

# МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

УДК 577.1.615.2

©Коллектив авторов

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЬЮТЕРНОЙ МОРФОДЕНСИТОМЕТРИИ В СОВРЕМЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.**

**Э.М. КОГАН, А.В. ЖУКОЦКИЙ, В.М. ГОВОРУН, К.Т. МОМЫНАЛИЕВ,  
И.А. ПОТАПОВ, Н.И. ЯКУБОВА, В.В. ЯЛПАЕВ.**

НИИ физико-химической медицины МЗ РФ.  
Москва, ул. М. Пироговская, д. 1а.

В настоящее время особенно широко распространение получили технологии, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), в частности *in situ* ПЦР.

Однако для широкого внедрения в клиничко-лабораторную практику этих методов необходимо:

повышение надежности принимаемых решений;

улучшение качества изображения для выявления более тонких различий объектов, повышения количества извлекаемой информации; автоматизированная регистрация результатов анализа;

применение оригинальной компьютерной видеотехнологии, адаптированной к специфике биомедицинских объектов - морфоденситометрии - позволяет успешно решать следующие задачи:

на основе использования количественных оптико-геометрических показателей оптимизировать условия проведения ПЦР *in situ*;

количественно и субпопуляционно характеризовать степень инфицированности единичных клеток бактериальным инфектом, а также ядер клеток - вирусным, что особенно актуально для внедрения молекулярно-генетических методов в клиничко-диагностическую практику;

автоматически регистрировать результаты анализа.

Возможности новой видеокомпьютерной технологии могут найти применение также в генодиагностике и генотерапии.

**Ключевые слова:** компьютерная морфоденситометрия, обработка биомедицинских изображений, ПЦР *in Situ*, гепатит, распределение ампликонов.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время молекулярно-биологические технологии находят все большее применение в клиничко-лабораторной практике. Широкое распространение получили технологии, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), в частности *in situ* ПЦР. Метод стал активно развиваться в последнее время благодаря тому, что он позволяет не только специфически амплифицировать какую-либо последовательность ДНК в отличие от водно-растворимой ПЦР, но и локализовать ее внутри клетки [1,2].

Однако для широкого внедрения в клиничко-лабораторную практику этих методов необходимо:

-повышение надежности принимаемых решений на основе каких-либо количественных методов регистрации (цитофото/флуориметрия);

-улучшение качества изображения методами цифровой обработки изображений (Image Analysis) для выявления более тонких различий объектов, повышения количества извлекаемой информации вследствие визуальной оценки;

-автоматизированная регистрация результатов анализа, что позволит ускорить и стандартизировать работу клинико-диагностической лаборатории, используя для этой цели максимально надежные и достаточно дешевые оптоэлектронные системы.

В тоже время известно, что применение видеокомпьютерных технологий позволяет решить часть этих проблем в водно-растворимой ПЦР. Так, например, известны коммерческие аппараты для регистрации результатов гель-электрофореза (Фирма "Bio-Rad, США). Однако проблема оценки ПЦР *in situ*, т.е. количественная регистрация ампликонов непосредственно в клетках, находится на ранних стадиях своего решения. Имеющиеся в арсенале морфологов компьютерные средства анализа изображений перечисленным выше требованиям в нужной степени не соответствуют. Нами для решения проблем, связанных с внедрением в клинико-лабораторную практику *in situ* ПЦР, использована современная видеокомпьютерная специализированная для проведения количественных биомедицинских исследований морфологических объектов (цито/гисто препаратов и др.) технология - компьютерная морфоденситометрия (КМДМ), разработанная в НИИ ФХМ [3,4,5,6]. Этот метод количественной морфологии предназначен для объективизации и повышения точности диагностики и контроля за лечением, включает: теоретико-экспериментальное обоснование, способы подготовки исследуемых морфологических (цитологических, гистологических) препаратов, программно-аппаратную систему компьютерной фото/флуориметрии, морфометрии, алгоритмы обработки изображения (Image processing), усовершенствованные методы статистической обработки результатов исследований [4,7,5,8,9,10]. Цель настоящей работы: оценить возможности новой компьютерной видеотехнологии - компьютерной морфоденситометрии (МДМ) в конкретных задачах, основанных на применении современных молекулярных технологий, в частности *in situ* ПЦР.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** *In situ* ПЦР. Принцип метода полимеразной цепной реакции *In situ* показан на рис. 1. *In situ* ПЦР состоит из нескольких частей:



