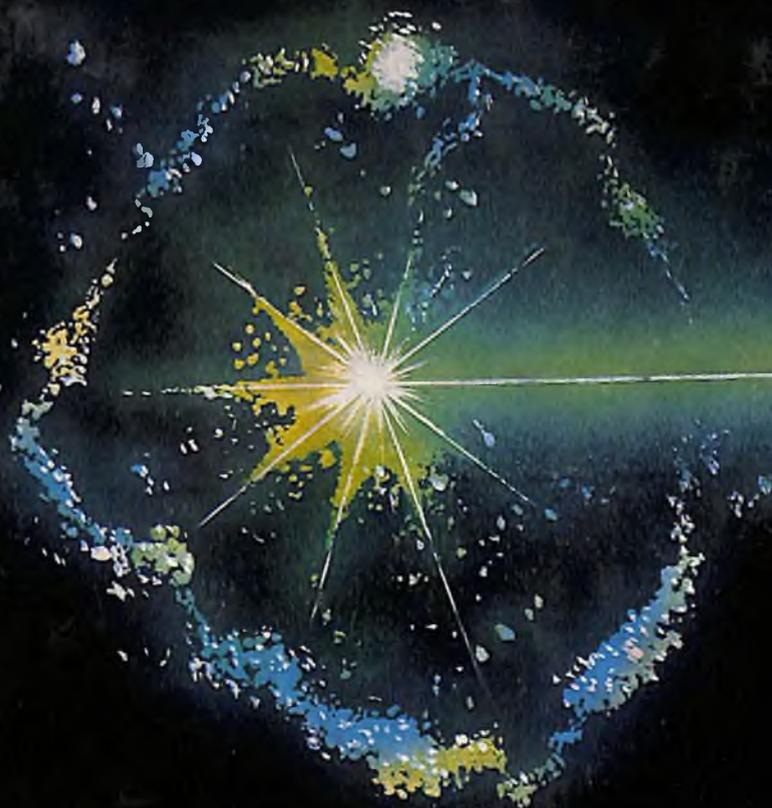


В.Л. ИСАКОВ  
В.Г. ПИНЧУК  
Л.М. ИСАКОВА

---

**Современные  
методы  
автоматизации  
ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ**



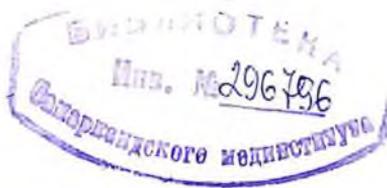
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ОНКОЛОГИИ  
ИМ. Р. Е. КАВЕЦКОГО

611-018  
U853

В. Л. Исаков  
В. Г. Пинчук  
Л. М. Исакова

---

# СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ АВТОМАТИЗАЦИИ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ



КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 1988

УДК [681.3+681.7.08] : 576.3

Современные методы автоматизации цитологических исследований / Исаков В. Л., Пинчук В. Г., Исакова Л. М. — Киев: Наук. думка, 1988. — 216 с. — ISBN 5-12-000256-0

Монография посвящена проблеме создания цитологических анализаторов и их клинического применения. На основании анализа зарубежных разработок, а также комплексных исследований, выполненных авторами на отечественном анализаторе «Интеграл-2МТ», рассмотрены главные направления совершенствования средств и методов автоматизации цитологической диагностики. Проанализированы способы отбора и подготовки препаратов, результаты клинической апробации цитологических анализаторов и состояние методов математической обработки цитометрических данных.

Для инженеров, цитологов, патологоанатомов, акушеров-гинекологов, онкологов, гематологов, студентов медицинских и технических вузов.

Ил. 76. Табл. 28. Библиогр.: 316 назв.

Ответственный редактор *В. Г. Пинчук*

Рецензенты *А. Ф. Киселева, А. К. Покотиленко*

Редакция физиологической, биохимической  
и медицинской литературы

И 411600000-16S КУ-5-121-88  
М221(04)-88

© Издательство «Наукова думка», 1988

ISBN 5-12-000256-0

## ВВЕДЕНИЕ

В биологической науке, а также экспериментальной и клинической медицине, особенно в цитологии, гематологии, иммунологии, микробиологии, одной из важнейших проблем является автоматизация исследований. В настоящее время методы цитологической диагностики доступны лишь опытным специалистам и связаны с низкой производительностью, обусловленной ручным трудом. В «Основных направлениях развития народного хозяйства СССР на 1985—1990 гг. и на перспективу до 2000 г.» предусматривается увеличение выпуска диагностической и лечебной медицинской аппаратуры. Выполнение поставленных в них задач всеобщей диспансеризации населения тесно связано с поиском новых средств массового цитологического обследования.

Проблема автоматизации цитологических исследований включает множество задач по изучению морфологических, биохимических и биофизических свойств клеток, представляющих собой сложные микрообъекты со специфическими структурными и функциональными особенностями строения. Цитология — наука о клетке, успехи которой основываются на достижениях научно-технического прогресса. Появление оптического, а затем электронного микроскопа послужило началом цитологических исследований. Однако микроскоп, не оснащенный приборами по измерению и обработке получаемых результатов, уже не удовлетворяет современным требованиям цитологической практики. При визуальном наблюдении не всегда удается идентифицировать клеточные элементы, характеризующие пограничные состояния исследуемого органа, особенно на стадии внутриэпителиального рака.

Микропроцессорная революция XX в. в различных областях науки и техники сделала реальностью создание цитологических роботов с перспективой полного автоматического скрининга. Сочетание микроскопа с микропроцессорами не только повышает производительность работы цитолога, но и создает перспективы освоения новых методов исследования разносторонней жизнедеятельности клеток, обеспечивая изучение их структурно-функциональных особенностей и взаимосвязей. Можно отметить два этапа разработки анализаторов для цитологии. На первом наблюдается тенденция создания универсальных, дорогостоящих приборов, в которых

учитываются требования, предъявляемые к лабораторной технике. Машинная обработка в них объективизирует статистическое описание параметров клеток, их оценку и классификацию, позволяет выявить тонкие, слабовыраженные изменения параметров клеток при патологических процессах, старении и влиянии на них внешних факторов. На втором этапе фундаментальные медико-биологические исследования завершаются внедрением объективных способов анализа клетки в клинику, разработкой диагностических методов, способствующих эффективному лечению, контролю генетических повреждений, предупреждению развития хронических заболеваний.

Медицина будущего — профилактика, в которой цитологии отводится существенная роль. В нашей стране ежегодно проводится более 300 млн. анализов крови, автоматизация этих исследований позволит выполнить гораздо больший объем лабораторных работ с меньшей стоимостью и высшей точностью. На этапе создания клинических приборов их экономическая рентабельность, ориентация на массовый спрос, а также диагностическая эффективность играют важную роль. Клинический прибор должен быть прост и надежен. В таких приборах должен резервироваться способ управления при отключении автоматического режима. Особо важное значение автоматические цитологические анализаторы имеют для клинической практики. Сегодня в развитых капиталистических странах каждый четвертый-пятый заболевает злокачественной опухолью. Эффективное лечение предопухолевых и опухолевых процессов возможно при ранней диагностике начальных стадий онкологических заболеваний, что требует высокой скорости анализа, большой выборки исследуемых клеток, проведения классификации цитологических препаратов с учетом многих параметров. Например, для достоверной диагностики рака шейки матки требуется исследовать несколько тысяч клеток в образце. Чтобы анализ был экономически оправдан, продолжительность его не должна превышать 3—5 мин. Учитывая, что 99 % препаратов при гинекологических осмотрах относятся к нормальным, автоматические анализаторы освобождают цитолога от неэффективной затраты времени на их просмотр.

Созданные приборы на втором этапе найдут широкое применение как при дифференциальной диагностике при проведении окончательного врачебного контроля, так и при массовых обследованиях населения.

Развитие цитометрии за рубежом объясняется вниманием, которое уделяется проблеме автоматизации цитологических исследований. В настоящее время многие ведущие иностранные фирмы выпускают более 100 разновидностей приборов.

Результаты разработки и применения этих приборов опубликованы в журналах «Acta cytology», «J. Histochemistry and Cytochemistry» и недавно появившихся — «Cytometry» и «Analytical and Quantitative Cytology and Histology». В основном в приведенных работах приводятся несистематизированные результаты разработки

и применения анализаторов для научно-экспериментальных работ.

В нашей стране накоплен некоторый опыт по созданию устройств для количественного анализа микрочастиц биологического происхождения. За последние годы достигнуты определенные успехи в области промышленной микробиологии. Всесоюзные семинары, посвященные анализу основных достижений и тенденций развития в области автоматизации цитологических исследований, традиционно проводимые каждые три-четыре года в Киеве, наглядно показывают, что расширяется круг исследователей, занимающихся указанными проблемами. Вместо отдельных энтузиастов и малочисленных групп в сферу автоматизированного анализа биологических микрообъектов включаются коллективы научных работников. Намечился переход от экспериментальных исследований к работам клинического направления.

Министерством здравоохранения СССР принято решение о серийном изготовлении цитологического анализатора «Интеграл-2МТ». Определенные успехи в области клинического применения цитологических анализаторов получены во Всесоюзном онкологическом научном центре АМН СССР, Киевском институте усовершенствования врачей МЗ УССР, Институте общей и патологической физиологии АМН СССР, Институте проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР. В ряде научных медицинских учреждений цитологические исследования проводятся на оригинальных образцах отечественных приборов типа «Морфоквант», «Протва-Люам», МТА, «Риф», «Структура» и т. д.

Отмечаются известные достижения и быстрый темп развития работ, посвященных научному и практическому использованию автоматизированных систем обработки изображения в медико-биологических исследованиях. Однако наблюдается некоторое отставание от зарубежных аналогов как в разработке отечественной аппаратуры, так и в создании новых методов ранней диагностики заболеваний. Клинические лаборатории страны пока не располагают серийным отечественным цитологическим анализатором. Недостаточно эффективно решаются вопросы разработки алгоритмов ранней диагностики заболеваний, метрологических средств и методик по стандартизации подготовки клеточных образцов. В настоящее время слабо координируются усилия различных ведомств в области создания цитологических приборов, а также специализированных клинических подразделений по апробации новых комплексов и внедрению их в клиническую практику.

В данной монографии обобщены достижения отечественных и зарубежных исследователей и собственный опыт авторов по созданию цитологических анализаторов, а также внедрению новой диагностической техники на базе достижений обработки изображения микрообъектов и проточной цитометрии. Авторы выражают уверенность в том, что прогресс в разработке автоматических приборов и их широкое применение в цитологии открывает перспективу

в организации новых форм лабораторного обследования, в первую очередь проведения массовых цитологических анализов. А это позволит наладить наблюдение за здоровыми людьми с целью охраны их здоровья, повысит точность и снизит стоимость лабораторных анализов, а также даст возможность контролировать применение новых лекарственных веществ. И наконец, в борьбе за снижение смертности от злокачественных заболеваний цитология займет одно из решающих мест в комплексе диагностических мероприятий по выявлению предраковых и раковых состояний различных органов и систем организма.

## ФИЗИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОК

В 1865 г. термин «клетка» (cell — англ.) был использован для характеристики биологических микроорганизмов изобретателем микроскопа, английским ученым Р. Гуком. При анализе среза пробки увиденные им клетки показались ему похожими на изолированные ячейки. И хотя по форме многие клетки далеки от правильных геометрических конфигураций, свойственных ячейкам, термин Р. Гука остался без изменения в последующие столетия.

Наука, изучающая клетки, называется цитологией (клетка — *cytos*, греч.). Согласно клеточной теории все организмы состоят из клеток. Передача наследственности осуществляется также через них. Жизнь существует только в форме клеток — простейших структурных и функциональных единиц живого. Рост, развитие, старение и другие процессы биологических объектов зависят от их поведения. И хотя открытие вирусов внесло некоторые коррективы в клеточную теорию, основные ее положения не изменились.

В течение более двухсот лет цитологические исследования носили описательный характер, так как были ограничены пределами восприятия наших органов чувств, в первую очередь разрешающей способностью и спектральной чувствительностью глаза человека. Применение технических средств позволило разработать новую экспериментальную и теоретическую базу цитологии, придав ей количественный, точный характер.

Свет, визуализирующий клетку, представляет собой электромагнитное излучение в небольшом спектральном диапазоне (табл. 1). Фактически это узкое «оконце», через которое человек может увидеть непосредственно клетку. Если учесть спектральную чувствительность глаза, то этот участок станет еще уже. Причем с изменением освещенности данная чувствительность также изменяется. При ярком освещении наилучшее наблюдение обеспечивает излучение с длиной волны  $\lambda = 0,56$  мкм в то время, как при слабом освещении длина волны оптимального видения укорачивается до  $\lambda = 0,51$  мкм, а диапазон длин волн, соответствующий спектральной чувствительности глаза на уровне 0,5, остается без изменения:  $\Delta\lambda = 0,11 \div 0,12$  мкм. Длительное время морфологические исследования клеток проводились только в видимой спектральной области. В дальнейшем количественный анализ биологических объектов

Т а б л и ц а 1. Спектральный диапазон электромагнитного излучения

| $E$ , эВ | Излучение        | $\lambda$ , мкм   |
|----------|------------------|-------------------|
| 0041     | Раднoвoлны       | 1                 |
| 41       | Инфракрасные     |                   |
|          | Видимое          | $1 \cdot 10^{-3}$ |
|          | Ультрафиолетовое |                   |
| 41 000   | Рентгеновское    | $1 \cdot 10^{-6}$ |
|          | Гамма            |                   |

ко групп: геометрические (площадь, объем, форма, распределение по объему), механические (масса, подвижность в поле градиента, вязкость и т. д.), оптические (отражение, поглощение, рассеяние, деполяризация излучения, собственная и вызванная флюоресценция), электрические (электрофоретическая восприимчивость, электропотенциалы клетки), цитохимические (содержание ДНК, РНК, протенинов, липидов, ферментов, гликогена, циклических аминокислот и т. д.), иммунологические (реакция на анти-тела).

Самые маленькие клетки (типа микоплазм) имеют размеры 0,1—0,25 мкм. Другие клетки (прокариотического типа), к которым относятся бактерии и синезеленые водоросли, характеризуются несколько большим размером. Например, *Bacillus subtilis* обладает сферической формой при толщине 0,7 мкм, длине 2—8 мкм и мембраной 0,01 мкм.

Клетки эукариот, т. е. растений и животных отличаются более сложной организацией. Их размеры колеблются от единиц до сотен микрон. Размеры вирусных частиц находятся в пределах 0,01—0,03 мкм. Форма этих частиц может быть самой разнообразной, например, шаро- и палочкообразной и т. д. Вирус по сравнению с клеткой имеет более примитивную структуру и не может самостоятельно воспроизводиться. Это микрочастица, развивающаяся внутри клеток путем передачи своей генетической информации, заставляющей клетку продуцировать вирусные частицы.

Невооруженным глазом можно увидеть только самые большие клетки, размеры которых превышают 100—200 мкм. Оптический микроскоп позволяет уменьшить этот предел до 0,2—0,3 мкм. Исследование самых мелких клеток или их частей осуществляется с помощью электронного микроскопа, разрешение которого 0,0002 мкм. Получаемые оптические и электронные «портреты» клеток являются плоскостными, дающими представление об их сечении. Информация о форме целой клетки может быть получена методом реконструкции изображений множества сечений, с помощью сканирующего электронного микроскопа или методом голографии. Микрофотографии различных типов клеток человека [171], полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, приведенные на рис. 1, показывают, что форма и размер

был распространен на другие участки спектра. К настоящему времени основной объем знаний о клетке накоплен для видимого участка спектра и освоение других областей служит одной из задач будущих исследований.

Измеряемые свойства клеток или их составных частей (ядра, цитоплазмы, органелл) можно разделить на несколь-

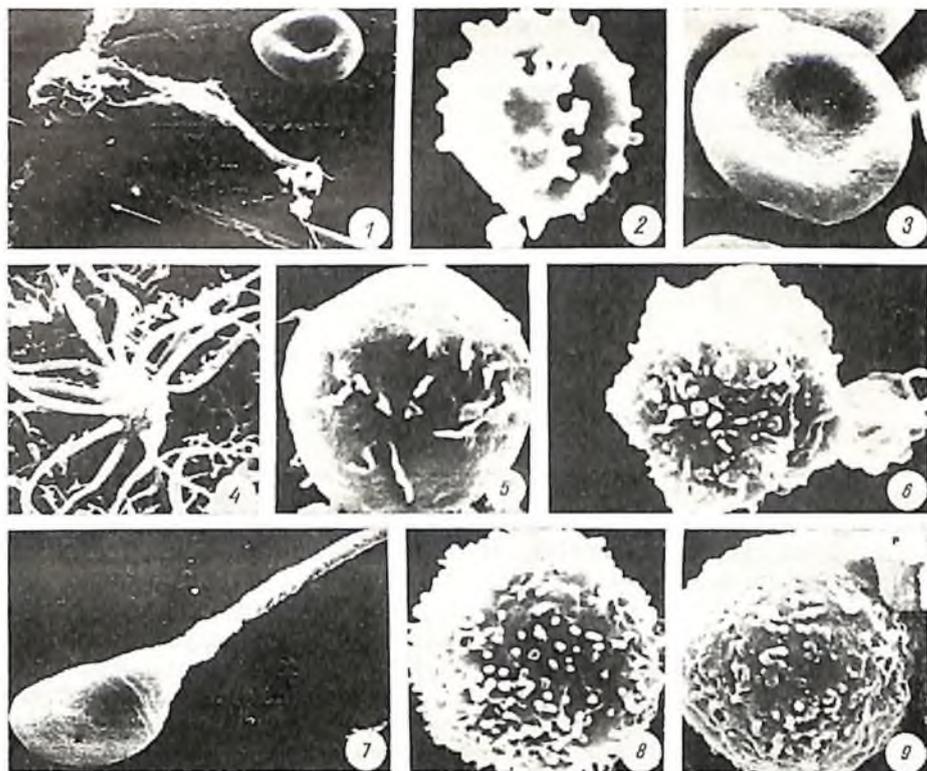


Рис. 1. Типы клеток:

1 — лейкоцит с эритроцитом; 2 — эхиноцит (деформированный эритроцит); 3 — эритроцит; 4 — клетка olfactory; 5 — лимфоцит Т; 6 — моноцит с псевдоподием; 7 — сперматозоид; 8 — лимфоцит В; 9 — нейтрофил

клеток тесно связаны с их функциональным назначением поэтому изучение разнообразных форм является важной проблемой сравнительной цитологии.

Определение сухой массы клеток и их структур производится интерференционным микроскопическим методом [16]. Результаты исследований свидетельствуют о сравнимости сухой массы ядер нормальных клеток различных животных. Причем половина массы приходится на ДНК, а половина на белки. При патологических состояниях наблюдается изменение сухой массы. Например, для нормальной клетки плоского эпителия слизистой оболочки влагалища сухая масса составляет в среднем  $35 \cdot 10^{-12}$  г, в то время как при плоскоклеточном неороговевающем раке шейки матки  $155 \cdot 10^{-12}$ . Характеристики массы некоторых биологических микрообъектов приведены в табл. 2.

При описании оптических свойств клеток необходимо учитывать двойственную природу электромагнитного излучения. В зависимости от соотношения длины волны излучения и размеров клеток изменяется характер исследуемого явления, так как свет проявляет

Т а б л и ц а 2. Характеристики массы микрообъектов (клеток, органелл)

| Метод исследования           | Масса, г       | Микрообъект                                       |
|------------------------------|----------------|---|
| Взвешивание<br>Интерференция | — $10^{-10}$ — | Клетки плоскоклеточного<br>—неороговевающего рака |
|                              |                | —Клетки культуры                                  |
| Рентгеновское излучение      | — $10^{-12}$ — | —Клетки мелкоклеточного рака                      |
|                              |                | —Нормальные клетки                                |
| Спектрометрия                | — $10^{-14}$ — | —Эритроциты                                       |
|                              |                | —Тучные клетки                                    |
|                              |                | —Митохондрии                                      |
| Рассеяние электронов         | — $10^{-16}$ — | —Вирус осповакцины                                |
|                              |                | —Частицы латекса<br>—диаметром 0,088 мкм          |

аналогичные свойства потоку частиц (квантов), либо волновому полю. Если размеры клеток (или их органелл) соизмеримы с длиной волны электромагнитного излучения, необходимо при описании воздействия света на клетку учитывать его волновые свойства, т. е. использовать классическую теорию электромагнитного поля, принимая во внимание такие физические явления, как дифракция, интерференция и др. При размерах клеток намного больше длины волны излучения удовлетворительным приближением для описания распространения света могут служить законы геометрической оптики. При коротких волнах, когда энергия квантов существенна, волновой характер излучения в ряде случаев также можно не учитывать.

В связи с неравномерным распределением внутреннего вещества клетки по объему при рассмотрении прохождения электромагнитной волны эту клетку следует считать средой со случайно распространенными параметрами. Согласно закону сохранения энергии световой поток, падающий на клетку, может быть представлен в следующем виде:

$$W_0 = W_1 + W_{от} + W_n + W_p, \quad (1)$$

где  $W_1$  — часть потока, прошедшего через клетку;  $W_{от}$  — отраженная часть потока;  $W_n$  — поглощенная часть;  $W_p$  — рассеянная часть потока. При прохождении через клетку электрическая составляющая электромагнитной волны, уравнение которой записывается в виде

$$e_z = E_0 \cos \omega \left( t - \frac{z}{v} \right) = E_0 e^{i\omega \left( t - \frac{z}{v} \right)}, \quad (2)$$

претерпевает изменение по амплитуде, фазе, частоте, где  $E_0$  — амплитуда электрической составляющей;  $\omega = 2\pi f$  — круговая частота;  $z$  — расстояние до точки определения волны;  $v$  — скорость распространения волны в клетке.

