

Количественная оценка микроструктурной неоднородности фаций биожидкостей

© М.Э. Бузоверя, Ю.П. Щербак, И.В. Шишпор

Саровский физико-технический институт — филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования
Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ,
607186 Саров, Нижегородская область, Россия
e-mail: buzoverya@expd.vniief.ru; ypshtcerbak@mail.ru; ira.shishpor@yandex.ru

(Поступило в Редакцию 5 февраля 2014 г.)

Рассмотрены различные виды микроструктурной неоднородности фаций биожидкостей. Приведены подходы к систематике и количественной оценке структурной неоднородности. Представлен алгоритм оценки микроструктурной неоднородности сыворотки крови на примере системы конкреций.

Введение

Микроструктурная неоднородность является параметром, от которого во многих случаях зависят свойства материалов. Поэтому объективная количественная оценка неоднородности структуры является важной и необходимой задачей в определении качества материалов. В такой предметной области, как функциональная морфология биожидкостей, также было замечено, что различия в микроструктуре фаций в целом связаны с состоянием организма и тяжестью патологии [1,2].

В области морфологического анализа биожидкостей на настоящий момент эмпирический поиск опережает развитие теории. Интерпретация структур фаций дается на основании анализа большого количества экспериментального клинического материала. При анализе микроструктур биожидкостей чаще всего используется описательный подход. В настоящее время вопросы интерпретации и количественного анализа изображений биологических жидкостей находятся в стадии интенсивного изучения. В работах по обработке и анализу изображений биологических жидкостей в основном рассматриваются частные задачи, касающиеся фрагментов фаций или отдельных структурных элементов [3–7].

В ходе изучения структур биологических жидкостей нами была разработана серия аппаратно-программных комплексов „Морфо“ (АПК „Морфо“), которая включает библиотеку программ для обработки изображений любых биожидкостей и позволяет получать как интегральные, так и детальные морфологические параметры [8,9]. Программное обеспечение воплощает предыдущий опыт в методологии изучения структуры полимерных систем и других твердотельных объектов, предназначено для широкого использования в области исследования различных структур многокомпонентных систем, в том числе пленок биополимеров.

Применение АПК „Морфо“ в медико-биологических исследованиях позволило получить ряд интересных для клинической практики результатов. Однако возможности методик, заложенных в комплексе, использованы на сегодняшний день далеко не полностью. Чаще всего

используются программы по обработке трещин. Оценка неоднородности структурных элементов не проводится и является в настоящее время неразработанной областью количественной микроскопии фаций биожидкостей. В настоящей работе показаны некоторые подходы к систематике и к количественной оценке структурной неоднородности фаций.

Виды микроструктурной неоднородности

Микроструктура описывается на качественном и количественном уровнях. Описание микроструктуры состоит в идентификации фаз, определении их морфологии (размера, формы частиц, их распределения) и химического состава. Рассмотрим некоторые общие понятия, необходимые для структурной характеристики фаций.

Микроструктурные параметры можно представлять количественно: объемная доля фаз, размеры, форма микрочастиц. Во многих случаях структура зависит от направления или геометрического положения структурных элементов. Степень изотропии и гомогенность материала являются важными характеристиками микроструктуры. Обычно реальные материалы гетерогенны, что отражается в их микроструктуре.

Объектами различных видов неоднородности являются элементы микроструктуры: отдельные частицы разных фаз, поверхности микрочастиц, углы ориентации частиц и др. Основными видами неоднородности строения отдельно взятых микрочастиц являются *неоднородность по форме и неоднородность по размерам*. Если же рассматривать структуру в целом, то появляется еще один вид неоднородности — *по расположению микрочастиц в пробе*.

Таким образом, приходится констатировать весьма большое многообразие форм структуры, определяемых понятием неоднородности. Реально во многих случаях неоднородность структур является комбинированной, и в ней соединяются неоднородности нескольких типов структурных элементов, относящихся к различным видам.

