

УДК: [636.7:591.04:004.354.4-047.56]-092.9



## Количественная оценка интенсивности гистохимических реакций на оцифрованных изображениях гистологических препаратов с использованием градуировочных стандартов

Т.А. Силантьева, Е.Н. Горбач

*ФГУ «РНЦ «ВТО им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий», Курган, Россия*

### РЕЗЮМЕ, ABSTRACT

Представлена методика оценки интенсивности гистохимических реакций, позволяющая определить концентрацию гистохимического красителя, связанного в стехиометрическом соотношении с веществом в составе структур ткани гистологического среза, выполняемая на оцифрованных изображениях с использованием градуировочных стандартов (Укр.журнал телемедицины и мед.телематики.-2010.-Т.8,№1.-С.68-71).

**Ключевые слова:** оцифрованные изображения, градуировочные стандарты, гистохимия

*Т.О. Силантьєва, О.М. Горбач*

КІЛЬКІСНА ОЦІНКА ІНТЕНСИВНОСТІ ГІСТОХІМІЧНИХ РЕАКЦІЙ НА ОЦИФРОВАНІХ ЗОБРАЖЕННЯХ ГІСТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ГРАДУЮВАЛЬНИХ СТАНДАРТІВ

*ФДУ «РНЦ «ВТО им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий», Курган, Росія*

Представлено методику оцінки інтенсивності гістохімічних реакцій, що дозволяє визначити концентрацію гістохімічного барвника, зв'язаного в стехіометричному співвідношенні з речовиною в складі структур тканини гістологічного зрізу, виконується на оцифрованих зображеннях з використанням градуювальних стандартів (Укр.журнал телемедицини та мед.телематики.-2010.-Т.8,№1.-С.68-71).

**Ключові слова:** оцифровані зображення, градуювальні стандарти, гістохімія

*T. A. Silantyeva, E. N. Gorbach*

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF HISTOCHEMICAL REACTION INTENSITY IN DIGITAL IMAGES OF HISTOLOGICAL PREPARATIONS USING GRADUATED STANDARDS

*Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russia*

The technique for assessment of histochemical reaction intensity that is able to determine the concentration of histochemical staining that is related stochiometrically to a substance in the histological section structure is presented that is performed basing on the digital images using graduated standards (Ukr.z.telemed.med.telemat.-2010.-Vol.8,№1.-P.68-71).

**Key words:** digital images, graduated standards, histochemical

Для изучения химического состава клеток и тканей широко используются классические методы биохимического анализа. Однако знание биохимических процессов без учета их локализации не достаточно для понимания единства структуры и функции [1]. Распределение веществ в клетках и тканях выявляется микроскопически постановкой гистохимических реакций. Первоначально методы гистохимического окрашивания гистологических срезов предназначались

для избирательного выявления различных по химическому составу тканевых компонентов [2]. Позднее интенсивность окрашивания структур стали связывать с содержанием химических соединений в их составе. Наименее точной является полуколичественная (балльная) оценка, основанная на субъективном визуальном восприятии. Широко применяется количественная оценка интенсивности гистохимического окрашивания гистологических срезов путем цитоспектро-

фотометрического измерения оптической плотности (D), являющейся производной от пропускания света исследуемым объектом [3; 4]. Также используются способы количественной оценки цветности и интенсивности гистохимического окрашивания, основанные на анализе параметров RGB [5] и оптической плотности в уровнях серого [6] оцифрованных

ных изображений гистологических препаратов.

Ранее нами была разработана методика изготовления градуировочных стандартов для оценки интенсивности гистохимических реакций, позволяющая определить концентрацию гистохимического красителя, связанного структурами ткани в гистологическом срезе (патент № 2363949).

### **Цель исследования**

Целью настоящего исследования являлась количественная оценка содержания ДНК и РНК на оцифрованных изображениях

гистологических препаратов с использованием градуировочных стандартов.

### **Материал и методы**

Из насыщенных водных растворов гистохимических красителей метилового зеленого и пиронина известной концентрации готовили серии двукратных разведений на основе коллоидного раствора желатина при температуре 37 °С с конечной концентрацией желатина 20 %. Растворы разливали в пластиковые контейнеры объемом около 1 см<sup>3</sup> и помещали для полимеризации в холодильную камеру бытового холодильника. Через сутки из блоков, имеющих консистенцию плотного геля, лезвием вырезали образцы размером 5х5х5 мм, замораживали их в жидком азоте для предотвращения кристаллизации воды и помещали на охлажденные блокодержатели криомикротомы. Криостатные срезы монтировали на заранее маркированные с указанием конечных концентраций красителя предметные стекла (не менее 5 срезов на стекло), высушивали на воздухе и заключали под покровные стекла в канадский бальзам.