В ряде случаев величину, характеризующую уменьшение падающего светового потока, определяют через коэффициент ослабления

$$\delta = \frac{W_0 - W_1}{W_0} = 1 - \frac{W_1}{W_0} = 1 - \tau, \quad (3)$$

где  $\tau$  — коэффициент пропускания. Следовательно, коэффициент ослабления зависит от отражения светового потока от границ сред с разными показателями преломления (воздух — клетка, иммерсия — клетка, различные органеллы клетки), от рассеяния и поглощения светового потока. Когда рассеянием и отражением можно пренебречь, коэффициент ослабления является коэффициентом поглощения.

При сканировании узким лучом уменьшение величины прошедшего потока зависит от внутренней неоднородности клетки. Темные участки в клетке больше ослабляют проходящий поток (рис. 2).

Коэффициент поглощения может выражаться через оптическую плотность

$$D = \lg \frac{W_0}{W_n} = -\lg \tau = kl, \quad (4)$$

где  $l$  — толщина объекта;  $k$  — показатель поглощения (постоянная экстинкция), численно равный обратной величине толщины объекта, соответствующей уменьшению падающего потока в 10 раз, и измеряемый в единицах  $\text{см}^{-1}$ .

В ряде случаев используют понятие показателя поглощения через натуральный логарифм ( $k'$ ), т. е. коэффициент, равный обратной величине толщины объекта, соответствующей уменьшению потока в 2,73 раза:

$$D' = \ln \frac{W_0}{W_n} = -\lg \tau = k'l. \quad (5)$$

Представленные оптические плотности связаны следующим уравнением:

$$D' = D \cdot 2,304. \quad (6)$$

Оптическая плотность клеток практически находится в пределах 0,01—1,8.

Часть потока, поглощенная клеткой, рассчитывается по формуле Ламберта—Бугера в дифференциальной или интегральной форме, т. е.

$$W_n = W_0 e^{-k'l}; \quad -dW_n = kW_0 dl. \quad (7)$$

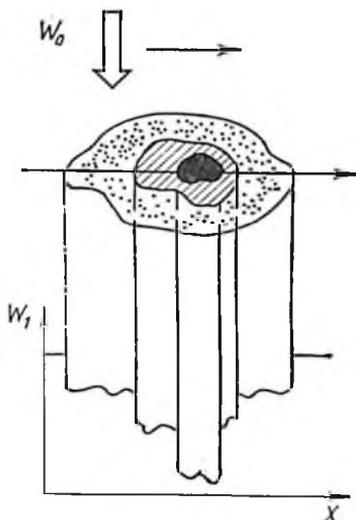


Рис. 2. Прошедший поток света при сканировании клетки

При рассмотрении поглощения клетки необходимо учитывать длину волны падающего излучения. Поглощающие вещества, входящие в состав клетки, имеют характерные спектры. Спектр поглощения клетки является общим суммарным, по которому можно судить о наличии того или иного вещества в клетке, следовательно, использовать его как основу при идентификации клеток. Расчет поглощенной части потока в этом случае может быть выполнен с использованием закона Ламберта—Бугера в интегральной форме:

$$W_n = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} W_0 e^{-k(\lambda)l} d\lambda. \quad (8)$$

Определение коэффициента поглощения в диапазоне частот приводит к существенным расхождениям его величины по сравнению со значением для одной длины волны. С целью исключения спектральной зависимости коэффициента поглощения необходимо использовать монохроматическое излучение.

В реальных препаратах в ослаблении падающего потока большую роль играют отражение и рассеяние. Величина отражения зависит от показателя преломления  $n=c/v$ , т. е. от изменения скорости распространения излучения в этих средах. Поскольку диэлектрическая постоянная  $\epsilon$  для клеток больше единицы, а магнитная проницаемость  $\mu$  практически равна единице, то скорость света в клетке меньше таковой света в вакууме. Следовательно, показатель преломления всегда больше единицы. В ряде случаев используют понятие относительного показателя преломления

$$n = \frac{n_1}{n_2}, \quad (9)$$

где  $n_2$  — показатель преломления иммерсии.

Живые клетки имеют показатель  $n=1,37$  ( $n_2=1,035$ ), для эпителиальных клеток  $n=1,37$  ( $n_2=1,018$ ). При фиксации показатель преломления увеличивается. Например, для эпителиальных клеток  $n=1,54$  ( $n_2=1,16$ ), а для клеток железистых органов  $n=1,52$  ( $n_2=1,14$ ).

Коэффициент отражения при нормальном падении луча на поверхность определяется как

$$\rho = \left( \frac{n'' - n'}{n'' + n'} \right)^2, \quad (10)$$

где  $n''$  и  $n'$  — показатели преломления сред. Отражение уменьшает падающий поток, поэтому пренебрежение им приведет к ошибочному увеличению коэффициента поглощения. Так, для центральной части луча величина потока, прошедшего через ядро клетки, определяется по формуле

$$W_n = (1 - \rho_1)^2 (1 - \rho_2)^2 e^{-(k'_u l_u + k'_n l_n)}. W_0, \quad (11)$$

где  $\rho_1$  — коэффициент отражения на границе цитоплазмы и внешней среды;  $\rho_2$  — коэффициенты отражения на границе ядро — цито-

плазма;  $k_n^*$ ,  $k_n^*$  — показатели поглощения ядра и цитоплазмы (см. рис. 2).

Рассеяние света клеткой уменьшает прошедшую через нее часть потока излучения. Поскольку клетки прозрачны в видимом участке спектра, рассеяние играет существенную роль в их взаимодействии с излучением. Интенсивность рассеянного излучения зависит от угла наблюдения, а так как клетки по структуре неоднородны и их внутренняя гетерогенность обуславливает варьирование оптических характеристик по объему клетки, то это также сказывается на формировании индикатрис рассеяния. Если размер микрочастицы меньше длины волны и соизмерим с таковым для молекул, такое рассеяние называется релеевским. Коэффициент рассеяния в этом случае определяется по формуле

$$\beta = 187A_p^2\lambda^{-4}(n-1)^2 \quad (12)$$

где  $A_p$  — площадь поперечного сечения, см<sup>2</sup>;  $\lambda$  — длина волны, см. Для клеток с размерами, сравнимыми с длиной волны излучения, рассеяние описывается теорией Ми [79, 226].

Существует ряд способов уменьшения влияния светорассеяния на результаты измерения поглощения: дифференциальный, двухволновой и т. д. Большинство из этих методов базируется на принципе исключения рассеяния путем вычитания прошедших частей излучения на двух соседних участках клетки или на двух длинах волн.

Электромагнитное излучение может вызвать в клетке фотобиологические эффекты, в основе которых лежат фотохимические и фотофизические процессы. Энергия поглощенных квантов обуславливает флюоресценцию, фотосинтез или вызывает термическое воздействие вплоть до повреждающего влияния на клетку.

Фотохимические процессы заметнее проявляются на спектральных полосах поглощения клетки. Например, максимальное поглощение белка наблюдается при  $\lambda=0,280$  мкм, а ДНК —  $\lambda=0,256$  мкм. При воздействии излучения на этих длинах волн энергия поглощенного кванта способствует переходу электрона на более высокий энергетический уровень, вызывая перевод молекулы в возбужденное состояние. Энергия кванта (фотона для видимой области) определяется по формуле

$$W_{(эв)} = \frac{1239,6}{\lambda_{(нм)}} \quad (13)$$

Для видимого участка спектра энергия кванта составляет  $(17-34)10^4$  Дж/моль, что сравнимо с макроэргической связью АТФ  $((29-42)10^3$  Дж/моль). При воздействии излучением УФ-спектра в клетке наблюдается разрыв связей в органических молекулах. Запасенная энергия при этом может расходоваться на тепловые колебания, флюо- и фосфоресценцию, миграцию энергии в соседние молекулы, а также на фотохимические процессы. Время возбуждения молекулы и высвечивания фотонов флюоресценции составляет  $10^{-8}-10^{-9}$  с (время нахождения на триплетном уров-

не), а при флуоресценции может быть от  $10^{-4}$  до нескольких секунд. Поскольку часть энергии поглощенных квантов тратится на тепловые колебания, спектр люминесценции сдвинут в более длинноволновую область (закон Стокса).

Спектр люминесценции (обобщенное понятие, включающее флюо- и фосфоресценцию) так же, как и спектр поглощения, является индивидуальной характеристикой клетки. Состояние вещества в биологических системах сказывается на характере люминесценции, поэтому по спектру судят о незначительных переменах, происшедших в клетках под влиянием внешних факторов, или физиологических изменениях.

Интенсивность люминесценции зависит от квантового выхода вещества [6]:

$$I_{\text{фл}} = I_0(1 - \tau) \cdot \gamma \cdot k \cdot \frac{1 - \cos u}{2}, \quad (14)$$

где  $I_{\text{фл}}$  — интенсивность люминесценции;  $I_0$  — интенсивность падающего излучения;  $\gamma$  — квантовый выход;  $k$  — коэффициент, характеризующий особенности схемы регистрации;  $u$  — апертурный угол.

Уравнение (14) свидетельствует о линейной зависимости люминесценции от энергии падающего потока. Как замечено выше, это справедливо до порога, после достижения которого наблюдаются необратимые потери за счет теплового воздействия, обуславливающего частичное или полное разрушение клетки. Следует, однако, отметить, что при значительных концентрациях поглощающего вещества эта пропорциональность нарушается как за счет экранирования наблюдаемого при сильном поглощении излучения передними по отношению к источнику воздействия слоями клетки, так и за счет дополнительного поглощения люминесценции самой клеткой.

Существует несколько видов люминесценции [10]: ультрафиолетовая и вторичная флуоресценция, темновая хемилюминесценция в видимой и УФ-областях.

Ультрафиолетовая флуоресценция наблюдается у большинства животных клеток в спектральном диапазоне 300—400 мкм при возбуждении ультрафиолетовым излучением 200—300 мкм. Функциональное состояние структур клеток сказывается в основном на интенсивности свечения, так как спектры для разных типов клеток различаются слабо. Гистограммы флуоресценции могут отражать функциональное состояние нормальных и патологических клеток. Это объясняется тем, что УФ-флуоресценция вызывается белками (триптофаном и триптофансодержащими белками). Наибольшей УФ-флуоресценцией в клетках обладают цитоплазма (особенно митохондрии) и ядрышко, в то время как ядро светится слабо.

С целью усиления интенсивности флуоресценции используется дополнительное окрашивание клеток флуорохромами. Вторичная

флюоресценция, наблюдаемая при этом методе, характеризуется большой амплитудой и, самое важное, позволяет избирательно исследовать структуры клеток путем подбора флюорохрома.

Следует также отметить темновую хемилюминесценцию клеток, имеющую физическую природу свечения, принципиально отличающуюся от рассмотренных выше. Темновая хемилюминесценция наблюдается без воздействия возбуждающего излучения. Она обусловлена биохимическими реакциями, во время которых происходит слабое свечение клеток в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Она настолько мала, что для ее регистрации требуются специальные установки с криогенным охлаждением. Широкого применения этот метод не получил, хотя в ряде случаев используется для исследования митотической активности и определения жизнеспособности клеток.

При рассмотрении оптических параметров клеток необходимо учитывать поляризацию электромагнитного поля. Известно, что электромагнитная волна имеет две составляющие: электрическую и магнитную, которые расположены перпендикулярно по отношению к направлению распространения волны. При линейной поляризации указанные составляющие не меняют направления в пространстве. При воздействии на анизотропную молекулу, т. е. на молекулу сложной формы, электрическая составляющая по-разному влияет на нее. Если лазерный луч, характеризующийся линейной вертикальной (обычно) поляризацией, поворачивать вокруг оси при облучении вытянутой клетки, то эффективность воздействия на нее будет изменяться. В случае облучения клетки поляризованным светом ее флюоресценция также будет поляризованной. Это объясняется тем, что наиболее эффективному воздействию будут подвергаться те клетки, большие оси которых совпадают с вектором электрической составляющей. Дихронизм клетки проявляется тогда, когда подавляющее число молекул ориентировано в определенном направлении. Если такую клетку поворачивать вокруг оси линейно поляризованного излучения, то величина прошедшей части луча будет зависеть от угла поворота. Степень поляризации определяется выражением

$$\psi = \frac{W_{\max} - W_{\min}}{W_{\max} + W_{\min}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}. \quad (15)$$

Измерение коэффициентов поляризации в диапазоне длин волн позволяет получить поляризационные спектры клеток. Было замечено, что изменение структуры белка значительно влияет на поляризационные спектры. Это может служить индивидуальным тестом для определения белка. При использовании флюорохромов обеспечивается информация о размерах макромолекул. Индуцированный дихронизм является одним из методов изучения анизотропной ориентации молекул.

Для наблюдения прозрачных клеток часто применяются красители, увеличивающие поглощение и способствующие визуализации

структуры клетки. Кроме того, изменение коэффициента преломления различных участков клетки вызывает изменение фазы воздействующего излучения, что позволяет обнаружить клетку на окружающем фоне без дополнительной окраски. Изменение фазы монохроматического луча обуславливается его прохождением через участки клетки с различными показателями преломления. При этом величина фазового сдвига [30] определяется выражением

$$\Delta\varphi = (n_1 - n_2) \frac{l}{\lambda}, \quad (16)$$

где  $l$  — толщина;  $n_1$  и  $n_2$  — показатели преломления.

## ЗАБОР И ПОДГОТОВКА КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Еще в ранних работах, связанных с количественной цитометрией которая большей частью проводилась рутинными способами оценки морфологии клетки (окуляр-микрометр, планиметр и т. д.), поднимались проблемы, касающиеся методики приготовления препаратов. Усилия исследователей были направлены на исключение из образцов различных артефактов, бактерий, эритро- и лейкоцитов, словом, возникла необходимость в минимизации элементов различного происхождения, которые не несут диагностической ценности и составляют фон препарата [194]. В дальнейшем, когда в диагностические и исследовательские лаборатории стали внедряться высокоразрешающие системы с телевизионной и вычислительной техникой, остро встал вопрос подготовки адекватных препаратов и клеточных суспензий, пригодных для полуавтоматического и автоматического анализов. По этому поводу уместно привести слова Wheelless — одного из основоположников цитометрии, который сказал, что подготовка препаратов является ахиллесовой пятой автоматизированной клинической цитологии [303]. Действительно, до настоящего времени задач не стало меньше, круг вопросов стал намного шире, поэтому проблема подготовки препаратов стала еще острее.

Во многих работах отечественных и зарубежных авторов большое внимание уделяется усовершенствованию существующих и разработке новых методик приготовления образцов из различных тканей и органов, предназначенных для количественной цитометрии [11, 228, 265, 283—285].

Изучаются все этапы подготовки образцов — начиная от способов получения материала, хранения, разделения и заканчивая фиксацией и окраской клеток. Критически оценивается и осмысливается каждое звено этой сложной цепи и акцентируется внимание на тех основных моментах, от которых зависит конечный результат исследования. Прежде всего, это способ получения диагностического материала, который должен быть унифицированным, воспроизводимым, исходить из этиологии и патогенеза заболевания, а также обеспечивать максимальное количество клеток для исследования. Сохраняющая среда, куда помещается изучаемый материал, должна обладать минимальным повреждающим действием и максимально долго сохранять клетки. Способы дезагрегации

клеточных скоплений или тканей должны обеспечивать монослойный препарат или монодисперсионную суспензию клеток. Кроме того, техника дезагрегации должна быть щадящей, доступной и легко воспроизводимой. Фиксация и окраска препаратов должны соответствовать целям и задачам исследования.

В данной главе в соответствующей последовательности будет рассмотрен круг проблем, касающийся подготовки образцов, предназначенных для исследования на цитофотометрах проточного и сканирующего типа.

## АНАЛИЗ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ МАТЕРИАЛА

Для цито- и гистологической диагностики материал может быть получен как самостоятельно, так и в комплексе с другими методами исследования. На первых этапах развития цитологический метод исследования в основном базировался на изучении эксфолиативного материала различных органов в виде мокроты, отделяемого влагалища, молочной железы, на оценке клеточных элементов асцитической и плевральной жидкости, мочи и крови.

В настоящее время установлено, что эксфолиативный материал, хотя и имеет определенную диагностическую ценность, в большинстве случаев приводит к ложноотрицательному диагнозу, особенно при наличии предраковых и начальных раковых процессов. В связи с недостаточной информативностью такого материала, а также ограниченным перечнем исследуемых органов стали разрабатываться более эффективные методы забора клеточных элементов, основанные на целенаправленном их получении. Это особенно стало возможно с развитием эндоскопических методов исследования полостных органов человека (пищевода, желудка, кишечника, мочевого пузыря, бронхов, трахен), поскольку одновременно с осмотром патологически измененных участков осуществляется прицельная биопсия ткани или соскоб слизистой оболочки исследуемого объекта.

Для получения диагностического материала из паренхиматозных органов человека (щитовидная, молочная, поджелудочная, предстательная железы, яичник, печень, почки, селезенка, лимфоидная ткань, спинной и головной мозг, кости и т. д.) широко используется тонко- и толстоигольная аспирационная пункция. Обычно для этой цели применяются иглы различного диаметра (№ 18—22—25) с одним отверстием на конце инструмента.

В последнее время стали использоваться иглы оригинальной конструкции с несколькими отверстиями на колющем конце под углом  $45^\circ$ , что позволяет получать материал на различном уровне опухоли. Такая модификация значительно повышает достоверность цитологической диагностики, составляющую 90,2 % [144].

Рассматриваемый метод высокоэффективен, информативен и практически не имеет ограничений для получения материала из любых органов и тканей человеческого организма. Аспирационная

диагностическая пункция требует лишь безукоризненной техники и определенных навыков. Имеются сообщения о том, что эту процедуру должен выполнять цитолог, а в случае глубокого расположения опухоли — радиолог или рентгенолог [112, 134]. Для большей целенаправленности получения материала, оценки топографии анатомических структур, определения локализации опухоли и во избежание осложнений аспирационную пункцию проводят под контролем компьютерной томографии, рентгено-термо- или эхографии [98, 149, 164]. Целесообразность применения аспирационной пункции доказана не только исследованиями качественного анализа морфологических особенностей клетки, но и оценками объективных количественных критериев диагностики, полученными посредством различных автоматизированных систем анализа микрообъектов [117, 126, 179].

Однако необходимо обратить внимание на то, что аспирационная пункция, используемая для диагностики первичных опухолей различных локализаций, имеет определенные ограничения [181].

Следует отметить, что способ получения материала во многом определяет качество и эффективность цито- и морфологического методов исследования. Необходимо определить способ получения диагностического материала (соскоб, аспират, аспирация, смыв, отпечаток, биопсия, пункция, скарификация), что будет давать более полную информацию о данном виде ткани. Ценность метода зависит от точности определения наиболее информативной области исследуемого объекта с точки зрения злокачественного перерождения, а также от особенностей развития патологического очага в каждом изучаемом органе. Известно, что различные патологические состояния, в первую очередь предопухолевые и ранние раковые процессы в шейке матки, преимущественно локализируются в области стыка многослойного плоского и цилиндрического эпителия — так называемой трансформационной зоне. В норме у женщин репродуктивного периода эта граница в основном находится на уровне наружного маточного зева, но при деформациях и рубцовых изменениях шейки матки происходит перемещение зоны стыка в глубину цервикального канала, восходящее смещение эпителиальной границы является характерной особенностью организма женщин старше 35—40 лет. Множество эпителиальных элементов в цервикальном канале, многослойный плоский и цилиндрический эпителий, резервные и незрелые клетки переходной зоны, видимо, играют существенную роль в этиологии и патогенезе предраковых процессов и рака данной локализации [22, 42, 58, 85, 261].

Немаловажно и то, что патологический процесс в 63—88 % случаев локализуется в цервикальном канале, стенки которого труднодоступны для клинического осмотра [18, 43].

Такой подход с оценкой физиологических и патогенетических особенностей рассматриваемого органа позволяет выделить трансформационную зону как наиболее информативную область шейки матки для получения диагностического материала.

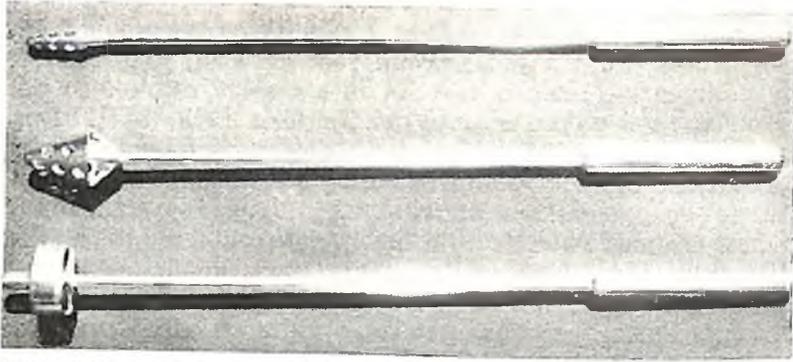


Рис. 3. Устройство для получения цитологического материала

Далее следует определить, какой из известных способов получения исследовательского материала будет наиболее эффективен для диагностики патологического процесса. Обзор литературных данных показал, какое множество инструментов и приспособлений используется для забора материала из шейки матки. Условно их можно разделить на три группы. Действие первой основано на принципе сбора самостоятельно отторгающихся клеточных элементов (эксфолиативная цитология) [9, 20, 48, 71, 76, 143, 243, 311—313]. Вторая группа методов получения материала основана на принудительной эксфолиации клеток за счет аспирационно-вакуумного разрежения [77, 201, 316]. Третья группа объединяет различные приспособления и устройства, позволяющие получать материал посредством соскоба слизистой оболочки шейки матки. Этот способ занимает промежуточное положение между биопсией и аспирационно-вакуумным методом получения материала [99—102]. Диагностический материал, полученный последним способом, представляется наиболее ценным, так как содержит клетки более глубоких слоев эпителия на уровне базально-парабазального слоя, а также резервные клетки из переходной зоны. Именно эти клеточные элементы наиболее информативны для определения степени и уровня происходящей малигнизации в эпителиальном пласте шейки матки.

Следовательно, щадящий соскоб слизистой оболочки шейки матки является самым достоверным и целенаправленным методом из всех рассматриваемых, поскольку дает наиболее полные сведения о происходящих изменениях в клетках покровного и выстилающего эпителия шейки матки.

