \ln(P)}{(2 \ln(P^*) - \ln(S^*) + \ln(S))}, \quad (9)$$

где d_{avr} – средний диаметр фазового изображения клетки; P^* – оценка периметра клетки в форме эллипса, описывающего фазовое изображение клетки на плоскости; S^* – оценка площади эллипса, описывающего фазовое изображение клетки на плоскости; P и S – вычисленные периметр и площадь фазового изображения клетки соответственно; r – фрактальная размерность контура фазового изображения клетки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 представлены типовые результаты измерений оптической толщины нативных и апоптотических клеток MCF-7 после воздействия доксорубина. На основе оптических изображений препарата исследуемых клеток (рис. 2, а, б) выбирали клетки, для которых осуществляли регистрацию фазового изображения (рис 2, в, г).

На фазовом изображении клетки четко визуализируются область адгезии клетки, цитоплазма, фрагментированное ядро. Для полученных фазовых изображений клеток выделяли контур (сплошная линия), в рамках которого осуществляли расчеты морфометрических показателей клеток и фрактальной размерности контура фазового изображения клетки.

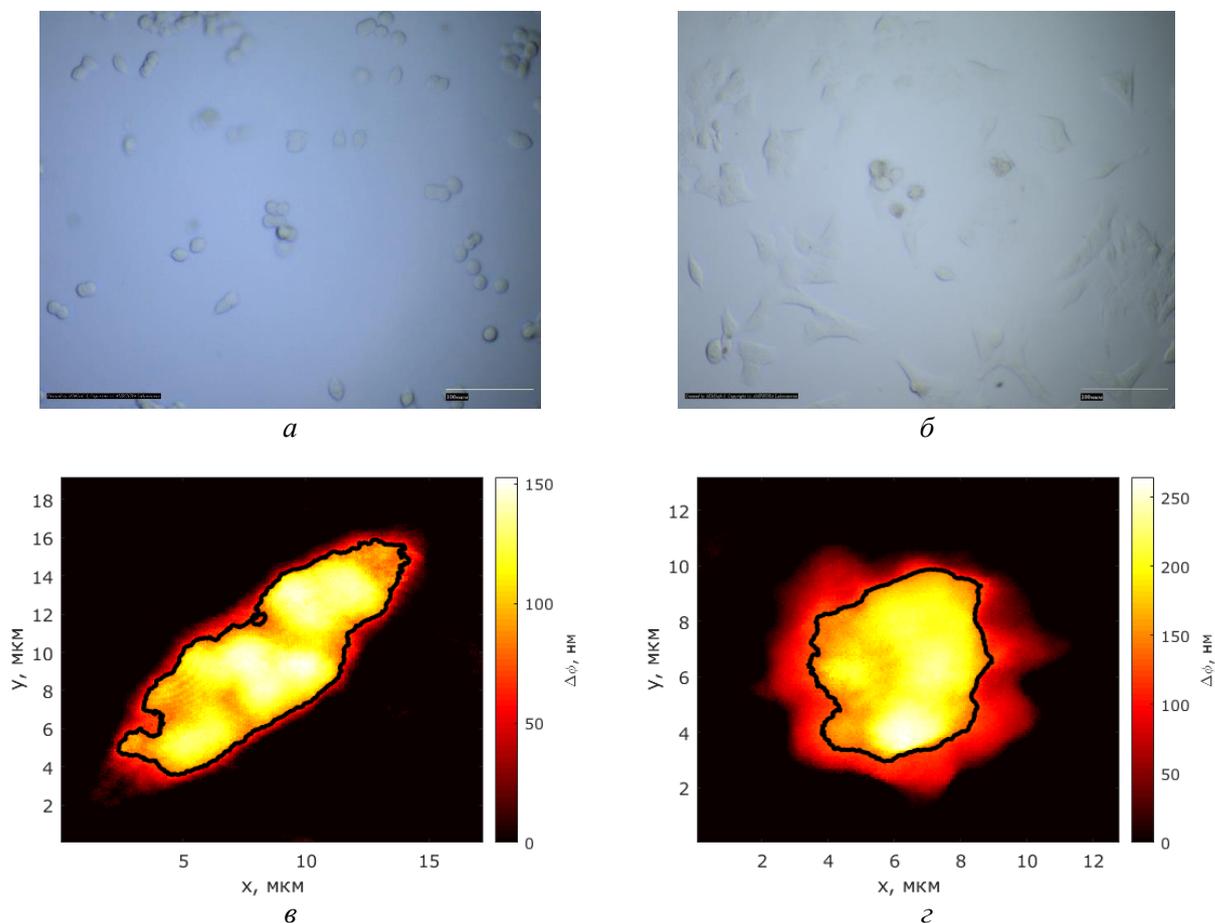


Рис. 2. Оптические (*a*, *б*) и фазовые (*в*, *г*) изображения препарата нативных (*a*, *в*) и апоптотических (*б*, *г*) клеток MCF-7. Сплошная линия на фазовых изображениях клеток обозначает контур клетки

Сравнение нативных и апоптотических (после воздействия доксорубицина) клеток MCF-7 проводили с помощью двухвыборочного непараметрического теста Уилкоксона–Манна–Уитни. Данный критерий позволяет выполнить оценку статистически значимой разницы между двумя выборками, статистические свойства которых заранее неизвестны. На рис. 3 представлены выборки морфометрических показателей фазовых изображений клеток MCF-7 до (левый бокс) и после воздействия доксорубицина (правый бокс) в виде диаграмм данных, на которых приведено медианное значение 25 и 75 % квантили. Как видно из рис. 3, разница между медианными значениями высоты, минимального и максимального диаметров, периметра, площади, а также объема фазовых изображений клеток двух групп составляет приблизительно 4,0 нм, 0,3 мкм, 2,8 мкм, 10,0 мкм, 10,0 мкм² и 1,3 мкм³ соответственно. Поскольку выемки в квадрате графика не перекрываются, можно с 95 % уверенностью заключить, что истинные медианы вычисленных значений действительно отличаются. Согласно критерию Уилкоксона–Манна–Уитни, анализируемые выборки достоверно различны по максимальному диаметру и периметру (*p*-значение не превышает 0,01).