Рисунок 1  
Принцип *In situ* ПЦР на стекле

1. Получение тканевых срезов или клеточных монослоев.
2. Их фиксация на поверхности предметного стекла.

3. Обработка протеолитическими ферментами для увеличения проницаемости клеток.
4. Нанесение на срез ПЦР-смеси для амплификации ДНК-мишени.
5. Герметизация ПЦР-смеси с помощью зажимов и клипс.
6. Амплификация ДНК
7. Отмывка и детекция амплифицированного фрагмента ДНК.

Нами были использованы следующие культуры клеток (культура клеток эпидермоидной карциномы, клетки HeLa, гепатоциты с интегрированным геномом HBV). Клеточные монослои, фиксированные на стеклах, последовательно инкубировали в 0,02 М HCl, в 0,01% (v/v) Тритон-Х 100 (Sigma) и промывали в фосфатном буфере (PBS). После чего обрабатывали протеиназой К (Promega, США) при 37°C. Стекла с монослоями клеток промывали в течение 2 мин в PBS, содержащим 2 мг/мл глицина. Для инактивации эндогенной щелочной фосфатазы стекла помещали в 20% уксусную кислоту 4°C. Затем промывали в PBS и деионизованной воде. Клеточный монослой подвергали последовательной дегидратации восходящими концентрациями спирта до 96%.

Для детекции *M. hominis* в клеточной культуре использовали праймеры, специфичные для гена P50-адгезина *M. hominis*. Для детекции вируса гепатита В использовали коммерческие наборы, предоставленные НПФ "Литех" (Россия). Для амплификации Alu-последовательностей использовали данные работы Batzer [11]. Реакционная смесь состояла из следующих компонентов: IX ПЦР буфер, 3 мкМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ, 2,5 мМ биотин-11-дУТФ и 0,5 мкМ каждого праймера и 10 единиц AmpliTaq DNA (Perkin-Elmer). После герметизации стекла зажимами (AmpliCover Disc и Clips, Perkin-Elmer, США), их помещали в программируемый термостат. ПЦР-протокол состоял из начальной денатурации: 94°C 5 мин; амплификации 94°C 40 сек, 55°C 90 сек в течение 30 циклов и дополнительной инкубации 72°C 7 мин. После завершения амплификации препарат промывали 2 x SSC 5 мин и инкубировали в течение 30 мин в буфере - 0,05 М Трис-HCl, 0,15 М NaCl, pH 7,5 (TBS), содержащим блокинг-реагент (Boehringer Mannheim) после чего промывали в TBS буфере. Амплифицированный фрагмент ДНК выявляли методом связывания биотина конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза с последующей цветной реакцией с 5-бромо-4-хлоро-3-индолилфосфатом (BCIP) и нитроголубым тетразолием (NBT), осуществляемой щелочной фосфатазой с образованием темно-синего нерастворимого осадка согласно протоколу Boehringer Mannheim. Реакцию проводили в темном месте при комнатной температуре под контролем микроскопа (Люмам-И2, Ломо) и прекращали после образования окраски ополаскиванием препарата дистиллированной водой.

**Компьютерная морфоденситометрия (КМДМ)** включает в себя совокупность базовых программных и аппаратных средств, а также специализированных программ для объективизации морфо-функционального состояния биомедицинских объектов для целей ранней диагностики, количественной оценки эффективности лечебных воздействий и прогноза. Аппаратно-программный комплекс ДиаМорф состоит из устройств ввода (микроскоп, негатоскоп, сканер, трансиллюминатор), телевизионной камеры, видеоконтрольного устройства, ЭВМ с аналого-цифровым преобразователем и специализированным программным обеспечением для анализа биомедицинских объектов, устройства печати.

