

УДК 611.018.3/.4/.8:611.984.001.0

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МЕТАХРОМАЗИИ СУСТАВНОГО ХРЯЩА В ТЕЛЕПАТОЛОГИИ

М.М. Щудло, Т.А. Ступина, Н.А. Щудло
е-mail: telemed@rncvto.kurgan.ru

Курганский филиал ЮУНЦ РАМН, г. Курган, Россия;
Государственное учреждение Российский научный центр
«Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова, г. Курган, Россия

Статья поступила 13 октября 2004 г.

Введение

Явление метакромазии (МТХ) известно [2] как «...окрашивание структуры в цвет, отличный от цвета используемого красителя». МТХ при окраске тиазиновыми красителями свидетельствует о наличии в срезе определенных химических соединений, несущих кислотные группы, например $-\text{OSO}_3^{2-}$ и $-\text{COO}^-$, от плотности расположения которых зависит цвет, интенсивность и устойчивость реакции [4]. В суставном хряще изменения реакции МТХ характеризуют сдвиги его структурной организации в различных экспериментальных [18] или патологических условиях [19]. Известны полуколичественные методы визуальной экспертной оценки количества осадка красителя в баллах [11]. Большие возможности количественных исследований обеспечивает телепатология [6, 16, 20], хотя информации о применении телемедицинских технологий для анализа метакромазии нам встретить не удалось. Это определило цель работы — разработать и апробировать алгоритм компьютерного анализа метакромазии в транспортированных по телекоммуникационным каналам полноцветных цифровых изображениях гистохимических препаратов суставного хряща.

1. Методика исследования

В качестве объекта исследования использован суставной гиалиновый хрящ наружного мыщелка бедра собак в процессе удлинения голени. После альдегидной фиксации образцы заключали в аралдит. Перпендикулярные суставной поверхности полутонкие (1,0 мкм) срезы готовили на ультратоме «Nova» (LKB, Швеция) и окрашивали метиленовым синим. На разных увеличениях большого исследовательского фотомикроскопа «Opton» (Германия) с аппаратно-программным комплексом «DiaMorph» (Москва) получали двадцатичетырехбитные цифровые изображения в цветовых моделях RGB и Lab [15], транспортировали их по локальной сети в отдел телемедицины и компьютерного анализа информации для исследования в программах «Adobe PhotoShop» и «DiaMorph» разных версий. Измерения проводили в микрометрах после геометрической калибровки изображений по оцифрованному при том же увеличении изображению шкалы объект-микрометра. При денситометрии пользовались общепринятой шкалой из 256 градаций интенсивности [5]. Цифровой материал анализировали в программе «Microsoft Excel» по критериям вариационной и непараметрической статистик [3, 10]. При оценке объемных отношений [1, 8] в трехмерном объекте по результатам точечной планиметрии его двумерных эквивалентов (изображений гистологических срезов) исходили из принципа Delesse [14] — основы стереологии.

2. Результаты

В окрашенных метиленовым синим препаратах суставного хряща (рис. 1) обнаружена разной интенсивности метахромазия в топографически различных зонах межклеточного матрикса, что определило направления исследования:

1. Топография зон метахромазии в объекте исследования.
2. Цветовые характеристики орто- и метахромазии разной интенсивности.
3. Размерные характеристики зон метахромазии в разных участках объекта исследования.
4. Объемные отношения орто- и метахроматически окрашенных структур в объекте.

1. В поверхностной зоне мелкоточечные участки метахромазии выявляются на поверхности демаскированных в условиях эксперимента пучков коллагеновых волокон. В гомогенном матриксе промежуточной зоны небольшие ортохроматически (0) окрашенные участки соседствуют с обширными слабо метахроматическими (1) полями. Глубокая зона отличается выраженной интенсивной метахромазией территориального матрикса (3) и присутствием в межтерриториальном матриксе участков с метахроматической реакцией слабой и средней интенсивности (2). По направлениям 2, 3 и 4 информация может быть получена не только описательным, но и количественными методами. При реализации последних наиболее интересными нам представились возможности стереологического анализа результатов компьютерной морфо- и колориметрии транспортированных по сети цифровых изображений микропрепаратов.

