

А. Ф. ГОРБАТОВ, Г. П. КИЩЕНКО
(Новосибирск)

СИСТЕМА ШУМОУСТОЙЧИВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФОРМЫ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР

Введение. В отличие от классических описательных методов анализа клеточных ядер [1] автоматический анализ изображений позволяет количественно охарактеризовать форму ядер [2—4].

В настоящее время наиболее математически обоснованным методом анализа формы изображений является текстурный анализ [5, 6]. Большой объем численных характеристик при текстурном анализе (например, размеры объекта, количество и размерное распределение структурных элементов объекта) обеспечивает широкое применение этому методу при идентификации стандартных объектов: цифробуквенных символов, аэрокосмических объектов и т. п. При анализе совокупности нескольких классов объектов с шумовой вариабельностью формы внутри каждого класса требования к математическому аппарату изменяются: необходимо иметь не большое количество точных форм-характеристик, а набор шумоустойчивых интегральных форм-характеристик с наглядным геометрическим смыслом. Поэтому в практике количественного анализа формы ядер используют, как правило, следующие характеристики: 1) отношение максимального радиуса к минимальному [7], 2) отношение периметра к корню квадратному из площади [8, 9], 3) корень квадратный из отношения максимального момента инерции к минимальному [9, 10]. Каждая из первых двух характеристик одновременно описывает вытянутость ядра и извилистость границы. Очевидно, с помощью этих характеристик невозможно отличить эллиптическое ядро от круглого с зубчатой границей. Однако частое их применение обусловлено простотой расчета и возможностью проводить вычисления, используя только граничные координаты. Третья из указанных характеристик описывает вытянутость ядра и нечувствительна к извилистости границы [10]. К сожалению, вычисление ее требует больших затрат времени при машинном счете, так как в алгоритме присутствуют координаты внутренних точек объекта и их оптические плотности.

В настоящей статье приводятся разработанные нами шумоустойчивые алгоритмы вычисления характеристик формы ядра, отдельно описывающих вытянутость ядра, извилистость границ и средний размер извилин, исходя только из координат границы.

Методика эксперимента. Измерения координат граничных точек клеточных ядер и модельных фигур проводились на микроскопе-анализаторе «Морфоквант» (ГДР, Карл-Цейсс Йена). Программы для расчета характеристик формы были реализованы на языке ЭВМ KSR-4100, входящей в комплект микроскопа-анализатора (машинный язык ЭВМ PDP-8, США). В качестве модельных микрообъектов применялись входящие в комплект «Морфокванта» тестовые микрофигуры, напыленные на стекле. Клетками для анализа служили образцы монослойной культуры ВНК-21 и фибробласты на срезах сердца 5-месячной мыши. Фиксация клеток проводилась в 70%-м этаноле, окраска клеточных ядер — галлоцианином-хромалауном по методу [11] после 2-минутного гидролиза в 5 н. растворе HCl при комнатной температуре. Для этих операций брался галлоцианин Московского химического завода им. Войкова.

Результаты и обсуждение. В качестве исходных характеристик нами были приняты все возможные моменты 1—3-й степени $\sum_i X_i^k Y_i^{n-k} \Delta X_i$, где $n = 1-3$, $k \leq n$, а X_i ,

Y_i — координаты i -й точки границы ядра. Существует девять таких моментов, три из которых при замкнутой границе равны нулю. Используя оставшиеся шесть моментов, составим систему шести комбинированных характеристик, имеющих более наглядный геометрический смысл:

$$S = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N (Y_{i+1} + Y_i)(X_{i+1} - X_i); \quad (1)$$

$$X_{\text{ЦТ}} = \frac{1}{4S} \sum_{i=1}^N (Y_{i+1} + Y_i)(X_{i+1} + X_i)(X_{i+1} - X_i); \quad (2)$$

$$Y_{\text{ЦТ}} = \frac{1}{8S} \sum_{i=1}^N (Y_{i+1} + Y_i)^2 (X_{i+1} - X_i); \quad (3)$$

$$I_Y = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^N (Y_{i+1} + Y_i - 2Y_{\text{ЦТ}})(X_{i+1} + X_i - 2X_{\text{ЦТ}})^2 (X_{i+1} - X_i); \quad (4)$$

$$I_{XY} = \frac{1}{16} \sum_1^N (Y_{i+1} + Y_i - 2Y_{\text{ЦТ}})^2 (X_{i+1} + X_i - 2X_{\text{ЦТ}}) (X_{i+1} - X_i); \quad (5)$$

$$I_X = \frac{1}{24} \sum_1^N (Y_{i+1} + Y_i - 2Y_{\text{ЦТ}})^3 (X_{i+1} - X_i). \quad (6)$$

Здесь S — площадь ядра; $X_{\text{ЦТ}}, Y_{\text{ЦТ}}$ — координаты центра тяжести; I_X, I_{XY}, I_Y — моменты инерции однородной плоской фигуры, повторяющей форму ядра; N — количество точек границы.