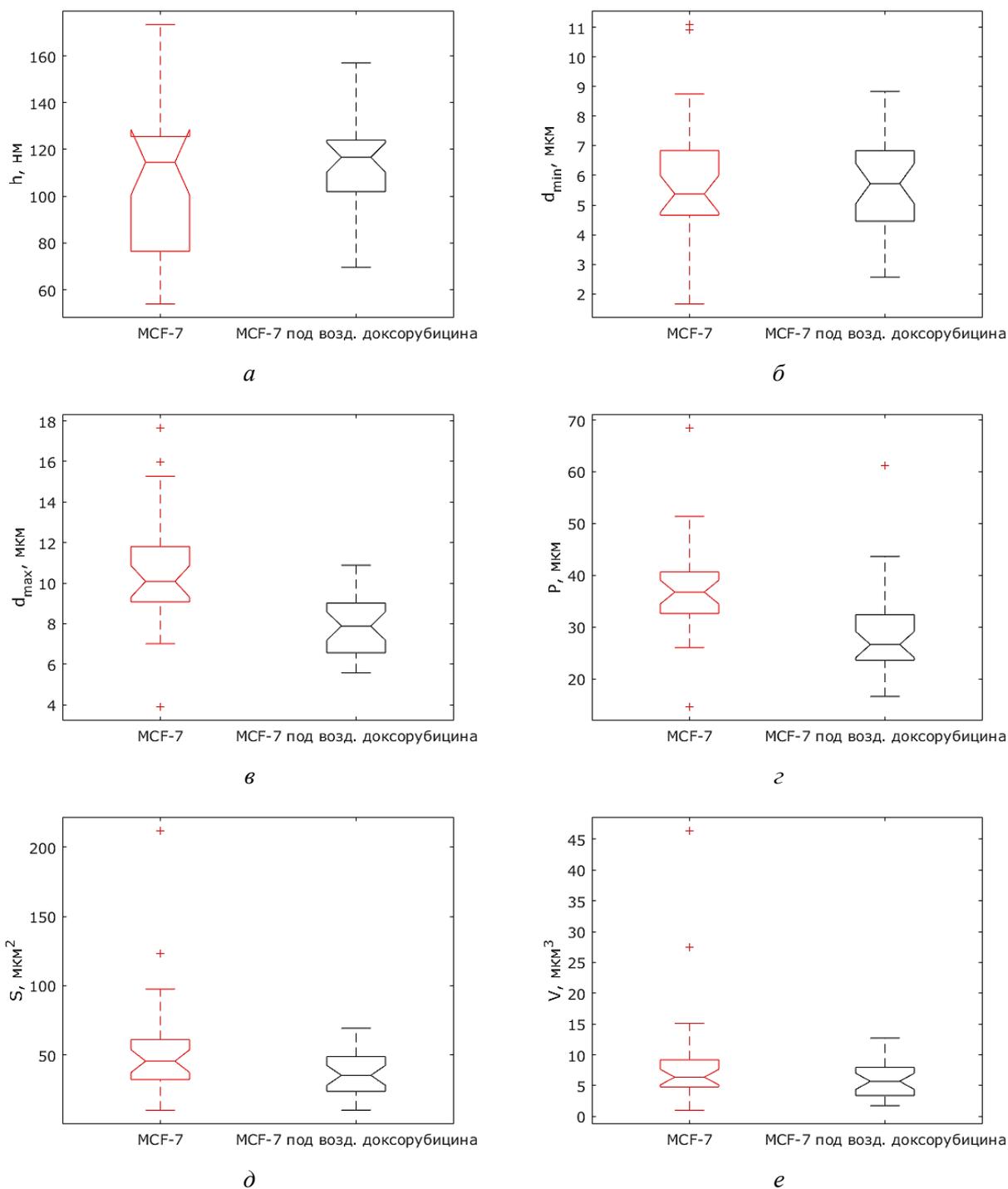


Рис. 3. Сравнение морфометрических показателей фазовых изображений клеток MCF-7 до и после воздействия доксорубицина: сравнение высоты фазового рельефа (*a*); сравнение по минимальному и максимальному диаметрам фазового изображения (*б, в*); сравнение по периметру и площади фазового изображения (*г, д*); сравнение объема фазового рельефа клеток (*e*). Средняя горизонтальная линия – медианное значение выборки. Верхняя и нижняя горизонтальные границы бокса – 75-процентная и 25-процентная квантили соответственно. Верхний и нижний доверительные интервалы соответствуют экстремальным значениям выборки. Маркеры «+» обозначают точки выборки, которые выходят за границы доверительных интервалов

При сравнении двух выборок значений фрактальной размерности контура фазовых изображений нативных и апоптотических клеток MCF-7 оказалось, что выборки между собой также различаются. Медианные значения фрактальной размерности контура фазовых изображений нативных и апоптотических после воздействия доксорубина клеток различаются приблизительно на 0,01. При этом p -значение составило 0,05 (рис. 4).

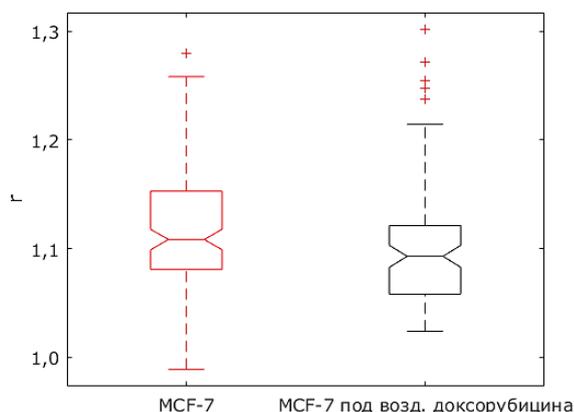