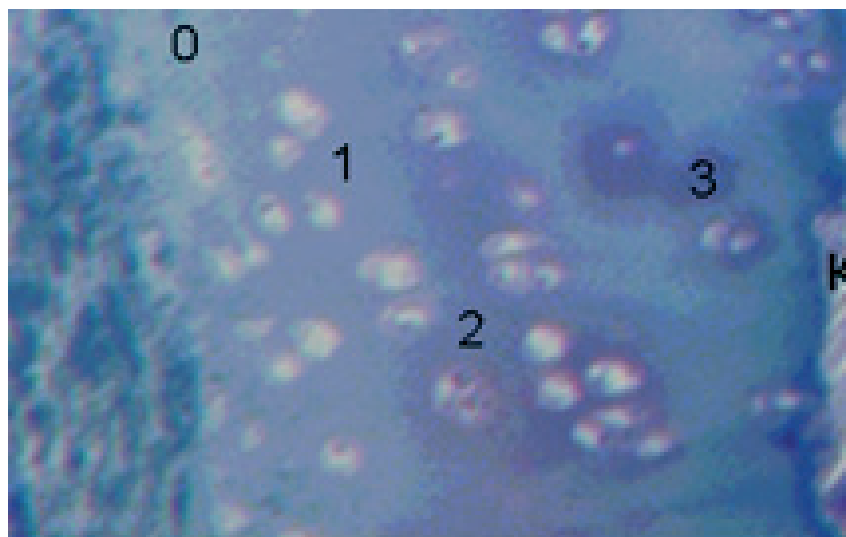


Рис. 1. Цифровое полноцветное изображение микропрепарата суставного хряща:

К — кость, 0 — орто- и 1—3 — метахроматически окрашенные участки межклеточного матрикса. Полутонкий срез, метиленовый синий. Об. 6,3; ок. $\times 12,5$.

2. Компьютерная колориметрия изображений позволила получить количественные цветовые характеристики орто- и метахроматических участков (рис. 2, таблица).

Во всех случаях преобладал синий цвет, различия же определялись взаимоотношениями двух остальных составляющих. В ортохроматических участках второй по значению — зеленый компонент отделен от синего интервалом в 25 и более условных единиц (у. е.) в 256-ступенчатой шкале, настолько же уступает зеленому значение третьей — красной составляющей.

Метахроматическое окрашивание сопровождается уменьшением зелено-красного интервала до ≈ 10 у.е. при слабой и до 5 у.е. и ниже — при средней степенях выраженности реакции. В очагах метахромазии высокой интенсивности значение красной составляющей выводит ее на вторую позицию, что характерно для γ -метахромазии.

3. Размерные характеристики метахроматически окрашенных участков исследованных изображений определяли, применяя стандартные морфометрические функции (длина отрезка, площадь, большой и малый диаметры и т. п.) использованных программ. Значения параметров выражали в пикселах, а после геометрической калибровки по эталону длины — в микрометрах.

4. Для анализа объемных отношений орто- и метахроматически окрашенных структур в полноцветных цифровых изображениях специально разработана и апробирована тестовая решетка равноудаленных точек с прозрачными центрами (рис. 3).

