

УДК 612

Н.В. АКУЛИЧ

ФИЗИОМЕТРИЯ ХРОМАТИНА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАГРУЗКАХ: РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ

В статье предложена технология анализа хроматина иммунокомпетентных клеток крови в норме и при функциональных нагрузках. Обсуждаются возможности повышения разрешающей способности оптической части комплекса для микроскопии, предлагаются подходы для морфоденситометрического и текстурного анализа хроматина.

В настоящее время отмечаются успехи в морфологических исследованиях, базирующиеся на совершенствовании методических подходов [1–12]. Внедрение информационных технологий, реализованных с помощью систем анализа изображений, позволило создать специализированные комплексы в области генетики (кариотипирование), сперматологии, гематологии, исследований микроциркуляторного кровотока.

Несмотря на появление новых систем и методик анализа биологических объектов [8], основными принципами работы созданных автоматизированных аппаратно-программных комплексов на базе световой микроскопии остаются биофизические методы, где в качестве первично регистрирующей величины используются оптическую плотность и количественные методы морфологии, подразумевающие оценку геометрических характеристик объекта.

Итогом работ по интеграции двух вышеупомянутых методических подходов явилось создание новой отрасли – морфоденситометрии [Жукоцкий и др., 1985] – метода, осуществляющего реконструкцию и преобразование методами цифровой обработки изображений биологических объектов к интегральным и локальным количественным показателям морфологических структур – морфоденситометрическим параметрам (МДМ параметры).

В настоящее время метод морфоденситометрии применяется в основном как инструмент для анализа и обработки изображений цитологических объектов в клинической практике [7]. Накопленный материал позволил ряду исследователей приблизиться к задачам ранней диагностики, тем более, что аппаратно-программный комплекс предоставляет более 200 количественных комплексных показателей для описания структур клеток и тканей.

Необходимо отметить, что особенностью аппаратно-программных комплексов определения структуры цитологических объектов, например, такого как “ДИАМОФ-ЦИТО” являлось то, что кроме знаний, опыта цитолога и литературных данных в предметной области, исследователю необходимо иметь основательную подготовку и в области цифровой обработки изображений, и в области информационных технологий.

В результате появляется возможность для выделения по оптической плотности не только ядра и цитоплазмы, но и гетеро- и эухроматина, а более полное использование возможностей компьютерных технологий позволит определить их наиболее информативные признаки [7].

Кроме преимуществ, работа на подобных комплексах имеет и ряд ограничений: во-первых – если объектом исследования является интерфазный хроматин

(ИХ) иммунокомпетентных клеток крови (ИКК), например, лимфоцитов, или нейтрофильных гранулоцитов, то полученные результаты можно рассматривать только в сравнительном аспекте; во-вторых – несмотря на достаточно большой накопленный клинический экспериментальный материал, изменения интерфазного хроматина по данным литературы и в наших экспериментах носили неспецифический характер, т.е. одни и те же параметры хроматина могли свидетельствовать о различных заболеваниях. Например, перестройки в окологранулярной зоне гетерохроматина наблюдались и у пациентов с атеросклерозом, и у больных с профессиональной патологией, и у детей, проживающих в зоне периодического радиационного контроля [3]. И, наконец, практически не изученными остаются особенности реакции ИХ иммунокомпетентных клеток крови без признаков патологии на широкий спектр раздражителей, что позволило бы, с одной стороны, более детально охарактеризовать хроматин ядросодержащих клеток здоровых людей, а с другой – определить морфофункциональные параметры хроматина ИКК при функциональных нагрузках с выявлением наиболее информативных его компонентов и оценкой специфических для данного воздействия признаков.

Предметом физиометрии являются функциональные особенности организма в целом, его частей и их связи. Традиционно, изучение функций организма человека в рамках такого подхода ограничивалось динамометрией, определением жизненной емкости легких, пневмотахометрией и некоторыми другими тестами, характеризующими, в основном, системные функции, что сужало использование такого подхода.

По нашему мнению, к таким стандартизированным физиометрическим показателям следует отнести и те показатели функционирования организма, которые, являясь интегральными, отражали бы изменения при действии факторов различной природы [3]. Мы предполагаем, что интерфазный хроматин иммунокомпетентных клеток крови может являться одним из таких интегральных показателей, характеризующих как клеточную активность, так и морфофункциональное состояние организма в целом.