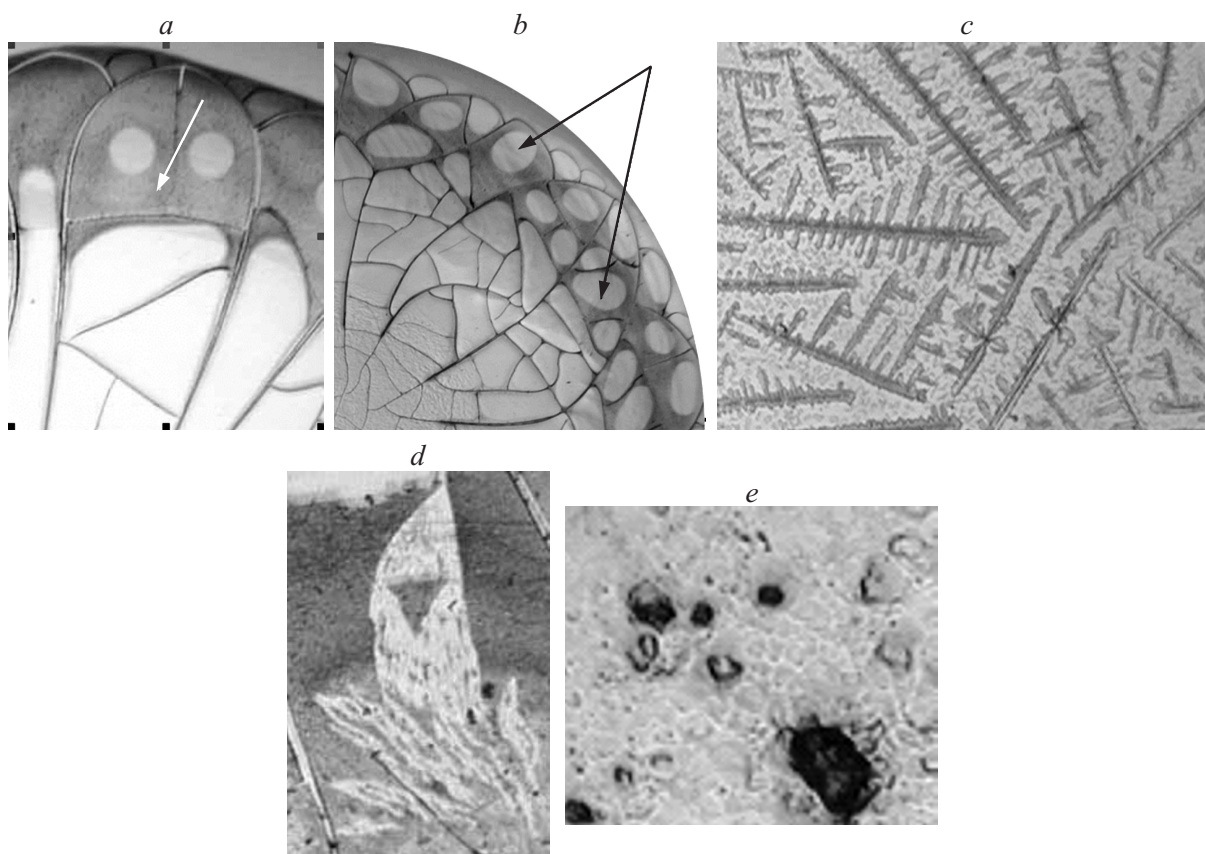


Рис. 1. Твердые структурные элементы биожидкостей: *a* — матрица, *b* — конкреции, *c* — дендриты, *d* — липидно-белковые агрегаты (языки Арнольда), *e* — включения.

Структурные элементы фаций

При изучении структуры материала большое значение имеет изучение структурных особенностей ее отдельных элементов. Прежде чем рассмотреть алгоритмы оценки неоднородности фаций, необходимо выделить структурные элементы в микроструктуре биожидкости, по которым, собственно, и будет проводиться оценка.

Биожидкости являются многокомпонентными системами. Удаляя воду, получаем *фацию-пленку*, на которой зафиксирована структура пространственного расположения элементов, ранее находившихся в растворенном высокоподвижном состоянии. Особенности структуры фации биожидкостей в первую очередь определяются концентрацией растворенных в них веществ и состоянием белков. К примеру, основными структурными элементами фаций биожидкостей, имеющих высокую концентрацию белка, таких как сыворотка крови (содержание общего белка в норме составляет от 65 до 85 г/л) в состоянии нормы, являются конкреции и трещины. Для фаций таких биожидкостей, как слюна, слеза, моча, структурные элементы — это дендриты, фракталы, включения, трещины. То есть концентрация белка является одним из основных факторов, влияющих на паттерн фации.