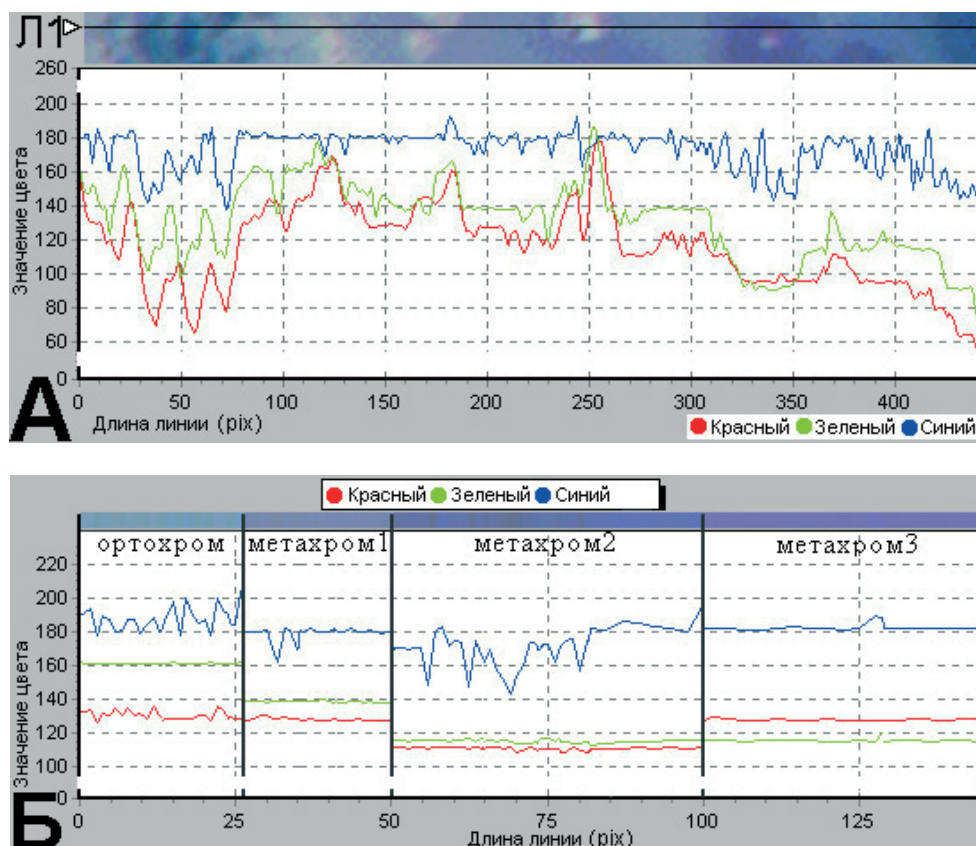


Рис. 2. Результаты компьютерной колориметрии по RGB-каналам:

А — по линии Л1; Б — отношения цветовых составляющих в зонах орто- и разной интенсивности метахроматического окрашивания

Результаты компьютерной колориметрии (в моделях RGB и Lab) участков разной степени выраженности (0, 1, 2, 3) метахроматической реакции

Цветовая модель	RGB			Lab (HSB)			Ss — доли (%) в общей площади
Параметры	красный	зеленый	синий	цв. тон	насыщ.	яркость	
Зона 0 — ортохроматическое окрашивание							
Среднее	130,74	161,1	187,44	208,07	76,41 %	62,25 %	50,05
Стандартная ошибка	±0,31	±0,03	±0,71	±0,45	±0,71	±0,11	
Зона 1 — слабая метахромазия							
Среднее	127,76	138,79	178,99	227,43	72,59 %	57,87 %	25,61
Стандартная ошибка	±0,1	±0,06	±0,51	±0,21	±0,59	±0,066	
Зона 2 — метахромазия средней интенсивности							
Среднее	111,18	115,31	173,00	236,29	89,83 %	51,86 %	10,91
Стандартная ошибка	±0,08	±0,07	±0,87	±0,13	±0,87	±0,12	
Зона 3 — метахромазия высокой интенсивности							
Среднее	127,41	115,65	182,31	249,98	92,61%	55,26 %	12,66
Стандартная ошибка	±0,05	±0,04	±0,14	±0,05	±0,13	±0,02	

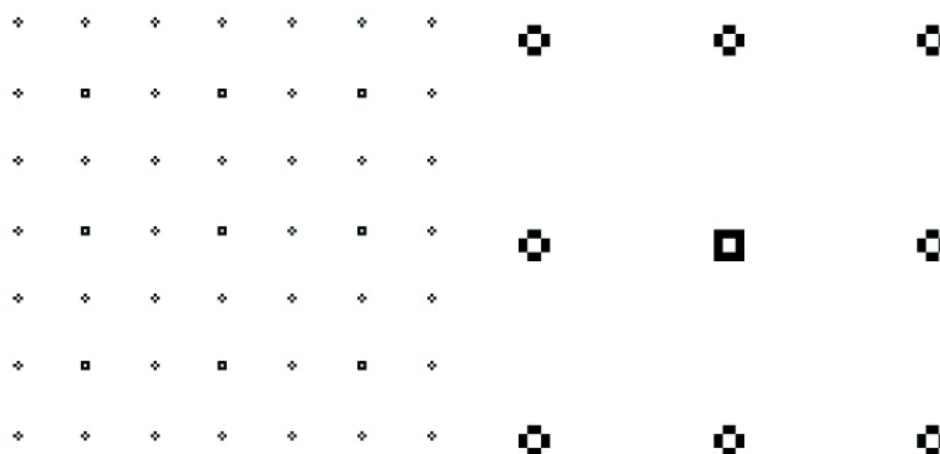


Рис. 3. Изображение тестовой решетки равноудаленных точек с прозрачными центрами (слева) и ее фрагмент при большем увеличении

После случайного совмещения решетки с исследуемым изображением колориметрировали попавшие в центры ее узлов пиксели. Сопоставляя результаты с предварительно полученными колориметрическими характеристиками различно окрашенных зон, определяли количество отнесенных к каждой из них узлов решетки и рассчитывали их доли в общей площади изображения (см. таблицу).