Нами был разработан унифицированный способ получения диагностического материала [34, 36, 92]. На рис. 3 представлен общий вид инструмента, выполненный в трех модификациях, что позволяет получить исследуемый материал из различных топографических областей шейки матки.

Применение инструмента в клинике на протяжении нескольких лет показало целесообразность его использования при специализированных и профилактических осмотрах женщин, поскольку позво-

лило значительно повысить выявляемость предраковых и ранних раковых состояний шейки матки, особенно с локализацией процесса в цервикальном канале, что составляет 32 % количества обследованных женщин [36]. Данный пример демонстрирует возможность стандартизации получения клеток, который основывается на знании физиологических и топографических особенностей изучаемого органа, а также обусловлен патогенезом развития болезни.

Определенную трудность испытывают специалисты при получении материала из полости матки. В связи с тем что в последнее время среди злокачественных новообразований у женщин рак эндометрия имеет тенденцию к возрастанию, возник вопрос о цитологическом скрининге именно этой локализации. Такие способы получения материала, как диагностическое выскабливание слизистой оболочки эндометрия, аспират из полости матки, получаемый при помощи шприца Брауна, в ряде случаев дают положительный результат, однако имеют некоторые ограничения и не всегда результативны.

Существующие приспособления в виде каниули Медоуза, предназначенные для цитоскрининга, не получили широкого применения [201]. В связи с этим предложен ряд новых способов, которые позволяют производить манипуляцию в амбулаторных условиях без обезболивания и обеспечивают необходимое количество клеток для исследования. Среди них ведущее место занимают способ забора материала, предложенный отечественными авторами [70], а также устройство, названное исследователями эндоскан, и способ получения материала по методу Issacs [110, 162, 267].

Большой интерес представляет «превикал-кюретка», предназначенная для разового использования. Инструмент состоит из двух частей: гильзы и лопасти, при введении приспособления в полость матки гильзу извлекают и лопасти раскрываются. При вращении происходит соскоб эндометрия, затем гильза возвращается в исходное положение и инструмент с материалом извлекают из органа [163].

Рассматриваемые способы получения материала обеспечивают необходимое количество клеток для исследования, эффективность цитологической диагностики составляет 94 %.

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что способ получения диагностического материала во многом определяется анатомическим расположением органов и их физиологическими особенностями.

Обобщенная информация о разнообразии существующих способов получения материала для каждого органа или вида ткани приведена в табл. 3.

Приведем данные работ, анализирующие вопросы, связанные с топографией получения материала из различных областей исследуемого органа, включая неизмененную ткань и область поражения раковым процессом, а также разные участки раковой опухоли [160, 161, 247]. Материал исследовался в виде клеточной суспензии методом проточной цитометрии. Farsund использовал метод

Таблица 3. Способы получения исследуемого материала из различных тканей и органов человека

| Исследуемый объект          | Способ получения материала                          |
|-----------------------------|---|
| ЦНС, спинной и костный мозг | АДП   |
| Полость рта                 | Соскоб, отпечаток                                   |
| Глаза                       | АДП   |
| Органы средостения          | АДП   |
| Плевра                      | ПБ  |
| Легкие (трахея, бронхи)     | Мокрота, соскоб, промывные воды, отпечаток, ПБ, АДП |
| Железы                      | АДП   |
| околоушные и слюнные        | АДП   |
| щитовидная                  | АДП   |
| поджелудочная               | АДП   |
| предстательная              | АДП   |
| молочная                    | АДП, выделение соска                                |
| Печень                      | АДП   |
| Почки                       | АДП   |
| Селезенка                   | АДП   |
| Яичник                      | АДП   |
| Лимфатические узлы          | АДП   |
| Желудок, кишечник, пищевод  | Соскоб, отпечаток, промывные воды                   |
| Мочевой пузырь              | Моча, промывные воды, АДП                           |
| Шейка матки                 | Соскоб, аспират, отпечаток                          |
| Эндометрий                  | Аспират, соскоб, промывные воды                     |
| Кожа                        | Скарификация, АДП                                   |
| Мягкие ткани                | АДП   |
| Кости, хрящи                | АДП   |

Обозначения: АДП — аспирационная диагностическая пункция тонкой иглой; ПБ — пункционная биопсия толстой иглой.

количественной цитометрии для диагностики патологических процессов мочевого пузыря. Представлены данные сравнительного анализа различных способов получения материала, которые включали эксфолиативные клетки, полученные ирригационным методом, и клетки, полученные специально разработанным укороченным катетером, соединенным со шприцем. Последняя процедура осуществляется одновременно с цистоскопией мочевого пузыря. Применение катетера позволяет прицельно аспирировать диагностический материал из определенных патологических участков, причем совершенно исключаются клеточные элементы неэпителиального происхождения, такие, как клетки стромы, эритроциты и лейкоциты. Установлено, что число таких клеток составляет не более 6%. Во избежание аспирации слушенных клеток, находящихся в полости мочевого пузыря, в течение процедуры забора клеток производится орошение органа физиологическим раствором.

Результаты сравнительной оценки различных методов забора материала отражены в гистограммах распределения ДНК в клетках слизистой оболочки мочевого пузыря (рис. 4). По анализу этих данных очевидно преимущество прицельного получения материала по сравнению с ирригационным способом. В последнем слу-

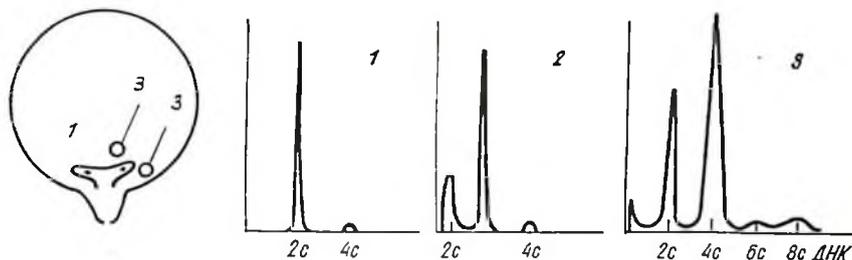


Рис. 4. Гистограммы распределения содержания ДНК в клетках слизистой оболочки мочевого пузыря:

1 — участок нормальной ткани, 2 — ирригационный смыв полости мочевого пузыря, 3 — участок опухоли

чае суспензия клеток представлена из различных топографических областей мочевого пузыря и в общей массе клеток малигнизированные клеточные элементы незначительны. Примесь же нормальных эпителиальных и неэпителиальных клеток достаточно велика, что находит отражение на гистограммах (рис. 4, 3). В данном случае такая ситуация повлечет за собой постановку ложноотрицательного диагноза, поскольку содержание ДНК в клетках, отобранных из различных областей, а также мочи, находится в пределах нормального распределения. Так, следует стремиться получать диагностический материал из соответствующих отделов органа, пораженных патологическим процессом, таким образом, можно избавиться от присутствия нормальных клеток, которые затрудняют идентификацию малигнизированных клеточных элементов [160, 161].

Особенно большое значение имеет рассматриваемое явление при микроскопических поражениях исследуемых органов. В связи с этим необходимо целенаправленно брать материал, что возможно при эндоскопических методах исследования. При таких условиях забора материала повышается степень эффективности цитологической диагностики, а также появляется возможность установления природы возникшего патологического очага и, что особенно важно — определения степени и стадии развития ракового процесса.

Представлены не менее важные результаты, демонстрирующие взаимосвязь цитологической диагностики с топографией получения материала [247]. Данные были получены при экспериментальном изучении методом проточной цитометрии биоптатов удаленной карциномы кишечника человека, взятых из различных участков опухоли, а также неизмененного эпителия слизистой оболочки кишки. При анализе гистограмм на содержание ДНК определено, что в одной опухоли, но в разных топографических участках присутствуют различные клеточные субпопуляции. Одни из них характеризуются околодиплоидным, другие — гипердиплоидным содержанием ДНК. Считают, что данное явление связано с гетерогенностью клеточной популяции, которая объективно отражает проявление мозаичности колоректальной опухоли. Причем в одних опухолях мозаичность выражена больше в других меньше. Как видно из рис. 5, ярко выраженный гипердиплоидный пик зареги-

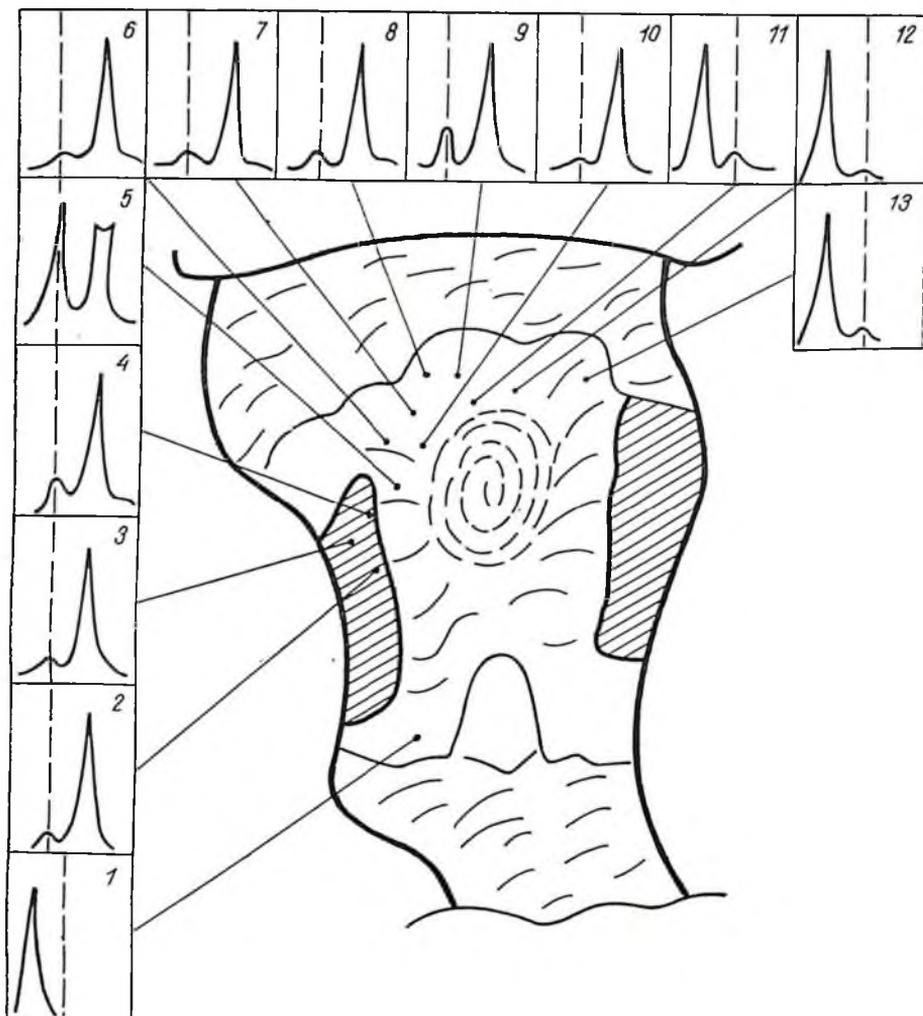


Рис. 5. Гистограммы распределения содержания ДНК в клетках, полученных из различных топографических участков опухоли кишечника при первичной (3, 7, 11) и вторичной (1, 2, 4—6, 8—10, 12, 13) биопсиях

стрирован только в одной из 8 гистограмм. Это объясняется тем, что в данной карциноме кишечника имеется лишь небольшой участок, характеризующийся гипердиплоидным содержанием ДНК, количество же нормальных эпителиальных клеток превосходит численность элементов клеточной популяции с малым отклонением от диплоидного (2С) содержания ДНК. Несмотря на эти результаты, корреляции между различным уровнем опухолевой дифференцировки и мозаичной композицией опухоли отмечено не было. Однако в основном все изучаемые колоректальные опухоли по усредненным значениям плоидности имели бимодальное распределение содержания ДНК.

Приведенные выше данные получены на операционном материале, который можно пунктировать неограниченное число раз, а также проводить повторные биопсии материала. Эти условия позволяют детально изучить клеточные популяции, отклоняющиеся от нормы, а также оценить пограничные области между различными субпопуляциями. Очевидно, что при обследовании больных возможность многократного получения материала отсутствует. Исходя из этого, можно лишь рекомендовать более тщательное пунктирование опухоли на различном уровне под контролем томо- или эхографии с тем, чтобы получить информативный материал, наиболее адекватно отражающий степень происходящей малигнизации ткани.

### ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ СУСПЕНЗИИ

После получения диагностического материала (любым из способов) клетки или ткань сразу помещают в сохраняющую среду. Эта процедура позволяет устранить сложность, связанную с необходимостью приготовления и изучения образцов сразу же после их получения, что в дальнейшем связано с повышением стандартизации цитометрии исследуемых параметров клетки проточным методом или анализатором сканирующего типа. В качестве сохраняющей среды используются денонизированная вода, раствор формалина с добавлением антибиотиков, спиртовые растворы различной концентрации, раствор уксусной кислоты, а также сбалансированные растворы: Версена (ЭДТА), Дэвиса, Па-Петти, Хэнкса, Рингера, Дульбекко и др. Прописи наиболее распространенных сбалансированных солевых и сохраняющих растворов приведены в табл. 4.

Следует обратить внимание исследователей на соблюдение в сохраняющей среде определенной концентрации ионов водорода. Величина рН для нормального роста культивируемых клеток находится в пределах 6,8—7,6, а для культивирования линий диплоидных клеток человека необходима строго определенная концентрация ионов водорода, не превышающая значение рН 7,2—7,6 [50]. Исходя из этих данных необходимо помещать исследуемые клетки в сохраняющие буферные растворы с определенным значением рН, находящимся в пределах 7,2—7,6.

В основном данное условие выполняется, в рассматриваемых ниже методиках любые рабочие растворы, будь то сохраняющая среда, красящий раствор или буфер для промывки проточной системы, имеют рН, близкое к 7,4.

В настоящий момент в развитии методов количественной цитометрии важной задачей является разработка таких способов фиксации и хранения клеток, которые бы обеспечивали долговременное хранение образцов и способствовали воспроизводимости результатов эксперимента.

Данные требования учтены в работах Montana и Vindelov [228, 298, 299]. В частности, это касается разработки способа

Таблица 4. Прописи сбалансированных солевых растворов (СБСР), г/л

| Раствор        | pH  | Феноловый<br>красный | NaCl | KCl  | CaCl <sub>2</sub><br>(безводный) |
|----------------|-----|----------------------|------|------|----------------------------------|
| Рингера        | 7,4 | —                    | 9,0  | 0,42 | 0,25                             |
| Хэнкса         | 7,2 | 0,02                 | 8,0  | 0,40 | 0,14                             |
| Эрла           | —   | 0,02                 | 6,8  | 0,40 | 0,20                             |
| Дульбекко      | 7,2 | —                    | 10,0 | 0,25 | —                                |
| Версена (ЭДТА) | 7,4 | 1—0,15               | 8,0  | 0,20 | —                                |
| Тирода         | —   | —                    | 8,0  | 0,20 | 0,20                             |

хранения и фиксации клеток, предназначенного для анализа препаратов на системах сканирующего типа. Клетки слизистой оболочки шейки и слизистой полости рта, полученные путем поверхностного соскоба, помещались в специальный сосуд из полипропилена с завинчивающейся пробкой, в котором находится 3,5 мл сохраняющей среды [228], каждый литр которой содержит 107,6 мл 95 %-ного этанола, 905,2 мл дистиллированной воды, 7,7 г хлорида натрия и 0,25 г тимола. Материал суспендируется, а затем фильтруется через нуклеопоровый фильтр с диаметром пор 3 мкм. Перенос исследуемого материала с фильтра осуществляется посредством плотного его прижатия к предметному стеклу и самопроизвольного отделения фильтра во время погружения в раствор 95 %-ного этанола. Препараты, полученные в результате этой методики, могут быть окрашены по Паланиколау, гематоксилином Гарриса и эозином.

Для оценки степени дисперсии исследуемых объектов и сохранности клеток в предлагаемой среде был проведен цитологический контроль через каждый час, а также на 1, 3, 7, 14, 21-е и 28-е сутки после инкубации материала. По стабильности окраски клеточных элементов, целостности лейкоцитов, выявлению структур ядра, наличию свободных ядер определено, что клетки пригодны для исследования на протяжении 4 нед. в условиях хранения их при температуре 21 °С (рис. 6). Данные количественной оценки структурных и размерных параметров клетки, полученные на двух порогах оптической плотности — ядра и цитоплазмы, в динамике наблюдения достаточно стабильны.

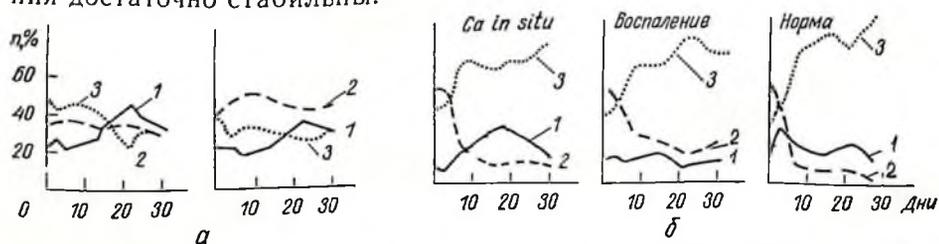


Рис. 6. Морфологическая оценка клеток слизистой оболочки полости рта (а) и шейки матки (б) в зависимости от сроков хранения материала в суспензии:

1 — цитоплазма, 2 — ядро, 3 — обломки клеток

| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ | $Na_2H_2PO_4 \cdot H_2O$ | $KH_2PO_4$ | Глюкоза | $NaHCO_3$ |
|----------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|------------|---------|-----------|
| —                    | —                    | —                      | —                        | —          | —       | —         |
| —                    | 0,2                  | 0,600                  | —                        | 0,06       | 1,0     | 0,35      |
| —                    | 0,2                  | —                      | 0,14                     | —          | 1,0     | 2,20      |
| —                    | —                    | 1,44                   | —                        | 0,25       | —       | —         |
| —                    | —                    | 1,15                   | —                        | 0,20       | —       | —         |
| 0,1                  | —                    | —                      | 0,05                     | —          | 1,0     | 1,0       |

Следующие работы касаются техники приготовления образцов с долговременным хранением клеток, в основе которых лежит способ длительной экспозиции материала при низкой температуре [298, 299].

Исследовались образцы экспериментальных моделей опухолей и клинический материал различных тканей и органов. Аспират клеток или маленькие кусочки солидной ткани (приблизительно  $5 \times 5 \times 5$  мм) помещают в полипропиленовый сосуд размером  $38 \times 12$ ; 5 мм, ресуспендируют тонкой иглой в буферном растворе. Концентрация клеток приблизительно составляет  $10^6$  на 400 мл буфера. В состав сохраняющей среды входит 85,5 г (250 мл) сахарозы, 11,76 г (40 мл) трехзамещенного лимоннокислого Na и 50 мл диметилсульфоксида (ДМСО), 1 л дистиллированной воды, pH среды 7,6. Присутствие диметилсульфоксида в буфере обусловлено его защитным действием, которое способствует сохранности клеточных мембран при быстром замораживании клеток. Однако чаще всего в качестве защитного агента в сохраняющий раствор добавляют глицерин. Дальнейший этап состоит в том, что суспензия клеток или маленькие кусочки ткани, находящиеся в полипропиленовом сосуде, погружаются в смесь сухого льда и 99%-ного этанола при температуре  $-80^\circ C$ . Образцы в таких условиях сохраняются в течение года. Перед исследованием материал размораживают в водяной бане при температуре  $37^\circ C$ . Образцы, хранящиеся в виде маленьких кусочков ткани, суспендируются в 400 мл сохраняющей среды, затем в виде монодисперсии окрашиваются пропидиумом йодида и исследуются в проточном анализаторе типа цитофлюориметра. В каждом образце конечная концентрация составляет  $(5-10) \cdot 10^4$  клеток/мл. Степень эффективности методики приготовления клеточной суспензии оценивали количественно на различных этапах хранения клеток (от 0,5; 1, 3, 9 и 12 мес), полученные данные сравнивали с результатами исследования нефиксированного свежего материала. Результаты эксперимента, представленные в виде гистограмм, свидетельствуют об отсутствии изменений в полученном распределении содержания ДНК по соответствующим фазам клеточного цикла.

## СПОСОБЫ ДЕЗАГРЕГАЦИИ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Препарат, приготовленный по обычной методике, удовлетворяет требованиям визуального исследования морфологии клеток, однако непригоден для автоматизированных систем диагностики. В основном он характеризуется многочисленными клеточными скоплениями, наслоением исследуемых элементов, в которых стерты ядерные и клеточные границы. Установлено, что при просмотре препарата, приготовленного по общепринятой методике, 60—80 % клеток расположены в скоплениях, 6—27 % соприкасаются и лишь незначительное количество клеток (приблизительно  $\frac{1}{5}$ ) расположено отдельно. Для исследования клеток в автоматизированных и полуавтоматизированных диагностических системах необходимо не менее 50 % раздельно расположенных клеток [62]. При визуальной оценке препарата распознавание ядер изучаемых клеток и артефактов не представляет серьезных трудностей, но выработка равноценной способности у автоматически действующего прибора в настоящее время является трудновыполнимой задачей. Лейкоциты и гистиоциты часто преобладают над количеством исследуемых клеток. Кроме того, в препаратах содержится множество клеточных агрегатов, в результате создается ложное представление о повышенном содержании ДНК — в клеточной популяции каждое скопление может быть интерпретировано как отдельная клетка с полиплоидным ядром, что является характерным признаком малигнизации ткани [167, 210]. Помимо этого скопления могут содержать необнаруженные атипичные клетки, поэтому приготовление препарата с раздельно расположенными клетками (в виде монослоя) необходимое условие для автоматизированных сканирующих систем распознавания микрообъектов [11, 303].

