

ОСОБЕННОСТИ ПРОГРАММНОЙ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДА ДНК-КОМЕТ

Введение

Длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды сопровождается увеличением повреждения ДНК и изменяет работу системы репарации, которые могут привести к инициации мутаций и злокачественной трансформации в клетках. В последние годы были разработаны многие аналитические методы, предназначенные для оценивания повреждения ДНК и исследования процессов репарации ДНК. Тем не менее, не все из них обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для мониторинга различных повреждений ДНК.

Метод ДНК-комет применяется в системах *in vivo* и *in vitro*. В настоящее время метод широко используется в исследованиях по экологии, по изучению радиопротекторных воздействий, генотоксичности фармацевтических препаратов и химических веществ, при исследовании репарации ДНК, терапии при раке. Использование метода ДНК-комет позволяет учитывать гетерогенность сложных популяций, изучать повреждения ДНК и репарацию [1].

Актуальность темы

Процесс исследования микропрепаратов обычно заключается в подсчете микрообъектов, а также в определении их качественных характеристик, различающихся по определенным признакам, что требует от специалиста-оператора большой внимательности, приводит к быстрой утомляемости зрения. Существенным фактором при этом также являются субъективные и качественные оценки параметров микрообъектов, приводящих к низкой точности лабораторной диагностики.

Интенсивное развитие вычислительной техники и широкое внедрение цифровых компьютерных технологий привело к появлению автоматизированных систем для обработки биомедицинских изображений. Применительно к исследованию микропрепаратов такие системы позволяют автоматизировать процесс определения количества микрообъектов, выполнять расчеты и формировать предварительные диагностические заключения [2].

Постановка задачи

Исходными данными являются цифровые изображения микропрепаратов, полученные методом щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) в лаборатории криобиологии.

Цель работы – рассмотрение особенностей программной реализации метода ДНК-комет, а также алгоритмов вспомогательной фильтрации и алгоритмов бинаризации изображений микропрепаратов.

Структура биомедицинской системы цифровой микроскопии

Биомедицинские системы цифровой микроскопии позволяют делать снимки изображения медицинских микропрепаратов, передавать их в ПЭВМ и выполнять их автоматизированную обработку. Программно-аппаратный комплекс включает подготовленный исследуемый микропрепарат, микроскопа Carl Zeiss 3D-microscope Axiovert 200M, цифровую высокочувствительную камеру, преобразующую изображение в цифровой код, блок сопряжения, выполняющего передачу полученного изображения в ПЭВМ и программный модуль для обработки полученных изображений [3]. Данные, поступающие в ПЭВМ через блок сопряжения и соответствующий программный интерфейсный модуль, преобразуются в модулях предварительной обработки, сегментации и анализа изображений (рис.1).

Специализированный программный модуль позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет, характеризующих целостность структуры ДНК, – длину кометы, длину хвоста, диаметр головы, процентное содержание ДНК в голове или хвосте, а также в качестве показателя поврежденности ДНК используют длину хвоста, %ДНК в хвосте и момент хвоста.

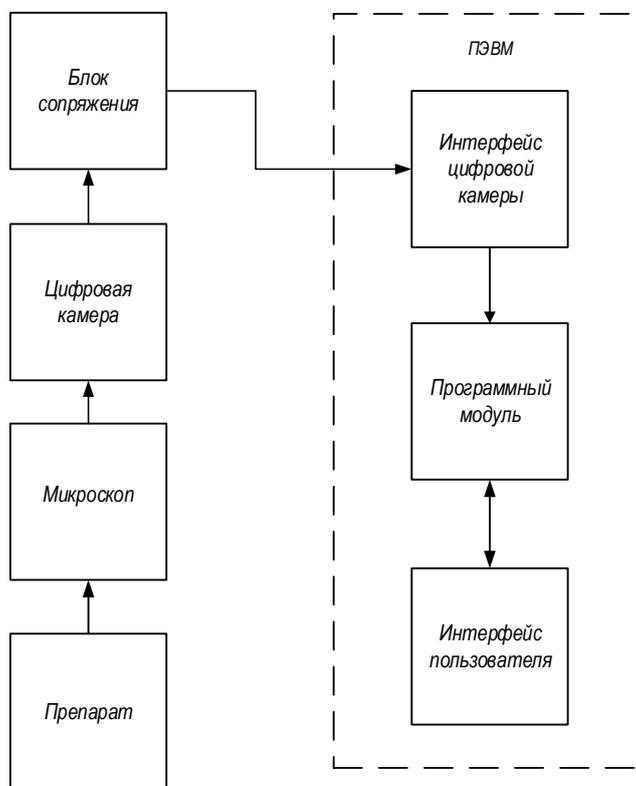


Рис. 1

На сегодня разработано около десятка программ для анализа ДНК-комет, несколько из которых находятся в свободном доступе. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме реального времени либо с сохраненных цифровых изображений.