Структура биологической жидкости образуется твердыми структурными элементами, слагающими структурный остов, и трещинами. Сочетание твердых структурных элементов с трещинами характеризует внешний облик фаций. Под твердыми структурными элементами биожидкостей следует понимать микрочастицы и их ассоциаты, образующие структурную основу фаций и определяющие ее дисперсность. К ним относятся: бесструктурная матрица, отдельные конкреции и их ассоциаты, дендриты, агрегаты белково-солевые, липидно-белковые или другой природы, инородные включения разной природы и формы (рис. 1).

Трещины и их показатели

В ходе проведения экспериментальных и клинических исследований было установлено, что многие элементы структуры пленок биологических жидкостей, прежде всего трещины, имеют четкую взаимосвязь с определенными физиологическими и патологическими состояниями организма. Отдельные стадии разрушения отражаются в рельефе поверхности фаций и надлежащая интерпретация этих следов дает ценные сведения. Само возникновение трещин является следствием характерной для фаций неоднородности распределения

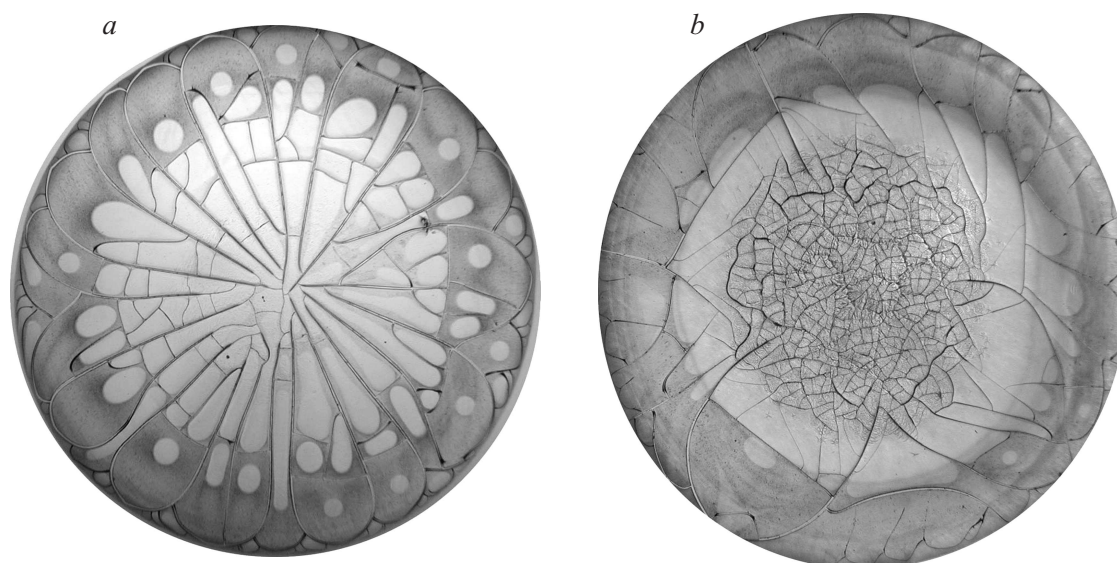


Рис. 2. Микроструктура фации сыворотки крови: *a* — практически здорового лица, *b* — больного с дисциркуляторной энцефалопатией.