На степень точности автоматического анализа изображений влияет и плотность расположения клеток на предметном стекле [195]. По мнению японских исследователей, для системы CYBEST оптимальное их число — четыре на 1 мм<sup>2</sup> препарата, так как от степени дисперсии клеточных элементов на стекле зависит конечный результат диагностики.

Аналогичные требования предъявляются к качеству образцов, предназначенных для исследования на проточных анализаторах. Сложность методики по подготовке монодисперсных суспензий и монослойных препаратов определяется видом исследуемой ткани. Достаточно просто подготовить одноклеточную суспензию из такого материала, как кровь, костный мозг, асцитическая и плевральная жидкости. Соскобы, аспираты из различных органов, отделяемое влагалища, мокрота — словом, цитологический материал, который содержит клеточные конгломераты в значительном количестве служит более сложной пробой для подготовки одноклеточной суспензии. Самый сложный для дезагрегации материал — солидная ткань различных органов. Несмотря на то что некоторые ее

виды, например лимфондная, достаточно легко дезагрегируются мягким механическим воздействием, солидные ткани нелимфондного происхождения требуют ферментного влияния для ослабления клеточных связей и освобождения клеток или ядер из тканевого комплекса.

Негативным моментом методик с ферментным и механическим воздействием является образование нежелательных включений стромального и клеточного происхождения в виде разнообразных обломков, т. е. артефактов.

Отсутствие эффективных методов разделения клеток стимулирует поиск новых путей дезагрегации клеточных скоплений. Каждый новый или усовершенствованный способ приготовления препаратов должен быть тщательно исследован и проанализирован с целью определения процента клеточных потерь, морфологической сохранности клеточных структур и степени их повреждения, изучения популяционных характеристик, способности клеток давать рост в первичной культуре.

В настоящей главе будут рассмотрены основные принципы дезагрегации клеточных скоплений и достигнутые успехи в этой области. Систематизируя данные литературы по изучаемому вопросу, можно выделить два ведущих механизма, лежащих в основе дезагрегации клеточных комплексов:

1. Физический (суспендирование взвеси клеток шприцем, пипеткой или воздушным потоком, центрифугирование, фильтрация, ультразвуковое воздействие).

2. Химический (ферментная обработка материала, обработка клеточных скоплений неорганическим раствором).

Обычно в работах, посвященных методикам подготовки препаратов, приводятся данные по сочетанному воздействию обоих механизмов. Ферментное воздействие сочетается с мягкой механической обработкой материала путем многократного суспендирования взвеси клеток шприцем с иглами № 18—27 ( $D=0,2-0,9$  мм). Указанный диаметр игл соответствует определенной маркировке отечественных игл: 0416, 0625, 0840. Первые две цифры указывают на диаметр иглы, последние — ее длину.

Следует отметить, что лучший эффект достигается при использовании игл № 21 и более. Иглы с меньшим диаметром обеспечивают до 90 % дезагрегированных клеток, но при их применении происходит значительная потеря некоторых типов клеток [303]. Многие исследователи для дезагрегации клеточных комплексов используют более совершенные приспособления, чем обычный шприц, однако принцип метода основан на том же механизме. Такое устройство представляет собой модифицированный шприц, заключенный в контейнер и содержащий набор сеток с отверстиями различного диаметра. На дно контейнера помещается предварительно размельченная ткань с небольшим количеством среды Мак-Коя. Подъемом поршня осуществляют прохождение материала через сетку. Взвесь многократно прогоняют через шприц до получения однородной суспензии, заменяя сетки более густыми. Способ

обеспечивает большой выход минимально травмированных клеток опухоли (в данном случае яичника) [315]. В последнее время стали активно разрабатываться системы автоматической дезагрегации исследуемого материала. Такая ситуация возникла в связи с выходом методики дезагрегации ткани за рамки научно-исследовательских поисковых работ. В частности, для VioPePR — системы, осуществляющей автоматический прескрининговый анализ цервикальных мазков, разработан автоматический ротор с двумя разновидностями углублений на поверхности поршня. Предполагается, что данная конструкция ротора обеспечивает действие, подобное шприцеванию. Время экспозиции составляет 15—30 с [241].

В некоторых работах физический метод воздействия используется как основной механизм дезагрегации клеточных скоплений. В данном случае считается, что техника шприцевания является более щадящей, чем химические методы воздействия путем обработки материала раствором Версено, трипсинном и пепсином [303].

В работе Pegget с соавт. в качестве разделяющего фактора также использовался физический метод дезагрегации клеточных скоплений [246]. Принцип метода заключается в пропускании слабой струи кислорода через суспензию клеток слизистой оболочки ободочной кишки и опухоли тонкой кишки крысы, индуцированной итра ректальным введением N-метил-N-нитрозомочевины. В качестве сохраняющей среды использовался физиологический раствор с добавлением 200 ммоль (36,4 г/л) маннитола, который способствует лучшему разобщению клеток. Затем полученную взвесь центрифугировали при 75 г в течение 2 мин, осадок ресуспендировали в свежей порции сохраняющего раствора и через 5 мин вновь пропускали струю кислорода. В результате получены препараты с отдельно расположенными клеточными элементами при хорошо сохраненной морфологической структуре ядра и цитоплазмы.

Для разделения скоплений эпителиальных клеток предложен метод суспендирования с помощью воздушных потоков. Образующиеся при этом слои взвеси перемешиваются в противоположных направлениях в одном сосуде в вертикальных либо горизонтальных плоскостях. При захлопывании воздушных пузырей возникает давление, отделяющее клетки друг от друга за счет механических усилий, величина которых превышает силы сцепления клеток. Наблюдаемое кавитационное явление и соударение клеточных конгломератов, вращающихся в противоположных направлениях, обеспечивают эффективное разделение клеток при незначительном повреждении. Достоинством предложенного метода является отсутствие вращающихся механических мешалок или нагрева, сопутствующего ультразвуковым методам разделения клеток [91].

Такие физические способы дезагрегации, как фильтрация и центрифужный, обычно применяются в комплексе с другими в качестве промежуточных этапов по подготовке монослойных препаратов или монодисперсионных суспензий.

Необходимо подробно остановиться на ультразвуковом (УЗ) механизме дезагрегации клеточных комплексов различных тканей

и органов. В исследованиях 70-х годов акцентировалось внимание на изучении механизма УЗ-воздействия на клетки, а также приводились данные по оценке степени эффективности применяемого метода [76, 167, 172, 227, 229, 244].

Из ранних работ следует упомянуть исследования Раггу с соавт. [244]. Материал был суспендирован в 0,5 мл деионизированной воды и оставлен на ночь при комнатной температуре. После экспозиции 0,3 мл концентрированной суспензии клеток озвучивали в маленьком стеклянном тест-тюбике в течение различных интервалов времени (до 10 мин) при интенсивности энергии 20 000 Гц и размахе амплитуды 0,23 и 0,46 мкм. Степень дезагрегации клеток оценивали микроскопически и в гемоцитометре Розенталя. Отдельную клетку или скопление принимали за одну клеточную единицу и подсчитывали их общее количество. В заключение проводили процентный анализ клеточных агрегатов.

Отмечено, что длительное озвучивание при амплитуде УЗ-волны 0,46 мкм приводит к постепенному снижению количества клеточных единиц и изменению морфологии клеток. Большая амплитуда с малым временем воздействия способствует появлению безъядерных клеток и фрагментации цитоплазмы, в то время как озвучивание с амплитудой 0,23 мкм в течение 20 мин недостаточно для сепарации клеточных агрегатов и вызывает некоторую атипичию в морфологии клеток.

Было установлено, что гидродинамические силы, необходимые для разрыва или разрушения скопления клеток, в основном зависят от физического состояния последних, которое определяется такими факторами, как локальные гормоны, уровень рН, наличие инфекции и состояние здоровья пациента. Тем не менее показано, что по сравнению с мембранами клеток силы, удерживающие клетки в агрегатах, слабее. Результат эксперимента удовлетворителен, о чем свидетельствует наличие в препарате более 95 % разобщенных клеток. К этому же периоду времени относится работа Моог с соавт. Условия эксперимента были отработаны на клетках первичной культуры молочной железы, культуры клеток линии HeLa S<sub>3</sub> в клетках китайского хомячка. Авторы использовали УЗ-генератора с частотой колебаний 20 кГц и амплитудой волны 39—50 мкм, при длительности экспозиции 5 мин при комнатной температуре. Отмечено, что в результате механического воздействия повреждается до 50 % исследуемых клеток.

Однако некоторые исследователи, используя озвучивание материала, смогли добиться удовлетворительных результатов. Эксперимент проводился на клетках слизистой оболочки шейки матки с оптимальной частотой вибрации 50 Гц, амплитудой 0,5—1 мкм и в течение 1 мин. В итоге получены клетки с четкими и сохраненными контурами ядерных и цитоплазматических мембран [76].

В следующей работе представлены данные исследования раздельного УЗ-воздействия и сочетанного с ферментным влиянием пепсина на разобщение различных клеток человека и экспериментальных животных [167]. В частности, при изучении клеток слизи-

стой оболочки шейки матки человека обрабатывались разные методические варианты с изменением времени инкубации материала в растворе пепсина (концентрация 0,01—1,0 %) и энергии озвучивания. Временной интервал находился в промежутке 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120 и 300 с для УЗ-воздействия и 5, 10, 15, 20, 30 мин для пепсинизации. Частота УЗ-генератора составляла 50 000 Гц. Предварительно клетки фиксировали в 70%-ном этаноле, в одном случае — в деионизированной воде, затем — в 96%-ном этаноле и промывали в физиологическом растворе. Материал инкубировали в 10 мл раствора пепсина (2,5 г пепсина в 0,5 л и 0,2%-ного хлорида натрия) при 37 °С. Протеолитический процесс прекращали добавлением охлажденного физиологического раствора (4 °С). Перед озвучиванием седимент диспергировали в растворе трис-буфера, состоящего из 12 г триса, 6 г хлорида натрия, 84 мл 1 н. соляной кислоты и дистиллированной воды, добавленной до 1 л общего объема рН=7,5.

Кроме того, в качестве изучаемой модели использовались культуральные клетки человеческих фибробластов, культура клеток HeLa и эпителиальные клетки молочной железы мыши.

Вначале материал диспергировали пипеткой, затем фиксировали последовательно в 70 и 96%-ном растворе этанола. Перед ферментной инкубацией седимент промывали физиологическим раствором. Концентрация пепсина варьировала от 0,01 до 1 % в 0,01 н. растворе соляной кислоты, рН=1,8. Инкубировали материал при 37 °С, интервал времени составлял 1—75 мин.

Степень эффективности каждой методики оценивали путем анализа цитологических препаратов в фазово-контрастном микроскопе, а также по содержанию ДНК в ядрах клеток, окрашенных по Фельгену.

При оценке морфологии клеток ни в одном из экспериментов не удалось получить селективное повреждение ядер лейкоцитов, отмечены частичная или полная деструкция клеточных ядер, а также лизис цитоплазмы исследуемых объектов.

В работе Garcia с соавт. также анализируются данные по экспериментальному воздействию УЗ на субстрат [172]. Моделью служили эпителиальные клетки слизистой оболочки шейки матки, помещенные в полиэтиленовый тубик в растворе Дэвиса. Суспензию клеток подвергали озвучиванию при 20 000 Гц в течение различных интервалов времени: 2—32 мин. Через 2, 4, 8, 16 и 32 мин были отобраны пробы и приготовлены цитологические препараты. Последние готовились посредством фильтрации материала через миллипоровый фильтр с диаметром пор 3 мкм с последующим перенесением клеток путем плотного прижатия фильтра к предметному стеклу и фиксации отпечатка в 96%-ном этаноловом спирте. Препараты, окрашенные по Папаниколау, исследовали с целью определения морфологической сохранности структуры клеток. Основными критериями оценки эффективности воздействия УЗ на материал являлось наличие разнообразных скоплений из 2—4, 7, 8 и более клеток, раздельно расположенных элементов, клеточных

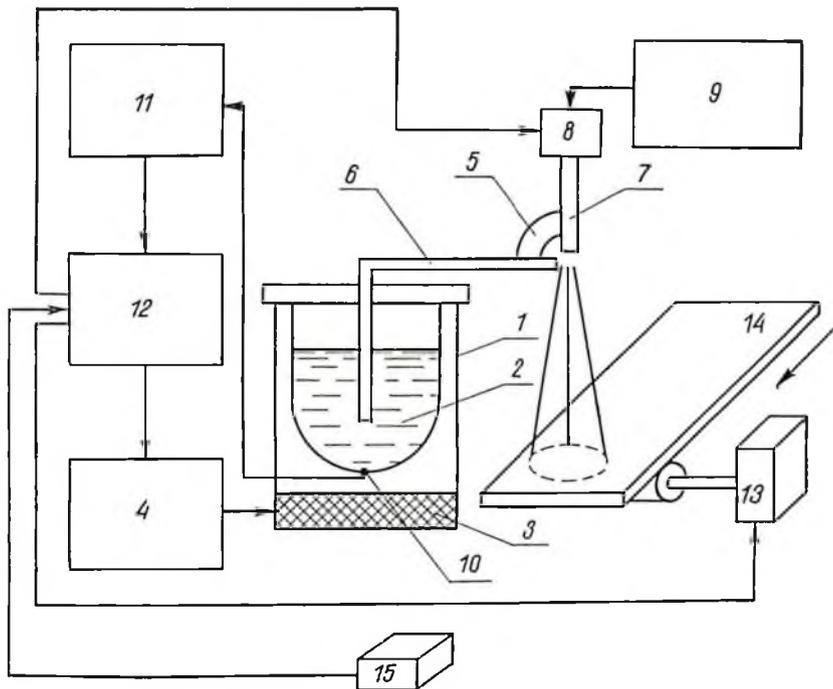


Рис. 7. Устройство для приготовления мазков для биологических клеток

обломков, «голых» ядер, фрагментированных лейкоцитов, артефактов. С применением математического подхода к изучению кинетики разрушения скоплений клеток и оценки морфологической сохранности исследуемых объектов были определены оптимальное время озвучивания и оптимальная сила воздействия УЗ на клетки. Наибольший эффект отмечался при двухминутной экспозиции материала с частотой УЗ-колебаний 20 000 Гц. При этих условиях разрушаются связи, удерживающие клетки в скоплениях, оставляя неповрежденными внутренние структуры и мембраны клеток.

Известно приспособление (рис. 7), в котором УЗ-генератор выступает в роли основного механизма, используемого для дезагрегации клеточных комплексов исследуемой ткани. Помимо диспергирования материала в функцию устройства входит монослойное распределение клеток на предметном стекле при помощи пульверизатора [91].

Принцип работы заключается в том, что с пульта 12 включаются генератор 4 и ультразвуковой излучатель 3. Исследуемый материал 2 в сосуде 1 размешивается в течение 5—10 мин, за это время происходит разделение клеточных агрегатов и взвесь приобретает равномерную плотность. Электрическое сопротивление между электродами датчика 10 достигает величины, экспериментально устанавливаемой в зависимости от вида клеток и конструкции сосуда. После этого электрический сигнал с усилителя 11 поступает

на пульт 12, который открывает клапан 8 источника 9 сжатого воздуха, выполненного в виде баллона. Затем включается привод 13 предметного стекла. Пульверизатор 5 засасывает взвесь клеток из сосуда 1 через трубку 6 и распыляет ее с расстояния 0,15—0,2 м воздушной струей, поступающей через трубку 7 на предметное стекло 14, которое перемещается со скоростью 0,1 м/с.

После перемещения стекла на всю длину срабатывает включатель 15, который через пульт 12 отключает клапан 8 и электропривод 13. Предложенное устройство позволяет получить на предметном стекле равномерный слой клеток, размещенных отдельно друг от друга. Это позволяет эффективно использовать полученные клеточные препараты при автоматизации цитологических исследований.

Выявлено, что применение УЗ-метода диспергирования материала в большинстве случаев дает положительные результаты. В работах последних лет также приводятся убедительные данные по использованию УЗ-метода с целью дезагрегации клеточных комплексов. Однако, несмотря на определенные достоинства метода и широкую апробацию его в экспериментальных работах, он не получил должного распространения в клинических исследованиях.

Методы диспергирования клеточных комплексов или тканей на основе применения неферментных химических веществ также не получили широкого признания, несмотря на удовлетворительные результаты [157, 216]. Видимо, это связано с большой трудоемкостью метода и труднопроизводимостью в обычной цитологической лаборатории. Однако следует привести одну из методик, которая обладает рядом достоинств, поскольку обеспечивает значительный выход изолированных клеток из тканей и органов человека, а также легко воспроизводится в обычной цитологической практике. Принцип метода основан на погружении ткани в раствор определенного состава с экспозицией в течение 1 ч при комнатной температуре и последующем растирании материала в ступке. Состав включает 9—11 частей этилового спирта, 1—2 — ледяной уксусной кислоты, 4—6 частей моноэтилового эфира этиленгликоля. Количественные соотношения компонентов растворителя могут изменяться в зависимости от вида ткани [93].

В настоящее время все чаще возникает потребность в получении монодисперсных суспензий, предназначенных для различных целей, в частности для прижизненного культивирования эксплантатов опухолевой ткани в диффузионных камерах, культивирования клеток в мягком агаре, выращивания сфероидов и т. д.

Резюмируя данные литературы последних лет, посвященной этим проблемам, можно сделать заключение о том, что наиболее эффективными и обеспечивающими достаточный выход жизнеспособных клеток являются методы, состоящие из двух-трех основных этапов: экспозиция клеток в сохраняющем растворе, мягкой механической обработки материала для дезагрегации клеточных комплексов, инкубации материала в растворе фермента.

Дальнейший этап зависит от способа исследования материала: если будет использоваться проточный анализатор, то окрашивается суспензия клеток, если метод сканирующей цитометрии, то вначале готовится тонкослойный препарат, который затем окрашивается.

Исходя из данного заключения, рассмотрим несколько вариантов методик, получивших достаточно широкое распространение в экспериментальных и клинических работах. Для ферментной дезагрегации ткани в качестве действующего агента может использоваться один фермент или же комплекс энзимов, называемый ферментным коктейлем, состав которого определяется видом ткани, необходимой для приготовления клеточной суспензии. Например, для дезагрегации солидных опухолей человека применяется среда, состоящая из гиалуронидазы, проназы и коллагеназы с добавлением 15%-ной телячьей сыворотки [260]. Достаточное количество жизнеспособных клеток можно получить при использовании ферментного коктейля, в состав которого входят 0,1%-ная коллагеназа, 0,01%-ная гиалуронидаза и 0,002%-ная дезоксирибонуклеаза. Средний выход жизнеспособных клеток в расчете на 1 г опухолевой ткани в случае саркомы составляет  $5 \times 10^6$ , а при дезагрегации широкого спектра опухолей желудочно-кишечного тракта, включающего рак пищевода, желудка, поджелудочной железы и толстого кишечника, —  $1 \times 10^7$  [257].

Значительный вклад в развитие и усовершенствование методик подготовки монослойных и монодисперсных клеточных препаратов различных тканей и органов внес Tanke с соавт. [283—285]. Была разработана и оценена степень эффективности методик, предназначенных для двух типов анализаторов: проточного и сканирующего, а также их комбинации (система LEYTAS). В качестве исследуемых моделей использовались клетки покровного и выстилающего эпителия различных органов, а также клетки крови. Ниже приведены прописи методик приготовления препаратов, предназначенные для количественной цитометрии, которые отработаны на клетках мочевого пузыря, полученных трансуретальной биопсией, диагностическом материале молочной железы и шейки матки. Клетки помещаются в буферную среду, состоящую из хлорида натрия, ацетата натрия, глюконата натрия, хлорида калия, хлорида магния (рН=7,4). Затем материал многократно суспендируется через иглу № 21 (диаметр 0,5 мм). Далее клетки промываются в 2%-ном растворе полиэтиленгликоля, приготовленного на 50%-ном этаноле, и еще раз суспендируются через иглу № 21. И в заключение материал наносится на предметное стекло, покрытое поли-L-лизинном, с использованием специально разработанных центрифужных кювет. Приготовленные таким образом препараты пригодны для традиционных методов исследования (мазки окрашивают по Папаниколау или Май-Грюнвальду), а также для изучения в автоматизированной системе LEYTAS с целью одновременного количественного изучения ДНК и белка.

Следующая методика предназначена для исследования суспензии клеток в проточном анализаторе. Упомянутые выше клетки фиксируются в течение 1 ч в растворе 70%-ного этанола, затем к каждому миллилитру клеточной суспензии медленно добавляется 2,7 мл 96%-ного этанола. После фиксации клетки дважды отмываются в фосфат-солевом буфере Дульбекко, который в отличие от других сбалансированных сред не содержит соли кальция, суспендируются несколько раз через иглу № 21 и окрашиваются (рН=7,2) раствором красителя содержащего 2 мг этидиума бромид (sigma), 4 мг митрамицина (pfizer) и 0,5 % Nonidet P 40 (детергент) на 1 мл среды Дульбекко [284].

Этими авторами разработана методика приготовления суспензии клеток крови [282]. Последние с антикоагулянтом тщательно ресуспендируются в миксере. В качестве антикоагулянта предлагается ЭДТА (раствор Версена). Затем к 50 мл исследуемого материала добавляется 5 мл фосфатного буфера (0,15 М, рН=7). После этого к суспензии клеток медленно, при постоянном помешивании, в течение 15 мин добавляется 2 мл 25%-ного раствора формальдегида, приготовленного на фосфатном буфере из расчета 5 частей клеточной суспензии на каждые 0,4 мл раствора формальдегида. Клетки перемешиваются на протяжении 2 ч, при необходимости материал может сохраняться в фиксирующей среде при температуре 4 °С при условии конечной концентрации формальдегида 7 %. Материал окрашивается пиронином G, по интенсивности флюоресценции клеток определяется содержание РНК при помощи флюоресцентного микроскопа или проточного анализатора.