Разработанное нами специализированное программное обеспечение включает базовые программы: ДиаМорф -Cito (программная среда обработки и анализа изображений) и ДиаМорф-ИПСО (интегрированный пакет прикладных программ анализа данных для сложно структурированных объектов) [12,13,9]. ИПСО позволяет проводить углубленный и всесторонний анализ диагностической значимости оптических, геометрических показателей цитологических и гистологических объектов и результатов клинико-лабораторных исследований. В ИПСО реализованы разнообразные алгоритмы статистической обработки данных

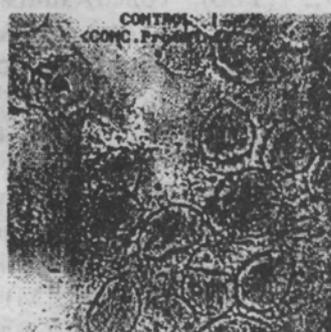
и теории распознавания образов, накопленные за 20 лет работы с клиническими морфологами, цитологами, гистологами, патологоанатомами, врачами-клиницистами.

Эти методы включают в себя выявление из множества оптических, морфометрических, морфоденситометрических и клинико-лабораторных показателей наиболее информативных признаков. Таким образом, можно построить из набора неспецифических (субклеточных, клеточных, тканевых) признаков специфическую комбинацию признаков, характеризующую патологическое состояние объекта на органном уровне.

В клинической морфологии впервые на базе ИПСО объективизирован синдромальный подход, характеризующийся описанием патологии не только с помощью признаков (количественных или качественных), но и учитывающий их взаимозависимость.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ** Полученные результаты можно распределить на следующие задачи по количественной оценке результатов ПЦР *In situ*. Задача №1. В настоящем примере отрабатывались оптимальные условия для проведения *in situ* ПЦР на культуре клеток эпидермоидной карциномы. В качестве зонда использовали стандартные Alu-последовательности. В качестве отрицательного контроля использовали неамплифицированные клетки карциномы. Цель эксперимента - подбор оптимальных концентраций протеиназы К и ПЦР реагентов, выбор оптимальных условий.

Клетки карциномы фиксировали на стекле, затем обрабатывали различными концентрациями протеиназы К, после чего проводили специфическую амплификацию Alu-последовательностей. Для количественного анализа клеток использовали метод МДМ, реализованный в аппаратно-программном комплексе "ДиаМорф". Изображения клеток непосредственно с микроскопа вводились в память компьютера с помощью TV-камеры. На рис. 2. приведены фрагменты изображения клеток карциномы, обработанных различными концентрациями



а



б

Рисунок 2.

Видеоархив клеток культуры карциномы (контроль), обработанные протеиназой К высокой 10 мкг/л(а) и низкой 1 мкг/л (б) концентрации ;

протеиназы К: а) 10 мкг/мл и б) 1 мкг/мл, взятых из компьютерного видеоархива. Обращает на себя внимание, что компьютерное повышение качества изображения позволяет визуализировать неокрашенные объекты. На рис. 3. приведены основные этапы видеокомпьютерной морфоденситометрии (МДМ). На рис. 3а приведено изображение ядра, покрытое линиями сканирования, на рис. 3б приведена двухмерная реконструкция распределения оптической плотности в ядре. По осям: X - пространственная координата, по Y - оптическая плотность. Каждый пик

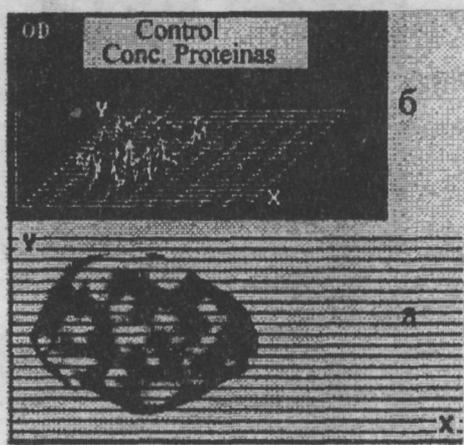


Рисунок 3.