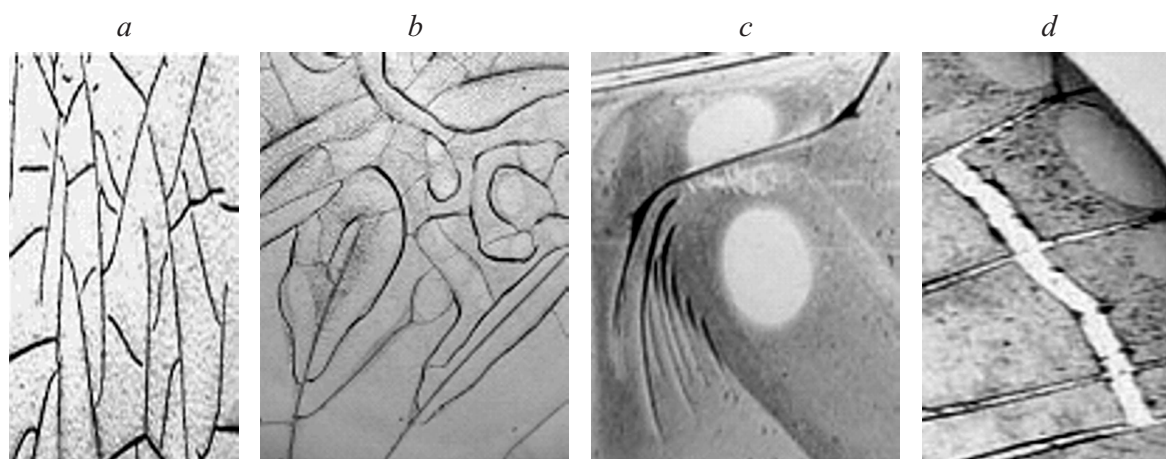


Рис. 3. Типы трещин: *a* — трехлучевые, *b* — жгутовые, *c* — штриховые, *d* — широкая.

напряжений по толщине и диаметру пробы. Разрывы химических или физических связей в цепных макромолекулах, возникающих в зонах перенапряжений, могут являться зародышами развивающихся в дальнейшем трещин. Путь и контуры трещины зависят от природы и структуры окружающего материала, на который воздействуют напряжения. Возникновение разрушения в дефектах, прерывистое развитие процесса, вторичные разрушения и их связь с фронтом главной трещины, образование различных геометрических фигур — все это имеет диагностическое значение, так как связано с физико-химическим состоянием исследуемых биожидкостей.

Для фации сыворотки крови здорового человека характерны радиальные трещины по периферии, загибающиеся в арки и сходящиеся в центре (рис. 2, *a*). При

различных патологических процессах меняется характер растрескивания как периферической, так и центральной зоны фации сыворотки; могут появляться различные структуры, не встречающиеся у здоровых людей (рис. 2, *b, 3*) [1,10]. Итак, трещины — это структурный компонент, характеризующий состояние матрицы.

Трещины в фациях отличаются по величине (длина, толщина), ориентации, месту расположения (край, центр). Они могут представлять истинные пустоты, а могут быть заполнены близлежащим к трещине веществом, которое переходит в трещину (жгуты) (рис. 3).

Механизм возникновения трещин до конца не выяснен, проблема требует изучения. Однако выявленные эмпирические закономерности позволяют делать оценку состояния организма и уже активно используются в медицинской практике.

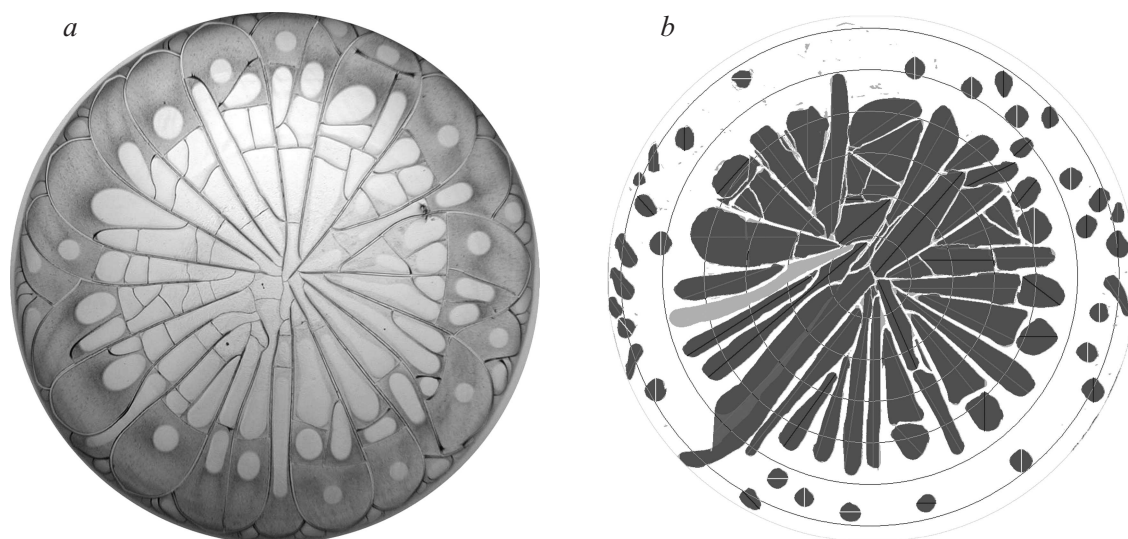


Рис. 4. Фрагмент работы программы Concretion: *a* — исходная проба, *b* — после обработки.