С помощью формул (1)–(6) можно вычислить три характеристики, описывающие размер и форму ядра: площадь, максимальный (I_{max}) и минимальный (I_{min}) моменты инерции. Остальные три характеристики отражают несущественные для нас координаты центра тяжести и ориентацию ядра. Опуская промежуточные громоздкие вычисления, находим

$$I_{\text{max}} = \frac{I_X + I_Y}{2} + \frac{1}{2} \sqrt{(I_X - I_Y)^2 + 4I_{XY}^2}; \quad (7)$$

$$I_{\text{min}} = \frac{I_X + I_Y}{2} - \frac{1}{2} \sqrt{(I_X - I_Y)^2 + 4I_{XY}^2}. \quad (8)$$

Полагая, что ядро имеет форму эллипса, границы которого искажены малыми гармоническими возмущениями, найдем отношение полуосей эллипса K и амплитуду возмущений δ :

$$K = \frac{2\pi}{S^2} (I_{\text{max}} - I_{\text{min}}) + \sqrt{\left(\frac{2\pi}{S^2} (I_{\text{max}} - I_{\text{min}})\right)^2 + 1}; \quad (9)$$

$$\delta = \sqrt{\frac{I_{\text{min}}}{S} - \frac{S}{4K}}. \quad (10)$$

Использование в формулах (9), (10) моментов инерции плоской фигуры и поправки на возмущения делают значение K и δ помехоустойчивым к ошибкам, возникающим при оконтуривании ядра. Например, ошибка характеристики K , вычисленной по формуле (9), $\sim \delta^4/S^2$, а по общепринятой формуле $\sqrt{I_{\text{max}}/I_{\text{min}}}$ [9, 10] ошибка составит $\sim \delta^2/S$. При вычислении δ по формуле (10) ошибка $\sim \delta^4/S^2$.

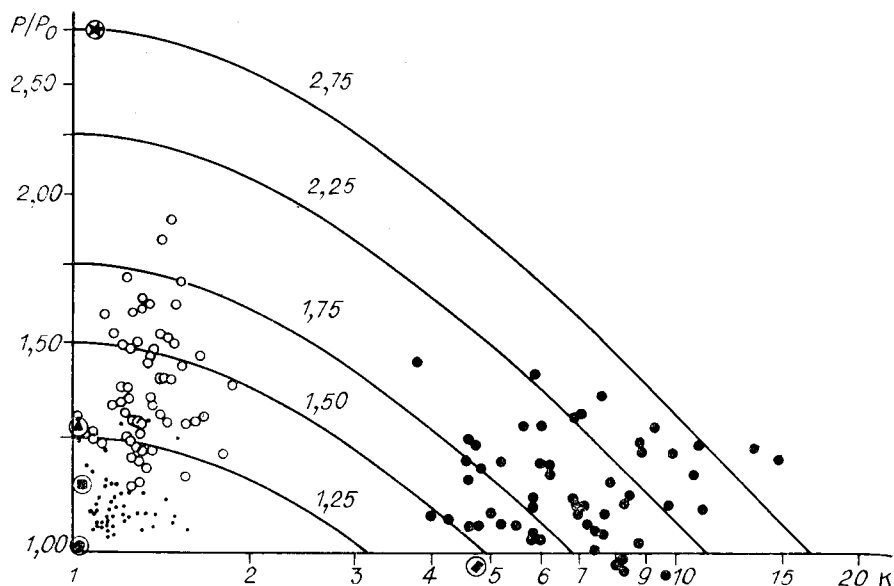
Итак, нами разработаны алгоритмы для вычисления трех характеристик, описывающих размер и форму ядер: площади S , отношения полуосей эллипса K и амплитуды гармонических возмущений δ . Для более полного описания формы ядра мы сочли нужным ввести дополнительно четвертую характеристику, выходящую за рамки разработанной нами системы, — зубчатость границы. Эта характеристика является отношением P/P_0 , где P — измеренный периметр ядра, P_0 — теоретический периметр эллипса с отношением полуосей K и площадью S :

$$P/P_0 = \frac{0,5 \sum_i \sqrt{(X_{i+2} - X_i)^2 + (Y_{i+2} - Y_i)^2}}{\sqrt{\pi S} \left(\frac{K+1}{\sqrt{K}} 1,48 - 0,96 \right)}. \quad (11)$$

Здесь $\sqrt{\pi S} \left(\frac{K+1}{\sqrt{K}} 1,48 - 0,96 \right)$ — предлагаемая нами эмпирическая формула вычисления периметра эллипса, имеющая ошибку менее 0,9 % в интервале $0,1 < K < 10$. В отличие от характеристики δ (амплитуды возмущения) характеристика P/P_0 отражает и амплитуду возмущений, и частоту возмущений, т. е. содержит в себе дополнительную информацию о крутизне возмущений на границе ядра.

