

MICROGLIA DETECTION IN THE BRAIN PREPARATIONS AFTER LONG-TERM STORAGE IN FORMALIN

Ye. G. Sukhorukova, M. S. Zakhryapin, N. M. Anichkov and D. E. Korzhevskiy

Currently, implementation in histological practice of a selective method for microglia revealing is hindered by a lack of a allowing revealing microglia in the.

Relatively simple protocol for identification of microgliaocytes in archived material is proposed. A novel variant is based on preparation processing with the use of polyclonal antibodies against Iba-1 protein. The proposed approach includes antigen

heat unmasking in a modified citrate buffer and prolonged incubation of the sections with the primary antibodies at high temperature. The method is highly specific and allows selective detection of microgliaocytes in sections prepared from a material stored in formalin for 2 months.

Key words: *formalin fixation, microglia, Iba-1 protein*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine; Department of Pathological Anatomy, I. I. Mechnikov North-Western State Medical University St. Petersburg

© В. М. Черток, М. С. Старцева, А. Е. Коцюба, 2012
УДК 578.087.9

В. М. Черток, М. С. Старцева и А. Е. Коцюба

ПРИМЕНЕНИЕ ПИКСЕЛЬНОГО МЕТОДА В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В. М. Черток), кафедра физики и математики (зав. — доц. С.Э. Ширмовский), Владивостокский государственный медицинский университет

Приведены результаты, полученные при использовании «пиксельного метода» для автоматизированного измерения интенсивности гистохимической реакции в нейронах. В основе метода лежит принцип измерений, который заключается в автоматическом подсчете с помощью стандартных компьютерных программ суммы яркостей всех пикселей, образующих данное изображение. Возможности этого метода продемонстрированы на примере изучения активности NADPH-диафоразы в нитроксидергических нейронах чувствительных и двигательных ядер продолговатого мозга крысы.

Ключевые слова: *количественная гистохимия, пиксельный метод, нитроксидергические нейроны*

Критерием в оценке результатов гистохимической реакции в структурных компонентах клеток является не только локализация, но и количественное содержание химических веществ [3, 5]. Для получения соответствующей информации чаще всего используется метод измерения оптической плотности продукта гистохимической реакции в клетках одно- или двухлучевыми микроспектрофотометрами, денситометрами и т.д. Несмотря на некоторые конструктивные особенности каждого из указанных аппаратов, их объединяет общий принцип измерений, напрямую вытекающий из закона Ламберта – Бера. Согласно этому закону, слои гомогенной поглощающей среды равной толщины поглощают равное количество света.

С помощью микроспектрофотометров исследуют пропускание и поглощение света веществом, связанным с красителем [1, 6]. После вычисления этих параметров определяют концентрацию связанного красителя, а следовательно, и количество исследуемого вещества. Однако необходимость многократных измерений, наличие многочисленных, зачастую трудновыполнимых условий для получения объективных данных, большие затраты времени при проведении таких исследований усложняют использование этого метода в решении научных задач [1, 3]. Определенный прогресс намечился с введением в практику научных исследований автоматизированной аппаратуры, позволяющей быстро и точно определять многие

Сведения об авторах:

Черток Виктор Михайлович (e-mail: chertokv@mail.ru), *Коцюба Александр Евгеньевич* (e-mail: akotc@mail.ru), кафедра анатомии человека; *Старцева Марина Сергеевна* (e-mail: startsevams@mail.ru), кафедра физики и математики, Владивостокский государственный медицинский университет, 690990 Владивосток, пр. Острякова, 2

параметры, включая концентрацию отдельных химических компонентов в цитоплазме клеток. Однако высокая коммерческая стоимость таких аппаратов ограничивает их применение в научных исследованиях.

Ранее для вычисления некоторых количественных показателей морфологических объектов мы предложили использовать комплекс известных компьютерных программ, позволяющих на их основе создавать автоматизированные системы анализа изображений (АСАИ) [2, 10]. При невысокой стоимости эти системы, к которым относится и предложенная нами АСАИ «Allegro-МС», точностью измерений не уступают их коммерческим аналогам. Впоследствии принцип, использованный нами при создании этой системы, был успешно реализован и другими исследователями для решения различных научных задач [4, 7].

В настоящей работе приводятся результаты нашего опыта по применению компьютерных программ Adobe Photoshop и Mathcad для измерения интенсивности гистохимической реакции на примере NADPH-позитивных нейронов ядра одиночного пути, двойного ядра и ретикулярного гигантноклеточного ядра в продолговатом мозгу у крыс.