На изображение ядра карциномы, наложены линии сканирования (а) и построена стереологическая реконструкция ядра (б).

(локальная оптическая плотность) соответствует положению ампликона в ядре, т.о. на рис. 3б приведена топология распределения ампликонов в интерфазном хроматине ядра клетки. Следующим этапом работы была отработка оптимальной концентрации протеиназы К, которая является критической для проведения *in situ* ПЦР. На рис. 4. приведен пример вымывания ампликонов из ядра, в результате чрезмерной обработки протеазной. На рис. 4б явлению вымывания соответствует примембранная топология ампликонов - "маргинация" (преимущественно их примембранная локализация под ядерной мембраной). Таким образом, применение КМДМ позволило оптимизировать проведение *In situ* ПЦР.

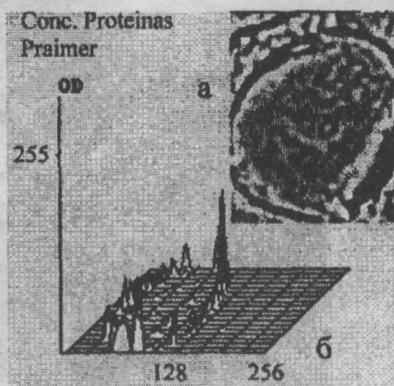


Рисунок 4.

Стереологическая реконструкция ядра при неоптимальной концентрации протеиназы К: а). Ядро клетки, обработанное протеиназой высокой (10 мкг/мл) концентрации; б). На трехмерном профиле видно, что "сигнал" расположен примембранно.

Задача №2. В чашки с монослоем клеток HeLa вводили  $1 \times 10^6$  КОЕ *M. hominis* в 1 мл свежей среды ЕМЕМ с 2% эмбриональной сывороткой. Зараженные и

контрольные культуры инкубировали при 37°С и отбирали для фиксации через 24, 48 и 72 часа, для чего супернатант отбрасывали, а клеточный монослой после отмывания в фосфатно-солевом буфере (PBS) фиксировали в метанол-ледяной уксусной кислоте 3:1 (v/v). Задача - оценить степень инфицированности клеток микоплазмой.

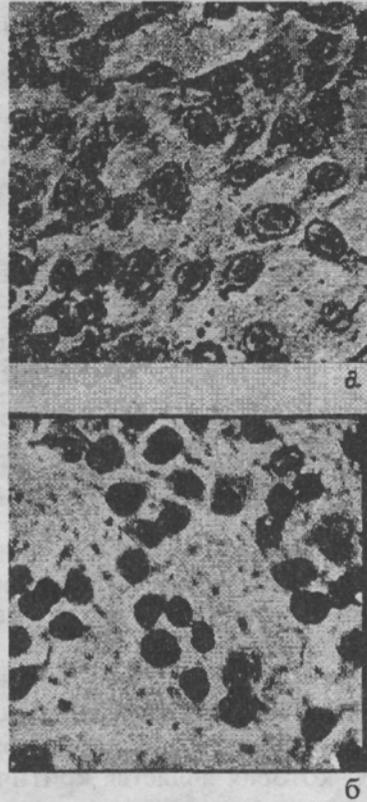


Рисунок 5.

Видеоархив монослая клеток HeLa: а). Контроль; б). Эксперимент. В ядрах наблюдается скопление микоплазмы, меченной флюоресцентным красителем.