Метод ДНК-комет является быстрым и чувствительным методом регистрации повреждений ДНК и изучения репарации ДНК на уровне одиночных клеток. Для того чтобы повысить скорость анализа повреждений ДНК, а также увеличить выборку микроскопических данных, необходимо разработать систему определения радиационного поражения человека для оценки целостности генома после воздействия различных факторов окружающей среды.

В работе требуется рассмотреть особенности программной реализации метода ДНК-комет с целью анализа полученных изображений ДНК-комет. В данную программную реализацию метода ДНК-комет необходимо включить три основных модуля [4]:

- а) модуль предварительной обработки изображения;
- б) модуль сегментации изображения;
- в) модуль анализа изображения.

Первым этапом предварительной обработки изображения является операция гистограммной коррекции. Для обработки изображений ДНК-комет на микропрепаратах целесообразнее использовать нелинейное изменение контрастности, так как оно применяется для устранения искажений передающих устройств, что важно в случае при передаче изображения от микроскопа на монитор компьютера [5].

Вторым этапом предварительной обработки изображения является фильтрация. Медианная фильтрация – вид нелинейной ранговопорядковой фильтрации. Медианой неубывающей последовательностью является середина этой последовательности. В случае применения данной фильтрации пиксели, попадающие в центральную окрестность (апертуру фильтра), необходимо упорядочить (по убыванию или возрастанию) и заменить центральный элемент медианным значением [6].

Медианная фильтрация не приводит к появлению новых промежуточных уровней интенсивности и полностью подавляет помеху, величина площади которой не превосходит половины апертуры фильтра. Поэтому апертура медианного фильтра выбирается, как правило, исходя из априорных сведений о размерах подавляемых помех.

В отличие от стандартной усредняющей фильтрации медианные фильтры не размывают контуры, так как на границах объекта перепады интенсивности занимают большую площадь, чем площадь помехи. Медианные фильтры можно применять как рекурсивно, так и нерекурсивно. В случае рекурсивности эффект фильтра усиливается [7].

Следующим этапом преобразования изображений является процесс автоматизированной сегментации. Данный процесс осуществляется в два этапа: грубой сегментации – отделения областей микрообъектов от фона и разметки областей, принадлежащих отдельным микрообъектам (микрообъекты не должны пересекаться) [8].

Метод ориентирован на обработку изображений, отдельные однородные участки которых различаются средней яркостью. Простейшим и вместе с тем часто применяемым видом сегментации является бинарная сегментация, когда имеется только два типа однородных участков. Простейшим видом сегментации является бинарная сегментация, в данном случае целесообразнее использовать метод Оцу (рис. 2) [9].

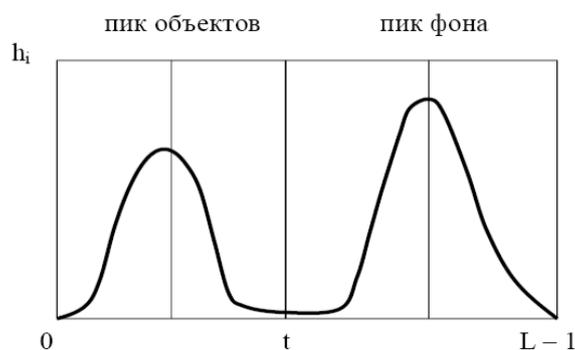


Рис. 2

Методы определения порога по гистограмме сводятся к определению глобального максимума, соответствующего фону, и наибольшего локального максимума, соответствующего изображениям хромосом. Пороговый уровень T рассчитывается по положению локального минимума между выделенными максимумами.

После бинаризации изображения появляется необходимость выделения найденных объектов на изображении, т.е. разбить исходное изображение на некоторое множество связанных (в пространственном смысле) областей, пиксели которых близки по некоторому признаку. Подходящим методом разметки в данном случае является рекурсивный алгоритм последовательного сканирования [10].

На этапе анализа проводится расчет основных показателей ДНК-комет. В качестве показателя поврежденности ДНК чаще всего используют длину хвоста, %ДНК в хвосте или их произведение – так называемый момент хвоста (рис. 3).