Результаты точечно-счетной планиметрии в свою очередь служили основанием для расчета объемных отношений в трехмерном объекте по репрезентативной серии его двумерных эквивалентов (срезов).

3. Обсуждение

Авторы полагают, что два вопроса заслуживают обсуждения в свете полученных данных:

1. Возможности практического использования предложенной технологии.
2. Перспективы развития количественной телепатологии в регионах России.

По вопросу 1 отметим, что по результатам компьютерной колориметрии получены четкие количественные критерии, позволяющие обнаруживать метахромазию, определять ее тип (β или γ) и интенсивность. При этом получаемые табличные данные служат основанием для стереологического анализа с возможностью регистрировать с высокой точностью (до 1 μm) изменения такого параметра как объемные плотности ортохроматической и разной интенсивности метахроматических зон. Применение полутонких (1 μm) срезов позволило пренебречь эффектом Холмса [12] при стереологическом анализе на светооптическом уровне исследования. Мы располагаем предварительными наблюдениями, позволяющими предположить универсальность указанных критериев количественной оценки метахромазии для различных объектов. Это открывает перспективы применения описанной технологии во всех случаях, когда реакция метахромазии используется как диагностический тест [13], а динамика изменений ее характеристик представляет научный интерес или имеет прогностическое значение [7, 17]. В нашем случае возможность количественно оценивать интенсивность МТХ позволяет в топографически различных участках хряща определять природу химических сдвигов, так как известна [9] зависимость устойчивости и степени выраженности реакции от плотности расположения свободных анионных групп в молекулах субстрата. МТХ в разволокненной поверхностной зоне вызвана высвобождением реактивных групп COOH , SO_3H демаскированных протеогликанов и гликозаминогликанов (в основном сульфатных групп кислых мукополисахаридов). Чем сильнее выражено разволокнение межклеточного вещества, тем интенсивнее МТХ. МТХ территориального и межтерриториального матрикса в средней и глубокой зонах хряща обусловлена усиленной продукцией хондроцитами сульфатированных гликозаминогликанов, концентрация которых снижается по мере удаления от клеток.

По вопросу 2: разработанная технология анализа полноцветных изображений по результатам компьютерной колориметрии применима во всех случаях полихромного окрашивания микропрепаратов, когда не только контрастные (основные, чистые) цвета, но и оттенки их несут смысловую информацию. Это открывает перспективу ее использования в количественной телепатологии. Принципы организации этого направления телемедицины изложены С.П. Мироновым с соавторами [6]:

«Цифровые микроскопические изображения могут передаваться в *научно-исследовательский центр* (разрядка наша — М.Щ.), занимающийся количественным анализом. В таких программах участвует большое число патологоанатомических отделений или бюро, но каждое из них передает в центр относительно небольшое число изображений. Наибольшие сложности здесь представляют адекватная подготовка препаратов и правильный отбор снимков». От себя добавим, что, очевидно, в первую очередь нужен специализированный центр количественной телепатологии с соответствующим кадровым, техническим, программным и, главное, финансовым обеспечением.

Заключение

В окрашенных метиленовым синим препаратах суставного хряща в процессе удлинения голени собак по Илизарову обнаружена разная интенсивность метахромазия в топографически различных зонах межклеточного матрикса. Цифровые изображения гистохимических микропрепаратов транспортировали по телекоммуникационным каналам и анализировали в программах Adobe PhotoShop и DiaMorph разных версий. Компьютерная колориметрия позволила получить количественные характеристики цветовых параметров орто- и метахроматических зон и при точечно-счетной планиметрии относить узлы тестовой решетки к одной из них для оценки объемных отношений в трехмерном объекте. Применение полутонких эпоксидных срезов дало возможность пренебречь эффектом Холмса при стереологическом анализе на светооптическом уровне. Возможность количественно оценивать интенсивность метахромазии позволяет в топографически различных участках хряща определять природу химических сдвигов, так как известна зависимость устойчивости и степени выраженности реакции от плотности расположения свободных анионных групп в молекулах субстрата. Технология стереологического анализа полноцветных цифровых изображений по результатам компьютерной колориметрии применима в количественной телепатологии во всех случаях полихромного окрашивания микро- и макропрепаратов.