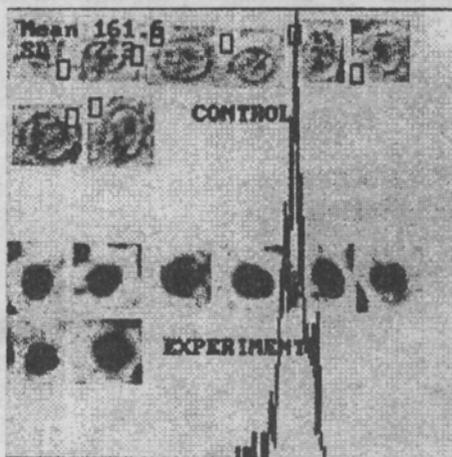


Рисунок 6.

Видеоархив монослая клеток HeLa. Вверху - контроль; Внизу - инфицированные микоплазмой. Рамкой выделен фрагмент фона вблизи объекта; среднее значение фона (Mean=161.6) необходимо для стандартизации оценки оптической плотности объекта

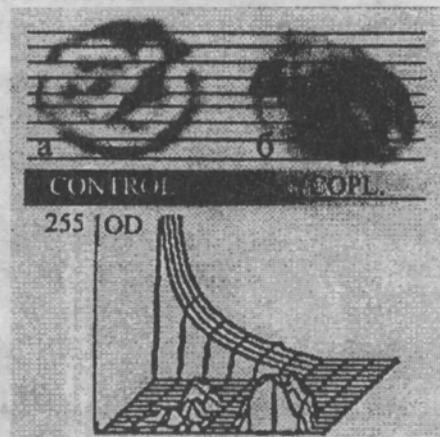


Рисунок 7.

а). Сравнение результата стереологической реконструкции по оптической плотности ядра клетки HeLa: а) контроль, б)- ядро, инфицированное микоплазмой.

На рис.6 (а и б) приведены поля зрения микроскопа, отображенные на негативах и введенные в память компьютера. Изображения вводились непосредственно с негатива фотопленки (результат микрофотографирования с микроскопа ЛЮМАМ). На рис.7 приведен фрагмент видеокomпьютерного архива единичных изображений клеток с отмеченными зонами опорного сигнала 10. Затем по специально разработанной программе (А.В. Жукоцкий) рассчитывалось оптическая плотность (OD) в каждом элементе Pij изображения (P pixel's)

$$D = -\lg \frac{I_{ij}}{I_0}$$

где  $I_{ij}$  - значение интенсивности в пикселе ij.

Интегральная оптическая плотность (IOD) определялась по формуле

$$IOD = \sum_i \sum_j D_{ij}$$

Средняя оптическая плотность OD определяется выражением:

$$OD = \frac{IOD}{A} = \frac{\sum_i \sum_j D_{ij}}{\sum_i \sum_j P_{ij}}$$

где  $\sum_i \sum_j P_{ij} = A$

число элементов изображения, определяющих площадь ядра (AREA) - контур обозначен белым на рисунке 10а, длина контура соответствует показателю периметр (PERIM). Геометрическим аналогом площадей является размер "масок" на рис. 10б.

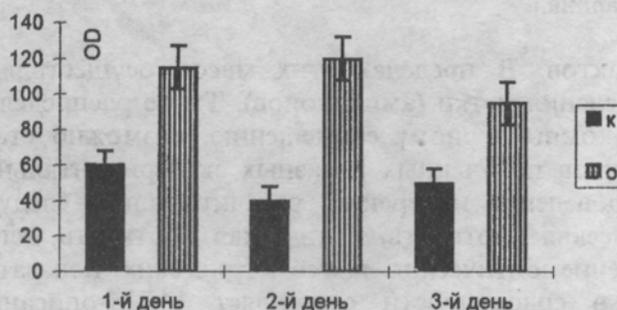
А вариабельность  $D_{ij}$  по объекту (StdOD) - оптическая гетерогенность - определяется выражением:

$$\frac{\sum (D_{ij} - OD)^2}{A-1}^{\frac{1}{2}}$$

Для оценки формы ядра используют FF - форм фактор:

$$FF = \frac{A}{(PERIM)^2}$$

На рис. 8 приведен фрагмент количественного анализа (интегральная оптическая плотность) накопления микоплазмы в клетке. Этот анализ позволяет достоверно провести различия между контролем (незараженная культура) и опытом (инфицированная микоплазмой). Результат количественной оценки приведен в диаграмме 1.