Таким образом, целью настоящей работы является разработка и реализация подходов, обеспечивающих нахождение различий между хроматином цитологических объектов крови при изучении клеточного материала в норме и при его реакции на широкий спектр раздражителей.

1. Разрешающая способность и способы ее повышения

Применение новых методов в микроскопии открывает большие возможности для исследования клеточных структур живых организмов, позволяет получить количественную информацию об изучаемом объекте и отдельных элементах его структуры. С появлением новейших методов исследования в микроскопии (фазового контраста, интерференционного контраста, люминесцентного анализа и др.) совершенствуются и сами микроскопы, создаются новые их типы с высококачественной оптикой, используются новейшие источники излучения. Современный микроскоп представляет собой не только инструмент для наблюдения, каким он являлся на протяжении нескольких веков. В настоящее время микроскоп превратился в весьма сложный оптико-механический прецизионный измерительный прибор, снабженный регистрирующими и электронными вычислительными устройствами, автоматикой и т.д.

Разрешающая способность (d) – одна из основных характеристик микроскопа, под которой обычно понимают возможность различения двух близких по ин-

тенсивности точечных объектов. Вследствие дифракционных явлений любой точечный объект размывается, и изображение в результате дифракции перекрывается с изображением от соседнего объекта.

Поставленная нами задача повышения разрешающей способности микроскопа – это, по сути, приближение к теоретически возможному разрешению, ограниченному волновой природой света.

Теоретическая разрешающая способность определяется формулой Аббе:

$$d = 0.61 \times \frac{\lambda}{NA}$$
. Коэффициент 0.61 в формуле – это допустимое прикрытие апертурной диафрагмы конденсора относительно числовой апертуры объектива, при этом в делителе – числовая апертура объектива.

Из этой формулы следует, что для объектива с апертурой 1.2 разрешающая способность составит 0.28 мкм (длина волны света 550 нм), что существенно ограничивает возможности для анализа. Исходя из этой зависимости, существуют подходы, позволяющие увеличить разрешающую способность.

Первый – сузить спектральный диапазон и, применяя фиолетовый или синий фильтры, уменьшить длину волны, но это не всегда оправдано по общеизвестным причинам.

Второй – увеличить числовую апертуру. Как известно, сумма числовых апертур измерительной системы определяется числовой апертурой объектива, вернее, правой фронтальной компонентой объектива и числовой апертурой осветительной системы, т.е. диаметром открытой апертурной диафрагмы конденсора. Раскрытие определяется выходным зрачком объектива. Если мы говорим об объективе масляной иммерсии, то числовая апертура объектива 100× может быть и 1.45, что позволяет формировать изображения на уровне дифракционного предела – 0.2 мкм.

Максимальная числовая апертура конденсора в сухом виде равна 0.9, применение фронтальной линзы позволило увеличить апертурное число до 1.25, при использовании масла она может быть увеличена и до 1.4.

Рэлею предложен критерий, согласно которому две точки считаются разрешенными, если величина "провала" в интенсивности по центру между изображениями точек составили 26% от максимума.

Существует точка зрения, согласно которой критерий Рэлея – условность, поскольку глаз может уверенно различать разность интенсивностей не 26, а несколько процентов. И с появлением видеомикроскопии и компьютерной обработки изображений появилась возможность для разделения изображения объектов, отличающиеся даже на один уровень интенсивности.

Система анализа изображения (разрешение камеры, разрешение монитора, программная обработка изображения) – это дополнительные устройства, способные разрешить изображение, созданное микроскопом, в пределах, ограниченных глубиной резкости, которую может зафиксировать матрица.

Опытный исследователь может подметить нюансы в изображении в пределах глубины резкости микроскопа за счет аккомодации глаза и среагировать не только на изменение интенсивности, как это делает камера, но и на глубинные эффекты. Однако такие преимущества достигаются в результате "домысливания", а камера фиксирует то, на что она "обучена". Но и при работе с камерой возможна фиксация небольших перефокусировок по глубине, которые затем можно с помощью программы "сшить", минимизируя фоновые засветки (снижение контраста за счет рассеянного света).

