

Фрактальная площадь клеточного ядра в цитометрии опухолей щитовидной железы

*Белорусский государственный университет, Республиканский консультационный
эндокринологический центр, Минск*

В статье рассматривается способность цитометрических параметров, основанных на фрактальной площади клеточного ядра, дискриминировать опухоли щитовидной железы по сравнению с обычными морфоденситометрическими параметрами. С помощью t-критерия Стьюдента и коэффициента детерминации отобраны следующие наиболее информативные параметры: выпуклый периметр ядра (Convex Perimeter), интегральная оптическая плотность ядра (IODn) и фрактальная площадь гетерохроматина (FAh). В виду того, что эти параметры слабо коррелируют между собой, их целесообразно использовать совместно в многопараметрических методах.

Ключевые слова: цитометрические параметры, фрактальная площадь, клеточное ядро, опухоли щитовидной железы.

S.V. Gloushen, M.A. Ivanova, N.S. Gordienko

The fractal area of cell nucleus in a thyroid tumors cytometry

The article considers the ability of cytometric parameters based on the fractal area of cell nucleus to discriminate between thyroid tumors in comparison with common morphodensitometric parameters. The following parameters were selected with help of Student's t-test and determination coefficient: Convex Perimeter, Integral Optical Density of nucleus (IODn) and Fractal Area of heterochromatin (FAh). Because of the weak correlation between these parameters it is reasonable to use them together in multiparametric methods.

Key words: cytometric parameters, fractal area, cell nucleus, thyroid tumors.

Фрактальная площадь клеточного ядра представляет собой площадь поверхности, формируемой при трехмерном представлении его цифрового изображения [3]. Хотя этот показатель был предложен более десяти лет назад [6], примеры его использования в цитометрии опухолей встречаются редко [5]. Ранее нами было показано, что фрактальная площадь клеточного ядра содержит информацию о связности компонентов хроматина, что может быть использовано для оценки патологических изменений морфологии ядра опухолевой клетки [1], а также для автоматической сегментации эу- и гетерохроматина [4]. Настоящее сообщение посвящено анализу информативности параметров, основанных на фрактальной площади клеточного ядра по сравнению с широко применяемыми в цитометрии опухолей морфоденситометрическими параметрами.

Материал и методы

Материалом исследования служили мазки клеток щитовидной железы, полученных из образцов тонкоигольной аспирационной биопсии, проводимой под контролем ультразвукового сканера. Для обработки цитологических препаратов использовали устройство НЕМА-ТЕК 200 фирмы Bayer (стандартизованная фиксация

и окраска по Райту). Всего было исследовано 22 пациента с диагнозом "фолликулярная опухоль" (12 случаев) и "папиллярный рак" (10 случаев).

Цифровые изображения клеток получали с помощью системы анализа изображений, состоящей из микроскопа Jenaval (Zeiss), телекамеры OS-45D (Oscar), фреймграббера MV-500 (Mutech) и компьютера. При использовании объектива 100x/1.25 и дополнительной линзы 0.8x размер ячейки ПЗС-матрицы в плоскости препарата составил 100 нм.

Для каждого случая записывали не менее 80 цифровых изображений клеток, на которых вычисляли по 20 параметров (14 морфоденситометрических параметров и 6 параметров, основанных на фрактальной площади):

