

УДК 611.8.018.82:004

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ СТАНДАРТНЫХ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ

М.С. Старцева, В.М. Черток

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: количественная гистохимия и иммуногистохимия, автоматизированная оценка интенсивности реакции.

Описан опыт применения стандартных компьютерных программ Adobe Photoshop и Mathcad для автоматизированного измерения интенсивности реакции в нейронах головного мозга. В качестве образцов для демонстрации возможностей этих программ использованы нитроксидергические и серотонинергические нейроны одиночного ядра, выявленные соответственно гистохимическим и иммуногистохимическим методами.

За последние годы количественная гистохимия превратилась в важнейшее научное направление в морфологии. Ее главное назначение – определение концентрации химических веществ на месте их образования. Эти данные, выраженные в условных единицах, представляют собой объективную оценку результатов гистохимического и иммуногистохимического исследований [1, 3, 6]. Для проведения измерений размеров, формы клеток, содержания в них химических компонентов выпускается специальная, большей частью автоматизированная аппаратура. Однако в связи с высокой коммерческой стоимостью таких аппаратов их применение в России ограничивается несколькими специализированными лабораториями. Значительно чаще для проведения соответствующих измерений используются более простые и дешевые приборы: одно- или двухлучевые микроспектрофотометры, денситометры и т.д. Несмотря на некоторые конструктивные отличия указанных аппаратов, в их работе используется единый принцип измерений, напрямую вытекающий из закона Ламберта–Бэра. Согласно этому закону, слои гомогенной поглощающей среды равной толщины поглощают равное количество света. С помощью микроспектрофотометров исследуют пропускание и поглощение света веществом, связанным с красителем. Измерив эти параметры, можно вычислить концентрацию красителя, связанного в результате гистохимической реакции, и, таким образом, найти концентрацию исследуемого вещества [1, 6]. Однако необходимость многократных измерений, наличие многочисленных, зачастую трудновыполнимых условий для получения объективных данных, большие затраты времени усложняют использование этого метода для решения крупных научных задач [1, 3].

В свое время для вычисления некоторых количественных параметров морфологических объектов мы предложили использовать комплекс известных

компьютерных программ, позволяющих на их основе создавать АСАИ – автоматизированные системы анализа изображений [2, 10]. При невысокой стоимости эти системы, к которым относится и предложенная нами АСАИ «Allegro-МС», точностью измерений не уступают их коммерческим аналогам. Впоследствии наши предложения были успешно использованы другими исследователями для решения различных научных задач [4, 8].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности применения известных компьютерных программ Adobe Photoshop и Mathcad, встроенных в АСАИ Allegro-МС, для измерения интенсивности реакции при гистохимических и иммуногистохимических исследованиях на примере NADPH-позитивных и серотонинергических нейронов одиночного ядра продолговатого мозга крысы.

При гистохимических исследованиях нейроны в одних и тех ядрах существенно отличаются между собой интенсивностью реакции, структурой и плотностью выпавшего осадка. Клетки, в которых осадок имеет гомогенную структуру и равномерно заполняет всю цитоплазму, встречаются довольно редко, примерно в 6–10% случаев [5, 9, 11]. Большинство же нейронов окрашивается крайне неравномерно: имеются участки цитоплазмы с отдельно лежащими мелкими и крупными, ярко окрашенными гранулами преципитата, между которыми могут находиться разного размера гранулы с бледной окраской, зачастую едва отличимые от фона. В других клетках осадок образует объемные конгломераты с более или менее интенсивной окраской. Все это в значительной степени затрудняет или делает невозможным объективную оценку данных, полученных при микроспектрофотометрии [1, 3, 6]. Кроме того, при вычислении средних значений показателя оптической плотности продукта реакции (СПОП) в ядерных или корковых образованиях мозга необходимо учитывать количество энзимопозитивных нейронов и их размеры, что требует дополнительных затрат времени и сил для таких измерений.

Опыт проведения подобных исследований показывает, что для вычисления оптической плотности продукта, образующегося в результате гистохимической или иммуногистохимической реакции, гораздо эффективнее использовать «пиксельный метод» обработки оцифрованных цветных изображений [5, 9, 11]. В его

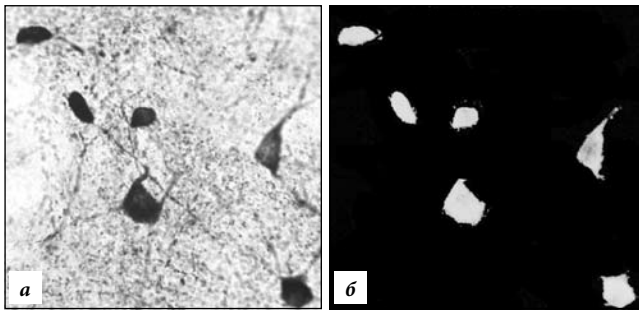


Рис. 1. Нейроны с разной степенью интенсивности гистохимической реакции в окне документа Adobe Photoshop: а – оцифрованное полноцветное изображение препарата; б – изображение того же препарата с удаленным фоном; $\times 100$.