Диаграмма

Столбиковая диаграмма изменения оптической плотности в эксперименте (вертикальные отрезки - ошибка среднего). Рис.1. Принцип *In situ* ПЦР на стекле.

Задача №3. В данном примере проведена детекция вируса гепатита В на гепатоцитах с интегрированным геном вируса гепатита В и культуральных гепатоцитах (не содержащих вирус гепатита В). Эта работа имеет непосредственное значение для клинко-диагностической практики. Ввод изображения проводился с микрофотографий. На рис. 8. приведен фрагмент исходного (а) и увеличенного (б) изображения. На рис. 9а приведены фрагменты видеоархива ядер клеток, подвергавшихся анализу на морфоденситометрическом комплексе ДиаМорф. Квадратами обведены участки для нормировки фоновых значений. Разработана специальная программа для стандартизации вычисления оптической плотности ядер клеток. На рис. 9б приведены "маски", т.е. участки, подвергавшиеся анализу, для

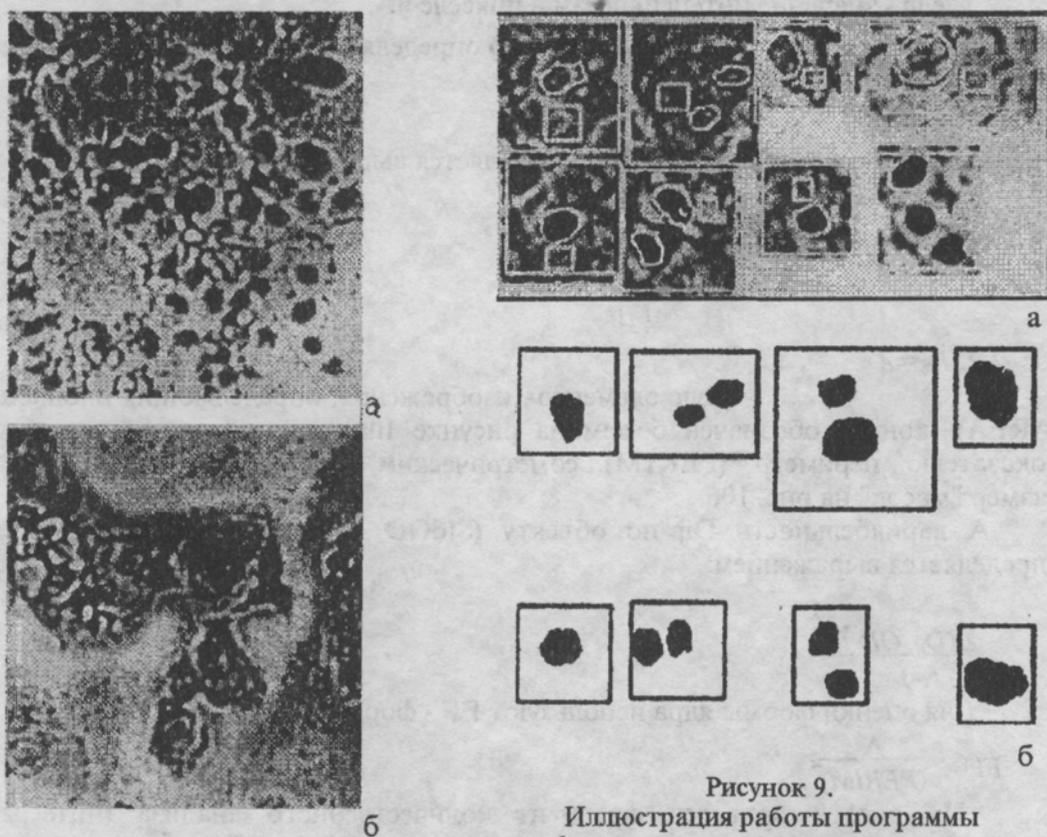


Рисунок 8.  
Видеоархив культуры гепатоцитов с интегрированным геном вируса гепатита В. а). Исходное изображение; б). Увеличенный с помощью компьютера фрагмент видеоархива

Рисунок 9.  
Иллюстрация работы программы морфоденситометрического исследования: а), выделение клеток; б) измерение отдельных клеток.

