

АВТОМАТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК

110-115
Спори́хин В.Я. докт. тех. наук., проф., Адамова Е.В. аспирант
Донецкий государственный технический университет

Рассмотрен метод определения функционального состояния клеток на основе внутриклеточных отложений диформазана - нерастворимой формы нитросинего тетразолия. Описана установка для исследования клеток. Приведен обобщенный алгоритм работы системы.

The method of a functional definition condition of cells on a basis insidecell of diformazan adjournment - insoluble form of tetrazoly is considered. The installation for research of crates is described. The generalized algorithm of system work is given.

Компьютерная обработка цифровых изображений является быстроразвивающейся областью вычислительной техники, и многие ее достижения применяются для решения задач биологии и медицины. В таких областях, как трансплантация ткани кожи в терапии тяжело обожженных, определение жизнеспособности клеток производится несколько раз при искусственном выращивании пласта кожи. Для определения жизнеспособности клеток обычно используются цитометрические методы, основанные на обработке ткани специальными химическими препаратами. В [1] предложены новые подходы и критерии для определения жизнеспособности клеток ткани, а в [2] описана система автоматизации процесса исследования состояния клеток с использованием этих критериев. Жизнеспособность клеток в большинстве случаев определяется их функциональным состоянием. Предложенную в [2] систему можно использовать и в случае определения функционального состояния клеток цитометрическими методами, что будет показано в данной работе.

Одним из наиболее простых и распространенных цитометрических методов исследования состояния человека является НСТ-тест. Данный тест является достаточно универсальным и применяется для решения различных задач [3]. Оценка состояния по

реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) используется, например, для дифференциального диагноза бактериальных и вирусных инфекций, протекающих с одинаковой клинической симптоматикой. На фоне острых бактериальных инфекций в отличие от заболеваний вирусной этиологии наблюдается достоверное увеличение количества нейтрофилов, восстанавливающих НСТ [4]. Показатели НСТ-теста рекомендуют учитывать и для оценки эффективности антибиотикотерапии: длительное сохранение повышенного уровня реакции свидетельствует о неправильном подборе антибиотика. Т. е. фактически диагноз или вывод о состоянии человека делается на основе исследования функционального состояния клеток крови – нейтрофилов.

Методика НСТ теста состоит в следующем: в свежевзятую кровь человека добавляют нитросиний тетразолий, а также некоторые другие вспомогательные вещества. Пробу инкубируют на водяной бане, делают мазки, которые затем просушивают на воздухе и подкрашивают нейтральным красным и изучают под микроскопом.

Учет реакции проводят на основании анализа нейтрофилов с темно-синими отложениями диформаза – восстановленной нерастворимой формы НСТ. В зависимости от задач исследования учет результатов можно производить 2-мя способами. При первом способе подсчитывают диформазан-положительные (активизированные) нейтрофилы в клетках. К позитивным относят клетки с четко видимыми отложениями диформаза. Результат считают в процентах. При втором способе определяют индекс активации нейтрофилов (ИАН). Способ предусматривает анализ интенсивности реакции каждого нейтрофила. ИАН представляет собой средний показатель активации системы фагоцитоза обследуемого в пересчете на 1 нейтрофил. По степени активации все нейтрофилы делят на 4 группы: 0 - клетки с единичным пылевидными гранулами или без них; 1 – клетки с отложениями, не превышающими в сумме $1/3$ площади ядра; 2 – клетки с отложениями диформаза более $1/3$ площади ядра, но не более размеров целого ядра; 3 – нейтрофилы с отложениями диформаза, превышающими размеры ядра. Ниже приведена формула вычисления индекса активации нейтрофилов:

$$ИАН = \frac{N_0 * 0 + N_1 * 1 + N_2 * 2 + N_3 * 3}{N},$$

где N_0, N_1, N_2, N_3 - число сочетаний клеток соответственно в 0, 1, 2, 3 группах,