Приводятся экспериментальные данные сочетанного ферментного и механического воздействия на клетки костного мозга с целью их дезагрегации [275]. При изменении времени инкубации и температурного режима был апробирован широкий спектр ферментов, включающий трипсин, гиалуронидазу, коллагеназу, бромелин, пепсин. Наиболее благоприятные результаты были получены при использовании коллагеназы. Известно, что именно этот фермент обладает минимальным повреждающим действием на клетки. Для аспирации костного мозга использовали обычный шприц, стенки которого обработаны антикоагулянтом (растворы гепарина, ЭДТА). Полученный материал помещали на часовое стекло, после чего множественные частички костного мозга немедленно переносили пипеткой в центрифужную пробирку, содержащую 10 мл СБСР Хэнкса с добавлением 230 ед/мл коллагеназы. Суспензию инкубировали в течение 15 мин при 37 °С, после чего материал центрифугировали и дважды промывали свежим раствором Хэнкса. Частично дезагрегированный материал под действием коллагеназы ресуспендировали шприцем через иглы № 19—25 ( $d=0,3-0,9$  мм). Затем суспензия клеток вновь центрифугируется, супернатант сливается. К осадку добавляются две капли 30%-ного бычьего альбумина, полученный раствор интенсивно перемешивается в миксере и несколько раз разбавляется раствором Хэнкса: сначала до концентрации 20 тыс. клеток/мл, а затем — 5—10 тыс.

В такой концентрации клеточная суспензия костного мозга пригодна для исследования в проточном анализаторе типа Цитографа. Возможности анализатора заключаются в изучении активности ферментативных систем клетки, таких, как щелочная фосфатаза, пероксидаза, кислая эстераза. После оценки гистограмм и электронных микрофотографий исследователи пришли к выводу, что предлагаемая техника дезагрегации клеточных скоплений превосходно сохраняет морфологию исследуемых клеток. Кроме того, она может быть предложена для изучения клеточного цикла с использованием специфических флюоресцентных красителей на ДНК.

Чрезвычайно сложной задачей является подготовка монодисперсных образцов из солидных опухолей человека, поскольку в результате дезагрегации в суспензию выходит очень малая фракция жизнеспособных клеток.

По данным разных авторов, изучающих экспериментальный и клинический материал, эта цифра колеблется в различных пределах; минимальный выход жизнеспособных клеток составляет  $0,01 \times 10^7$ , а максимальный —  $10 \times 10^7$  на 1 г опухолевой ткани [154, 186, 252, 254, 257, 274]. Малая фракция жизнеспособных клеток может не включать важные клеточные популяции, которые наиболее характерны для данного вида ткани. Помимо этого различные методы воздействия могут изменять структуру клеточных элементов и дальнейшая информация о биологических свойствах и природе нормальных и атипичных клеток может быть искажена. Несмотря на специфику солидной ткани, для получения монодисперсных образцов также применяется сочетание ферментного и механического методов воздействия. При этом механическая обработка должна быть щадящей, это достигается суспендированием клеток посредством шприца и набора игл различного диаметра. Более совершенное механическое воздействие, такое, как интенсивный пассаж через сито, гомогенизация, размельчение через «мясорубку», «терку», способствует большему выходу клеток из опухолевого матрикса, однако приводит к появлению значительного количества поврежденных клеток, стромальных элементов и снижению общего выхода жизнеспособных клеток [255, 258, 273, 274]. Исходя из изложенного, следует тщательно выбирать ту или иную методику с изучением степени повреждающего фактора, определяя наиболее эффективную для каждого типа ткани.

Engelholm использовал современные подходы к определению степени повреждающего фактора трех различных методов воздействия на клетки солидных опухолей человека (карцинома молочной железы, злокачественная меланома, мелкоклеточная карцинома гортани) с последующей гетеротрансплантацией полученной суспензии клеток бестимусным мышам. Данные эксперимента, представленные в табл. 5, позволяют выбрать наиболее оптимальный вариант диспергирования для определенного типа опухоли человека [154].

Рассматривая различные варианты методик, используемые в работах, приведем одну из них как альтернативный вариант приго-

Таблица 5. Сольдные опухолевые клетки человека, дезагрегированные тремя раз

| Тип опухоли   | Триессинь      |     |     |   |
|---------------|----------------|-----|-----|---|
|               | долговременная |     |     |   |
|               | а              | б   | в   | г |
| CPHSCCL 049   | 5,0            | 3,4 | 1,6 | + |
| CPHSCCL 054 В | 5,5            | 2,2 | 1,2 | + |
| CPHSCCL 075-5 | 5,5            | 3,0 | 1,6 | + |
| CPHSCCL 084   | 3,1            | 6,6 | 1,9 | + |
| T 60          | 2,4            | д   | д   | + |
| T 61          | 2,2            | д   | д   | + |
| T 2           | 10,0           | 0,9 | 0,7 | + |

Обозначения: CPHSCCL (0,49, 054 В, 075-5, 084) — мелкоклеточная карцинома гортани, делен по способности их поглощать краситель ( $\times 10^7$ ), б — колониеобразующая способность клеток вой ткани ( $\times 10^4$ ), г — возможность формирования опухоли у бестимусных мышей (+), д — карци-  
рост in vitro

товления монодисперсных суспензий из солидных опухолей чело-  
века. Для наглядности методика представлена в табл. 6 [273].

Об эффективности разработанного метода свидетельствуют до-  
статочно большая доля выхода жизнеспособных клеток из тканей  
и достаточно широкий спектр исследуемого материала, включаю-  
щий помимо злокачественной меланомы, карциномы молочной же-  
лезы и гортани различные классифицируемые и неклассифицируе-  
мые саркомы: фибросаркому, миосаркому, рабдомиосаркому,  
хондросаркому, нейробластому, остеосаркому, синовиальную сар-  
кому и др.

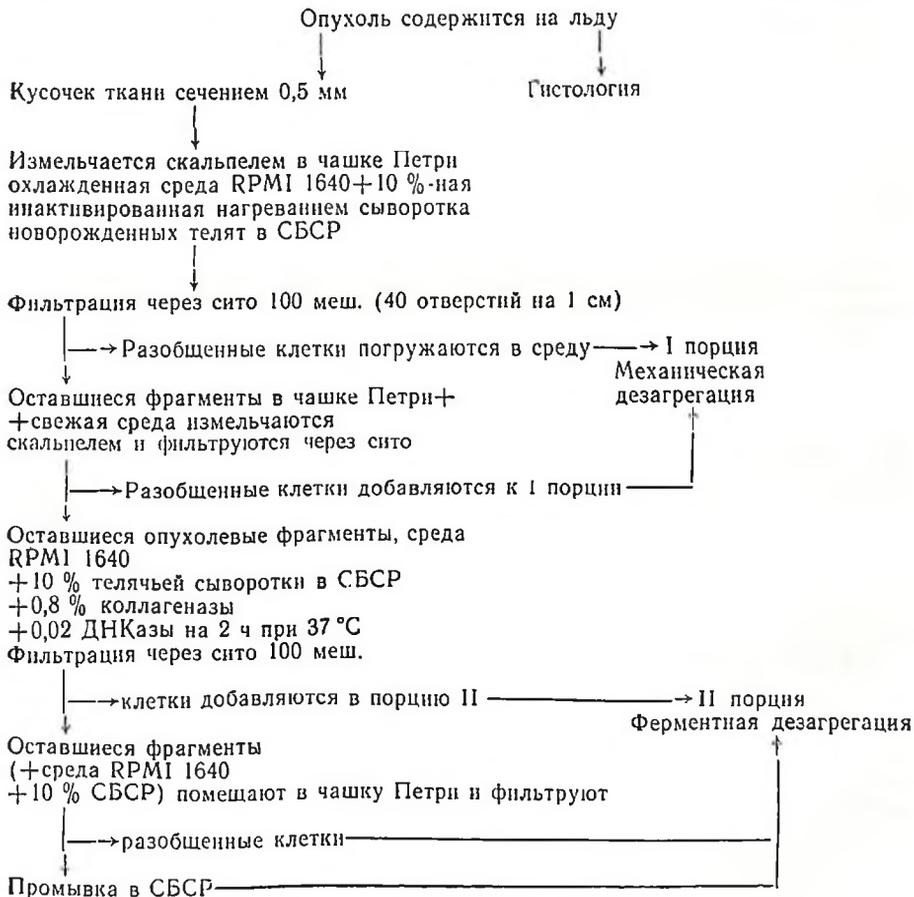
В последнее время особое место среди применяемых методик  
стали занимать оригинальные способы подготовки монодисперс-  
ных образцов из патогистологических парафиновых блоков [184,  
185, 266, 295]. По мнению авторов, ценность методики заключае-  
тся в ретроспективном анализе архивного материала при помощи  
анализаторов любого типа. Способ приготовления клеточной взве-  
си отработывался на значительном количестве разнообразного ма-  
териала, включая злокачественные опухоли мочевого пузыря, пря-  
мой кишки, молочной железы и яичника.

Суть метода заключается в депарафинировании тонких срезов  
(около 30 мкм толщиной) исследуемой ткани человека в двух пор-  
циях ксилола с последующей регидратацией материала в спиртах  
нисходящей крепости (100, 95, 70 и 50 %). Каждая процедура про-  
водится при комнатной температуре в течение 10 мин (за исклю-  
чением методики Schutte, где каждая манипуляция занимает 1 ч  
и 0,5 ч соответственно). Затем ткань дважды отмывается в дистил-  
лированной воде или физиологическом растворе, ресуспендируется  
на магнитной мешалке и инкубируется в присутствии фермента в  
термостате при 37 °С. По методике Hedley материал помещали в  
0,5%-ный раствор пепсина, приготовленный на физиологическом  
растворе с добавлением 2 н. (рН=1,5). Время инкубации 30 мин.  
По методике Schutte с соавт. материал инкубируется в течение

| защита          |      |      |   | Механическая дезагрегация |      |      |   |
|-----------------|------|------|---|---------------------------|------|------|---|
| кратковременная |      |      |   | а                         | б    | в    | г |
| а               | б    | в    | г | а                         | б    | в    | г |
| 4,7             | 2,20 | 0,90 | + | 0,30                      | 0,90 | 0,03 | + |
| 6,1             | 0,90 | 0,50 | + | 1,0                       | 0,40 | 0,04 | + |
| 0,6             | 0,03 | 0,02 | - | 0,03                      | 1,20 | 0,03 | - |
| 1,0             | 2,70 | 0,30 | + | 0,01                      | 0,01 | 0,01 | с |
| 0,1             | д    | д    | - | 0,01                      | д    | д    | е |
| 2,0             | д    | д    | - | 0,01                      | д    | д    | е |
| 3,0             | 1,00 | 0,20 | + | 0,1                       | 0,01 | 0,01 | е |

Г 60, Г 61 — карцинома молочной железы, Г2 — злокачественная меланома; а — выход клеток, опре- (%), в — выход клоногенных клеток равен количеству колониеобразующих клеток на 1 г опухоли молочной железы, не дающая рост *in vitro*, с — низкий выход опухолевых клеток не дает

Таблица 6. Методика, предназначенная для дезагрегации сближенных клеток



ночи в 0,25%-ном растворе трипсиона в цитратном буфере (рН=7,6).

Исследователи считают, что долговременная трипсинизация материала не только способствует лучшему освобождению клеток из тканевого матрикса, но и увеличивает интенсивность флюоресценции клеток, окрашенных йодистым пропидием. Такой эффект возникает за счет дополнительного разрыва поперечно связанных нуклеопротеидов в макромолекулах ДНК клетки.

По методике Van Driel-Kulker материал подвергается воздействию 0,05%-ной проназы (9,7 ед/мл, тип 7) в фосфатно-солевом буфере в течение 30 мин. Завершаются описанные варианты методики промывкой материала либо физиологическим раствором, либо средой RPMI 1640 в модификации Мак-Коя и фильтрацией суспензии клеток через нейлоновый фильтр с диаметром пор 50—70 мкм.

Степень эффективности и качество методики Hedley с соавт. оценивал по 3 параметрам. Количество разобщенных клеток подсчитывали на гемоцитометре. Определено, что метод обеспечивает получение монодисперсной взвеси в концентрации более чем  $10^5$  клеток на 1 мл. Данная степень дисперсии оптимальна для исследования материала на проточном анализаторе. Морфология клеток оценивалась при помощи фазово-контрастного микроскопа путем сравнения клеток, полученных предложенным методом и механической дезагрегацией нефиксированного материала. Не было обнаружено каких-либо заметных различий в морфологии клеток. Кроме того, на гистограммах по содержанию ДНК в 24 различных опухолях, полученных разработанным способом и при окрашивании свежих нефиксированных тканей митрамицином и этиднумом бромидом, хорошо видна корреляция результатов.

В дополнение к приведенным методикам следует сказать, что немаловажное значение придается качеству используемых ферментов и ксилолу, а также фиксирующим смесям, которые используются для обработки патогистологического материала. Из большого спектра фиксирующих жидкостей наиболее благоприятные результаты были получены при использовании нейтрального формалина или формальдегида (ацетон) уксусной кислоты. Жидкость Буэна, пикриновая кислота и ртутьсодержащие фиксирующие жидкости менее пригодны для обработки исследуемого материала, который в последующем анализируется проточными анализаторами [185].

В заключение данного подраздела необходимо рассмотреть некоторые трудности, которые возникают на любом этапе подготовки монодисперсных образцов независимо от метода дезагрегации. Клетки, освобожденные из тканевого матрикса, имеют тенденцию к реагрегации в комплексы. Особенно это проявляется после центрифугирования или долговременного хранения клеточной суспензии. Для избежания этого рекомендуется дезагрегированный материал хранить на холоде или же в присутствии сыворотки. В течение всей процедуры приготовления необходимо тщательно

суспендировать исследуемый материал пипеткой или же шприцем с набором тонких игл. Для исключения оставшихся клеточных коагломератов обязательной процедурой является фильтрация клеточной суспензии через нейлоновый фильтр с диаметром пор 50 мкм.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

За последние три десятилетия накоплен определенный опыт по применению красителей, используемых для количественной цитохимии, в частности красителей с абсорбционными свойствами. Рассмотрены механизмы проникновения этих красящих веществ в клетку, определена чувствительность поглощающих красителей к определенному виду ткани, созданы модификации известных методов окраски и т. д. [6, 16, 47]. Среди этих работ следует выделить данные по количественному обоснованию выбора типа красителей для анализатора с известной спектральной характеристикой, а также по стандартизации как самого красителя, так и методики окраски препарата, предназначенного для исследования клеток на приборах сканирующего типа [33, 67, 308].

В представленной главе будут рассмотрены и в определенной мере систематизированы данные, касающиеся флюоресцентных красителей, которые в настоящее время получили широкое распространение в количественной цитометрии. Это обусловлено тем, что флюорохромные красители специфически связываются с различными клеточными компонентами и могут служить определенными количественными маркерами структурного и функционального состояния клетки.

Прежде чем приступить к изложению вопросов, касающихся окраски исследуемого материала, рационального выбора красителя, его спектральных характеристик и т. п., необходимо остановиться на некоторых пунктах, которые следует учитывать при проведении исследований на анализаторах проточного и сканирующего типа.

1. В связи с тем что интенсивность окраски ядерного вещества и содержание ДНК коррелируют друг с другом и находятся в прямой зависимости от методики приготовления материала, необходимо в каждой работе давать четкое и адекватное описание этих процедур.

2. Для стандартизации исследований и воспроизводимости экспериментальных данных следует обязательно приводить сведения об условиях проведенных измерений с указанием типа источника света, рабочей длины волны и фильтров, используемых в данной системе для выделения требуемого участка спектра.

3. Для трактовки полученных данных и калибровки прибора необходимо использовать цитометрический стандарт двух типов: оптический и биологический. В качестве оптического стандарта в случае использования цитоанализатора проточного типа чаще всего применяются флюоресцентные полистероловые микрочастицы различного диаметра — латексы, выпускаемые промышленностью.

Некоторые исследователи для калибровки проточной системы используют объединенные нормальные образцы, взятые от нескольких пациентов (10 и более), с двумя отрицательными цитологическими заключениями и соответствующими анамнестическими данными. Такой усредненный биологический стандарт готовится параллельно с экспериментальным материалом и анализируется перед каждой пробой с целью определения вариации окраски материала и стабильности работы прибора.

С целью определения индекса ДНК, особенно если исследуется неизвестная клеточная популяция, необходимо добавлять к изучаемому образцу стандартные клетки. В основном в экспериментальных и клинических работах применяются такие специфические биологические стандарты, как эритроциты цыпленка — CRBC (chicken red blood cells), эритроциты радужной форели — TRBC (rainbow trout red blood cells), мышинные лимфоциты и человеческие лимфоциты периферической крови, дрожжи, пыльца. Упомянутые клетки применяются в свежем виде или фиксированными в формалине, метаноле или этаноле.

В случае измерения содержания ДНК в клетках, фиксированных на предметном стекле, также необходимо иметь контроль для сравнения результатов. Чаще всего в качестве внутреннего биологического стандарта с нормальным диплоидным содержанием ДНК (2c) используют лейкоциты, которые всегда присутствуют в достаточном количестве в каждом изучаемом препарате [239], или же нормальные промежуточные клетки в случае изучения эпителиального пласта слизистой оболочки шейки матки [301]. В некоторых работах для определения стволовой линии ДНК используют сперматозонды быка или человека, что соответствует гаплоидному набору хромосом, содержание ДНК равно 1c [188].

В последнее время в связи с внедрением цитометрических методов исследования углубилось представление о многих механизмах, происходящих в клетке, и факторах, способствующих регуляции этих явлений. Стали появляться работы с критическим анализом и тщательной оценкой контрольных клеток, используемых в качестве биологического стандарта. Так, данные некоторых авторов свидетельствуют о неустойчивости уровня пloidности ДНК в  $G_1$ -фазе клеточного цикла внутри самого стандарта.

В работе Hedley с соавт. показано, что ни CRBC, ни лимфоциты человека (свежие или фиксированные в формалине) не имеют стойкого диплоидного  $G_1$ -пика на анализируемой гистограмме. Попытка использовать в качестве внутреннего стандарта нормальную ткань, приготовленную из парафиновых блоков, также не увенчалась успехом [184].

Более поздняя работа Schutte с соавт. показала возможность успешного использования нормальных клеток здорового участка патологически измененного органа в качестве биологического стандарта [268]. Более того, исследователи предлагают свою методику в качестве альтернативного способа подготовки стандарта для изучения суспензии клеток в проточных анализаторах. Авторы на

частном случае, а именно колоректальной опухоли человека, смешанной с материалом здорового участка хирургически удаленной кишки, показали возможность использования смешанной популяции клеток в качестве достаточно стабильного стандарта. Данные табл. 7 свидетельствуют об устойчивости значения коэффициента

Таблица 7. Коэффициент вариации диплоидных пиков неизменной слизистой оболочки и опухоли

| Статистический параметр | Неизменная слизистая оболочка | Опухоль | Смешанная популяция клеток |
|-------------------------|-------------------------------|---------|----------------------------|
| Коэффициент вариации, % | 5,28                          | 5,10    | 5,27                       |
| Стандартная ошибка      | 1,11                          | 1,17    | 1,08                       |

вариации уровня плоидности нормальной слизистой и опухолевой ткани, а также смешанной популяции клеток.

Разница коэффициента вариации для неизменной слизистой оболочки и опухоли по сравнению со смешанной популяцией не достоверна (парный Т-тест,  $P > 0,30$ , соответственно  $P > 0,95$ ).

На данном примере показано, что подготовка адекватного биологического маркера не вызывает трудностей, поскольку в каждом исследуемом материале всегда присутствуют в достаточном количестве клетки нормальной ткани.

Как видно из обсуждаемых работ, значение стандартов в количественной цитометрии очень велико, и этому вопросу уделяется большое внимание. Заседание рабочей группы по номенклатуре общества аналитической цитологии обсуждало круг вопросов, касающихся цитометрической терминологии и выбора стандартов [190]. Предложено в качестве идеального внутреннего биологического стандарта использовать диплоидные клетки нормальной ткани того органа, который исследуют.

4. Важным методологическим приемом является определение кинетики насыщенности изучаемого материала флюоресцентным красителем. С этой целью окрашивают любые стандартные клетки или исследуемый материал раствором красителя различной концентрации и определяют оптимальный вариант.

В настоящее время количественные методы используются как в фундаментальных биологических исследованиях, так и в клинической медицине на базе применения анализаторов проточного и сканирующего типа. В основу этих методов положены принципы исследования различных клеточных «структурных» и «функциональных» параметров: «внешних» и «внутренних», которые по оригинальной классификации Shapiro можно изучать с применением и без флюорохромных красителей [270].

«Внутренние» структурные параметры включают размер и форму клетки, характер цитоплазматической гранулярности, наличие пигмента (гемоглобина, хлорофилла). «Внутренние» «функциональные» параметры характеризуют окислительно-восстановительное состояние клетки.

Таблица 8. Флуоресцентные красители, применяемые для изучения «внешних»

| Область спектра |            | Измеряемые                        |                |   |
|-----------------|------------|-----------------------------------|----------------|---|
| возбуждение     | испускание | поверхностно-структурные свойства | основной Селок | ДНК   |
| УФ              | Синяя      | SITS                              | SITS           | Ho, DAPI, DIP1  |
| УФ              | Зеленая    | DANS                              | DANS           | —   |
| Сине-фиолетовая | »          | FITC                              | FITC           | 7-амино-AMD оливомицин, митрамицин, хромомицин А <sub>3</sub> |
| Сине-зеленая    | »          | FITC                              | FITC           | АО  |
| УФ к желтой     | Красная    |                                   | SR 101         | EtBr, PI  |
| Сине-зеленая    | »          | TRITC, Фикоэритрин                | TRITC          | —   |
| Желто-зеленая   | »          | XRITC, SR101, Фикоцианин          | —              | —   |
| Красная         | »          | Аллофикоцианин                    | —              | —   |

«Внешние» структурные клеточные параметры позволяют получить информацию о поверхностных антигенах, лектиносвязывающих веществах, сульфгидрильных группах, содержании ДНК и РНК, а также о структуре хроматина, кальцийионных мембранных связях, содержании общего и основного белка.

