УДК 611–018
© Коллектив авторов, 2013

СОВРЕМЕННЫЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В. Е. Милюков[1, 2], В. А. Мхитаров[1], К. К. Нгуен[2],
Х. М. Муршудова[1, 2], Т. С. Жарикова[1, 2]
[1]ФГБУ "Научно-исследовательский институт морфологии человека" РАМН, г. Москва, Россия
[2]ГБОУ ВПО "Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова" Минздрава России, г. Москва, Россия

Статья посвящена современным морфометрическим методикам оценки гистохимических исследований. Обсуждаются технологические аспекты применяемых ранее оптико-электронных и современных цифровых средств и программного обеспечения.
Ключевые слова: цитохимия, цитофотометрия, цифровые изображения, пиксель.

© The authors, 2013
The Modern Morphometric Techniques for Estimating Histochemical Methods

The article is devoted to modern morphometric evaluation techniques histochemical studies. The technological aspects of previously used optical-electronic and modern digital equipment and software are discussed.
Keywords: cytochemistry, cytophotometry, digital image, pixel.

На современном уровне развития науки в медицинских морфологических исследованиях все более значительную роль играют методы абстрактно-логического моделирования процессов и математической обработки полученных данных. В то же время известно, что, зная о том, как распределяются в тканях белки, жиры, углеводы, ферменты и другие вещества в норме и при различных воздействиях на организм, можно судить с большей или меньшей вероятностью и о направленности метаболических процессов в исследуемых структурах.

Качественные гистохимические методы исследования, основанные на использовании реакций, с помощью которых выявляют химические вещества в клетках тканей и органов, являются одними из фундаментальных методов цитохимии и широко используется в биологии и медицине. Современными гистохимическими методами обнаруживают в клетках аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, витамины, минеральные и другие вещества, определяют активность различных ферментов, например в цикле Кребса. Выявление этих веществ основано на специфичности реакций между химическим реактивом и субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур, и на выделении продуктов химических реакций в виде окрашенных осадков [1–3, 9].

Примерами используемых методов выявления ферментов могут служить определение неспецифической эстеразы (Muller et al., 1975, в модификации) – для оценки состояния лизосомного аппарата; сукцинатдегидрогеназы (Quaglino, Hayhoe, 1960; Нарциссов, 1969) как ключевого фермента цикла Кребса; НАДН- и НАДФН-тетразолий редуктаз (Novikoff, Masek, 1958) – в качестве показателей общей интенсивности окислительных процессов в клетке [6, 8]. Выявляли также гликоген (McManus, 1946; Hochkiss, 1948), суммарное количество нуклеиновых кислот при окрашивании смесью галлоцианин-хромовых квасцов (Boer, Sarnaker, 1956) и др. [1–4].

Количественную оценку результатов цитохимических реакций в значительном числе ранее опубликованных работ проводили посредством точечной фотометрии клеток и/или их структур (например, ядер) [5, 7]. Выбор точек измерения основывался на статистических требованиях достоверной достаточности данных с целью оценить гистохимические изменения в исследуемых органах и тканях. Раздельно определяли фоновый фототок (ФФ) и фототок от объекта (Фо), а также

“темновой” фототок – ошибка прибора (Фт). Дальнейшее определение изменений активности обменных процессов проводили на основании изменений содержания количества продуктов специфических цитохимических реакций, расчет которых производили по формуле закона Бугера–Ламберта–Бера. Содержание изучаемых веществ пропорционально количеству продуктов цитохимической реакции (С) [1].

Чем больше продукта реакции, тем больше поглощение исходного потока света, излучаемого источником (фоновый фототок), тем меньше значение фототока от объекта. По закону Бугера-Бера:

$$I=Io\times 10^{\circ} –bCx$$
или
$$Фо=Фф\times 10^{\circ} –bCx,$$

где b – коэффициент пропорциональности, не зависящий от С, х – толщина среза, отсюда:

$$\frac{Фо}{Фф}=10^{\circ} –bCx =$$
$$=> \lg \frac{Фо}{Фф} = -bCx$$
$$bCx = - \lg \frac{Фо}{Фф},$$

с учетом ошибки прибора

$$bCx = - \lg \frac{Фо - Фт}{Фф - Фт}.$$

Полагая, что коэффициент b одинаков для всех срезов, содержащих группы цитохимических реакций, и толщина срезов “х” одинакова для всех срезов, можно считать, что произведение bCx, далее обозначенное, как А, является пропорциональным количеству вещества и может служить его характеристикой, а направленность изменений А может характеризовать направленность изменений обменных процессов.

Необходимо оговорить, что толщина срезов существенно не влияет на погрешность измерения активности исследуемого обменного параметра, так как с изменением “х” изменяется и “С” – количество продуктов реакции, а соответственно и фототоки (правая часть уравнения).

Таким образом, $A= -\lg\frac{Фо-Фт}{Фф-Фт}$ в единицах оптической плотности.

Результаты измерений подлежат статистической обработке при помощи методов линейной статистики и с применением корреляционного и нелинейного регрессивного анализа.

Альтернативным, более современным и перспективным, на наш взгляд, подходом для количественной оценки результатов в этой области исследований может оказаться аппаратура, использующая цифровую технику.

Учитывая высокую специфичность реакций между химическим реактивом и исследуемым субстратом, входящим в состав клеточных и тканевых структур, выделение продуктов цитохимических реакций в виде окрашенных осадков, также высоко специфично.