Рис. 4. Сравнение фрактальной размерности контура фазовых изображений нативных и апоптотических клеток MCF-7. Средняя горизонтальная линия – медианное значение выборки. Верхняя и нижняя горизонтальные границы бокса – 75-процентная и 25-процентная квантили соответственно. Верхний и нижний доверительные интервалы соответствуют экстремальным значениям выборки. Маркеры «+» обозначают точки выборки, которые выходят за границы доверительных интервалов

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе использовали клеточную линию MCF-7 как наиболее охарактеризованную и изученную линию опухолевых клеток молочной железы человека, клетки которой впервые были выделены в 1973 г. Гербертом Соулом с соавторами из протоков молочной железы человека (эпителиоподобная аденокарцинома молочной железы) и широко применяются в качестве модельного объекта во многих фундаментальных и прикладных исследованиях [17]. Процесс программируемой гибели клеток MCF-7 индуцировали путем воздействия противоопухолевого препарата доксорубина, вызывающего активацию апоптотических путей в раковых клетках. Выбор доксорубина обусловлен тем, что данный препарат используется в большей части протоколов стандартных и рекомендуемых схем адъювантной химиотерапии рака молочной железы [4], а также при исследовании цитотоксического действия соединений на клетки молочной железы человека, в том числе клетки линии MCF-7 [6, 24].