Твердые структурные элементы сыворотки крови и их показатели

Под твердыми структурными элементами следует понимать первичные частицы, их ассоциаты, определяющие дисперсность фазы и формирующие ее структурный скелет. В фазиях сыворотки крови выделяют следующие структурные элементы: бесструктурная аморфная матрица, в которую погружены структурные элементы сыворотки крови — конкреции, ассоциаты конкреций, специфические маркеры.

Результаты многочисленных современных исследований показали, что действие патогенного фактора изначально выражается в изменениях структуры белковых и других органических молекул. При различных патологических сдвигах в фазиях дегидратированных биожидкостей больного формируется адекватный структурный рисунок, который объективно отражает интегрированную картину этих нарушений. Фаза сыворотки крови теряет симметрию радиальных трещин, секторов и отделенностей, а конкреции носят незавершенный характер или не формируются вообще [1]. Таким образом, размер, расположение и форма конкреций являются существенным диагностическим критерием.

Согласно работам [1,11], конкреция — скопление однородного вещества в фазии биожидкости, образующееся вследствие его стяжения локальным центром самоорганизации и сжатием активными элементами окружающей среды. В состоянии нормы конкреции имеют вид глобул молочного цвета по форме, близкой сферической. Размер частиц варьирует незначительно. Характерна слабая связанность. При патологических состояниях начинается объединение первичных конкреций в ассоциаты разной формы и размеров. В зависимости от вида и тяжести патологии форма, размер и характер распределения конкреций изменяются в больших пределах.

Основные морфометрические характеристики конкреций — размер, форма, степень связанности и занимаемая ими площадь. Кроме того, важным текстурным признаком является их ориентация в пространстве. Поэтому кроме морфометрических признаков следует оценивать как *направление преимущественной ориентации структурных элементов, так и степень их ориентации*. Степень ориентации характеризует упорядоченность структурных элементов в направлении ориентации (по отношению к центру фазии) и оценивается как отношение числа элементов, лежащих в направлении ориентации к общему числу частиц.

Специфические маркеры

По терминологии материаловедения специфический маркер можно назвать дефектом. Дефект — аномальное, редко встречающееся, несвойственное эталонной структуре образование. Например, появление структур в виде специфического маркера „языка Арнольда“ (рис. 1, *d*) свидетельствуют о воспалительном процессе в организме [1,12].

В библиотеке программ „Морфо“ есть программа Markerblood, которая позволяет производить подсчет количества особых объектов (маркеров) и вычислять суммарную площадь, которую они занимают.

Количественные методы оценки микроструктурной неоднородности фазий

С 2001 г. АПК „Морфо“ используется клиницистами в их исследовательских разработках [13–17]. В основном при исследовании сыворотки крови использовалась программа ProtoBlood, которая позволяет получать количественные характеристики трещин. На наш взгляд,

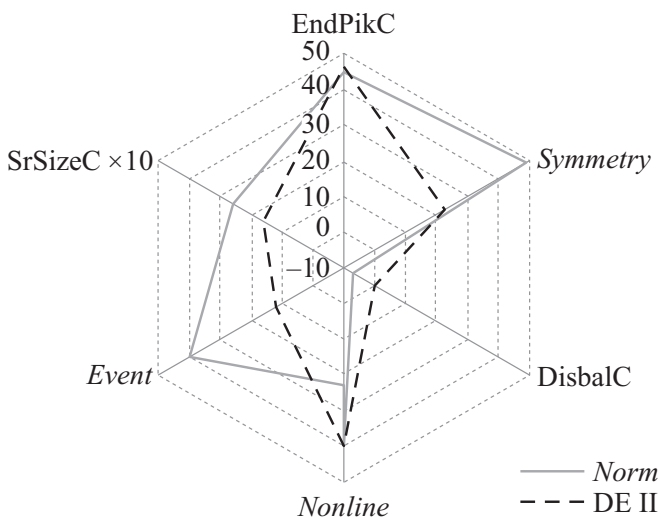


Рис. 5. Диаграмма обчета конкреций в фациях сыворотки крови здорового человека и пациента с ДЭ II.