Исходя из этого, мы полагаем достоверным для количественной оценки содержания продуктов реакции в объектах исследования, использование оригинальной методики, включающей в себя компьютерные программы, позволяющие оценить количество единиц площади объекта исследования, занятых продуктами цитохимической реакции.

Так же можно сказать, что количество единиц площади объекта исследования, занятых продуктами цитохимической реакции – это доля пигментов, являющихся результатом цитохимической реакции, в изначальном чистом цвете, после преобразования в черно-белые тона различной степени насыщенности.

Поскольку доля пигментов в единице площади исследуемых объектов характеризует количество продуктов цитохимической реакции в этой же площади, очевидно, что площадь, занимаемая продуктом цитохимической реакции на площади гистологического среза в объектах исследования, пропорциональна количеству субстрата, вступившего в реакцию, т.е. характеризует количество химического вещества в клетках тканей и органов, а так же – в структурных компонентах клеток этих тканей и органов. Таким образом, измерив площадь конкретного цветового диапазона, соответствующего цветовому диапазону примененного гистохимического маркера, можно получить относительную количественную характеристику химического субстрата, а, проследив эти изменения в динамике развития процессов в тканях и органах,

достоверно определить направленность этих изменений.

Для измерения площади можно применять любую морфометрическую программу, позволяющую проводить сегментацию объекта. В наших исследования использовалась программа “Image-Pro Plus”. Фотосъемка препаратов производилась на микроскопе “Axioplan 2 Imaging”, оснащенном цифровой камерой “AxioCam HRc” с разрешением 2788×2040 пк. при увеличении 640. На первом этапе изображение в программе “Adobe Photoshop” преобразовывалось в черно-белый режим. Затем была создана рамка – квадрат со сторонами 55×55 мкм, которую можно переносить на любую фотографию. С помощью этой рамки на срезе в ручном режиме выделялись интересующие области. На следующем этапе в программе “Image-Pro Plus” с помощью функции Count/Size производится выделение соответствующего цветового диапазона и подсчитывается количество пикселей данного цвета на заданной площади. Зная площадь измеренной области (55×55мкм), можно, вычислив площадь одного пикселя, получить площадь окрашенного субстрата в мкм².

Данный метод морфометрии продуктов цитохимических реакций позволяет выполнять исследование не только для определенных клеточных структур, но и для тканевых образований, например для сравнения уровня обменных процессов в единице площади эпителия, мышечной оболочки органа и т.п.

Выбор точек измерения основывается на статистических требованиях достоверной достаточности данных с целью оценить гистохимические изменения в исследуемых органах и тканях.

Очевидным достоинством этого метода является возможность анализа малых групп клеток, детектируемых на препаратах in situ, а также – доступность метода математического моделирования направленности обменных процессов и объективная сравнимость результатов исследования разных авторов при выборе одинаковых заданных параметров исследования.

Список литературы

1. *Агроскин Л. С.* Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению / Л.С. Агроскин, Г.В. Папаян. Л.: Наука, 1977. 295 с.
2. *Количественные* методы исследования функциональной активности клеток и тканей : методические рекомендации. Уфа: Изд. БГМИ, 1988. 33 с.
3. *Коржевский Д. Э.* Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. СПб.: СпецЛит, 2010. 95 с.
4. *Меркулов Г. А.* Курс патологической техники / Г.А. Меркулов. Л.: Медицина, 1969. 423 с.
5. *Исследование* фотометрических характеристик ядер лимфоцитов человека и крупного рогатого скота в норме и при патологии / В.Д. Новиков [и др.] // Цитология. 1992. Т. 34, № 7. С. 47–52.
6. *Сапожников А. Г.* Гистологическая и микроскопическая техника (руководство) / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич. Смоленск: “САУ”, 2000. 476 с.
7. *DNA* analysis of laryngeal carcinoma cells by flow cytometry: the histoclinical factors and their significance / Dobroś W [et al.] // J Otolaryngol. 2000. Vol. 29, № 6. P. 371–376.
8. *Novikoff A. B.* Biochemical and staining reactions of cytoplasmic constituens / A. B. Novikoff // Developing cell systems and their control; edit. D. Rudnick D. New York: The Ronald Press Company, 1960. 167 p.
9. *Enzyme* patterns and flow cytometric DNA measurements in colorectal hyperplastic polyps and tubular adenomas less than five millimeters / Vatn M.H. [et al.] // Scand J Gastroenterol. 1989. Vol. 24, № 9. P. 1031–1038.

Информация об авторах

Милюков Владимир Ефимович – д.м.н., профессор, профессор кафедры анатомии человека лечебного факультета ГБОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М.Сеченова” Минздрава России; профессор кафедры военно-полевой хирургии института усовершенствования врачей МУНКЦ им.П.В.Мандрыка МО РФ. 103904 г. Москва, ул. Моховая, дом 11 стр. 10. E-mail: Milyucov@mail.ru

Мхитаров Владимир Аршакович – к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ “Научно-исследовательский институт морфологии человека” РАМН. 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Муршудова Хеяля Муршуд кызы – аспиранта кафедры анатомии человека лечебного факультета ГБОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М.Сеченова” Минздрава России. E-mail: hot_az_heart@mail.ru

Нгуен Као Кыонг – аспирант кафедры анатомии человека лечебного факультета ГБОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М.Сеченова” Минздрава России. E-mail: cuongthao2002@yahoo.com

Жарикова Татьяна Сергеевна, аспирант кафедры анатомии человека лечебного факультета ГБОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М.Сеченова” Минздрава России. E-mail: wise_tanya@mail.ru

Поступила в редакцию 2.08.2013 г.