По результатам сравнительного анализа фазовых изображений нативных и апоптотических клеток культуры MCF-7 можно сделать вывод, что метод лазерной интерференционной микроскопии позволяет идентифицировать апоптотически измененные раковые клетки на основе морфометрических данных и фрактальной размерности контура фазовых изображений клеток. При этом такие показатели, как максимальный диаметр и периметр, могут быть использованы в качестве комплексного критерия для индикации апоптотически измененной опухолевой клетки при достаточной представительности сравниваемых выборок. В частности, если максимальный диаметр клетки менее 9,0 мкм и периметр менее 32,6 мкм, то клетка считается апоптотической.

Следует отметить, что полученные в настоящем исследовании результаты хорошо согласуются с морфологическими признаками процесса апоптоза клеток, которые регистрируются с помощью классических методов микроскопии, включая:

- 1) изменение формы клетки: клетки, входящие в стадию апоптоза, на начальном этапе теряют свою форму и становятся округлыми, затем происходит деформация цитомембраны (сморщивание);
- 2) изменение объема клетки [8];
- 3) конденсацию и разрушение хроматина в ядре, а также диссоциацию ядрышек [25];
- 4) фрагментацию ядра и конденсацию цитоплазмы [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы проведен сравнительный анализ фазово-контрастных изображений нативных и апоптотических раковых клеток MCF-7 на основе оценки морфометрических и фрактальных показателей, полученных с использованием данных лазерной интерференционной микроскопии. Установлена количественная разница между медианными значениями высоты, минимального и максимального диаметров, периметра, площади, а также объема фазово-контрастных изображений клеток обеих представительных групп. Анализ фрактальной размерности контуров клеток также позволил установить отличия между нативными и апоптотическими клетками. Медианные значения фрактальной размерности контуров фазово-контрастных изображений нативных и апоптотических после воздействия доxorубина клеток MCF-7 различаются на значение, равное 0,01. Таким образом, может быть предложена методика дифференцирования клеток на основе вычисления морфометрических и фрактальных свойств фазово-контрастных изображений клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60718X0202).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исаева В.В. Фрактальные и хаотические паттерны в морфологии животных // Труды зоологического института РАН. – 2009. – Т. 313, № S1. – С. 199–218.
2. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы / Ин-т компьютер. исслед. – М., 2002. – 656 с.
3. Наймарк О.Б., Гришко В.В., Баяндин Ю.В., Никитюк А.С. Механобиологическое исследование динамики и морфологии клеточных структур методом лазерной микроскопии и приложения в онкологии // Вестн. Перм. федер. исслед. центра. – 2020. – № 1. – С. 61–78.
4. Османова Л.И. Цели и задачи адьювантной и неоадьювантной терапии рака молочной железы [Электронный ресурс] // V Рос. онкол. конф. – М., 2016 – URL: <https://rosoncweb.ru/library/congress/ru/05/38.php> (дата обращения: 03.09.2020).
5. Патрикеев И.А., Крючков А.Н., Фрейнд Г.Г., Юрлов Р.А., Рец А.В. Применение вейвлет-фильтрации для оценки выраженности полиморфизма ядер клеток инвазивной протоковой карциномы молочных желез // Российский журнал биомеханики. – 2004. – Т. 8, № 4. – С. 91–96.
6. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Клетсель А.Е. Неоадьювантное и адьювантное лечение рака молочной железы / Мед. информ. агентство. – М., 2008.
7. Bizzarri M., Palombo A., Cucina A. Theoretical aspects of systems biology // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2013. – Vol. 112, no. 1–2. – P. 33–43.
8. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell // Cell Death and Differentiation. – 2002. – Vol. 9, no. 12. – P. 1307.