Микрофотографии с препаратов получали при помощи микроскопа Axiomager (Carl Zeiss, Германия) со встроенным осветителем, соединенным с фотокамерой Sony Cyber-shot DSC-HX5V (с разрешением матрицы 10,0 Mega Pixels) в положении трансфокатора — 3х. Стандартизация параметров силы света и освещенности проводилась с помощью люксметра ТКА-Люкс/Эталон.

Как показали наши наблюдения, при гистохимических исследованиях нейроны в одних и тех же ядрах существенно различаются по интенсивности реакции, структуре и плотности выпавшего осадка (рис. 1, а–г). Клетки, в которых

осадок имеет гомогенную структуру и равномерно заполняет всю цитоплазму, встречаются довольно редко, примерно в 6–10% [5, 7, 9]. Большинство же нейронов окрашиваются крайне неравномерно: имеются участки цитоплазмы с отдельно лежащими мелкими и крупными ярко окрашенными гранулами преципитата, между которыми могут находиться разного размера гранулы с бледной окраской, зачастую едва отличимые от фона (см. рис. 1, а, б). В других клетках осадок образует конгломераты с более или менее интенсивной окраской (см. рис. 1, в, г). Все это в значительной степени затрудняет или делает невозможным объективную оценку данных, полученных при микроспектрофотометрии [1, 3, 6].

Опыт проведения подобных исследований показывает, что для вычисления оптической плотности осадка, образующегося в результате гистохимической или иммуногистохимической реакции, гораздо эффективнее использовать «пиксельный метод» обработки оцифрованных цветных изображений [5, 8, 9]. В его основе лежит совершенно иной, чем при цитофотометрии, принцип измерений, который заключается в автоматическом подсчете с помощью стандартных компьютерных программ Adobe Photoshop и Mathcad суммы яркостей всех пикселей, образующих данное изображение.

Пиксель — элементарное составляющее оцифрованного изображения, характеризуется цветом и яркостью. Один пиксель может хранить информацию только об одном сочетании цветов, который и ассоциируется с ним, а яркость пикселя является показателем того, насколько сильно цвет данного пикселя отличается от черного цвета. Формирование цвета в режиме RGB происходит при отображении препарата на экране компьютерного монитора, а цветовой оттенок каж-

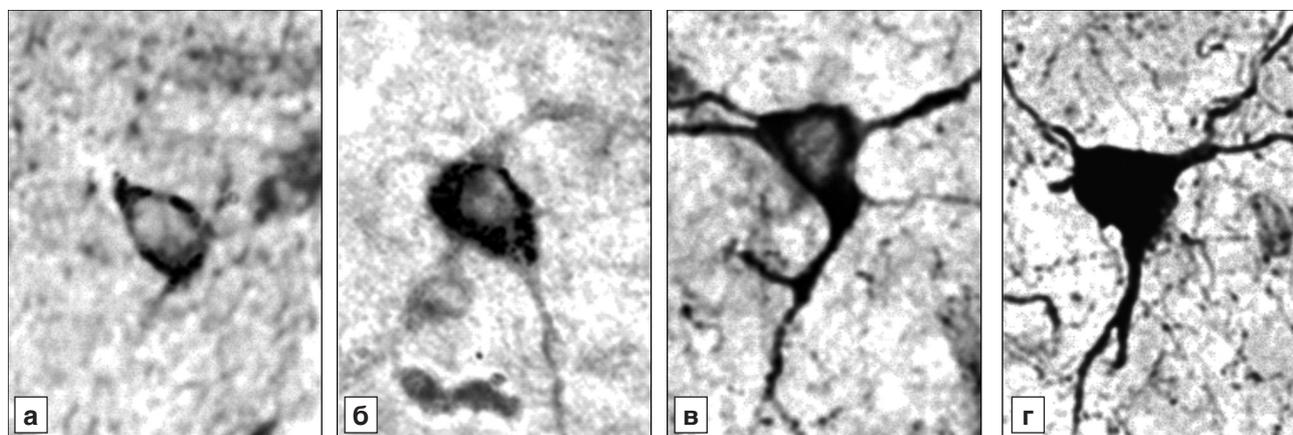


Рис. 1. NADPH-позитивные нейроны, различающиеся по структуре и плотности преципитата.

а — нейроны с низкой, б — средней, в — высокой и г — очень высокой активностью NADPH-диафоразы. Гистохимическая реакция на NADPH-диафорузу [11]. Об. 40, ок. 10.