Практически это реализовывалось следующим образом: мы прикрывали осветительную апертуру, уходя от теоретической разрешающей способности, делали съемки на минимальном шаге предметного столика (100 нм), а затем произво-

дили монтаж слоев. Повышение разрешающей способности возможно и без применения этого приема, например, при использовании DIC-призм, применение в световой микроскопии устройств когерентного освещения (например, лазера).

Таким образом, первым этапом анализа цитологических объектов является получение его изображения с помощью микроскопа и камеры; измеренная разрешающая способность микроскопа, проведенная по методу, предложенному в работе [10] составила порядка 170-200 нм. Это достигнуто за счет использования объектива с большой числовой апертурой, монтажа разных по глубине слоев, снятых при прикрытой диафрагме конденсора.

К способам, позволяющим повысить разрешающую способность микроскопа, относят методы, основанные на анализе принципов обработки сигналов в оптическом тракте микроскопа и зрительной сенсорной системе.

Пространственно-частотные характеристики глаза объясняются частично оптическими и частично нервными механизмами. Как оптический инструмент глаз имеет ограниченную разрешающую способность из-за конечных размеров апертуры линзы, оптических aberrаций и конечных размеров палочек и колбочек. По аналогии с микроскопом – апертура объектива и конденсора, присутствие в них полевых и хроматических aberrаций и размер сенсора ПЗС-матрицы.

Эти эффекты могут быть представлены в модели фильтром нижних пространственных частот, включенным между рецептором и нелинейным элементом. Наиболее существенный вклад в частотную характеристику глаза вносит механизм латерального торможения, что может быть смоделировано применением полосового линейного пространственного фильтра, операциями над изображениями с некоторой константой (сложение изображений, дополнение изображений, деление двух изображений или деление изображения на константу, линейная комбинация изображений и др.).

Другим способом улучшения изображения является выравнивание его гистограммы, что приводит либо к снижению, либо повышению его контрастности.

Перспективным представляется удаление шумов, для чего используют наложение тестовых шумов на изображение, что дает хорошее представление о влиянии шума того или иного вида на изображение, использование медианой, ранговой и адаптивной фильтрации.

Например, усредняющий фильтр используется для уменьшения влияния шума на изображение, но его применение приводит к размытию изображения и ухудшению его четкости. Фильтр Гаусса – фильтр нижних частот, но, по сравнению с усредняющим фильтром он меньше размывает изображения. Центральный элемент маски такого фильтра имеет максимальное значение, что соответствует пику распределения Гаусса. Последнее описывается выражением, определяющим двумерное распределение Гаусса.

Фильтры Собеля и Превитта применяются для выделения границ объекта и по этой причине в основном применяются для бинарных изображений.

2. Оценка морфоденситометрических и текстурных признаков интерфейсного хроматина

Признаком изображения называется его простейшая отличительная характеристика или свойство. Некоторые признаки являются естественными в том смысле, что они устанавливаются визуальным анализом изображения, тогда как другие, так называемые искусственные признаки, получаются в результате его специальной обработки или измерений. К естественным признакам относятся

светлота (яркость) и текстура различных областей изображения, форма контуров объектов. Гистограммы распределения яркости и спектры пространственных частот дают примеры искусственных признаков.

Оценка морфофункциональных признаков большинства цитологических препаратов производится практически всегда при их окрашивании специфическими и не специфическими красителями. В первом случае, например, при окраске по Романовскому, можно говорить только о морфологических и колориметрических (в частности, азур II придает разный цвет ядрам и цитоплазме клеток крови) параметрах клеток. Во втором – способность к связыванию изучаемого вещества с красителем позволяет, наряду с морфологическими, проводить денситометрические измерения, например, определять оптическую плотность или величину светопропускания.

2.1. Морфоденситометрические признаки интерфазного хроматина

Анализ структурных фракций интерфазного хроматина проводился разными специалистами и в большинстве случаев проводилось деление хроматина на эу- и гетерохроматин с последующим анализом рыхлого и компактного хроматина.

Наиболее разработанным подходом к анализу хроматина считается метод морфоденситометрии, разработанный коллективом Института физико-химической медицины, а руководителем проекта являлся А.В. Жукоцкий [7]. Согласно А.В. Жукоцкому, интерфазный хроматин ядер подразделялся на 4 компоненты. Принципом дискриминации компонент являлся метод, объединяющий оптические и геометрические показатели.