Перечень «внешних» функциональных параметров содержит большой спектр различных характеристик клетки, включая целостность мембран, поверхностный потенциал, внутриклеточное рН, цитоплазматический митохондриальный потенциал, поверхностно-цитоплазматические рецепторы, ферментную активность, текучесть мембран, или микровязкость, проницаемость мембран, эндоцитоз и синтез ДНК, структурированность цитоплазматического матрикса.

В этой главе из предложенной Shapiro классификации будет рассмотрена лишь часть клеточных параметров, которые выявляются только благодаря комплексу флюорохром — субстрат.

В настоящее время существует целый ряд флюорохромов с известным химическим составом и в большей или меньшей степени изученным механизмом связывания красителей с клеточными органеллами. Благодаря этим красителям можно определять содержание белков, ДНК, РНК, выявлять липидсодержащие структуры, активность различных ферментных систем, SH-группы, определять величину мембранного потенциала, рН внутриклеточной среды, по-

параметров клетки

параметры

| РНК             | целостность мембраны | pH         | мембранный потенциал                | ферментная активность         |
|-----------------|----------------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| —               | —                    | ADB        | —                                   | Кумарин основной субстрат     |
| —               | —                    | ADB        | —                                   | Нафтол основной субстрат      |
| —               | FDA, COFDA           | FDA, COFDA | Оксикарбоцианин                     | Флюоресценс основной субстрат |
| —               | FDA, COFDA           | FDA, COFDA | Оксикарбоцианин, родамин            | Флюоресценс основной субстрат |
| —               | EtBr, PI             | —          | —                                   | —                             |
| АО<br>Пиронин-G | —                    | —          | Индикарбоцианин                     | —                             |
| —               | —                    | —          | Трикарбоцианин, оксидикарбоцианин   | Резорурфин основной субстрат  |
| Оксидин 1       | —                    | —          | Индодикарбоцианин, тридикарбоцианин | —                             |

лучать информацию о поверхностных антигенах клетки и т. п.

Сведения о применении наиболее распространенных в количественной цитометрии флюоресцентных красителей приведены в табл. 8 [140, 270].

Из используемых флюорохромов более всего изучена группа ядерных красителей, которые в известной степени являются маркерами макромолекул ДНК. Так, например, производные бензимидазола, к которым относятся красители типа Хехст, DAPI, DAPI, возбуждаемые в УФ-области спектра, окрашивают аденин-тиминовые богатые области ДНК и свидетельствуют об относительном содержании ДНК в клетке. С ГЦ-богатыми участками цепи ДНК взаимодействуют такие лекарственные препараты, как 7-амино-АМД, митрамицин, хромомицин Аз, оливомицин. Эта особенность позволяет использовать названные вещества в роли специфических красителей ДНК. Следует отметить, что митрамицин является в высшей степени специфическим красителем ДНК, так как не взаимодействует с участками двунитчатой спирали РНК [263].

В качестве интеркалирующих флюорохромных красителей для определения количества ДНК широко применяются производные фенантридина — пропидиум йодид и этидиум бромид, а также акридиновый оранжевый. В этом случае для обнаружения макромолекул ДНК материал необходимо предварительно обработать РНКазой или гидроксью бария с целью исключения неспецифиче-

ской окраски двунитчатой спирали РНК. Следует подчеркнуть, что интеркалирующие красители, индуцирующие флюоресценцию, очень чувствительны к изменениям вторичной структуры ДНК. Также отмечено, что чувствительность ДНК к денатурации более высокая в покоящихся клетках с конденсированным хроматином, чем в делящихся клетках с более диспергированным хроматином [263].

Указанные красители в основном используются для количественной оценки содержания ДНК в клетках, в то время как акридиновый оранжевый и этидий бромид позволяют получить информацию о структуре хроматина и степени его конденсации. В работе Mazzini с соавт. показано, что клетки линии Wi 38 с одинаковым значением содержания ДНК, но разной конформацией хроматина можно различать, окрашивая их EtBr низкой концентрации. Это объясняется тем, что число интеркалирующих связывающих участков увеличивается после стимуляции к пролиферации, свидетельствуя о происходящей конденсации хроматина именно в течение  $G_0$ ,  $G_1$ -фаз цикла [221].

За прошедшее десятилетие в исследованиях с применением методов количественной цитометрии накоплен определенный опыт по применению флюорохромоов в экспериментальной и клинической цитологии [6, 16, 27, 47]. Однако только в настоящее время стали появляться работы, в которых представлены данные по выяснению тонких механизмов проникновения флюорохромоов в клетку (за исключением АО), специфического связывания красителя с определенными клеточными структурами.

В качестве примера можно привести историю открытия такого широко используемого флюорохромоа, как Но 33342, который в 1977 г. был впервые представлен как витальный краситель для количественного определения содержания ДНК [96].

Были изучены некоторые особенности Но 33342, касающиеся его мутагенных свойств и токсичности для культивируемых клеток. Механизм связывания красителя с субстратом клетки оставался долгое время неизвестным и лишь в последних работах определено, что для связывания красителя Но 33258 с макромолекулами ДНК необходимым, но не единственным условием является порядок следования четырех последовательных АТ-пар. Предполагается, что дополнительным фактором в механизме взаимодействия является конформация АТ-богатых участков спирали ДНК [220]. Это предположение подтвердил Sandhu с соавт., которым путем экспериментального воздействия на плазмиды рBR 322, выделенные из *E. coli* HB 101, были получены две различные формы ДНК: сверхспирализованная форма I и ковалентно-ослабленная кольцевая закрытая форма I°.

Установлено, что Но 33342 в комплексе с формой I имеет более выраженную интенсивность флюоресценции, чем в комплексе с формой I° ДНК, которая составляет приблизительно 30 %. Причем на эту закономерность не влияет степень концентрации флюорохромоа ни концентрация ДНК плазмид. Это, по-видимому, связано

Таблица 9. Механизм взаимодействия и скорость протекания реакции некоторых типов флюорохромов

| Флюорохром              | Характер связи                                    | Субстрат                      | Время экспозиции, мин |
|-------------------------|---|-------------------------------|-----------------------|
| DAPI<br>Но 33 342<br>АО | Возможный интеркалятор<br>Внешняя<br>Интеркалятор | АТ                            | 5                     |
|                         |   | АТ                            | 30                    |
|                         |   | Пиримидин-пуриновые основания | 5                     |
| EtBr                    | »   | То же                         | 10                    |
| PI                      | »   | » »                           | 10                    |
| Квунакрин               | »   | » . »                         | 10                    |
| 7-амино-AMD             | »   | ГЦ                            | 10                    |
| Митрамицин              | Внешняя, $Mg^{2+}$ потребность                    | ГЦ                            | 30                    |
| Хромомиицин $A_3$       | Внешняя   | ГЦ                            | 30                    |

со сверхспирализацией конформации ДНК, делающей область молекул (возможно, АТ-богатые участки) более доступной для взаимодействия с красителем [262].

В этом же плане интересны работы Darzynkiewicz с соавт. [138—141] по изучению кинетики насыщенности красителями культивируемых клеток лейкемии Френд в зависимости от условий эксперимента, включая различную концентрацию красителя (от 0,1 до 10,0 мМ), время экспозиции (от 1 до 40 с), обработку экспоненциально растущих и дифференцированных клеток 0,1 н. HCl.

Изучена кинетика равновесия реакции окраски в зависимости от механизма проникновения флюорохрома в клетку, определены оптимальное время экспозиции красителя с субстратом и условия, обеспечивающие более интенсивную флюоресценцию клеток с использованием 9 различных типов флюорохромов. Показано, что красители АО, PI, квунакрин, 7-амино-AMD, а также DAPI быстро вступают в реакцию с макромолекулами ДНК исследуемых клеток, равновесие достигается через 5—10 мин. В случае применения митрамицина, хромомиицина  $A_3$ , а также красителей группы Хехст реакция протекает более медленно и равновесие наступает после 30-минутной экспозиции. Данную закономерность авторы объясняют исходя из механизма взаимодействия флюорохромов с клеточными компонентами. Как известно, первый тип реакции характерен для всех интеркалирующих красителей, спорным вопросом считается в настоящее время интеркалирующая природа DAPI, но данные эксперимента предполагают подобный механизм.

Второй тип реакции, отмеченный у названных выше флюорохромов (митрамицина, хромомиицина  $A_3$ , красителей группы Хехст), характеризует красители, которые взаимодействуют с субстратом по типу внешних связей. Именно эта особенность обуславливает медленную реакцию как в дифференцированных, так и в экспоненциально растущих клетках лейкемии Френд (табл. 9).

В публикациях последних лет представлены данные об оценке влияния условий эксперимента на специфику окраски изучаемого

Таблица 10. Спектры возбуждения и флюоресценции некоторых флюорохромов на уровне 0,5

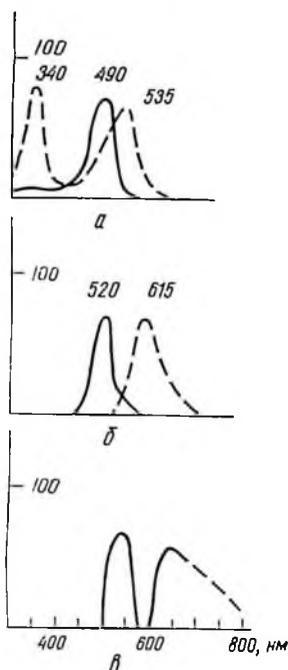
| Флюорохром                                    | Спектр      |     |      |               |     |      |
|---|-------------|-----|------|---------------|-----|------|
|   | возбуждения |     |      | флюоресценции |     |      |
|   | $\lambda_0$ | мин | макс | $\lambda_0$   | мин | макс |
| Хлортетрациклин                               | 300         | 290 | 320  | 525           | 475 | 570  |
| Et Rg   | 320         | 290 | 350  | 610           | 575 | 650  |
|   | 510         | 450 | 550  | —             | —   | —    |
| PI  | 340         | 320 | 360  | 615           | 575 | 660  |
|   | 535         | 490 | 570  | —             | —   | —    |
| DAPI, DAPI                                    | 350         | 290 | 380  | 475           | 400 | 520  |
| Но 33 342, Но 33 258,<br>Но 33 378, Но 33 662 | 350         | 320 | 380  | 460           | 420 | 520  |
| DANS  | 375         | 340 | 400  | 525           | 490 | 575  |
| SITS  | 375         | 340 | 400  | 450           | 425 | 500  |
| Митромицин, хромо-<br>мицин А <sub>3</sub>    | 420         | 390 | 440  | 550           | 475 | 620  |
| Оливомитцин                                   | 425         | 400 | 450  | 600           | 500 | 630  |
| Акрифлавин                                    | 450         | 400 | 475  | 505           | 470 | 560  |
| АО  | 490         | 450 | 505  | 550           | 520 | 600  |
| FITC  | 490         | 450 | 510  | 525           | 520 | 560  |
| Оксикарбоцианин                               | 490         | 460 | 500  | 505           | 495 | 425  |
| Индокарбоцианин                               | 550         | 515 | 560  | 570           | 550 | 590  |
| Тнокарбоцианин                                | 550         | 520 | 575  | 590           | 560 | 610  |
| Пиронин G                                     | 550         | 510 | 590  | 575           | 560 | 605  |
| TRITC   | 550         | 525 | 575  | 580           | 560 | 605  |
| Оксидикарбоцианин                             | 580         | 560 | 590  | 610           | 590 | 640  |
| Родамин 101                                   | 595         | 560 | 610  | 610           | 600 | 640  |
| Индодикарбоцианин                             | 630         | 610 | 650  | 675           | 670 | 700  |
| Тнодикарбоцианин                              | 650         | 620 | 670  | 690           | 670 | 705  |
| Индотрикарбоцианин                            | 740         | 720 | 760  | 780           | 750 | 800  |

материала, об анализе характера взаимосвязи флюорохрома с клеточными компонентами, а также установлена возможность идентификации структурных элементов ядра и клетки.

Установлено, что в первую очередь на механизм связывания флюорохрома с ядерными структурами влияют проницаемость цитоплазмы, особенности строения мембран и состояние ядерной ДНК. Известно, что от упаковки нитей ДНК, степени ее спирализации зависит взаимодействие флюорохрома с субстратом клетки. Экспериментально показано, что нативные и денатурированные ДНК и РНК под воздействием температуры или кислоты также различно связываются с флюорохромом [138, 141, 263]. Эти свойства можно использовать для повышения интенсивности флюоресценции исследуемых объектов, а также исследования структурных особенностей клетки. Определено, что использование в методике окраски деонизированной воды взамен дистиллированной увеличивает интенсивность флюоресценции комплекса ДНК с интеркалирующими красителями, это способствует выделению субпопуляций лимфоидных клеток с различной степенью конденсации и структурной организации хроматина [221, 222].

Рис. 8. Спектры:

*а* — возбуждения, *б* — флюоресценции ТТС и йодистого пропидия, *в* — спектральные характеристики светофильтров. Длина возбуждения лазера 488 нм



При рассмотрении некоторых особенностей флюоресцентных красителей, которые в основном отражают химическую или биологическую суть реакции, необходимо остановиться на физических сторонах этого явления.

Известно, что спектры возбуждения и испускания различных флюоресцентных красителей значительно отличаются друг от друга. Спектральные области возбуждения и испускания разных типов красителей, представленные в работе Shapiro (табл. 10), используются при исследованиях с применением различных фильтров для выделения необходимого участка длины волны, которые специфичны для данного красителя. Таким образом, создается возможность для одновременного изучения нескольких разных ингредиентов клетки при окрашивании исследуемого материала двумя или тремя флюорохромами. При определенных условиях сочетание красителей типа PI и FITC, DAPI и SR 101 дает возможность одновременно изучать содержание ДНК и основного белка [278, 279]. Комплекс красителей, состоящий из АО и EtBr, служит для анализа ДНК и РНК, что, в свою очередь, позволяет определить в популяции опухолевых клеток шейки матки гетеропloidные клетки и выделить фракции пролиферативных [146]. Комбинация красителей типа Но 33342, FITC и пиронин G служит для измерения содержания ДНК, белка и РНК соответственно. На основании этих данных появляется возможность анализа регуляторных факторов, участвующих в контроле прохождения клеточного цикла, что показано на модели клеток линии CHO HL-60 и макрофагов человека [136]. Помимо этого исследователи часто применяют комбинации только ядерных красителей, которые позволяют детально изучить структурные особенности ядра в разные фазы клеточного цикла. В основу метода положен различный механизм специфического связывания красителей с гуанинцитозинновыми и аденин-тиминновыми участками ДНК. Такие комплексы могут состоять из хромомиицина А<sub>3</sub> и красителя типа Но 33258, которые дифференциально окрашивают клетки с различной степенью упаковки хроматина [130, 131]. Данная особенность имеет место при определенных условиях фиксации, которая несущественно изменяет структуру хроматина.

Для подобных целей служит флюоресцентный комплекс, состоящий из EtBr и митрамицина, Но 33258 и митрамицина. Как изве-

стно, EtBr интеркалирует в пирамидин-пуриновое основание нуклеиновых кислот. Но 33258 специфически взаимодействует с АТ-богатыми участками спирали ДНК. Митрамицин, как отмечалось, связывается только с двунитчатыми участками спирали ДНК.

На примере работы Crissman, Steinkamp можно рассмотреть основные технические приемы и принципы, используемые для одновременного изучения двух каких-либо компонентов клетки, в частности содержания ДНК и основного белка. Так, вначале необходимо четко определить спектры возбуждения и испускания флюорохромов (в данном случае PI и FITC) в связи с тем, что спектры возбуждения этих красителей перекрываются в области 450—525 нм. Для возбуждения обоих флюорохромов необходимо использовать аргоновый или криптоновый лазер с линией излучения 488 нм. Подобные данные для любого другого комплекса флюорохромов можно определить исходя из табл. 10. Поскольку спектры испускания PI и FITC отдалены достаточно далеко друг от друга, можно определить отдельно содержание ДНК и белка, производя измерения в двух различных спектральных интервалах (рис. 8). Помимо этого показаны спектральные полосы, в которых проводились измерения красной и зеленой флюоресценции. С целью выделения рабочих интервалов измерения зеленой (до 580 нм) и красной флюоресценции (более 610 нм) применяют различные фильтры. Для отсечки длины возбуждения 488 нм применяют фильтр пропускания длинных волн, для разделения зеленого и красного излучения — интерференционный. Этот пример может быть использован в качестве руководства по выбору рабочей длины волны для определенного типа флюорохрома или их комбинаций [136, 278].

**ОПТИЧЕСКИЕ СКАНИРУЮЩИЕ ПРИБОРЫ**

Создание полуавтоматических устройств для исследования клеточных препаратов, нанесенных на предметное стекло (высокоразрешающий, или статический, метод), началось в 50-е годы. При разработке первых приборов была предпринята попытка возложить на них задачи подсчета клеток и измерения параметров, а цитологическую диагностику оставить за оператором. Такое комплексное решение построения полуавтоматических приборов позволило объективизировать определение параметров клеток и перейти от качественной к количественной характеристике препаратов. По сравнению с визуальным (ручным) методом повысилась производительность исследований, уменьшились субъективные ошибки. Однако участие оператора в работе прибора по-прежнему требовало значительного времени, что ограничивало область его применения дифференциальной диагностикой. Для массовых профилактических осмотров с целью выявления ранних форм заболеваний требуется автоматизировать процесс анализа. Пути решения этой проблемы лежат в направлении использования новых аппаратных средств с применением микропроцессоров изображения и разработки программного обеспечения.

Прежде чем приступить к рассмотрению современных тенденций в построении цитометрических анализаторов сканирующего типа, напомним, что при ручном методе цитолог с помощью микроскопа видит изображение клеток, нанесенных на предметное стекло, распознает атипичные клетки или их скопления. Результаты морфологических и стереологических исследований (количество, размеры, площадь, ориентация и т. д.) характеризуют «архитектуру» клетки, а следовательно, и опосредованно связанные с ней биохимические внутренние процессы. На основании проведенного анализа устанавливается цитологический диагноз. При этом ограниченная выборка, т. е. малое число исследуемых клеток, порождает неточность количественного описания исследуемого препарата. Возможны также ошибки, источником которых могут быть усталость оператора, недостаточная его профессиональная подготовка. К недостаткам визуального метода диагностики следует отнести низкую производительность и ограниченность рабочего времени цитолога, так как большую часть времени он затрачивает на отбор нормы, поскольку атипичные препараты встре-

чаются редко. Отсюда следует, что организация массовых цитологических осмотров на базе визуального метода оценки препаратов нецелесообразна, так как требует огромного объема ручного труда.

Рассмотрим основные узлы прибора, позволяющего повторить работу цитолога по визуальной оценке препарата. В состав такого цитометра необходимо включить: сканирующий микроскоп, фотоприемник, блок обработки с микропроцессором изображения и блок вывода результатов анализа. Параметры предполагаемого анализатора прежде всего зависят от выбора микроскопа.

Рассмотрим процесс формирования изображения с целью оценки влияния основных характеристик микроскопа на результаты исследования. При использовании освещения по методу Кёлера источник света устанавливается в фокусе коллекторной линзы. С помощью конденсора излучение источника передается на микрообъект, находящийся на предметном столе микроскопа. Следует отметить, что такой способ освещения позволяет получить наиболее равномерный фон при использовании источников, яркость которых распределена в пространстве неравномерно. С помощью объектива и окуляра, установленного фокусом перед плоскостью изображения микрообъекта, формируемого объективом, получается увеличенное изображение. Величина его больше реальных размеров исследуемого микрообъекта на коэффициент, равный произведению увеличения объектива и окуляра. Обычно на объективах указываются значение увеличения и численная апертура, от которой зависят светосила и разрешение объектов, величина ее определяется формулой

$$A = n \cdot \sin \alpha, \quad (17)$$

где  $n$  — показатель преломления иммерсии (для воды  $n=1,33$ , для масла  $n \approx 1,5$ , для воздуха  $n=1$  в случае использования сухих объективов);  $\alpha$  — угол между оптической осью и лучом, выходящим из фокуса, на край объектива.

Значение апертуры сухих объективов меньше единицы, при масляной или водяной иммерсии апертура возрастает в  $n$  раз. Напомним, что апертура объектива и конденсатора согласуются, т. е. необходимо стремиться к их равенству. Как следует из табл. 11, объективы с большой апертурой весьма критичны к фокусировке и глубине резкости [193].

Следующий параметр, который необходимо учитывать, это разрешение объективов, величина которого ограничена дифракционным эффектом. Под разрешающей способностью принято понимать минимальное расстояние между точками микрообъекта, которые можно регистрировать отдельно. В зависимости от степени когерентности источника и ряда других факторов величина этого параметра выбирается в пределах

$$r = (0,5 \div 1) \lambda / A. \quad (18)$$

Оптическая информация о клетке с помощью фотоприемников

Таблица 11. Основные характеристики объективов

| Увеличение объектива | Апертура, $\Delta$ | Разрешение ( $\lambda = 0,5$ мкм) | Рабочее расстояние, мм | Глубина резкости, мкм | Площадь пятна, мм <sup>2</sup> |
|----------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 5                    | 0,12               | 2,5,0                             | 30,00                  | —                     | 4,00                           |
| 10                   | 0,17               | 1,8,0                             | 14,00                  | 9,0                   | 1,00                           |
| 10                   | 0,25               | 1,2,0                             | 6,00                   | 9,0                   | 1,00                           |
| 10                   | 0,35               | 0,85                              | 1,00                   | 5,0                   | 1,00                           |
| 40                   | 0,65               | 0,45                              | 0,70                   | 1,0                   | 0,06                           |
| 40                   | 0,85               | 0,35                              | 0,40                   | 0,4                   | 0,06                           |
| 40                   | 0,95               | 0,32                              | 0,20                   | 0,2                   | 0,06                           |
| 100                  | 1,30 (масло)       | 0,23                              | 0,26                   | 0,3                   | 0,01                           |

преобразуется в электрический сигнал. Как видно из табл. 11, величина рабочего поля объективов микроскопов позволяет наблюдать ограниченную часть препарата. Последовательное измерение интенсивности светового потока, прошедшего через каждую точку клеток, расположенных на всей поверхности препарата, выполняется сканирующими устройствами.