- Area - площадь проекции ядра на плоскость без участков с фоновой яркостью
- Filled Area - площадь проекции ядра, включая участки с фоновой яркостью
- Perimeter - периметр проекции ядра
- Convex Perimeter - выпуклый периметр проекции ядра
- Form Factor - фактор формы, рассчитываемый по формуле $4 \cdot \text{Area} / \text{Perimeter}^2$
- Roundness - фактор формы, рассчитываемый по формуле $4 \cdot \text{Area} / \text{Length}^2$ (Length - максимальный диаметр ядра)
- Convexity - фактор формы, рассчитываемый по формуле $\text{Convex Perimeter} / \text{Perimeter}$
- Solidity - параметр, оценивающий компактность ядра; рассчитывался по формуле $\text{Area} / \text{Convex Perimeter}$
- IODn - интегральная оптическая плотность ядра
- IODh - интегральная оптическая плотность гетерохроматина
- IODE - интегральная оптическая плотность эухроматина
- AODn - средняя оптическая плотность ядра
- AODh - средняя оптическая плотность гетерохроматина
- AODE - средняя оптическая плотность эухроматина
- FAn - фрактальная площадь ядра
- FAh - фрактальная площадь гетерохроматина
- FAe - фрактальная площадь эухроматина
- RFAn - относительная фрактальная площадь ядра
- RFAh - относительная фрактальная площадь гетерохроматина
- RFAe - относительная фрактальная площадь эухроматина

Выделение границы ядра проводилось по гистограмме яркости. Для расчета фрактальной площади использовали кривую зависимости суммарного периметра компонентов хроматина от яркости - профиль фрактальной площади (рис. 1). Фрактальная площадь ядра FAn равнялась интегралу на участке А - С, а с учетом того, что максимум в точке В соответствовал границе гетеро- и эухроматина, интегрирование участков А - В и В - С давало фрактальные площади гетеро- и эухроматина. Интегральные оптические плотности рассчитывали как суммы значений пикселей в пределах всего ядра или его эухроматиновых и гетерохроматиновых участков. Средние оптические плотности вычисляли путем деления интегральной оптической плотности на площадь соответствующего компонента ядра.

Для уменьшения влияния размеров ядра параметры фрактальной площади (FA) делили на площадь ядра Area, в результате получали относительные фрактальные площади RFA. Статистическую обработку результатов измерений проводили с

помощью программ Excel и Statistica. Для анализа информативности параметров использовали коэффициент детерминации [2]. Взаимосвязь параметров оценивали по коэффициенту корреляции Спирмена.

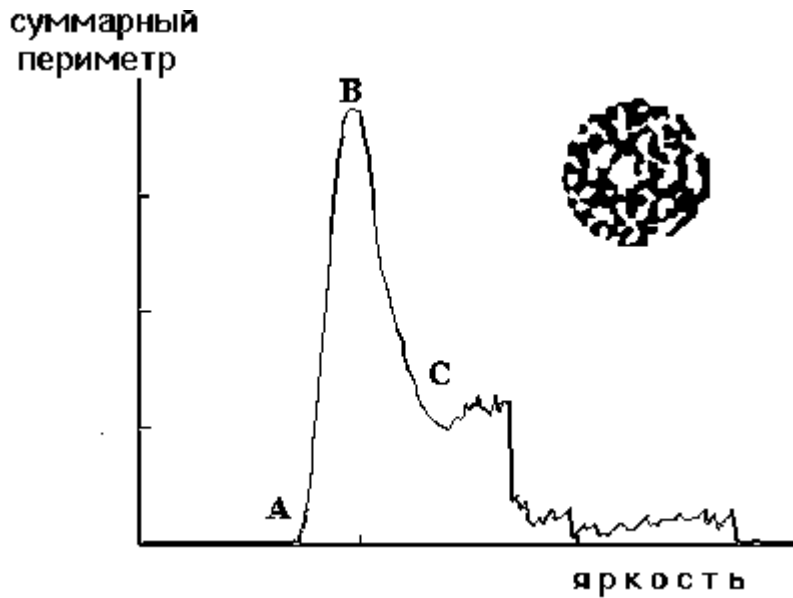


Рис. 1. Профиль фрактальной площади ядра и распределение хроматина в точке В
Результаты и обсуждение

Результаты статистического анализа цитометрических параметров клеточных ядер опухолей щитовидной железы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Различия цитометрических параметров клеточных ядер фолликулярной опухоли (аденома) и папиллярного рака (карцинома) щитовидной железы ($M \pm s$)