Две из компонент хроматина были отнесены к компактному, плотному или конденсированному (гетеро-) хроматину; и две – к диффузному, рыхлому или деконденсированному (эу-) хроматину. Наиболее темная (оптически более плотная) гранулярная компонента гетерохроматина обозначена q_1 ; светлая компонента гетерохроматина, так называемая перигранулярная зона – q_2 ; наиболее светлая компонента эухроматина – q_4 , и, соответственно, промежуточная между q_2 и q_4 – компонента q_3 . В рамках метода морфоденситометрии была реализована идея гистографов В.В. Смолянинова [6], что позволило представить структуры окологранулярного хроматина конечной толщины в виде скелетона.

2.2. Текстурные признаки интерфазного хроматина

Среди признаков хроматина имеются и такие, которые визуальный анализ практически не выявляет и очень слабо оценивает (например, текстурные, топологические показатели).

При текстурном анализе, как правило, производится разделение исходного изображения на области с однородным свойством – текстурой, затем определяются основные параметры этих областей, необходимые для принятия решения. Концепция текстуры окончательно не определена, что является следствием факта, что процессы, происходящие в зрительной сенсорной системе человека, изучены недостаточно.

Используемые на этапах определения признаков текстуры и сегментации методы и алгоритмы определяют качество обработки изображений определенного типа. При текстурном анализе должна рассматриваться определенная окрестность каждого пикселя, охватывающая несколько текстурообразующих элементов – элементарных фрагментов, из которых и формируется текстура.

В литературе, посвященной анализу изображения, для определения текстуры используют в основном два подхода:

- интерпретация текстуры как повторения базовых примитивов, имеющих различную ориентацию в пространстве. Это определение предполагает наличие структурированности в природе текстуры;
- для текстуры не характерно наличие ярко выраженных краев. Для этого подхода нет каких-либо типичных образцов или доминирующей частоты в текстуре, поэтому для ее анализа используется вероятностный метод решения.

Таким образом, текстура может характеризоваться двухуровневой структурой, представляющая собой пространственную организацию (высший уровень) базовых примитивов, имеющих стохастическую составляющую (низший уровень).

Одним из важных подходов к описанию областей является количественное представление их текстурных признаков. Несмотря на отсутствие формального определения текстуры, к настоящему времени сформировались представления, согласно которым этот дескриптор является мерой таких свойств области, как *гладкость*, *шероховатость* и *регулярность*.

В цифровой обработке изображений для описания текстуры области применяются несколько подходов. Среди них выделяют методы: основанные на измерении пространственной частоты количества перепадов на единицу площади изображения; использующие матрицу смежности значений яркости; описывающие текстуры длинами серий; основанные на гистограмме пространственной разности яркостей; осуществляющие поиск регулярности в форме структурных элементов; основанные на анализе микроструктуры текстурного поля.

Среди существующих подходов (статистический, структурный и спектральный) статистический – наиболее приемлемый для наших задач. В рамках этого подхода предложено 14 параметров, которые рассчитываются из матриц, содержащих информацию о текстурных характеристиках изображений. В свою очередь среди этих параметров мы предпочли текстурные особенности, связанные с пространственным распределением и пространственной взаимозависимостью значений яркости области изображения.

Статистики пространственной взаимозависимости значений яркости вычислялись по матрицам переходов значений яркости между ближайшими соседними точками. Матрица смежности (или матрица совместной встречаемости) уровней яркости представляла собой оценку плотности распределения вероятностей второго порядка, полученную по изображению, исходя из предположения, что плотность вероятности зависит лишь от расположения двух пикселей.

Обозначим эту матрицу $P(i, j, d, \varphi)$, где i и j – яркости соседних точек на изображении, расположенных на расстоянии d друг от друга, при угле φ направления. Для описания текстуры использовали четыре параметра, приведенные ниже.

1. **Второй угловой момент (ASM)** – мера однородности.
2. **Контраст** – мера местного представления изменений в изображении.
3. **Корреляция** – мера линейной зависимости в отражении оттенков серого.
4. **Энтропия** – мера однородности изображения.