Результаты оцифровки конкреций с использованием программы Concretion

	EndPikC	Summetry	DisbalC	Nonline	Event	SrSizeC × 10
Норма	45.00	48.90	-7.45	23.00	40.00	26.20
ДЭ II	45.90	21.80	0.40	40.00	12.00	15.60

Примечание. В работе использованы индексы программы:
 – EndPikC — процент от всей площади фации, занятый конкрециями, %;
 – Summetry — „правильность“ конкреций, т.е. доля круглых и эллиптических конкреций от общего числа конкреций, усл. ед.,
 – DisbalC — значение дисбаланса или симметрии углов наклона вдоль максимальной оси конкреций (диаметра Фере),
 – Nonline — линейность зависимости распределения конкреций от центра к периферии,
 – Event — индекс равномерности распределения конкреций по площади фации,
 – SrSizeC — средняя площадь конкреций, μm^2 или $\text{picse}1^2$.

не менее интересной и информативной может быть программа Concretion, которая позволяет оцифровывать конкреции и получать количественные параметры их формы, размеров, ориентации и др. (рис. 4).

Основными видами неоднородности отдельно взятых микрочастиц — конкреций, составляющих структуру фаций, являются неоднородности их по форме и неоднородности по размерам. При рассмотрении пробы в целом появляется третий вид неоднородности, которая связана с их расположением. Этот вид неоднородности многообразен. Он может выражаться наличием определенного угла ориентации конкреций, их неравномерным распределением, которое создает неоднородность фазового состава, кучным распределением определенной размерной группы и т.д.

Количественная оценка неоднородности конкреций может быть полезна не только в диагностической практике, но и при изучении структурообразования фаций

(процессы слияния, образование кластеров, вязких пальцев и т.п.).

Рассмотрим на конкретных примерах работу программы Concretion и ее возможности в оценке микроструктурной неоднородности фации.

Программа Concretion позволяет производить оцифровку конкреций и производить вычисления большинства параметров (количество и размеры, равномерность их распределения, симметричность расположения, угол отклонения, фрактальность и др.).

Для сравнения в таблице и на диаграмме рис. 5 представлены результаты обчета проб сыворотки крови практически здорового индивидуума и пациента неврологического отделения с дисциркуляторной энцефалопатией (ДЭ II) по наиболее показательным индексам программы. Характерные пробы для каждой группы приведены на рис. 2.

Анализ диаграммы показывает, что структура фации ДЭ II характеризуется большей неоднородностью. Следует отметить, что особенно это касается фактора формы (Symmetry) и характера распределения конкреций (Nonline, Event).

Программа Concretion дает возможность получать не только интегральные индексы типа Symmetry, но и при необходимости проводить более детальный анализ. Для наглядности на диаграммах рис. 6 приведены результаты расширенного анализа формы конкреций тех же проб (рис. 2). Из диаграммы видно, что количество круглых конкреций в фации ДЭ II значительно меньше, чем в группе норма; основная доля приходится на бесформенные конкреции.

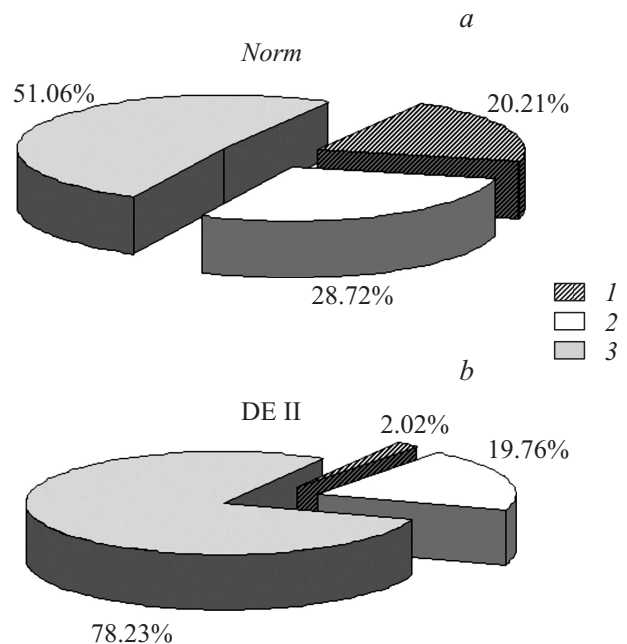


Рис. 6. Неоднородность формы конкреций: *a* — фация группы норма, *b* — фация пациента с ДЭ II. 1 — круглые, 2 — эллиптические, 3 — бесформенные.