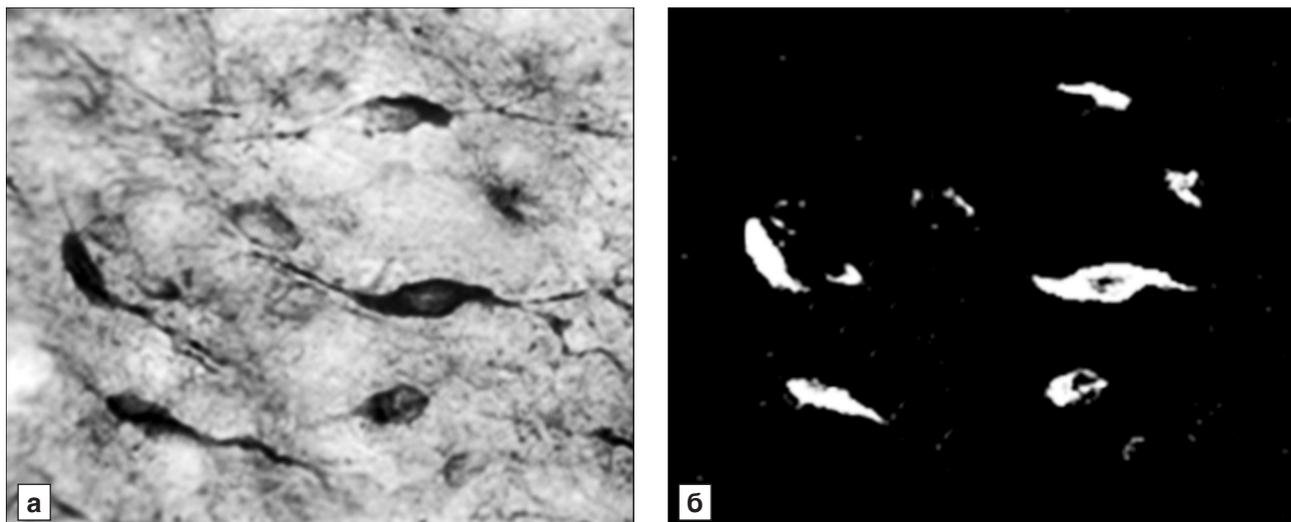


Рис. 2. Нейроны с разным уровнем интенсивности гистохимической реакции в окне документа Adobe Photoshop.

а — оцифрованное полноцветное изображение препарата; б — тот же препарат с удаленным фоном и инвертированным изображением. Гистохимическая реакция на NADPH-диафорузу [11]. Об. 10, ок. 10.

дого пикселя определяется интервалами между интенсивностями RGB-составляющих. В работе использована обычная шкала из 256 градаций интенсивности и общепринятая для RGB модель цветового пространства. Сложение яркостей пикселей в исследуемом участке изображения позволяет определить средние значения интенсивности цвета отдельных его компонентов (в нашем случае — окрашенных гранул в цитоплазме одного нейрона или всех нейронов в исследуемом ядре продолговатого мозга).

Для вычисления значений этого показателя оцифрованное полноцветное изображение препарата отображается на экране компьютера и помещается в окно программы Adobe Photoshop (рис. 2, а). Затем область фона выделяется и удаляется, а изображение инвертируется (см. рис. 2, б). В результате этой процедуры становится возможным автоматический подсчет суммы яркостей пикселей не только в отдельных, обведенных «световым пером» нейронах, но и автоматизированное вычисление значений показателя во всех клетках препарата, контуры которого для получения «морфометрической маски» были предварительно обведены «световым пером». Adobe Photoshop присваивает черному цвету значение 0, белому — 255 из 256 градаций интенсивности. Кроме того, после инверсии цвета нейроны со светлой окраской имеют привычные для восприятия меньшие значения интенсивности, а с более темной — большие. После пересохранения документа из формата Jpg в формат BMP (8 бит/пикс) изображение перемещается в программу Mathcad с помощью встроенной функции READ BMP, что приводит к автоматическому построению матрицы

с размерностью $m \times n$, где m — количество пикселей в столбце, n — количество пикселей в строке. Каждому пикселю в такой матрице соответствует свой номер яркости. Функция «imhist» делает возможной подсчет пикселей определенных значений яркостей. Эти данные используются для дальнейшего вычисления суммарной яркости пикселей в какой-то одной или во всех клетках одновременно выделенного участка препарата.