N – общее число сочетаний нейтрофилов

При компьютерном анализе изображений клеток крови возникает несколько проблем. Одна из них – выбор непосредственно клетки нейтрофила из всего разнообразия клеток крови. Ведь на 1 мл крови приходится 5 млн. эритроцитов и 9 тыс. лейкоциты (нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, базофилы и др.). Основное отличие нейтрофилов – это сегментированное ядро. Лимфоциты имеют круглое ядро, моноциты более крупные по размерам клетки, базофилы относятся также к клеткам крупного размера, имеющим ядро похожее на трезубец. Для выявления этих особенностей требуется существенный опыт работы, учитывая, что кроме нахождения нейтрофила необходимо выявить долю диформаза в ядре клетки. В настоящее время в лабораториях обработку полученного изображения производят визуально, а для подсчетов используют примитивные аппараты. Такая работа требует не только внимания, но и занимает много времени. Создание автоматизированной системы во многом облегчит труд медицинского персонала, а также уменьшит погрешности при наблюдениях и расчетах.

Для автоматизации системы выбора клеток нейтрофила необходимы программа оконтуривания особых областей и экспертная система, различающая клетки. После нахождения клетки нейтрофила необходимо выделить ядро а также выделить долю диформаза в этом ядре, оценить площадь гранул диформаза относительно ядра клетки и классифицировать клетку по степени активности в соответствующую этой степени активности группу. Т. о. Необходимо рассчитать площадь ядра и гранулы диформаза в клетках нейтрофила а также количество клеток в группах по степени активности. Эта задача аналогична решаемой в [2], разница лишь в объектах оконтуривания. В первом случае - это ядро клетки и гранула диформаза, во втором - это сама клетка и ее ядро. Расчет и

сравнение площадей, а также учет количества клеток необходимо производить при выполнении обеих задач.

Для автоматизации процесса исследования клеток нейтрофилов необходимо компьютеризировать изображения клеток, чтобы в дальнейшем его обработать и проанализировать. С этой целью оптическое изображение необходимо преобразовать в электрические сигналы, оцифровать эти сигналы и занести в память компьютера. Для этого используются различные устройства, одним из которых является видеокамера. С помощью видеокамеры можно оцифровать уже выполненные двумерные изображения (например, фотографии), трехмерные образы или эпизоды; кроме того, видеокамеру можно подсоединить к различным приборам, например к световому или люминесцентному микроскопу [5]. Если видеокамера не обладает прямым цифровым выходом, то ее необходимо укомплектовать оцифровывающим устройством. В качестве оцифровывающего устройства может служить видеокарта компьютера.