С целью классификации существующих методов сканирования используется принцип определения местоположения подвижной диафрагмы или светового зонда. Выделяются три вида сканирования: в плоскости объекта, источника и изображения (табл. 12) [310].

Механическое перемещение специального стола микроскопа во взаимно перпендикулярных направлениях позволяет просканировать препарат при неподвижных объективе и источнике. При таком методе сканирования исключается влияние неравномерности освещенности поля препарата на амплитуду выходного электрического сигнала. В качестве фотоприемника используются ФЭУ, имеющие высокую чувствительность и широкий динамический диапазон. Управление растром, числом шагов, скоростью сканирования выполняется с помощью блока управления. В большинстве сканирующих микроскопов данного типа используется развертка: линейная или по меандру ( $\Sigma$ ). Наименьший шаг перемещения стола микроскопа составляет обычно 0,5 мкм. Рассматриваемый механический тип сканирующих устройств традиционен для сканирующих микрофотометров. К недостаткам этих приборов следует отнести высокие требования к изготовлению механических узлов сканера, массивность перемещаемого стола микроскопа, обуславливающую инерционность системы, виброчувствительность, а также малую скорость.

Второй тип сканирования осуществляется перемещением сфокусированного светового луча по поверхности препарата. В качестве такого светового зайчика в некоторых приборах используется лазерный луч, сфокусированный объективом, установленным по схеме инвертированного микроскопа. Перемещение лазерного пятна по препарату выполняется модулятором, в качестве которого могут использоваться система из двух зеркал, качающихся

Таблица 12. Типы Сканирующих устройств

| Плоскость сканирования | Микрообъект                              | Источник  |
|------------------------|--|-----------|
| Тип сканирования       | Перемещение предметного стола микроскопа | Модулятор |
| Фотоприемник           | ФЭУ                                      | ФЭУ       |
| Максимальная частота   | 100 Гц                                   | 18 кГц    |

во взаимно перпендикулярных направлениях, акустические модуляторы или гальванометрическая резонансная система.

«Бегущий» луч катодно-лучевой трубки вызывает свечение люминофора. Если это излучение проецировать в плоскость препарата, то на выходе ФЭУ электрический сигнал будет пропорционален интенсивности прошедшего через микрообъект светового потока. Такую же роль выполняет зонд, перекрывающий часть излучения источника. Примером модулятора служит диск Нипкова. Основными недостатками рассматриваемого метода сканирования являются малые светоотдача (за исключением лазерного луча) и скорость сканирования, существенная неравномерность

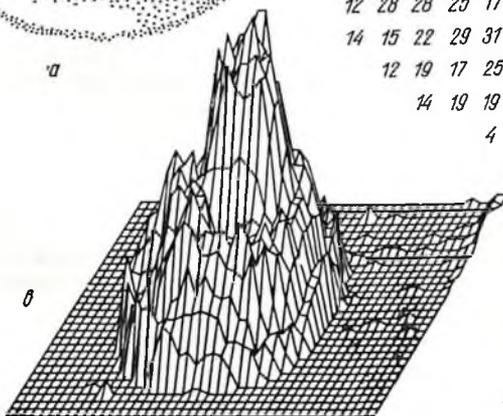
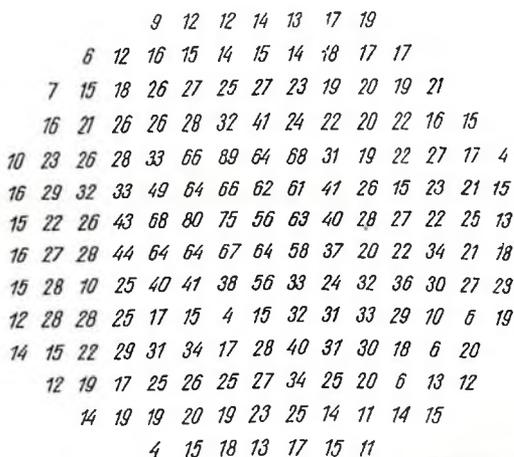
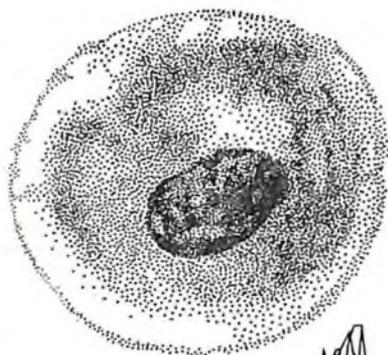


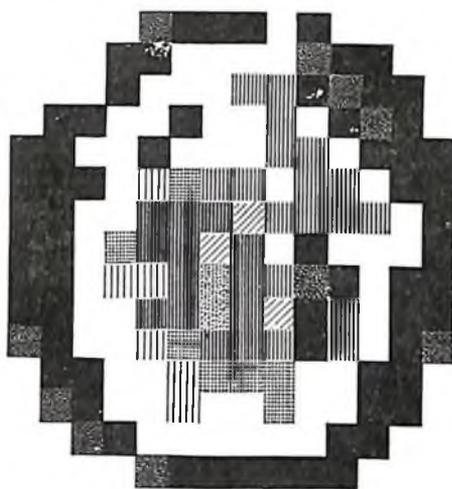
Рис. 9. Четыре портрета эпителиальной клетки

| света  |          | Изображение      |                  |                    |
|--------|----------|------------------|------------------|--------------------|
| ТБЛ    | Лазерный | Диодная ли-нейка | Диодная мат-рица | ТВ                 |
| ФЭУ    | ФЭУ      | ПЗС              | ПЗС              | Видикон, плюмбикон |
| 10 кГц | 10 кГц   | 100 кГц          | 5 мГц            | 1 мГц              |

освещенности, вызванная неоднородностью слоя люминофора и искажениями формирующей оптики.

Дифрагма, установленная и перемещаемая в непосредственной близости фотоприемника, служит примером реализации сканирующего устройства в плоскости увеличенного изображения (третий тип). Такой же эффект можно получить при проектировании изображения на диодную сборку, в которой сканирование в одном направлении может выполняться за счет электронного переключения фотодиодов матрицы, а в другом — за счет механического перемещения. Приборы с зарядной емкостью (ПЗС) и передающие телевизионные трубки (видиконы, плюмбиконы) не требуют механических элементов сканирования, поэтому удовлетворяют требованиям регистрации быстропротекающих процессов. К недостаткам этих приборов следует отнести: существенные коммутационные шумы для ПЗС, некоторую нелинейность разверток и невысокое значение отношения сигнал/ шум для телевизионных систем, а также необходимость учета неравномерности освещенности фона по препарату.

Разработка сканирующих систем, предназначенных для анализа клеток, основывается на преобразовании информации о строе-



нии трехмерных микрообъектов в цифровую форму. Как отмечалось, последовательное сканирование изображения клетки обуславливает появление видеосигнала фотоприемника, амплитуда которого пропорциональна интенсивности излучения, прошедшего или отраженного от сканируемой точки изображения. Цифровые значения амплитуд этого сигнала создают цифровую матрицу, соответствующую оптической плотности изображения клетки.

Фотография эпителиальной клетки, окрашенной по Папаниколау, полученной на оптическом

микроскопе (объектив  $\times 100$ ,  $A=1,3$ , масляная иммерсия), приведена на рис. 9, а. Там же представлены «цифровой портрет» (б) и трехмерная фигура (в), являющаяся пространственным представлением двумерного распределения величины поглощения в каждой точке изображения рассматриваемой клетки. Весь диапазон изменения поглощения клетки по цифровой матрице можно разбить на ряд значений и присвоить каждому шагу определенный цвет или уровень оптической плотности по шкале серости. Изображение эпителиальной клетки получено подобным образом и приведено на рис. 2. Выбор масштаба и закона его изменения для шага позволяет избирательно анализировать исследуемый параметр клетки в определенных поддиапазонах. Вывод подобно-го «искусственного» изображения клетки на экран дисплея позволяет визуально представить пространственную характеристику исследуемого параметра.

На величину и форму электрического сигнала фотоприемника при сканировании существенно влияет размер подвижной диафрагмы. Если размер диафрагмы или зонда меньше клетки (режим малого зонда), то в форме импульса отражается внутренняя ее структура. При малом зонде четко видны границы ядра и цитоплазмы. Если размеры зонда больше размеров клетки (режим большого зонда), фотоприемник регистрирует интегральный поток. В этом случае на выходе фотоприемника наблюдаются импульсы, близкие к треугольной или трапецевидной форме в зависимости от того, соизмеримы ли размеры зонда и клетки или размер зонда больше размера клетки соответственно. При измерениях большим зондом точная информация о размерах ядра и цитоплазмы чаще всего отсутствует.

Выбор размера зонда влияет на ошибку измерения. Дело в том, что внутреннее содержание клетки распределено неравномерно. В пределах малого зонда данная неравномерность сказывается меньше, поэтому ошибка распределения минимальна. С увеличением площади зонда, когда одновременно фотометрируются участки клетки с различной оптической плотностью, результат измерения зависит от степени перекрытия. Наблюдается эффект «экранировки» нижних слоев клетки верхними, степень поглощения общего потока ослабляется. Для наглядности представим модель, поглощающее вещество которой распределено равномерно по всей площади. В случае перекомпоновки поглощающего вещества клетки в бесконечно малый объем локальная оптическая плотность этого участка модели существенно возрастает, как и общее светопропускание по всей площади. И как следствие оптическая плотность, рассчитанная по результатам измерения большим зондом, будет меньше. Ошибка распределения, таким образом (при измерении большим зондом), зависит от степени гранулированности и поглощения вещества клетки.

## ОПТИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ СО СКАНИРОВАНИЕМ МИКРООБЪЕКТА

В качестве анализатора со сканированием в плоскости объекта рассмотрим SMP 0,1 или 0,5 (scanning microscope photometers), созданный на базе mikroskop photometer-MPV. Этот прибор характеризуется простотой построения, при которой цифровая матрица изображения клетки получается в результате механического перемещения препарата. Шаг сканирования составляет 0,5 и 10 мкм. Спектральный диапазон источника обеспечивает возможность проведения исследований от ультрафиолетовой до ближней инфракрасной области. Площадь препарата, на котором проводится поиск клеток,  $75 \times 25$  мм. Процесс сканирования контролируется компьютером типа РДР 8/Е или РДР 12/20. Обработка данных выполняется вторым компьютером. Тенденция разделения указанных задач между специализированными ЭВМ характерна для современных анализаторов цитологического назначения. Контроль сканирования и накопления данных изображения осуществляется обычно микро-ЭВМ. Обработка же данных поручается более мощной ЭВМ. Отсюда вытекает необходимость применения двух терминалов, на одном из которых проводится контроль сканирования, а на другом выполняется обработка накопленных на дисках данных в интерактивном режиме. Для записи полного изображения SMP требуется сравнительно большая память. Для случая перекрытия всей площади препарата в одном кадре при шаге сканирования 0,5 мкм содержится  $7 \times 10^9$  элементов. Введение такого объема информации в машинное поле усложняет построение анализатора, обуславливая применение мощных, универсальных ЭВМ. Одним из решений поставленной проблемы может служить сжатие информации. Следует отметить, что для специализированных диагностирующих устройств, какими являются цитологические анализаторы, процесс выделения информативных признаков целесообразно выполнять в предварительных блоках обработки. Интересно с этой точки зрения введение двух режимов сканирования: грубого и точного. При первом выполняются возврат к подозрительным клеткам и детальный их анализ. Причем сканирование может выполняться одновременно на нескольких длинах волн. Анализатор, построенный по принципу регистрации параметров нормальных и опухолевых клеток на различных длинах волн, приведен в патенте [311]. Поскольку спектр поглощения ДНК и РНК имеет максимум поглощения на длине волны 0,25 мкм, а спектр поглощения протенина — на длине волны 0,28 мкм, то измерение объема, ядерно-плазматического соотношения, коэффициента формы, а также количества ДНК клеток было предложено осуществлять по отношению и разности амплитуд сигналов двух каналов с различными длинами волн. Алгоритм предложенного прибора базируется на следующих критериях: разностный сигнал прошедшего потока у малигнизированной клетки в связи с повышенным синтезом белка по сравнению с нормальной

клеткой больше; сигналы, обусловленные разрушенными клетками и артефактами (краситель, пыль), также различаются, так как имеют другие спектральные характеристики. В устройстве обработки идентификация клеток выполняется по наличию сигналов в указанных каналах, их отношению и разности с учетом нормирования.

Из отечественных цитологических анализаторов с механическим сканирующим устройством следует отметить «Морфоквант». Общее поле сканирования прибора составляет  $20 \times 40$  мм с минимальным шагом сканирования 0,1 мкм [37]. Применение зондов с размером 0,2 и 0,8 мкм в плоскости предметного стола позволяет получить оптическую информацию с локального участка изображения. Блок микроскопа обеспечивает все режимы работы: морфо-, спектрофото-, фотометрический в прямом и отраженном свете. В состав комплекса введена вычислительная машина KSR 4100 с объемом памяти 16 Кб и магнитным внешним диском 512 Кб. Задачи ЭВМ заключаются в следующем: управлении сканированием стола микроскопа с помощью прецизионных шаговых двигателей, автоматической фокусировке объектива в процессе сканирования, обработке полученной информации и выводе ее результатов на диски памяти, телетайп и канал самописца.

К подобным системам также относится микроскоп-фотометр с устройством съема информации УСИ «Протва-С», созданный Ленинградским оптико-механическим объединением [86]. Прибор разработан по однолучевой схеме с минимальным шагом 0,5 мкм. Сканирование выполняется двухкоординатным предметным столом, а для фотометрирования предусмотрены сменные диафрагмы, расположенные в плоскости изображения, что позволяет исследовать участки препарата 0,3—220 мкм. Поскольку диафрагма неподвижна, то используется только центральная часть объектива, тем самым минимизируются оптические aberrации. УСИ «Протва-С» предназначена для получения фотометрической информации. Однако для дальнейшей обработки необходима стыковка с ЭВМ типа АСВТ М-6000.

Рассматриваемый метод оптико-механического сканирования высокочувствителен, имеет большой динамический диапазон, высокое разрешение. Следует отметить, что скорость обработки этого метода самая низкая по сравнению с другими известными методами сканирования.

### АНАЛИЗАТОРЫ СО СКАНИРОВАНИЕМ ИСТОЧНИКА

Как отмечалось, свечение люминофора, нанесенного на внутреннюю поверхность трубки (ТБЛ), вызывается электронным пучком, положение которого управляется магнитным полем отклоняющих катушек, обеспечивая режим *flying spot scanning*. Такой способ ввода изображения, являющийся примером сканера в плоскости источника, применен в ряде анализаторов: FIDCA (film input to digital automatic computer) [215], CYBEST model 2

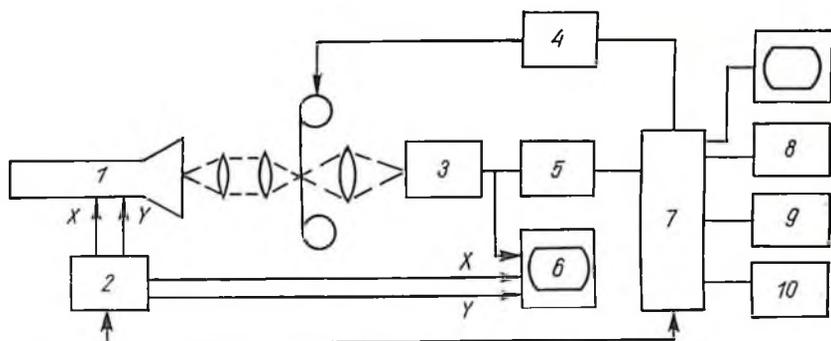


Рис. 10. Структурная схема цитологического анализатора с трубкой бегущего луча:

1 — трубка бегущего луча (ТБЛ), 2 — сканирующее устройство, 3 — ФЭУ, 4 — устройство ввода изображения, 5 — АЦП, 6 — ВКУ, 7 — микро-ЭВМ, 8 — дисплей, 9 — графопостроитель, 10 — диск памяти

(cyto-biological electronics screening systems, [231, 280, 281], ВЮРЕР [310]. Структурная схема подобных систем, в которых свечение трубки бегущего луча проецируется на препарат или диапозитив с помощью высокоразрешающих линз, представлена на рис. 10. Современные трубки бегущего луча позволяют получить несколько сотен линий на  $1 \text{ мм}^2$  поверхности экрана. Этот растр может быть уменьшен с помощью проекционной оптики при облучении микрообъектов до предела, когда строки начнут сливаться. Следует отметить, что современные высококачественные оптические объективы и трубки бегущего луча позволяют достигнуть предела оптического разрешения.

При фотографировании препарата [310] авторы получали до 6 фотонегативов, причем на каждом размещалось не менее 1—3 тыс. клеток. По общей площади перекрытия это составляло  $\frac{1}{4}$  всего препарата. На втором этапе проводился анализ фотопленки. Покадровая смена фотонегативов выполнялась лентопротяжным механизмом, привод которого связан с устройством ввода изображения в ЭВМ. В режиме полного изображения точечный растр такого прибора обеспечивает достаточно высокое разрешение в основном ограниченное параметрами используемой ЭВМ.

Допустим, что размер эпителиальной клетки достигает 80 мкм. Если ширина строк и расстояние между ними равно 1 мкм, то получаем 1600 информационных точек на всю площадь пленки. Длина изображения эпителиальной клетки на фотонегативе при увеличении в 1000 раз составляет 80 мм. При этом же растре получается уже  $1,6 \times 10^9$  информационных точек на всю площадь изображения клетки, в то время как максимально допустимое число информационных точек для изучаемой клетки при исследовании ее с помощью оптических микроскопов (при оптическом разрешении 0,25 мкм) не превышает  $2,5 \times 10^4$ . Таким образом, разрешающая способность процесса выборки для рассматриваемого примера избыточна и фактически ограничивается пределом опти-

ческого разрешения микроскопа. В указанных выше анализаторах точечный растр имеет различные размеры. Например, в FIDAC он состоит из  $700 \times 500$  точек, выборка которых производится  $32\,768 \times 32\,768$  элементами разрешения, на передачу которых затрачивается 40 с, т. е. 4 мин на препарат [231]. Использование более мощной ЭВМ позволит сократить время анализа препарата до 1 мин. Задание адресов такого растра осуществляется 15-битовым амплитудоцифровым преобразователем. Кодирование уровней амплитуды выходного сигнала, получаемого на фотоэлектронном умножителе при прохождении света через фотонегатив, выполняется 8-разрядным кодом (256 уровней). На практике установлено, что для цитологических исследований достаточна фотометрическая разрешающая способность 6—7 бит. В качестве ЭВМ в этой работе использовалась РДР 11/40. Во время работы прибора изображение исследуемой клетки визуализируется на видеоконтрольном устройстве, которое синхронизировано с режимом развертки трубки бегущего луча. Результаты обработки выводятся на дисплей или графопостроитель. В отличие от большинства существующих анализаторов в приборе BIOPEPR наряду с режимом измерения оптической плотности в каждой точке сканирования введен режим «sweep mode», который предназначен для исследования геометрических параметров клеток. В этом режиме адреса точек растра записываются при условии, если уровень света, прошедшего через пленку, превышает заданный порог. Значение этого порога выбирается исходя из значений фона, окружающей исследуемую точку. Такой режим существенно сокращает время обработки по сравнению с режимом фиксированного уровня.

В системе CYBEST model 2 [231, 281, 282] предусмотрены два режима сканирования препарата. При первом луч трубки бегущего луча диаметром 4 мкм освещает часть площади препарата (полная площадь равна  $20 \times 40$  мм). В этом режиме производится поиск атипичных клеток путем выделения их по оптической плотности над фоном. Затем включается более точный режим сканирования. Причем диаметр луча уменьшается до 1 мкм. Растр в этом режиме имеет  $64 \times 64$  элемента. Среднее время исследования одного кадра в двух режимах не превышает 6 мин. При первом режиме вычисляются три параметра клеток: размер ядра, оптическая плотность ядра, ядерно-цитоплазматическое соотношение. При втором режиме добавляется параметр формы ядра. По результатам измерения этих параметров вычисляется степень атипичности каждой клетки и выполняется общий анализ препарата на основании непараметрического, дискриминантного анализа или метода Колмогорова—Смирнова. В рассматриваемом приборе применено устройство автофокусировки. Это вызвано тем, что непараллельность сторон предметного стекла, а также допуски механических частей стола микроскопа приводят к существенной дефокусировке изображения клеток. Применение автоматического фокусирующего устройства путем вертикального перемещения

стола микроскопа со скоростью 40 шагов/с под управлением мини-ЭВМ позволяет исключить влияние указанных источников погрешности. С целью ускорения работы прибора в его состав включена конструкция контейнера, содержащего до 50 препаратов.

В 1978 г. был создан новый вариант анализатора — CYBEST model 3, разработанный на базе новой сканирующей телевизионной системы с корректировкой фона, автофокусировкой и улучшенным устройством подачи препарата. Авторам нововведений удалось сократить время анализа одного препарата до 3 мин.