Исследование выполнено на образцах печени 3-х интактных животных (собаки). Уход и эвтаназию осуществляли в соответствии с требованиями приказа МЗ СССР № 755 от 12.08.77 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организованных форм работы с использованием экспериментальных животных». Материал фиксировали в 10% растворе формалина, дегидратировали

в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали пиронином либо метиловым зеленым по модифицированной методике [1]. Оцифровку изображений осуществляли с использованием цифровой камеры-окуляра DCM-300 (Hangzhou Scopetek Opto-Electric Co.,Ltd., Китай), обладающей функцией выставления баланса белого, установленной на световом микроскопе «Микмед-5» (ЛОМО, Россия). Оцифровку изображений полей зрения осуществляли с использованием программного обеспечения "ScopePhoto" (ScopeTeck, Китай). По локальной компьютерной сети полученные микрофото переносили на жесткий диск компьютера с установленной программой-анализатором «ВидеоТест-Морфология 4.0» (Россия). Измерение оптической плотности изображений гистологических срезов печени и градуировочных стандартов проводили в уровнях серого (D). Значения оптической плотности градуировочных стандартов использовали для построения графика калибровочной функции, которая представляла собой зависимость между концентрацией красителя в градуировочном стандарте (ось абсцисс) и вычисленным значением оптической плотности (ось ординат). Построение калибровочных кривых выполняли в приложении Excel (программный продукт Microsoft Office).

### **Результаты и обсуждение**

Известно, что гистохимические красители метиловый зеленый и пиронин специфично и стехиометрически связываются с нуклеиновыми кислотами [1]. Визуализация возможна как при раздельном использовании растворов метилового зеленого и пиронина, так и при окрашивании их смесью [1; 2; 7]. Использование градуировочных стандар-

тов позволяет вычислить истинную локальную концентрацию связанного красителя, а не его количество в условных единицах оптической плотности, как это принято в практике гистохимических исследований [3, 6]. На оцифрованных цифровых изображениях гистологических препаратов печени, окрашенных метиловым зеленым либо пирони-

ном (рис. 1), проводили измерения и вычисляли оптическую плотность в участках, соответствующих профилям ядер и цитоплазмы гепатоцитов (n=15). Значения концентраций красителя в исследованных участках препарата определяли графическим способом

(рис.2). Среднее значение концентрации метилового зеленого в ядрах гепатоцитов составляло  $3,71 \pm 0,142$  г/л, а пиронина в цитоплазме -  $6,82 \pm 0,294$  г/л, или  $6,2 \times 10^{-3}$  и  $2,3 \times 10^{-2}$  мкмоль/мкл соответственно.

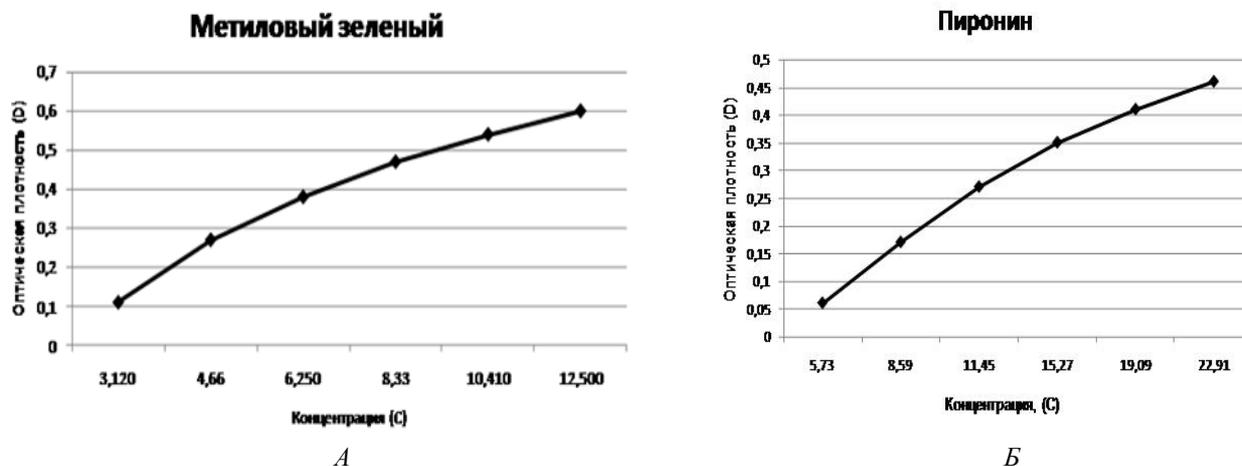


Рисунок 1. График калибровочной функции, представляющей собой зависимость между концентрацией красителя и вычисленным значением оптической плотности для градуировочных стандартов: А – метилового зеленого; Б – пиронина