Для определения суммарной яркости пикселей (I) цветного изображения в исследуемом фрагменте препарата применяется формула:

$$I = j_0 \cdot 0 + j_1 \cdot 1 + \dots + j_{255} \cdot 255 = \sum_{i=0}^{255} j_i \cdot i,$$

где j_0 — количество пикселей с яркостью 0, j_i — количество пикселей с определенной яркостью, j_1 — количество пикселей с яркостью 1, ... j_{255} — количество пикселей с яркостью 255, i — значение градации яркости (от 0 до 255).

Оптическая плотность, как мера поглощения света прозрачными объектами или отражения света непрозрачными объектами, непосредственно связана с интенсивностью света, прошедшего через объект или отразившегося от него. Анализ света, прошедшего через объект, позволяет получить данные об изображении, основываясь на значении яркости пикселя в каждой его точке. Поэтому яркость пикселя может быть откалибрована в более привычных для исследователей единицах оптической плотности.

Поскольку оптическая плотность объекта равна десятичному логарифму отношения интенсивностей падающего и отраженного света, то для вычисления среднего показателя оптической плотности (СПОП) осадка во всех клетках выде-

ленного участка изображения (в нашем случае всех NADPH-позитивных нейронов, находящихся в ядре продолговатого мозга) может быть использована следующая формула:

$$\text{СПОП} = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \left(\frac{255 \cdot P_N}{\sum_{i=0}^{255} j_i \cdot i} \right),$$

где I — суммарная яркость пикселей в клетках, I_0 — суммарная яркость пикселей в клетках при отсутствии поглощения, P_N — количество пикселей в клетках.

Ввиду того, что максимально возможное значение яркости пикселей равно 255, то, умножая эту цифру на количество пикселей в исследуемых клетках (P_N), получаем максимально возможное значение яркости пикселей при отсутствии поглощения света. Для вычисления значения P_N нужно сложить все пиксели с разной степенью яркости и вычесть количество пикселей с яркостью 0 (фон):

$$P_N = \sum_{i=0}^{255} j_i - j_0.$$

Иногда для сравнения интенсивности гистохимической реакции в нейронах нескольких ядер удобнее использовать другую величину — показатель оптической плотности осадка в расчете на одну клетку исследуемого ядра (ПОП_N), который вычисляется по формуле:

$$\text{ПОП}_N = \frac{\text{СПОП}}{N},$$

где N — количество клеток в исследуемом ядре.

Пользуясь программой Adobe Photoshop, можно в автоматическом режиме вычислить количество клеток в выделенном участке изображения, используя следующие опции меню: «анализ» → «инструмент» → «счетчик».

Подсчеты показывают, что исследованные нами ядра существенно отличаются значениями I , СПОП или ПОП_N (таблица). Величина этих показателей позволяет объективно судить об интенсивности гистохимической реакции в том или ином фрагменте изображения.

Между тем, высокие значения СПОП, например, определяются и в случае, если исследуемый участок препарата содержит много клеток с очень высокой плотностью отложения продукта реакции, и в случае повышенного содержания клеток с умеренной плотностью и отсутствием — с низкой. Существуют и другие варианты формирования значений того или иного показателя, которые, по понятным причинам, меняют представления исследователя о причинно-следственных отношениях в цепи рассматриваемых событий.

Для детализации этой информации необходимо систематизировать клетки с различным диапазоном активности реакции, т.е. в исследуемом участке препарата определить долю клеток с заданными значениями показателя. Такие вычисления при использовании программы Mathcad производятся в автоматическом режиме. Для этого необходимо предварительно выставить интервалы значений для клеток, имеющих, например, очень высокую, высокую, умеренную и низкую оптическую плотность осадка. Количество размерных групп может увеличиваться или уменьшаться в соответствии с задачами исследования. Как показали наши наблюдения, доля NADPH-позитивных нейронов, входящих в ту или иную размерную группу, существенно различается в разных ядрах (см. таблицу). В ядре одиночного пути преобладают нитроксидергические нейроны со средней и низкой оптической плотностью преципитата. В двойном ядре много клеток с высокой и очень высокой активностью реакции, но редко встречаются с низкой, чем и объясняются большие цифры I , ПОП_N и СПОП в этом ядре. В ретикулярном гигантоклеточном ядре установлены не столь высокие значения показателей, поскольку в нем вдвое больше клеток с низкой и на треть меньше нейронов с очень высокой оптической плотностью отложения продукта реакции.

