

## **АЛГОРИТМ ВИРТУАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ ВОДНЫМ РАСТВОРОМ НАНОЧАСТИЦ CDSE/ZNS**

***Копыцкий А.В., Хильманович В.Н., Шиман О.В.***  
*Гродненский государственный медицинский университет,  
Беларусь, Гродно*

***Стрекаль Н.Д., Мотевич И.Г.***  
*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,  
Беларусь, Гродно*

*В работе описывается алгоритм виртуального окрашивания гистологических срезов, выдержанных в водных растворах наночастиц CdSe/ZnS, позволяющий оценить локальное значение pH с пространственным разрешением до 200 нм. Для этого разработана программа анализа спектров люминесценции наночастиц в рамках модели эффекта Штарка.*

***Ключевые слова:*** *гистологические срезы; наночастицы; CdSe/ZnS; спектры люминесценции; цифровая обработка.*

## **AN ALGORITHM FOR VIRTUAL STAINING OF HISTOLOGICAL SECTIONSEXPOSED TO AN AQUEOUS SOLUTION OF CDSE/ZNS NANOPARTICLES**

***Kapytski A.V., Khilmanovich V.N., Shiman O.V.***  
*Grodno State Medical University,  
Belarus, Grodno*

***Strekal N.D., Motevich I.G.***  
*Yanka Kupala State University of Grodno,  
Belarus, Grodno*

*The paper describes an algorithm for virtual staining histological sections soaked in aqueous solutions of CdSe/ZnS nanoparticles, which makes it possible to estimate the local pH value with spatial resolution up to 200 nm. For this, a program has been developed for the nanoparticle's luminescence spectra analysis within the framework of the Stark effect.*

***Key words:*** *tissue section; nanoparticle; CdSe/ZnS; luminescence spectra; digital processing.*

На сегодняшний день стандартными методами окрашивания срезов тканей является окрашивание с использованием гематоксилина и эозина. Данный метод является хорошо изученным, стандартизированным с точки зрения подготовки препаратов и красителей, а также времени и условий экспонирования красителем. Помимо указанных веществ широко используются и другие: азури, метиленовый синий и др. Особенностью подхода, при котором используются красители является то, что готовый окрашенный препарат рассматривается в оптический микроскоп. Исторически параллельно методу окрашивания тканей развивались и другие изучения прозрачных биологических структур: метод люминесценции, метод фазового контраста, метод наблюдения в косых лучах и пр. В наше время также встречается комбинирование методов окрашивания (например, флюорохромом акридиновым оранжевым) и флуоресцентной ультрафиолетовой микроскопии.

Начиная с 80-90-х годов 20 века активно развивается физика наночастиц (НЧ) – частиц размером в 1–100 нм, обладающих уникальными свойствами, зависящими от их размера и окружения; проводятся эксперименты с взаимодействием наночастиц и биологических тканей. Также ведётся изучение спектров люминесценции наночастиц (свечения частиц, освещённых возбуждающим ультрафиолетовым излучением) при различных внешних условиях, в том числе и в тканях, экспонированных их растворами. Проведённые эксперименты указывают на то, что спектры люминесценции НЧ (CdSe/ZnS, в частности) могут меняться при различных значениях рН сред, в которых они находятся [1, 2]. Таким образом, перспективным является использование НЧ в качестве люминесцентных красителей биологических объектов (микроорганизмов, срезов тканей), так как спектр люминесценции НЧ будет зависеть от их окружения, которое, в свою очередь, зависит от позиции в клетке и от её метаболизма. Это позволяет нам не только видеть содержимое клеток и тканей, но и делать вывод о распределении продуктов жизнедеятельности в них.

**Цель** настоящей работы состоит в создании программы цифровой обработки для визуализации локального рН в пределах гистологических срезов тканей с опухолевой и предопухолевой патологией шейки матки, а также неизменной тканью шейки матки на основании формы спектров люминесценции наночастиц CdSe/ZnS.

**Материалы и методы исследования.** Для достижения поставленной цели были обработаны флуоресцентные изображения гистологических срезов тканей, описанных в целях настоящей работы, полученных на конфокальном микроскопе «NanoFinder S». В ходе сканирования регистрировался спектр люминесценции НЧ CdSe/ZnS в заданных точках образца (всего 200×200

точек) на 1024 длинах волн (от 452 до 755 нм). Полученные данные конвертировались при помощи программы «Nano SP» в текстовый формат («txt») для дальнейшей цифровой обработки. Главной целью последующей обработки было получить распределение pH среза ткани на основании спектров люминесценции НЧ. Для этого мы использовали следующий алгоритм:

1. Для улучшения качества спектров, полученных от среза, проводится их сглаживание методом Савицкого – Голая и последующее нормирование.

2. Для спектра водного раствора НЧ проводится нормирование и далее по нормированному спектру численно определяются первые и вторые производные, которые также нормируются.

3. Для точек среза находятся и нормируются спектры Штарка, как разности между спектрами в точках и спектром водного раствора НЧ CdSe/ZnS.

Таким образом, промежуточно мы имеем: массив нормированных спектров в точках образца, массив нормированных спектров Штарка в этих же точках, первую и вторую нормированные производные водного раствора НЧ.

4. Далее в исследуемых точках образца определяются 3 различных расстояния Канберры между следующими парами нормированных спектров:

- a. между спектром Штарка для точки и первой производной спектра люминесценции НЧ – мера близости к щелочному pH;
- b. между спектром Штарка для точки и второй производной спектра люминесценции НЧ – мера близости к кислому pH.
- c. между спектром люминесценции для точки и спектром люминесценции НЧ – мера близости к нейтральному pH.

Полученные расстояния сводятся в массив из трёх столбцов.

5. Для каждой строки описанного массива определяется наименьшее расстояние из 3 возможных. Это позволяет оценить pH в данной точке и пометить её соответствующим цветом. Точки с высоким pH отмечаются фиолетовым, с низким pH – розовым, с нейтральным pH – коричневым.

6. Яркость в каждой точке определяется пропорционально расстоянию Канберры – чем меньше расстояние между спектрами в точке, тем выше её яркость. Яркости определяются отдельно для точек с различными типами pH.

7. Полученная информация о цветах точек образца и их яркостях преобразуется в изображение, позволяющее визуально оценить распределение pH в образце ткани.

**Результаты и выводы.** Описанный алгоритм используется в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025,

задание 3.03.7» для изучения возможностей применения НЧ в качестве нанозондов в биологических объектах. Данный метод может быть обобщён и для определения локальных параметров живых сред: для этого необходимо записать спектры НЧ при различных значениях изучаемого локального параметра (температуры, вязкости и т.д.) в эталонном растворе. Далее, по близости спектра люминесценции НЧ в гистологическом срезе в некоторой точке к одному из эталонных спектров можно оценить локальное значение параметра.

### **Список литературы**

1. Флуоресцентные наночастицы CdSe/ZnS как нанозонды локального pH в диагностике онкологических заболеваний / И.Г. Мотевич, Н.Д. Стрекаль, А.В. Шульга, С.А. Маскевич // Оптика и спектроскопия. – 2018. – том 124. – вып. 5. – С. 605-611.
2. Влияние pH и полиэлектролитов на спектрально-кинетические свойства полупроводниковых квантовых точек AlS/ZnS в водных растворах / И.Г. Мотевич, Э.И. Зенькевич, А.Л. Строюк, А.Е. Раевская [и др.] // Журнал прикладной спектроскопии. – 2020. – Т. 87, № 6. – С. 926-935.