Параметр	Аденома	Карцинома	t-критерий
Area	79.01 ± 16.06 мкм	113.3 ± 29.64 мкм	8,98 *
Filled Area	79.43 ± 16.66 мкм	114.7 ± 30.19 мкм	9,10 *
Perimeter	38.64 ± 6.627 мкм	54.65 ± 23.08 мкм	6,14 *
Convex Perimeter	31.27 ± 4.470 мкм	38.80 ± 5.45 мкм	9,19 *
Form Factor	0,688 ± 0,147	0,582 ± 0,216	3,54 *
Roundness	0,886 ± 0,049	0,772 ± 0,111	8,61 *
Convexity	0,923 ± 0,072	0,901 ± 0,052	2,09
Solidity	0,996 ± 0,009	0,979 ± 0,031	5,01 *
IODn	13766 ± 3758	25415 ± 9946	10,41 *
IOD7h	4136 ± 1368	7369 ± 2540	10,36 *
IODe	8880 ± 3026	16961 ± 9096	8,03 *
AODn	1,176 ± 0,313	1,472 ± 0,568	4,06 *
AODh	0,347 ± 0,083	0,427 ± 0,127	4,64 *
AODE	0,765 ± 0,297	0,980 ± 0,542	3,10 *
Fan	79878 ± 24181	123544 ± 56793	4,51 *
Fah	28126 ± 8864	49611 ± 20841	8,91 *
Fae	49859 ± 17010	71155 ± 40981	6,64 *
RFAh	6,759 ± 1,605	7,327 ± 3,206	0,52
RFAh	2,417 ± 0,788	2,895 ± 1,071	3,12 *
RFAe	4,181 ± 1,032	4,268 ± 2,468	0,29

· достоверно при $P < 0.05$

Из 20 использованных нами цитометрических параметров статистически значимые различия между обеими формами опухолей обнаружены по 17 параметрам. В наибольшей степени различия регистрируются по интегральной оптической плотности ядра и гетерохроматина (IODn и IODh), параметрам площади ядра (Area и Filled Area), выпуклому периметру (Convex Perimeter), фрактальной площади гетерохроматина (FAh) и одному из факторов формы (Roundness).

Информативность цитометрического параметра можно оценить также с помощью коэффициента детерминации, который представляет собой отношение дисперсии средней по случаям к общей дисперсии параметра для данной нозологической формы (табл. 2).

Таблица 2

Оценка информативности цитометрических параметров по коэффициенту детерминации

Морфометрические		Денситометрические		Фрактальной площади	
Area	0,3097	IODn	0,3338	Fan	0,1746
Filled Area	0,3143	IODh	0,2271	Fah	0,2771
Perimeter	0,1562	IODe	0,0015	Fae	0,0885
Convex Perimeter	0,3974	AODn	0,0840	RFAh	0,0481
Form Factor	0,0068	AODh	0,0802	RFAh	0,0559
Roundness	0,2808	AODE	0,0072	RFAe	0,0617
Convexity	0,0324				
Solidity	0,1095				

В группе морфометрических параметров максимальные коэффициенты детерминации наблюдаются у параметров Convex Perimeter, Filled Area, Area и Roundness. В группе денситометрических параметров высокие коэффициенты детерминации характерны для IODn и IODh. Среди параметров фрактальной площади высокий коэффициент детерминации отмечен у фрактальной площади гетерохроматина (FAh). В результате как наиболее информативные для дискриминации фолликулярной опухоли и папиллярного рака из каждой группы было отобрано по одному параметру:

- выпуклый периметр (Convex Perimeter);
- интегральная оптическая плотность ядра (IODn);
- фрактальная площадь гетерохроматина (FAh).

Результаты проверки их коллинеарности показаны в таблице 3.

Таблица 3

Взаимная корреляция наиболее информативных цитометрических параметров*

Параметры	Convex Perimeter	IODn	FAh
Convex Perimeter	—	<i>0,6385</i>	<i>0,3331</i>
IODn	0,2322	—	- <i>0,0816</i>
FAh	0,3163	0,1156	—

*курсивом выделены данные по аденоме, жирным шрифтом - по карциноме

Высокая информативность и статистическая независимость отобранных параметров создает условия для их совместного использования. Об эффективности такого подхода свидетельствует диаграмма рассеяния клеток контрольной выборки, построенная в координатах FAh и IODn/Convex Perimeter (рис. 2).