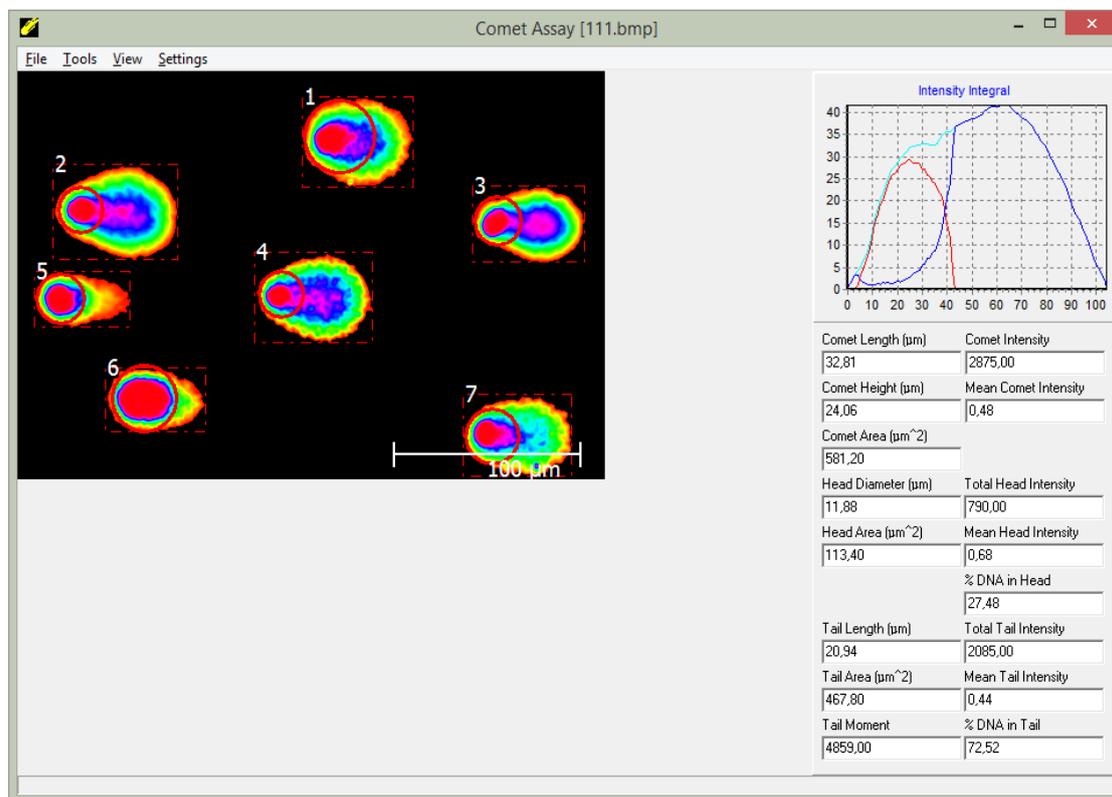


Рис. 3

Выводы

Повышение скорости анализа повреждений ДНК, автоматизация расчетов основных показателей приводят к повышению информативности методов исследования повреждений ДНК и систем репарации ДНК. Использование таких программных реализаций позволяет в значительной степени автоматизировать трудоемкий процесс анализа микропрепаратов и получить более точные количественные характеристики исследуемых объектов.

Таким образом, рассмотренные особенности программной реализации метода ДНК-комет позволяют оценить целостность генома после воздействия различных факторов и могут быть использованы в лабораториях криобиологии, в исследованиях генотоксичности фармацевтических препаратов и клинических исследованиях по пренатальной диагностике.

Список литературы: 1. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. – 2008. – Т.10, №3. – С. 303-309. 2. Суворов А.П. Микроскопия в науке и технике. – М. : Наука и техника, 2012. – 136 с. 3. Кэррил Ф.М. Как работать с цифровым микроскопом. М. : Мир, 2010. – 250с. 4. Шлихт Г.Ю. Цифровая обработка изображений. – М. : Эком, 2011. 336 с. 5. Горьян И.С. Введение в цифровую обработку изображений. – СПб. : ЭИС им. М.Бонч-Бруевича, 1992. – 60 с. 6. Приоров А.Л. Цифровая обработка изображений. – Ярославль : ЯрГУ, 2013. – 235 с. 7. Хуанг Т. Обработка изображений и цифровая фильтрация. – М. : Мир, 2010. – 496 с. 8. Сойфер В.А. Методы компьютерной обработки изображений. – М. : Физматлит, 2003. – 394 с. 9. Пантелеев В.Г. Компьютерная микроскопия. – М. : Техносфера, 2005. – 305 с. 10. Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. – М. : Техносфера, 2006. – 1072 с.

Харьковский национальный
университет радиоэлектроники

Поступила в редколлегию 10.02.2016