исключения артефактов. В пределах этих масок осуществлялось измерение и вычисление распределения метки (ампликонов). Такое распределение приведено на рис. 10. Благодаря компьютерному совмещению, возможно стандартизированное сопоставление объектов полученных в разных экспериментальных условиях (рис. 10а и б). После проведения измерений, рассчитывались следующие показатели: интегральная оптическая плотность, оптическая плотность, площадь ядер и т.д. (табл. 1). Определение оптических и геометрических показателей, а также их производных, что в совокупности составляет МДМ-описание объекта [3,15] приведено в задаче 2 (выражения 1 - 5). Отметим, что еще одним важнейшим МДМ - показателем является топология максимальной оптической плотности (рис. 4,5), соответствующая распределению ампликонов.

Применение видеокомпьютерных технологий позволило визуализировать

распределение генома вируса гепатита В и оценить степень инфицированности ядра.

Таким образом, методика компьютерной морфоденситометрии (КМДМ) на примере детекции вируса гепатита В возможна количественная регистрация ПЦР *in situ*, а также стандартизованной сопоставления компьютерных отображений (рис. 10) распределения ампликонов в ядре клетки.

Таблица 1. Оптические и геометрические показатели ядер гепатоцитов, инфицированных вирусом гепатита В (II) по сравнению с контролем (I).

	Контроль(1)	Эксперимент (II)
OD	0.25±4.5	0.53±1.2*
StdOD	4.6±0.8	8.2±1.3
AREA	264±79	261±2
D	17.0±3	16.5±2
PERIM	54±12	59±6.6
FF	0.9±0.03	0.9±0.02

\* $p < 0.001$

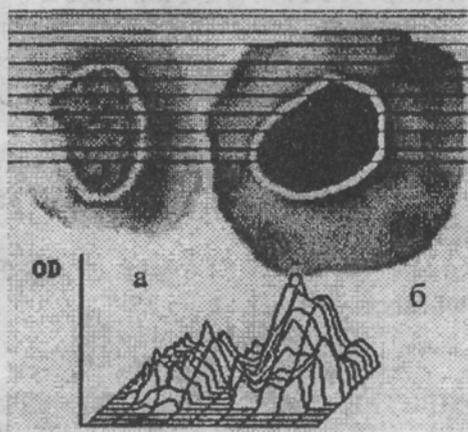


Рисунок 10.

Стереологическая реконструкция по оптической плотности ядра гепатоцита:  
а). Контроль; б). Эксперимент.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Применение оригинальной компьютерной видеотехнологии, адаптированной к специфике биомедицинских объектов - морфоденситометрии - позволяет:

- на основе использования количественных оптико-геометрических показателей оптимизировать условия проведения ПЦР *in situ*;
- количественно и субпопуляционно характеризовать степень инфицированности единичных клеток бактериальным инфектом, а также ядер клеток - вирусным, что особенно актуально для внедрения молекулярно-генетических методов в клинико-диагностическую практику.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Komminoth P., Long P.P. (1993). Virchows Archiv B Cell Pathology. 64:67-73;
2. Nuovo G.J., Gallery F., MacConnell P., Braun A. (1994). Am. J. Pathol. 144. 659-666
3. Жукоцкий А.В. (1992). Компьютерная телевизионная морфоденситометрия нормальных и патологических клеток и тканей в норме и патологии: Автореф. дисс. докт. мед. наук. -Москва.
4. Жукоцкий А.В., Якубова Н.И., Пономарев А.В., Пуртов В.А., Пальцев М.А.,