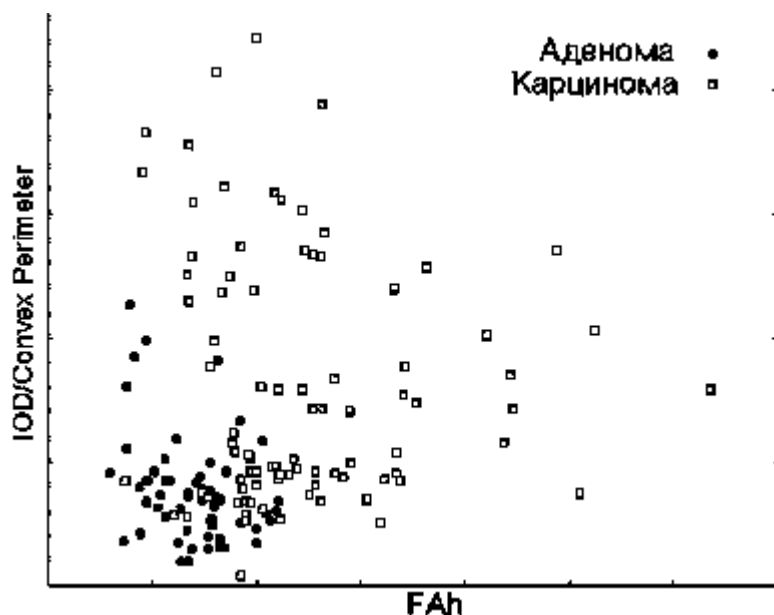


Рис. 2. Диаграмма рассеяния клеток по параметрам FAh и IODn/Convex Perimeter

Из представленной диаграммы следует, что при совместном использовании параметров "фрактальная площадь гетерохроматина", "интегральная оптическая плотность ядра" и "выпуклый периметр ядра" большинство клеток доброкачественной и злокачественной форм занимает различные области параметрического пространства, хотя полной дискриминации фолликулярной опухоли и папиллярного рака получить не удастся.

Выводы. Параметры фрактальной площади клеточного ядра позволяют оценить различия структуры хроматина опухолей щитовидной железы, причем наиболее информативной является "фрактальная площадь гетерохроматина". Ввиду того, что параметры фрактальной площади ядра слабо коррелируют с его морфоденситометрическими параметрами, их целесообразно использовать совместно для усиления дискриминирующего эффекта.

Литература

1. Глушен С. В. Модель "ландшафта" и ее применение в цитопатологии// В сб. "Достижения современной биологии и биологическое образование".-Минск: БГУ, 1997. - С.158-163.
2. Медик В. А., Фишман Б. Б, Токмачев М. С. Руководство по статистике в медицине и биологии (в 2-х томах). Т. 1.- М.: Медицина, 2001. - 412 с.
3. Doudkine A., MacAulay C., Poulin N., Palcic B. Nuclear texture measurements in image cytometry // Pathologica. - 1995. - N 87. - P. 286-299.
4. Gloushen S., Melnikov I., Merkulova I., Pasukov V. Rapid evaluation of cell nuclear morphology in tumors by image cytometry// 15th Heidelberg Cytometry Symposium. - Heidelberg, 2002. - P. 62.
5. Lavrencak J., Zganec M., Us-Krasovec M. Image analysis of Feulgen-thionin stained nuclei with round low-chromatin areas (RLCA) // Analytical and Cellular Pathology -1999. - Vol.18, N 20. - P. 109-119
6. MacAulay C., Palcic B. Fractal texture features based on optical density surface area: use in image analysis of cervical cells // Analytical and Quantitative Cytology and Histology - 1990. - N 12. - P. 394-398.