Числовые значения исследуемых параметров в исследованных ядрах, полученные с помощью компьютерных программ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Объект исследования	Измеряемые параметры						
	I	СПОП (усл. ед.)	ПОП _N	Доля NADPH-позитивных нейронов с различным уровнем активности реакции			
				низкой	средней	высокой	очень высокой
ЯОП	8,4±0,5	0,49±0,02	0,070±0,003	29,9±2,4	55±5	10,9±2,0	4,2±1,1
ДЯ	15,3±0,6	0,93±0,04	19,0±0,008	4,8±1,4	14,7±2,7	64±3	16,4±2,4
РГЯ	6,5±0,3	0,68±0,03	17,0±0,008	9,4±2,8	20±4	58±4	12,3±2,0

Примечание. I — суммарная яркость пикселей в клетках; СПОП — средний показатель оптической плотности; ПОП_N — показатель оптической плотности осадка в расчете на одну клетку исследуемого ядра; ЯОП — ядро одиночного пути; ДЯ — двойное ядро; РГЯ — ретикулярное гигантоклеточное ядро; интервалы значений оптической плотности составляют: для клеток с низкой активностью реакции — 0,2–0,5; с умеренной — 0,51–0,7; с высокой — 0,71–0,9; с очень высокой — 0,9 и больше.

Понятно, что для использования «пиксельного метода» в автоматическом режиме приведенные выше формулы и алгоритм действий по расчету показателей следует внедрить в соответствующие компьютерные программы. После этого исследователю остается только поместить изображение в окне монитора, обвести «световым пером» контуры интересующего фрагмента препарата для создания «морфометрической маски», а затем в считанные минуты получить значения заданных параметров.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям. Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт № 14.740.11.0186).

ЛИТЕРАТУРА

- Агроскин Л. С. и Папаян Г. В. Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению. Л., Наука, 1977.
- Афанасьев А. А. и Черток В. М. Количественная биомикроскопия микроциркуляторного русла. Тихоокеанск. мед. журн., 2004, № 2, с. 82–86.
- Журавлева Т. Б. и Прочуханов Р. А. Введение в количественную гистохимию ферментов. М., Мир, 2002.
- Ирьянов Ю. М., Силантьева Т. А. и Горбач Е. В. Обработка и анализ изображений в гистологических исследованиях с применением стандартных компьютерных программ. Морфол. ведомости, 2004, № 12, с. 11–13.
- Коцюба А. Е. и Черток В. М. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидаергических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра человека. Тихоокеанск. мед. журн., 2010, № 4, с. 43–46.
- Луппа Х. Основы гистохимии. М., Мир, 1980.
- Силантьева Т. А. и Горбач Е. Н. Количественная оценка интенсивности гистологических реакций на оцифрованных изображениях гистологических препаратов с использованием градуированных стандартов. Украинск. журн. телемедицины, 2010, № 1 (8), с. 68–71.
- Старцева М. С., Коцюба А. Е. и Колдаев В. М. Применение методов системного анализа для оценки значимости изменений нитроксидаергических нейронов в ядрах продолговатого мозга крыс при экспериментальной гипертензии. Тихоокеанск. мед. журн., 2011, № 3, с. 61–64.
- Старцева М. С. и Черток В. М. Количественная оценка интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций с применением стандартных компьютерных программ. Тихоокеанск. мед. журн., 2012, № 1, с. 121–123.
- Черток В. М., Афанасьев А. А. и Коцюба А. Е. Применение автоматизированной системы анализа изображений Allegro-MS для морфометрических исследований. Морфология, 2003, т. 124, вып. 4, с. 88–92.
- Hope B. T. and Vincent S. R. Histochemical characterization of neuronal. NADPH-diaphorase. J. Histochem. Cytochem., 1989, v. 37, p. 653–661.

Поступила в редакцию 13.01.2012
Получена после доработки 15.05.2012

THE APPLICATION OF A «PIXEL METHOD» FOR THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE RESULTS OF THE HISTOCHEMICAL STUDIES

V. M. Chertok, M. S. Startseva and A. Ye. Kotsyuba

The results of the application of a “pixel method” for the automated measurement of the intensity of histochemical reaction in the neurons are presented. The method is based on measuring principle, which includes the automatic counting the sum of brightnesses of all the pixels forming the image with the help of standard computer programs. The potential of this method is demonstrated on the example of NADPH-diaphorase activity study in the nitroxidergic neurons of sensory and motor nuclei of the medulla of healthy rats.

Key words: *quantitative histochemistry, the pixel method, nitroxidergic neurons*

Department of Human Anatomy and Department of Physics and Mathematics, Vladivostok State Medical University