основе лежит совершенно иной, чем при цитофотометрии, принцип измерений, который заключается в подсчете стандартными компьютерными программами Adobe Photoshop и Mathcad в автоматическом режиме суммы пикселей, образующих данное изображение в выделенном участке препарата. Предлагаемый нами метод позволяет обойти большинство из отмеченных выше трудностей, возникающих при цитофотометрии продукта реакции.

Пиксел (от англ. *picture element* – элемент изображения) – элементарное составляющее оцифрованного изображения, характеризуется определенным цветом, яркостью и, возможно, связанной с ней прозрачностью. Один пиксел может хранить информацию только об одном цвете, который и ассоциируется с ним, а яркость пикселя определяет, насколько сильно цвета пикселей этих компонентов отличаются от черного цвета. Формирование цвета в режиме RGB происходит при отображении препарата на экране компьютерного монитора, а цветовой оттенок каждого пикселя определяется интервалами между интенсивностями RGB-составляющих [7].

В нашей работе использована обычная шкала из 256 градаций интенсивности и общепринятая для RGB-модель цветового пространства, а сложение яркостей пикселей в исследуемых участках изображения позволило определить средние значения интенсивности цвета отдельных его компонентов (в нашем случае – окрашенных гранул как в цитоплазме одиночного нейрона, так и в их совокупности на препарате продолговатого мозга).

Для вычисления значений оптической плотности продукта гистохимической реакции в нейронах оцифрованное полноцветное (8 бит/пиксел) изображение препарата переносится на экран компьютера и вводится в окно программы Adobe Photoshop (рис. 1, а). Затем область фона выделяется и удаляется, а цвета инвертируются (рис. 1, б), что делает возможным автоматический подсчет суммы яркостей пикселей не только в отдельных, обведенных «световым пером» нейронах, но и автоматизированное вычисление этого показателя во всех клетках выделенного участка препарата. Кроме того, после инверсии цвета в этой

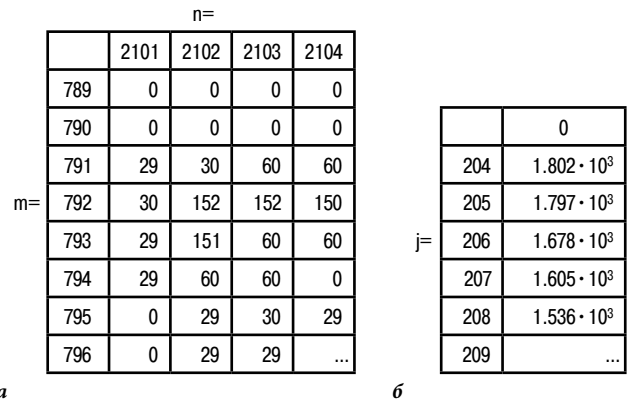


Рис. 2. Документы Mathcad:

а – изображение матрицы в цифровой форме, где каждому пикселю соответствует свой номер яркости; б – изображение матрицы с количеством пикселей, обладающих разной степенью яркости, в нейроне одиночного ядра.

программе нейроны со светлой окраской имеют более привычные для нашего восприятия меньшие значения интенсивности, а с более темной – большие, т.е. программа присваивает белому цвету – значение 1 из 256 градаций интенсивности.

После пересохранения документа из формата JPEG в формат BMP изображение автоматически перемещается в программу Mathcad с помощью встроенной функции READBMP. В программе Mathcad с использованием функции imhist происходит автоматическое построение матрицы размерностью $m \times n$, где m – количество пикселей в столбце, n – количество пикселей в строке. Каждому пикселю в такой матрице соответствует свой номер яркости (рис. 2, а).

Данные, приведенные в матрице, используются для вычисления суммарной яркости пикселей в выявленных нами нейронах (рис. 2, б).

Для вычисления суммарной яркости пикселей (I) используется следующая формула:

$$I = j_0 \times 0 + j_1 \times 1 + \dots + j_{255} \times 255 = \sum_{j=0}^{255} j_i \times i,$$

где j_i – количество пикселей с определенной яркостью.

Для нашего случая это число составляет:

$$I = \sum (i \times j_i) = 5,91 \times 10^7.$$

Полученное значение I подставляем в формулу для вычисления СПОП во всех нейронах выделенного «световым пером» участка препарата (в нашем случае NADPH-позитивных нейронов одиночного ядра продолговатого мозга):

$$\text{СПОП} = \frac{I}{S} = \frac{I}{N} r \Gamma^2 = 143,6 \text{ усл. ед.},$$

где I – суммарная яркость пикселей в выявленных нами нейронах, S – площадь нейронов, N – количество пикселей в нейронах исследуемой области, r – разрешение

документа (количество пикселей в см²), Г – увеличение, при котором производилась съемка.

В том случае, когда требуется вычислить содержание исследуемого вещества, исходя из объема клеток, в приведенной выше формуле следует заменить значения площади нейронов (S) на величину их объема (V). Заметим, что оба эти показателя вычисляются автоматически АСАИ «Allegro-МС» [2, 11].