Заключение

Оределены возможные виды структурной неоднородности фазий биожидкостей. На примере анализа системы конкреций показан алгоритм оценки микроструктурной неоднородности фазий и продемонстрирована часть возможностей программно-аппаратного комплекса Mogfo в области оцифровки конкреций.

Использование количественной оценки конкреций может быть дополнительным инструментом при разработке диагностических тестов и при изучении механизмов структурообразования биожидкостей.

Список литературы

- [1] *Шабалин В.Н., Шатохина С.Н.* Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризостом, 2001. 304 с.
- [2] Сб. научн. тр. II Всерос. научно-практической конф. „Морфология биологических жидкостей в диагностике и контроле эффективности лечения“. М.: ФГУП Медсервис, 2001. 114 с.
- [3] *Петров В.О.* Автоматизация растровых изображений твердой фазы биологической жидкости медико-биологических препаратов. Автореф. канд. дис. Волгоград, 2009. 20 с.
- [4] *Быстревская А.А., Деев Л.А.* // Материалы III Всерос. научно-практической конф. „Функциональная морфология биологических жидкостей“. М., 2004. С. 16–17.
- [5] *Петров В.О., Камаев В.А., Поройский С.В.* // Современные проблемы науки и образования. 2009. № 6–3. С. 105–110.
- [6] *Тарасевич Ю.Ю.* // Матер. II Междунар. конф. „Процессы самоорганизации в высыхающих каплях многокомпонентных жидкостей: эксперименты, теории, приложения“. Астрахань, 2012. С. 231–239.
- [7] *BouZeid W., Vicente V., Brutin D.* // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2013. Vol. 432. P. 139–146.
- [8] Каталог Ярмарки инновационных медицинских высокотехнологичных проектов „Атоммед-2008“. Саратов: ФГОУ ВПО „СарФТИ“, 2008.
- [9] *Бузовера М.Э., Шишпор И.В.* // Проблемы безопасности и чрезвычайных ситуаций. 2013. № 5. С. 79–86.
- [10] *Бузовера М.Э., Шишпор И.В., Потехина Ю.П., Щербак Ю.П.* ЖТФ. 2012. Т. 82. Вып. 7. С. 123–128.
- [11] *Сергеева Ю.В.* Оптимизация диагностики острого коронарного синдрома с помощью маркеров функциональной диагностики. Автореф. канд. дис. Саратов, 2008. 20 с.
- [12] *Бойко Г.В.* Прогностические критерии у новорожденных с хирургической патологией при критических состояниях. Автореф. канд. дисс. М., 2004. 20 с.
- [13] *Бузовера М.Э., Шатохина С.Н., Шабалин В.Н., Кац Ю.Д.* // Клиническая лабораторная диагностика. 2006. № 9. С. 12–17.
- [14] *Бузовера М.Э., Сельченков В.Л., Щербак Ю.П., Шатохина С.Н., Шабалин В.Н.* // Альманах Геронтология и гериатрия. М., 2001. Вып. 1. С. 55–60.
- [15] *Бузовера М.Э., Шишпор И.В., Карпущина М.Б., Потехина Ю.П., Густов А.В.* // Медицинский альманах. 2010. № 2 (11). С. 40–42.
- [16] *Потехина Ю.П.* Значение морфологической картины биологических жидкостей в диагностике и контроле эффективности лечения некоторых распространенных заболеваний у лиц пожилого и старческого возраста. Автореф. канд. дис. М., 2004. 187 с.
- [17] *Карпущина М.Б.* Динамика клинических проявлений и морфологической картины плазмы крови при дисциркуляторной энцефалопатии на фоне нейропротективной терапии. Автореф. канд. дис. Нижний Новгород, 2011. 136 с.