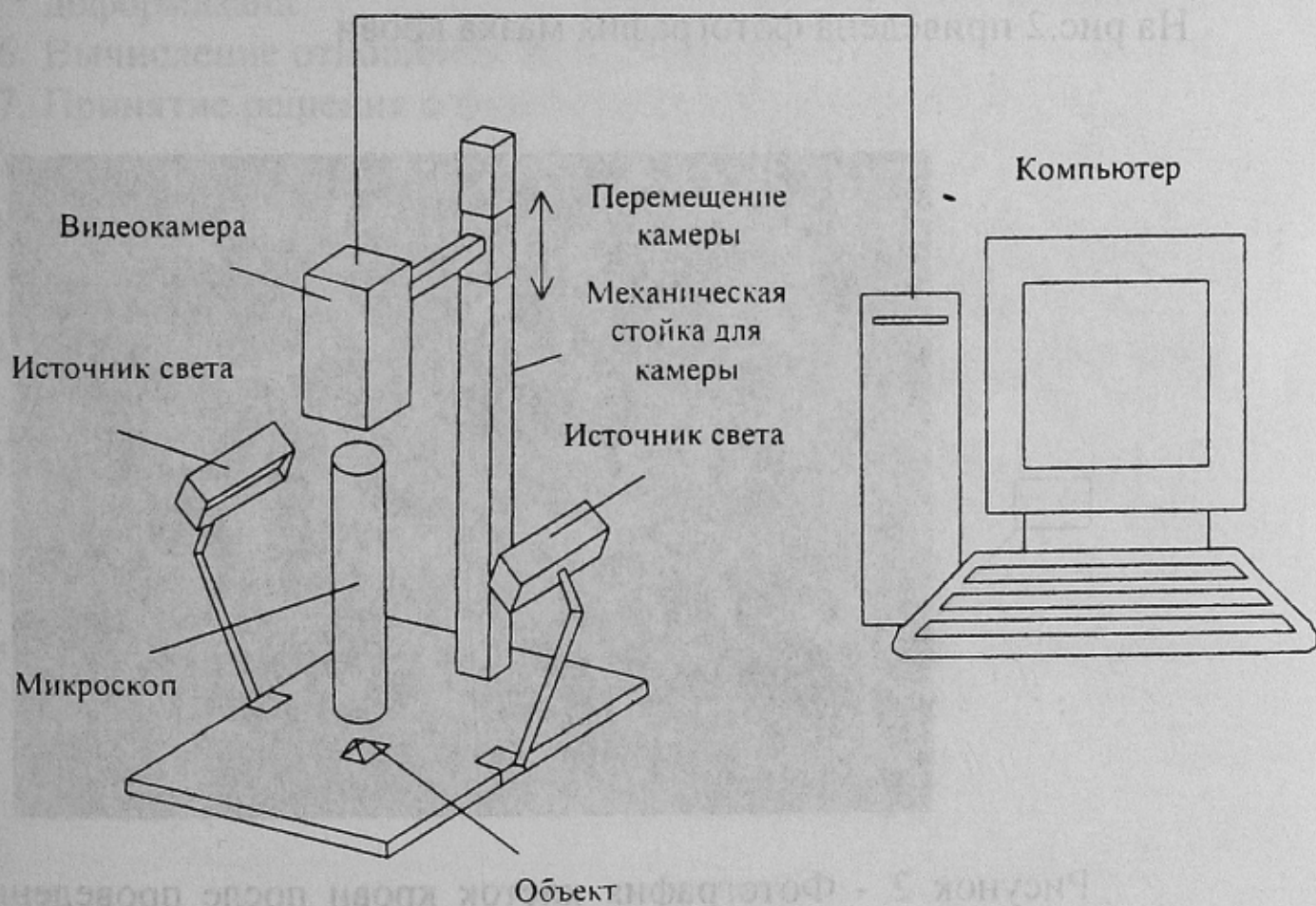


Рисунок 1 - Установка для регистрации изображения

Изображения клеток получают с помощью микроскопа, к которому крепится объектив камеры. На рис. 1 представлена установка для регистрации и последующего ввода в компьютер изображения.

Видеокамера крепится на механической стойке, которая позволяет вертикально перемещать камеру для получения требуемого изображения. Большую роль в получении изображения играет освещение, которое направляется под объектив микроскопа.

В описанной установке использованы: микроскоп люминесцентный «Люам-РЗ», камера цветная типа «OOS-35», подставка для камеры, источник света, компьютер с видеокартой ASUS AGP-V3400TNT/TV in, монитор Samsung SyncMaster 550b. Для снятия и фиксации изображения использовался программный продукт ASUS Line из комплекта поставки видеокарты.

В ходе эксперимента с помощью установки (рис. 1) были сняты 120 изображений клеток крови, которые в дальнейшем были использованы для оценки функционального состояния нейтрофилов. На рис.2 приведена фотография мазка крови