СПОП – информативный показатель, но он дает лишь общее представление об интенсивности реакции во всех нейронах данного участка препарата. Однако уменьшение значений этого показателя, например, может наблюдаться как при сокращении числа клеток с высокой активностью фермента, так и при снижении в части из них активности реакции, что может существенно изменить представления исследователя о причинно-следственных отношениях в цепи рассматриваемых событий.

Детализировать информацию об изменениях СПОП в интересующем нас участке препарата можно в том случае, если систематизировать нейроны с различной яркостью пикселей, т.е. определить долю клеток с заданной интенсивностью реакции в выделенном участке препарата. Такие вычисления можно осуществить в автоматическом режиме с использованием программы Mathcad. Для этого необходимо предварительно выставить интервалы значений яркости пикселей для нейронов, имеющих, например, очень высокую, высокую, среднюю и низкую активность фермента в гистохимических работах, или интервалы содержания продукта реакции в клетках в иммуногистохимических исследованиях, а затем активировать функцию «count» этой программы. Понятно, что количество размерных групп можно увеличивать или уменьшать в соответствии с задачами исследования.

Как показали наши наблюдения, количественное соотношение как NADPH-позитивных, так и серотонинергических нейронов, имеющих высокие и низкие значения оптической плотности преципитата, существенно отличается в разных ядрах [5, 9, 11]. В одиночном ядре преобладают нитроксидаергические нейроны с умеренной и низкой активностью фермента, но отсутствуют с высокой, а в ретикулярном крупноклеточном ядре много клеток с высокой и очень высокой активностью энзима, но редко встречаются с низкой. Клеток с высоким содержанием серотонина всегда много в ядрах шва, но они почти полностью отсутствуют в вегетативных ядрах и одиночном ядре.

Таким образом, с помощью компьютерных программ в процессе реализации «пиксельного метода» в основном совершаются три операции, которые можно назвать «операции ЗС» – сложение, систематизация, счет. Понятно, что для использования этого метода в автоматическом режиме приведенные выше формулы и алгоритм действий по расчету показателей следует внедрить в соответствующие компьютерные

программы. После чего исследователю остается только ввести изображение в окно монитора, выделить «световым пером» контуры интересующего участка препарата для создания «морфометрической маски», а затем в считанные минуты получить значения заданных параметров.

References

1. Agroskin L.S., Papajan G.V. Cytometry. Apparatus and methods for the analysis of cell absorption. L.: Nauka. 1977. 624 p.
2. Afanasev A.A., Chertok V.M. Quantitative biomicroscopy microvasculature, *Pacific Medical Journal*. 2004. No. 2. P. 82–86.
3. Zhuravleva T.B., Prochuhanov R.A. Introduction to quantitative histochemistry of enzymes. M.: Mir, 2002. 234 p.
4. Irjanov Ju.M., Silanteva T.A., Gorbach E.V. Processing and image analysis in histological researches by using standard computer programs, *Morfologicheskie vedomosti*. 2004. No. 12. PS. 11–13.
5. Kocjuba A.E., Chertok V.M., The spatial organization of serotonergic and ergic neurons in some nuclei of bulbar department of human cardiovascular center, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 4. P. 43–46.
6. Luppа H. Fundamentals histochemistry. M.: Mir, 1980. 344 p.
7. Nedzved A.M., Ablamejko C.B. The representation of color images for the mathematical morphology, *Kompjuterij analiz dannyh i modelirovanie*: sb. nauch. statej V mezhdunar. konf. / eds. S.A. Ajvazjana i Ju.S. Harina. Minsk: BГУ, 1998. Part 4. P. 86–95.
8. Silanteva T.A., Gorbach E.N. A quantitative assessment for the intensity histological reactions to digitized images of histological preparations with using graded standards, *Ukrainskij zhurnal telemediciny*. 2010. No. 1. P. 68–71.
9. Starceva M.S., Kocjuba A.E., Koldaev V.M. The use of systems analysis to assess the significance of ergic neurons changes in the nucleus of the rats medulla oblongata with experimental hypertension, *Pacific Medical Journal*. 2011. No. 3. P. 61–64.
10. Chertok V.M., Afanasev A.A., Kocjuba A.E. The use of automated image analysis system Allegro-MS for morphometric researches, *Morfologija*. 2003. No. 4. P. 88–92.
11. Chertok V.M., Kocjuba A.E., Kocjuba E.P. Serotonin and nitroxiдаergic neurons in the nucleus of the medulla oblongata, *Morfologija*. 2011. No. 1. P. 32–37.

Поступила в редакцию 12.03.2011.

QUANTIFICATION OF INTENSITY OF HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL RESPONSES USING STANDARD COMPUTER SOFTWARE

M.S. Startseva, V.M. Chertok

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Summary – The paper describes experience in applying software programs Adobe Photoshop and Mathcad to automatically measure intensity of the responses in cerebral neurons. The authors have used nitroxiдаergic and serotoninerгic neurons of single nucleus detected by histochemical and immunohistochemical methods, respectively, as specimen needed to demonstrate the possibilities of applying the software.

Key words: quantitative histochemistry and immunohistochemistry, computer-aided response scoring.