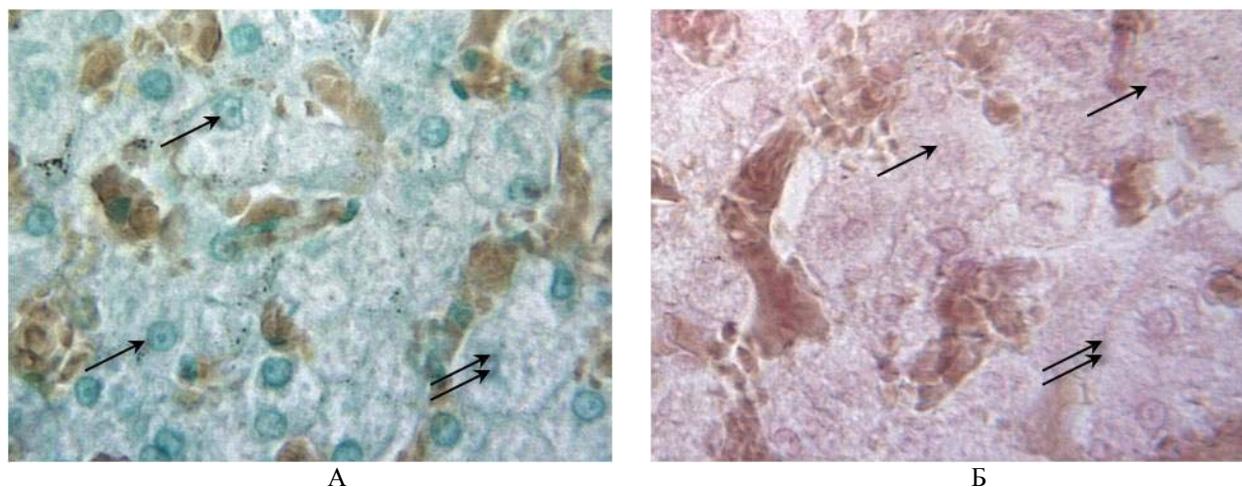


Рисунок 2. Оцифрованные изображения парафиновых срезов печени, окрашенных: А – метиловым зеленым; Б – пиронином. Об. 40, ок. 10. Одиночными стрелками указаны ядра, двойными – цитоплазма гепатоцитов

Исходя из данных о структуре химической связи красителя и вещества, возможно вычисление концентрации анализируемого соединения. Известно, что каждая молекула как метилового зеленого, так и пиронина ковалентно связывается с двумя соседними нуклеотидами в составе нуклеиновых кислот; таким образом, стехиометрическое со-

отношение между количеством нуклеотидов и связанных с ними молекул красителя составляет 2:1 [8, 9]. Вычисленное значение молярной концентрации нуклеотидов, таким образом, составит для ядерной ДНК –  $1,24 \times 10^{-2}$ , а для цитоплазматической РНК –  $4,6 \times 10^{-2}$  соответственно.

### Выводы

Применение градуировочных стандартов для анализа оцифрованных полей зрения гистохимически окрашенных гистологических

препаратов позволяет определить концентрацию красителя, связанного в стехиометрическом соотношении с веществом в со-

ставе гистологических структур. Полученная информация может быть использована как для объективизации результатов гистохими-

ческого анализа, так и для интерпретации данных биохимических исследований.

### Литература и веб-библиография

1. *Кисели Д.* Практическая микротехника и гистохимия / Д. Кисели, под ред. Д. Ромханьи. Перевод Г. Дьенеш, Й. Пушкаш. - Budapest: Akademiai Kiado, 1962. - 399 с.
2. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли, под ред. В.В. Португалова. - М: «Мир», 1969. - 624 с.
3. *Агроскин Л. С.* Цитофотометрия. Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению. / Агроскин Л. С., Папаян Г. В. - Л., 1977. - с.295.
4. *Ташкэ К.* Введение в количественную цитогистологическую морфологию / К. Ташкэ. Перевод И. Пятницкого. - Bucuresti: Изд-во Акад. Соц. Респ. Румынии, 1980. - 192 с.
5. *Щудло М. М.* Количественный анализ метахромазии суставного хряща в телепатологии / М. М. Щудло, Т. А. Ступина, Н.А. Щудло // Известия Челябинского научного центра. - 2004. - Спец. выпуск (25).- С.17-22.
6. *Ирьянов Ю. М.* Обработка и анализ изображений в гистологических исследованиях с применением стандартных компьютерных программ / Ю. М. Ирьянов, Т. А. Силантьева, Е. Н. Горбач, Е. В. Осипова, Т. Ю. Ирьянова // Морфологические ведомости. - 2004. - № 1-2. - С. 11-13.
7. *Сапожников А. Г.* Гистологическая и микроскопическая техника: руководство / А. Г. Сапожников, А. Е. Доросевич - Смоленск : САУ, 2000. - 476 с.
8. *Буданцев А.Ю.* Основы гистохимии: Учебное пособие (компьютерный вариант) / А.Ю. Буданцев. - Пушино: Пушинский гос. ун-т, 2008. - Режим доступа: [http://window.edu.ru/window/library?p\\_rid=59159](http://window.edu.ru/window/library?p_rid=59159)
9. *Конарев В. Г.* Цитохимия и гистохимия растений: [учеб. пособие для биол. фак. гос. ун-тов]. - М.: Высш. школа, 1966. - 319 с.

Надійшла до редакції: 25.09.2009.

© Т.А. Силантьева, Е.Н. Горбач

---

Кореспонденція: Силант'єва Т.О.,  
вул. Гоголя, д. 60, кв. 12, 640000, Курган, Росія  
E-mail: [tsyl@mail.ru](mailto:tsyl@mail.ru)