- Коган Э.М. (1992). Бюл. эксперим. биологии и медицины. Т. СШХ. -N.4, 417-419.
5. Zhukotsky A.V., Molodtsov M.U., Butusova N.N. et. al. (1990). Laser applications in life sciences. The 3-rd Int. Conf., Book of abstr. Moscow, v. 2, p. 74.
  6. A.V.Zhukotsky, M.U.Molodstov, N.N.Butusova, N.I.Yakubova, E.M.Kogan. (1990). Laser application in life sciencies. The 3 Int. Conf. on Laser Scattering Spectroscopy and Diagnostics of Biological Objects, Book of abstr. vol 2, pp. 74
  7. Жукоцкий А.В., Якубова Н.И., Никулина Л.А., Королев Ю.Н., Зубкова С.М. (1993). Биофизика, 38. -Вып. 2. 284-286.
  8. Zhukotsky A.V., Erenpreisa Je.A. (1992) Proc. the Latvian Acad. Sci. B. N. 7(540), 74-75
  9. A. Zhukotsky, V. Kopylov, O. Marchenko, O. Lomakin, S.Chemysh, T.Putina, E.Kogan. (1994). J. Analyt. Cell. Pathol., 3, 218.
  10. Zhukotsky A., Yevstigneeva M., Mishnev O., Kogan E. (1994). J. Analyt. Cell. Pathol., 3, 218.
  11. Batzer MA., Deininger P.L., Hellmann-Blumberg U., Jurka J., Labuda D., Rubin C.M., Schmid C.W. (1996). J. Mol. Evol., 42: 3-6
  12. Жукоцкий А.В., Бутусова Н.Н., Щеголев А.И., Коган Э.М. (1985). Автоматизация цитологических исследований: Сб. науч. тр. / АН СССР. Науч. центр биол. исслед. ИБФ. - Пуцдино, 78-87.
  13. Жукоцкий А.В., Елютина С.И., Молодцов М.Ю., Бутусова Н.Н., Коган Э.М. (1990). II Всесоюз. научно-практ. конф. молодых спец. Применение вычислительной техники в медицине, г. Москва 28-29 нояб. 1990 г.: Тез. докл. М., 156-157.
  14. Zhukotsky A., Kogan E., Kopylov V., Marchenko O., Lomakin O. (1994) Biochemical Diagn. Instrument. (Editors R.F.Bonner, G.E.Cohn, Th.M.Laue, A.V.Priezzhev.) Proc. SPIE, Los-Angeles, 2136, pp. 36-42,
  15. Zhukotsky A.V., Kogan E.M. (1989). In Sov. Med. Rev. B. Physicochem Asp. Med. - Harwood Academic Publishers GmbH, 2, pp.25-77.

#### THE USE OF COMPUTER MORPHODENSITOMETRY IN MODERN MOLECULAR-DIAGNOSTIC PRACTICE.

E.M. KOGAN, A.V. ZHUKOTSKY, V.M. GOVORUN, K.T. MOMYNALIEV, I.A. ПОТАПОВ, N.I.YAKUBOVA, V.P. ORLOVA, V.V. YALPAEV.

Research Institute of Physicist-Chemical Medicine. Moscow, M. Pirogovscaya st. 1a.

Technologies based on the use of polymerase chain reaction, in particular IS PCR are widely used now. However, wide introduction in clinico-laboratory practice of these methods requires: increase of reliability of the accepted decisions, improvement of the image for revealing more fine distinctions of objects, increase of quality of the obtained information, automated registration of results of the analysis. The application of original digital image analysis, adapted to specificity of biomedical objects -morphodensitometry -allows to solve successfully the following tasks: to optimize conditions of IS PCR realisation on the basis of use of quantitative opticogeometrical parameters, quantitatively and subpopulistically to characterize a degree of infected cells with viral infection, and also nucleuses of cells, that is especially actual for introduction of molecular - genetic methods in clinico diagnostic practice and, automatically to register results of the analysis. Thus, employment of morphodensitometry can be very important in genediagnostic and also gene therapy.

**Key words:** computer morphodensitometry, digital image analysis, IS PCR, hepatitis, distribution amplicon.