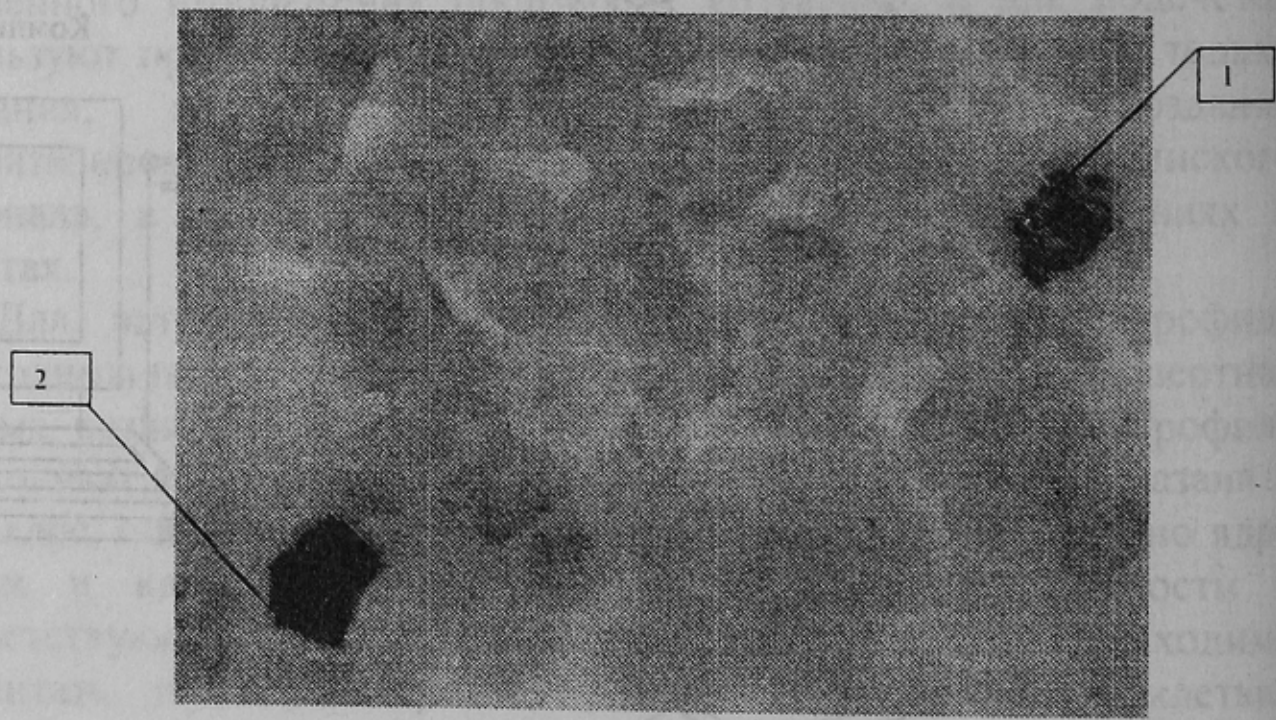


Рисунок 2 - Фотография клеток крови после проведения НСТ теста

Верхний правый нейтрофил (1) не является активным, т.к. поглощение гранул диформаза он не произвел. Нижний левый нейтрофил (2) является активным, со степенью активности группы 2, т. к. диформазан занимает больше $1/3$ ядра, однако не превышает размеров этого ядра. Клетки без ядер, являющиеся основой фотографии – эритроциты. Отличительная их особенность – отсутствие ядра и большое количество, похожее на однородную массу.

Обобщенный алгоритм автоматизации процесса определения функционального состояния клеток крови после проведения НСТ-теста можно описать следующим образом:

1. Получение цифрового изображения клеток.
2. Фильтрация изображения.
3. Распознавание нейтрофилов
4. Оконтуривание ядра клетки нейтрофила и гранулы диформаза в этом ядре.
5. Расчет площадей ядра клетки и площади гранулы диформаза.
6. Вычисление отношения этих площадей.
7. Принятие решения о функциональном состоянии клетки.

Список источников

1. Спорыхин В.Я., Адамова Е.В., Герасимов И. Г. Выбор критерия определения жизнеспособности клеток для автоматизированной системы диагностики. // Наукові праці Донецького державного університету, Донецьк, 2000 – с. 224-230
2. Спорыхин В.Я., Адамова Е.В. Автоматизация процесса отбора жизнеспособных клеток. // Вычислительная техника в информационно-управляющих системах, Мариуполь, 2000, с. 85-88
3. И. Г. Герасимов, О. А. Калуцкая. Кинетика реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами крови человека. // Цитология, 2000, том 42, № 2, с. 160-165
4. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции нитросинего тетразолия, под ред. М.Е. Виксмана
5. Микрокомпьютеры в физиологии, под ред. П. Фрейзера. Москва. «Мир», 1990, 383 стр.