9. Canny J. A computational approach to edge detection // *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*. – 1986. – No. 6. – P. 679–698.
10. Gerasimova E., Audit B., Roux S.G., Khalil A., Argoul F., Naimark O., Arneodo A. Multifractal analysis of dynamic infrared imaging of breast cancer // *EPL (Europhysics Letters)*. – 2014. – Vol. 104, no. 6. – P. 68001.
11. 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.
12. Gerasimova-Chechkina 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.
13. Goodvin B.C. The life of form. Emergent patterns of morphological transformation // *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*. – 2000. – Vol. 323, no. 1. – P. 15–21.
14. Huang S., Ingber D.E. A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: self-organizing attractors in cell regulatory networks // *Breast Disease*. – 2007. – Vol. 26, no. 1. – P. 27–54.
15. Huang S., Ingber D.E. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks // *Experimental Cell Research*. – 2000. – Vol. 261, no. 1. – P. 91–103.
16. Ingber D.E. Mechanical control of tissue growth: function follows form // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102, no. 33. – P. 11571–11572.
17. Lacroix M., Haibe-Kains B., Henny B., Laes J.F., Lallemand F., Gonze I., Cardoso F., Piccart M., Leclercq G., Sotiriou C. Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes // *Oncology Reports*. – 2004. – Vol. 12, no. 4. – P. 701–707.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65, no. 1–2. – P. 55–63.
19. Naimark O.B. Structural-scaling transitions and localized distortion modes in the DNA double helix // *Physical Mesomechanics*. – 2007. – Vol. 1, no. 10. – P. 33–45.
20. Pasqualato A., Palombo A., Cucina A., Mariggio M.A., Galli L., Passaro D., Dinicola S., Proietti S., D'Anselmi F., Culuccia P., Bizzarri M. Quantitative shape analysis of chemoresistant colon cancer cells: correlation between morphotype and phenotype // *Experimental Cell Research*. – 2012. – Vol. 318, no. 7. – P. 835–846.
21. Smith Jr T.G., Lange G.D., Marks W.B. Fractal methods and results in cellular morphology—dimensions, lacunarity and multifractals // *Journal of Neuroscience Methods*. – 1996. – Vol. 69, no. 2. – P. 123–136.
22. Xu X., Lai Y., Hua Z.C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials // *Bioscience Reports*. – 2019. – Vol. 39, no. 1. – BSR20180992.
23. Yusipovich A.I., Parshina E.Yu., Brysgalova N.Yu., Brazhe A.R., Brazhe N.A., Lomakin A.G., Levin G.G., Maksimov G.V. Laser interference microscopy in erythrocyte study // *Journal of Applied Physics*. – 2009. – Vol. 105, no. 10. – P. 102037.
24. Zhong Y., Zhang F., Sun Z., Zhou W., Li Z.Y., You Q.D., Guo Q.L., Hu R. Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF-7/DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response // *Molecular Carcinogenesis*. – 2013. – Vol. 52, no. 10. – P. 824–834.
25. Ziegler U., Groscurth P. Morphological features of cell death // *Physiology*. – 2004. – Vol. 19, no. 3. – P. 124–128.

ANALYSIS OF MORPHOMETRIC AND FRACTAL PROPERTIES OF PHASE-CONTRAST IMAGES OF NATIVE AND APOPTOTICALLY CHANGED MCF-7 CELLS

**Yu.V. Bayandin, A.S. Nikitiuk, A.O. Voronina, Yu.A. Beloglazova, O.N. Gagarskikh,
V.V. Grishko, O.B. Naimark (Perm, Russian Federation)**

The aim of this work is to determine the morphometric and fractal characteristics of native and apoptotic MCF-7 cells based on the analysis of phase-contrast images obtained using laser interference microscopy. MCF-7 cells were cultured under standard conditions. Phase images of cells were obtained using a laser interference microscope MIM-340 at the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. In the work, 30 native MCF-7 cells and 30 MCF-7 cells apoptotically changed under the influence of doxorubicin were studied. As a result of processing, the obtained phase images, the cell contour was estimated, which was used to determine the morphometric parameters and the fractal dimension of the cell phase image contour. The maximum and minimum diameters, perimeter and volume of the cell phase image were chosen as the geometric characteristics of the cell phase image. The fractal dimension of the phase image contour was calculated as a scale-invariant indicator characterizing the ruggedness of the cell contour. Comparative analysis of the morphology of native and apoptotic MCF-7 cells made it possible to differentiate the studied cells using the two-sample non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test.

Key words: cell, apoptosis, phase-contrast image, morphometric parameters, fractal dimension.

Получено 4 сентября 2020