Поскольку текстура – пространственное свойство, измерения ее признаков ограничивались областями, обладающими относительной однородностью. Поэтому, прежде чем производились измерения текстуры, устанавливались границы области с однородной текстурой путем экспертных оценок (наблюдение) или с помощью методов автоматической сегментации изображения.

Исследования, посвященные анализу текстур с помощью спектра Фурье, свидетельствуют [13], что крупнозернистая текстура дает спектр Фурье, энергия которого сосредоточена на низких пространственных частотах. Наши экспери-

менты (неопубликованные данные) показали, что, несмотря на незначительное перекрытие спектров для областей с отличающейся текстурой, спектральный фурье-анализ оказался пригодным для диагностики ранней патологии.

Заключение

Разработан и оптимизирован комплексный алгоритм исследования функционально-структурных реакций лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов на основе методов матморфологии, объединяющий основные классы анализа оптического изображения клеточных структур. По данному алгоритму проведен первичный анализ изображений гетерохроматических областей ядер иммунокомпетентных клеток с использованием частично когерентного источника света и DIC-призм. Результаты исследования позволяют считать новый алгоритм анализа пригодным для выявления тинкториальных свойств и микроанатомии функционально активно-го интерфазного хроматина лимфоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Абламейко, С.В.** Обработка изображений: технология, методы, применение / С.В. Абламейко, Д.М. Лагуновский. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 1999. – 100 с.
2. **Автандилов, Г.Г.** Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
3. Морфоденситометрический анализ хроматина лимфоцитов – метод биоиндикации действия физических факторов / Н.В. Акуліч [и др.] // Медико-биологические аспекты действия физических факторов, Минск, 24-25 октября 2006 г. / Институт физиологии НАН Беларуси. Минск, 2006. – С. 41-43.
4. **Бутаков, Е.А.** Обработка изображений на ЭВМ. / Е.А. Бутаков, В.И. Островский, И.М. Фадеев. – М.: Радио и связь, 1987. – 234 с.
5. **Бутусова, Н.Н.** Опыт применения телевизионных анализаторов изображения в цитологических и иммуноморфологических исследованиях / Н.Н. Бутусова, А.В. Жукоцкий, Э.М. Коган // Биофизические методы исследования: Сб. науч. трудов. – М., 1990. – С. 133-165.
6. **Гонсалес, Р.** Цифровая обработка изображений / Р. Гонсалес, Р. Вудс. – М.: Техносфера, 2005. – 1072 с.
7. Методика цитофотометрического структурного анализа клеточного ядра (экспериментальное и клиническое обоснование) / А.В. Жукоцкий [и др.] // Автоматизация научных исследований. – Пуццино, 1985. – С. 78-87.
8. **Иваницкий, Г.Р.** Математическая биофизика клетки / Г.Р. Иваницкий, В.И. Кринский, Е.Е. Сельников. – М.: Наука, 1978. – 308 с.
9. Клетки крови – современные технологии их анализа / Г.И. Козинец [и др.]. – М.: Триада-фарм, 2002. – 200 с.
10. **Недзьведь, Л.М.** Обработка медицинских изображений гистологических объектов / Л.М. Недзьведь, С.В. Абламейко // Цифровая обработка изображений. Вып. 4. – Мн.: Ин-т техн. кибернетики НАН Беларуси, 2000. – С. 152-164.
11. **Прет, У.** Цифровая обработка изображений: в 2 кн. / У. Прет. – М.: Мир, 1982. – 790 с.
12. **Смолянинов, В.В.** Математические методы биологических тканей / В.В. Смолянинов. – М.: Наука, 1980. – 366 с.
13. **Cécile Rousselle.** Chromatin texture analysis in living cells / Cécile Rousselle, Sylvain Paillason, Michel Robert-Nicoud, & Xavier Ronot // The Histochemical Journal. – 1999. Vol. 31. – P. 63-70.
14. Image analysis of lymphocytes chromatin at the apoptosis / N.V. Akulich [et. al] // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, Supplement 2. – P-S-495.
15. **Erenpreisa, J.** The chromatin network: image analysis of differentiating chick embryo chondrocytes. / J. Erenpreisa, A. Zhukotsky, A. Kozlov // Eur J Histochem. – 1993. Vol. 37. – P. 139-147.