Список литературы

1. Системная стереометрия в изучении патологического процесса / Г.Г. Автандилов, Н.И. Яблчанский, В.Г. Губенко. М.: Медицина, 1981. 189 с.
2. Гистология, введение в патологию / Н.В. Бойчук, Р.Р. Исламов, Э.Г. Улумбеков и др. М.: Гэзтар медицина, 1998. 950 с.
3. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: Специальный справочник. СПб.: Питер, 2001. 754 с.
4. Кононский А.И. Гистохимия. Киев: Выща школа, 1976. 280 с.
5. Маркварде М.М., Белодед Л.В. Способ определения оптической плотности костной структуры зубочелюстной системы. Радиология в медицинской диагностике (современные технологии) / Материалы Международного межуниверситетского семинара по диагностической и терапевтической радиологии. Минск, 2003. С. 104—106.
6. Миронов С.П., Эльчиан Р.А., Емелин И.В. Практические вопросы телемедицины. М.: Главный научно-исследовательский вычислительный центр Медицинского центра Управления делами Президента Российской Федерации, 2002. 182 с.
7. Наумова Е.М., Сергеева В.Е. Гистохимический анализ популяции тучных клеток тимуса мышей при введении АКГГ1–24 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2004. Т. 137, № 7. С. 107—110.
8. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Г.И. Непомнящих. М.: Наука, 1986. 159 с.
9. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М.: Изд-во иностр. лит., 1962. 964 с.
10. Уткин В.А. Статистические технологии в медицинских исследованиях. Пятигорск, 2002. 215 с.
11. Хрящ / В.Н. Павлова, Т.Н. Копьева, Л.И. Слуцкий, Г.Г. Павлов. М.: Медицина, 1988. 320 с.

12. Проблема эффекта Холмса в количественной телепатологии (методические аспекты) / М.М. Щудло, Т.Н. Варсегова, Т.А. Ступина, И.В. Борисова, С.В. Гордичук, Л.В. Воинкова, А.В. Кобелев // Изв. Челябинского науч. центра УрО РАН, 2003. № 1. С. 1—5.
http://www.sci.urfu.ac.ru/news/2003_1/2003_1_16_1r.pdf
13. Costa E.N., Beletti M.E. Abnormality in the dna-protein complex of human spermatozoa as assessed by the «Induced Metachromasy» test // Bioscience Journal: Revista do Centro de ciências biomédicas. Brasil. Vol. 12. <http://www.biosciencejournal.ufu.br/abstracts/volume12.htm>
14. Delesse A.E. Procédé mecanique pour determine la composition de roches // C. R. Acad. Sci., 1847. Vol. 25. P. 544.
15. Digital color Imaging in biomedicine (electronic version) / Ed. Hiroshi Tanaka, Yoichi Miyake, Masahiro Nishibori, Debu Mukhopadhyay.
<http://biocolor.umin.ac.jp/book200102/>
16. Furness P.N. The use of digital images in pathology // J. Pathol., 1997. Vol. 183, № 3. P. 253—263.
17. Garfinkel-Shweky D., Yariv S. Metachromasy in clay dye systems: the adsorption of acridine orange by Na-beidellite // Clay Minerals, 1999. Vol. 34, № 3. P. 459.
18. Lietman S.A., Miyamoto S., Brown P.R., Inoue N., Reddi A.H. The temporal sequence of spontaneous repair of osteochondral defects in the knees of rabbits is dependent on the geometry of the defect // J. Bone Joint Surg. Br., 2002. Vol. 84, № 4. P. 600—606.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12043787&dopt=Abstract
19. Stanescu R., Stanescu V., Maroteaux P. Homozygous achondroplasia: morphologic and biochemical study of cartilage // Am. J. Med. Genet., 1990. Vol. 37, № 3. P. 412—421.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=91082853
20. Yagi Y., Gilbertson J.R. Digital imaging in pathology: for standardization // http://www.itu.int/itudoc/itu-t/workshop/e-health/wcon/s7con001_ww9.doc.