С использованием этих алгоритмов на микроскопе-анализаторе «Морфоквант» были измерены модельные фигуры: два круга с разными диаметрами, квадрат, треугольник, звезда пятиконечная с углом луча 20° и прямоугольник. Погрешности результатов измерений, оцененные по [12], — не более $\pm 3\%$ при доверительной вероятности 0,95.

Для дифференцировки фигур достаточно сравнения двух характеристик — K и P/P_0 . С целью проверки пригодности нашей системы характеристик для дифференцировки реальных биологических объектов нами измерены K и P/P_0 у интерфазных ядер клеток культуры ВНК-21 и фибробластов мыши, а также ядер в М-фазе клеток ВНК-21. Результаты измерений представлены в графическом виде (см. рисунок) на координатной плоскости ($K, P/P_0$). Из рисунка видно, что три типа ядер достоверно различаются по расположению на координатной плоскости, которое к тому же согласуется с наглядным представлением о форме ядер: действительно, форма интерфазных ядер ВНК-21 близка к кругу, ядра в М-фазе имеют округлую зазубренную форму (зубья — теломеры хромосом), а ядра фибробластов вытянуты и имеют плавную грани-



Представление ядер клеток на координатной плоскости ($K, P/P_0$):
 — интерфазные ядра клеток культуры ВНК-21; \circ — ядра клеток культуры ВНК-21 в М-фазе; \bullet — ядра фибробластов мыши. Символами, обведенными кружками, обозначены модельные фигуры, сплошные линии — изохарактеристические линии с постоянным $P/(2\sqrt{\pi S})$, значение которого указано над каждой линией

цу. На координатной плоскости представлены также изохарактеристические линии для различных значений характеристики $P/(2\sqrt{\pi S})$, которая используется другими авторами для описания формы [8, 13]. Из рисунка следует, что при сравнении ядер по данной характеристике около 30 % М-ядер ВНК-21 и ядер фибробластов находятся в одном интервале $1,50 < P/(2\sqrt{\pi S}) < 1,75$ и, следовательно, не отличаются по этой характеристике.

Выводы и рекомендации. Полагаем, что предложенная система характеристик формы ядер является перспективной для идентификации типа клеток и, возможно, для медицинской цитодиагностики.

Авторы благодарны В. Я. Тихонову за предоставление препаратов клеток культуры ВНК-21.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Босток К., Самнер Э. Хромосомы эукариотической клетки.— М.: Мир, 1984.
2. Фосс К., Нойман Э., Витзак В. «Универсальная система программ» для автоматического анализатора микроскопических изображений «MORPHOQUANT» // Йенское обозрение.— 1979.— № 4.
3. Косых В. П., Перетягин Г. И. Автоматическая цитодиагностика: аппаратура, модели, методы // Автоматизированный анализ клеточных популяций.— Новосибирск: ИАиЭ СО АН СССР, 1978.
4. Ташкэ К. Введение в количественную цитогистологическую морфологию.— Бухарест: АН СРР, 1980.
5. Матерон Ж. Случайные множества и интегральная геометрия.— М.: Мир, 1978.
6. Serra J. Image analysis and mathematical morphology.— N.-Y.: Academ. Press, 1981.
7. Gray S. B. Local properties of binary images in two dimensions // IEEE Trans. on Comput.— 1971.— C-20.— P. 551.
8. Kleinsasser O. Die Klassifikation und Differentialdiagnose der Epithelhyperplasien der Kehlkopfschleimhaut auf Grund histomorphologische Merkmale // Z. Laryng Rhinol.— 1963.— 42.— P. 339.
9. Gschwind R., Umbricht C. B., Terhorst J. e. a. Evaluation of shape descriptors for the morphometric analysis of cell nuclei // Path. Res. Pract.— 1986.— 181.— P. 213.
10. Киричук В. С. Алгоритмы анализа формы клеточных ядер // Автоматизированный анализ клеточных популяций.— Новосибирск: ИАиЭ СО АН СССР, 1978.
11. Зандриттер В., Кифер Г., Рик В. Введение в количественную цитохимию.— М.: Мир, 1969.
12. Новицкий П. В., Зограф И. А. Оценка погрешностей результатов измерений.— Л.: Энергоатомиздат, 1985.
13. Kalter P., Lubsen H., Dellamare J. F. M. Quantitative morphometry of squamous cell hyperplasia of the larynx // J. Clin. Pathol.— 1985.— 38.— P. 489.

Поступило в редакцию 16 июня 1988 г.