Анализатор Hematrak фирмы Opton, предназначенный для исследования мазков крови, представляет сканирующую трехканальную систему, в состав которой входит микроскоп с 40-кратным панапохроматическим объективом с масляной иммерсией, сканирующим столиком с автофокусировкой, электронным блоком обработки, телевизионным блоком, пультом оператора и цифропечатью. Изображение исследуемой клетки формируется системой сканирования с трубкой бегущего луча (катодно-лучевая трубка с излучением в видимой области спектра) и разделяется с помощью светофильтров на три канала. Трехцветное изображение позволяет использовать определенные алгоритмы обработки изображения клеток, исключая из анализа эритроциты и превращая в цифровую форму видеосигналы только ядерных клеток. В результате обработки сигналов цветных каналов определяются следующие параметры: размеры, форма ядра, гранулярность, отношение площади ядра и цитоплазмы, оптическая плотность. Алгоритм распознавания позволяет классифицировать лимфо-, моноциты, нейтро-, эозино-, базофилы. Результаты анализа выводятся в виде стандартных карточек гематологических исследований. Окрашенный мазок при работе устанавливается на сканирующий столик микроскопа и цитолог визуально исследует его. Если окраска выполнена не контрастно, препарат исследуется вручную обычными методами. При машинной обработке предусматривается режим без остановки на подозрительных клетках с указанием их общего числа и режим с остановкой на них. Тромбоциты, загрязненные клетки или элементы красителя при классификации исключаются. В анализаторе используется автофокусировка по высокочастотной составляющей видеосигнала. Пьезоэлектрический кристалл управляет положением объектива с целью получения максимума высокочастотной составляющей видеосигнала. Нанесение мазка крови автоматизировано при помощи устройства Нетаргер, обеспечивающего подготовку двух мазков одновременно. Производительность анализатора Hematrak составляет 40—50 препаратов за 1 ч при исследовании 100 клеток в одном мазке. В отличие от сканирующего микротомера в лазерном сканирующем микроскопе по неподвижному объекту перемещается малое светящееся пятно, представляющее собой сфокусированный лазерный луч. В каждый момент времени происходит облучение какой-то одной локальной точки клетки. При

этом никакое изображение клетки, наблюдаемое в обычном микроскопе на задней фокальной плоскости объектива, не формируется. Если же полученные результаты измерения последовательно освещенных точек клетки записать в память, а затем воспроизвести на экране дисплея за время стандартной развертки, то получится ее портрет.

В чем же отличие изображений, наблюдаемых оператором в стандартном микроскопе и лазерном сканирующем. В обычном микроскопе освещаются одновременно все точки клетки с определенным рассеянием и дифракцией. На плоскости изображения наблюдается фактически суммарная интерференционная картина. При последовательном освещении точек клетки вклад дифракционной и рассеянной частей излучения соседних точек исключается. Этим уменьшается фоновая засветка, следовательно, повышается контраст электронного сфокусированного портрета клетки. Следует также отметить, что лазерное излучение монохроматично, направленно и когерентно, что облегчает фокусировку его в минимальное пятно, близкое к пределу оптического разрешения с высокими значениями энергетической плотности. Итак, достоинство лазерного сканирующего микроскопа заключается в следующем: во-первых, отсутствии больших перемещающихся масс сканера, позволяющем получить сравнительно высокие скорости сканирования, во-вторых, обеспечении возможности повышения контрастности изображения исследуемых микрообъектов, в-третьих, облегчении возможности достижения предельных значений оптического разрешения за счет электронного формирования изображения, следовательно, дополнительной регулировки увеличения без переключения объектива.

Фирмой Оптон (ФРГ) разработана одна из первых промышленных моделей лазерного оптического микроскопа. Луч лазера, в качестве которого используются He—Ne (633 нм), Ar (458—514 нм), He—Cd (442, 325 нм), управляется двумя зеркалами, колеблющимися во взаимно перпендикулярных направлениях. Лазерный луч сканируется по кадру  $512 \times 512$  или  $1024 \times 1024$  элемента. Время кадра можно регулировать в диапазоне 2—64 с. Амплитуда выходного сигнала фотоэлектронного умножителя кодируется 8-разрядным амплитудоцифровым преобразователем.

На лазерном сканирующем микроскопе можно получить самое высокое разрешение. С помощью такого устройства авторы при использовании He—Ne лазера (633 нм) и объектива с числовой апертурой 1,45 получили хороший, контрастный снимок диатомы с разрешением 4000 линий/мм.

Лазерный сканирующий микроскоп представляет наибольший интерес для исследования слабоконтрастных микрообъектов, требующих граничного разрешения оптического микроскопа. Поскольку клетка при этом получает меньшую дозу облучения, так как находится под воздействием лазерного излучения короткое время, можно сделать вывод, что лазерный сканирующий микроскоп особенно важен при изучении живых клеток.

## АНАЛИЗАТОРЫ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Фотография отечественного цитологического анализатора «Интеграл-2МТ», рекомендованного Министерством здравоохранения СССР в 1985 г. к серийному производству и внедрению в медицинскую практику, представлена на рис. 11. В состав прибора входят: микроскоп типа Люмам Р-3, канал промышленно-телевизионной установки ПТУ-50 с камерой КТП-73, блок обработки и микро-ЭВМ «Электроника-60» [23].

Прибор предназначен для дифференциальной цитологической диагностики опухолевых новообразований и обеспечения автоматизации исследований морфологических параметров клеток, нанесенных на предметное стекло или заснятых на пленку в виде фотопозитива (фотонегатива). Поиск микрообъекта и фокусировка микроскопа выполняются с помощью перемещения столика оператором, который находится непосредственно перед пультом с дисплеем, либо с помощью регулировочных винтов диапроектора. На телевизионном экране дисплея визуализируются исследуемый



Рис. 11. Цитологический анализатор «Интеграл-2МТ»

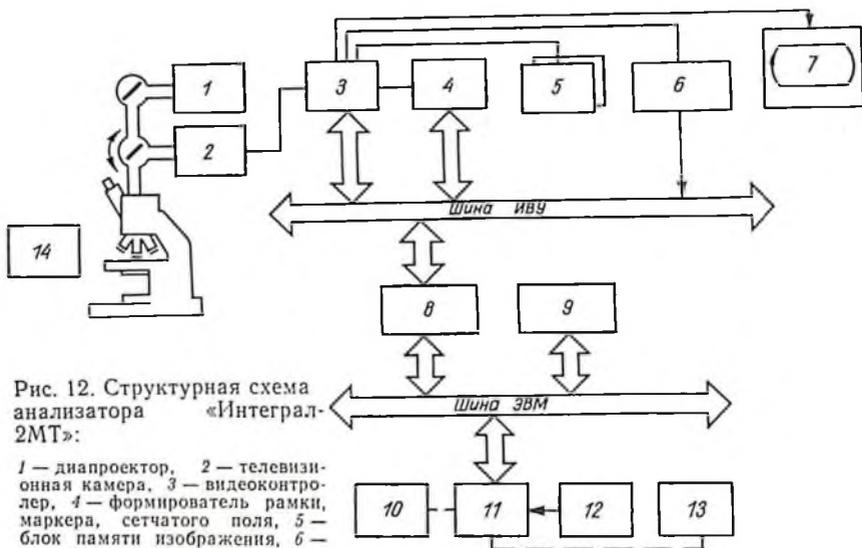


Рис. 12. Структурная схема анализатора «Интеграл-2МТ»:

1 — диапроектор, 2 — телевизионная камера, 3 — видеоконтролер, 4 — формирователь рамки, маркера, сетчатого поля, 5 — блок памяти изображения, 6 — устройство ввода, 7 — ВКУ, 8 — контролер интерфейса внешних устройств, 9 — ПЗУ, 10 — алфавитно-цифровое печатающее устройство, 11 — центральный процессор, 12 — ленточный перфоратор, 13 — фотосчитыватель, 14 — тестовый образец

объект, результаты статистической обработки и диалоговая информация. Работа и управление анализатора осуществляются через контролер интерфейса внешних устройств от микро-ЭВМ «Электроника-60М» по заданной программе.

Конструктивно прибор разделен на две стойки, на одной из которых установлен микроскоп. В стойке размещены блоки питания микроскопа. С целью расширения функционального назначения анализатора и применения для анализа изображений микрообъектов со слайдов, кроме телевизионной камеры, на микроскопе установлен диапроектор. Такое конструктивное решение позволяет использовать анализатор «Интеграл-2МТ» в области электронной микроскопии, гистологии, бактериологии и т. д. Для удобства работы оператора и уменьшения влияния вибраций, передаваемых от вентиляторов микро-ЭВМ и ВКУ, стойка микроскопа сконструирована передвижной. Другая стойка является пультом управления, на столе которой размещены устройство ввода с узлом наложения и ВКУ. В тумбе стойки установлены: микро-ЭВМ «Электроника-60», блоки питания и управления ПТУ-50, блок обработки и управления, выполненный в виде легкоъемной кассеты.

Структурная схема анализатора «Интеграл-2МТ» приведена на рис. 12. Видеосигнал с телевизионной камеры поступает на блок управления ПТУ-50, блок обработки и управления для преобразования в цифровую форму на 64 уровнях квантования. На экране ВКУ визуализируются изображение исследуемого микрообъекта и результаты цифровой обработки. Аппаратно формируется следующая информация: неподвижная рамка  $256 \times 256$  элементов,

перекрестие маркера  $16 \times 16$  элементов, подвижная стробирующая рамка, размеры и местоположение которой изменяются узлом наложения (трекболлом), цифровое изображение на одном уровне квантования и страница памяти для рабочей зоны. Программа работы процессора, символьная информация содержится в ПЗУ, динамическое ОЗУ используется для формирования страниц памяти.

Программно управляемые кассеты блока обработки и управления подключены к шине ЭВМ через контролер интерфейса внешних устройств КИВУ, выполненного в конструктиве модулей микро-ЭВМ «Электроника-60».

Система программного обеспечения рассчитана на интерактивный режим работы анализатора по измерению морфологических параметров клеток. Она включает программу МОНИТОР, группу подпрограмм графического отображения, ввода-вывода, расчета параметров и др.

В начале работы оператор после включения питания микро-ЭВМ и начальной установки вводит дату измерения, коэффициент пересчета, номер препарата. В начальном диалоге оператор также выбирает режим работы и измеряемые параметры. Имеются два режима работы: маркер и строб-рамка (прямоугольная и круглая). В режиме стробирующей рамки осуществляется аппаратное измерение площади клеток. Во время работы оператор ограничивает зону измерения и устанавливает уровень квантования. Измерение площади выполняется по усреднению 64 полукадров. Измеренные значения запоминаются в оперативной памяти. В дальнейшем они умножаются автоматически на коэффициент пересчета, что обеспечивает измерение параметров в абсолютных значениях.

В режиме маркера оператор обводит по контуру исследуемый объект, визуально контролируя точность обводки по следу маркера на экране дисплея. Адреса точек контура записываются в оперативной памяти. После замыкания контура вычисляются значения площади и периметра. Программа рассчитывает дополнительные параметры: отношение площади ядра к площади клетки, отношение периметра ядра к периметру клетки, коэффициент формы клетки, коэффициент формы ядра, а также статистические характеристики распределения микрообъектов по различным параметрам: математическое ожидание и среднеквадратичное отклонение.

По команде оператора могут быть распечатаны все измеренные параметры и статистические характеристики в виде таблиц и выведены на экран дисплея. Там же может быть построена гистограмма любого параметра, масштабы которой выбираются оператором или задаются микро-ЭВМ. В анализаторе предусмотрены фотодокументирование с экрана дисплея, а также вывод на перфоленту полученных результатов обработки. Возможность ввода информации с перфоленты, обеспеченная в анализаторе, позволяет при цитологических исследованиях провести сравнение изменений гистограммы и контроля в ходе лечения больных.

Модульный принцип построения прибора, интерактивный режим работы позволяют в минимальные сроки обучить операторов, не имеющих опыта и знаний в области программирования и средств вычислительной техники.

Среди иностранных приборов подобного типа большое распространение нашли полуавтоматические анализаторы: Artek 800, Magiscan 1, 2; TAS (Leitz), IBAS (Opton). Во всех приборах используются микроскопы, состыкованные с телевизионными передатчиками (камерами). Перемещение объекта и фокусировка (в ряде случаев автофокусировка) осуществляются дистанционно с помощью сканирующего предметного столика. Оператор (цитолог) находится перед пультом управления чаще всего с двумя телевизионными экранами, один из которых используется для визуализации исследуемого объекта, другой — для отображения результатов статистической обработки и информации, относящейся к диалоговому режиму. Почти во всех системах обеспечивается несколько режимов ввода информации в компьютер: световое перо (планшетная система IBAS), стробирующая рамка в виде круга или прямоугольника. Разрешение светового пера — один элемент разложения телевизионного кадра ( $256 \times 256$  или  $512 \times 512$ ) — рабочее поле при двух уровнях квантования. Размер светового пера составляет  $10 \times 100$  мм. В приборах TAS и Magiscan 1 использованы телеменю, что обеспечивает оперативное управление обработкой изображения объекта. Кстати, все шире внедряются в качестве дисплеев цитоанализаторов цветные видеоконтрольные устройства, что можно объяснить повышением визуального разрешения изображения клетки, а также возможностью вывода на один экран информации различных каналов обработки. Размер этих экранов составляет 300—510 мм (по диагонали).

В последнее время большое внимание уделяется разработкам программного обеспечения. Например, в области оптического изображения фирма Joyce Loebel разработала специальные языки SPEL (Simple picture evaluation language) и MAGIC (Image Basic language), позволившие существенно упростить программы обработки. Следует также отметить, что для хранения данных и программ используются флоппи-дисконные системы Magiscan (315 Кб) или магнитные кассеты (TAS). В качестве фотоприемника телевизионных камер используются видиконы, плюмбиконы, Chalnicon. Особое внимание уделяется линейности сканирования во всей рамке. Разрешение системы Magiscan составляет 1%, Artek — 0,5%. Использование видиконов обеспечивает большую чувствительность, а плюмбиконов и чалниконов — большую линейность. Рассматриваемые приборы предназначены как для измерения геометрических параметров микрообъектов — площади, периметра, ориентации, коэффициента формы, так и для определения денситометрических параметров (интегральной оптической плотности, гистограмм уровней квантования) или текстурных характеристик. Погрешность измерения геометрических параметров (площади и периметра) составляет  $\pm 3\%$ . Некоторый раз-

брос среди характеристик указанных приборов наблюдается в выборе рабочего поля. В большинстве приборов величина его составляет  $512 \times 512$  элементов разложения при выборе числа уровней квантования от 64 до 512. В конструктивном решении наблюдаются два пути. Либо это единые по конструкции приборы (Magiscan, Artek), либо комплекс различных приборов, объединенных рабочим столом (TAS, IBAS). Однако следует отметить, что во всех приборах микроскоп с телевизионной камерой выполнен в виде самостоятельного блока.

Во многих анализаторах введены системы светового пера и телемню, позволяющие с помощью информации, выведенной на экране дисплея, решать ряд практических задач, среди которых можно отметить выбор объекта или различных его компонентов в случае малого контраста и наложения объектов, ограничение измеряемого поля и исключение артефактов, выбор параметров и режима обработки, ввода измеряемого поля. Осуществляется это путем «прикосновения» светового пера к определенным зонам экрана вне рабочего поля. Применение в анализируемых приборах графопостроителей, матричных терминалов позволяет документировать результаты обработки, что имеет большое практическое значение для медико-биологических исследований.

Первенцем анализаторов телевизионного типа можно считать разработанный английской фирмой Itasco Ltd прибор Quantimet 720. Особенностью анализатора является нетрадиционная развертка, составляющая 10,5 кадров/с при 720 строках в кадре. Медленная развертка по сравнению со стандартной (50 кадров/с), используемой почти во всех известных анализаторах подобного типа, позволяет существенно повысить отношение сигнал/шум, что имеет исключительное значение для телевизионных приемников. Применение в этом приборе ряда автодетекторов обеспечило выполнение предварительной обработки видеосигнала, в том числе фильтрации, за счет учета соседних участков изображения по отношению к исследуемому участку. Выше было замечено, что для телевизионных анализаторов большое значение имеет параметр, характеризующий неравномерность фона, зависящий от неоднородности освещенности аберраций формирующей оптики и характеристик самого видикона. С помощью разработанного корректора в Quantimet 720 фоновое изображение регистрируется, записывается в памяти и используется для исключения влияния неравномерности фона при анализе изображения.

В качестве ЭВМ используется РДР 11/05 с 28 Кб памяти и флоппи-дисками. Прибор измеряет площадь, периметр, горизонтальные и вертикальные проекции, количество и объем микрообъектов, а также оптическую плотность в диапазоне 0—3,0. В анализаторе обеспечивается подключение ряда входных устройств, в том числе: эпидиаскопа, электронного микроскопа, 35-миллиметрового слайдового проектора, проектора чашек Петри. Весьма интересен опыт создания на базе этого прибора промышленного образца Quantimet-360 для контроля микрообъектов в условиях промышлен-

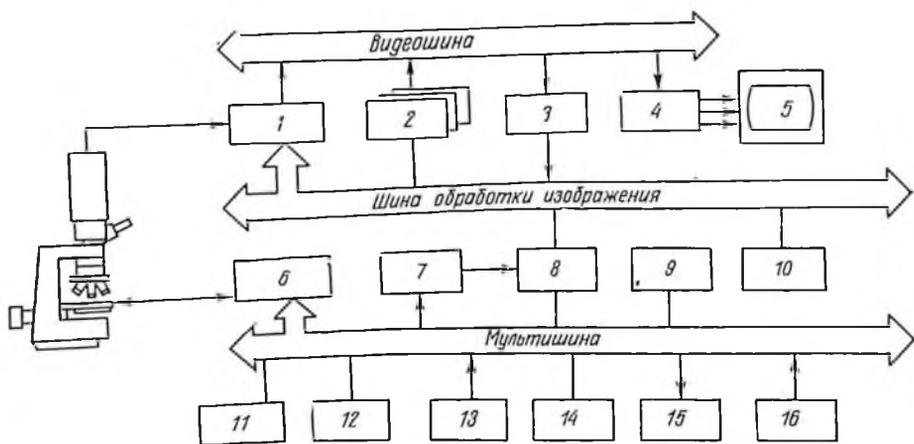


Рис. 13. Структурная схема анализатора изображения:

1 — цифровой преобразователь данных (формат:  $256 \times 256 \times 8$ ,  $1024 \times 1024 \times 8$ ), 2 — блок памяти, 3 — устройство свертки, 4 — преобразователь в цвет, 5 — ЦВКУ, 6 — блок управления, 7 — ОЗУ, 8 — микропроцессор, 9 — векторный процессор, 10 — главный процессор, 11 — управляемый процессор, 12 — ПЗУ 512 К, 13 — ОЗУ 256 К, 14 — диски от 10 М до 1Г, 15 — цветное печатающее устройство, 16 — пульт оператора

ленного производства. Управление им осуществляется семью кнопками. Прибор устойчив к вибрации и позволяет производить непрерывные измерения со скоростью 10 образцов в 1 с.

Фирма Nemelec (Франция) разработала анализатор Histo-processor, представляющий собой модульную систему с несколькими процессорами развитой мощности (рис. 13). В качестве системного управляемого процессора использовали Intel 8086. Процессором обработки изображения служили АМД 2903. Арифметический процессор выполнялся на Intel 8087. Управляющий процессор контролируется с алфавитно-цифрового пульта с трекболлом, на который возложены задачи выбора параметров, управления движением курсора, сдвига изображений, изменения масштаба, выбора цвета в режимах псевдо- и реального цветового отображения. Через управляющий процессор выполняется диалог. Оцифрованное изображение вводится в десять плат памяти  $512 \times 512 \times 8$  бит. Дополнительно применяются четыре платы маркера  $612 \times 612 \times 4$ . Все платы памяти адресованы на две независимые шины: видео и обработки изображения.

Содержание восьми плат памяти отображается на цветной монитор через преобразователь цвета. Оператор имеет возможность выбрать сочетание цветов из 16 млн возможных комбинаций с помощью трех просмотрных таблиц (look-up tables), каждая из которых контролирует красный, зеленый или голубой цвет. Фильтрация цифровой информации осуществляется устройством свертки  $3 \times 3$ , обеспечивающим градиентные преобразования, подчеркивающим границы исследуемых объектов или преобразование Лапласа.

Результаты обработки представляются в виде гистограмм в форме горизонтальных или вертикальных колонок. Возможно изо-

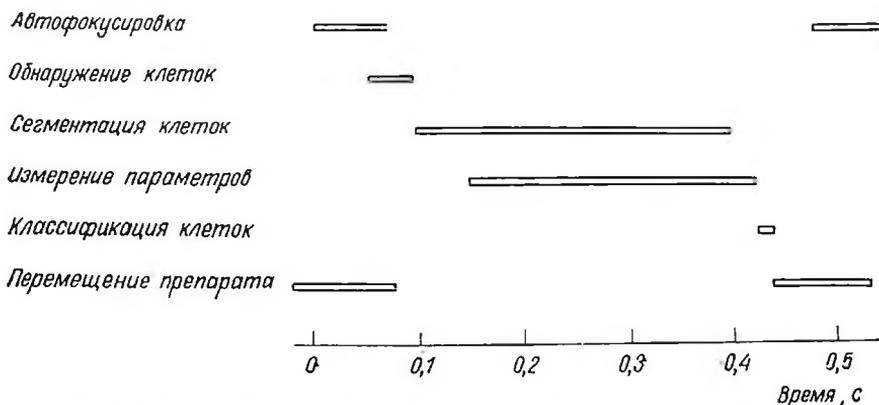


Рис. 14. Временная диаграмма алгоритма обработки цитологического анализатора на базе «Magiscan»

метрическое представление информации, выводимой на экран дисплея. В качестве периферийных и вспомогательных устройств предусмотрены гибкие диски с объемом памяти 1 Мб, диски «Винчестер» общей емкостью до 1 Гб. Для системы анализа и визуализации разработано матобеспечение, включающее измерение морфологических параметров, сегментацию, структурную обработку и классификацию.

В анализаторе изображения Magiscan (фирма Youse Loebel — Англия), как и в других подобных приборах, телевизионная камера используется в стандартном режиме. Мини-ЭВМ контролирует работу процессора изображения и управляет обменом с пользователем. Язык высокого уровня (ФОРТРАН) и операционная система позволяют быстро перестраивать прибор для решения новых задач. Распределение функций между процессорами оптимизирует программу обработки. При этом на процессор изображения возлагаются задачи сегментации и измерения параметров микрообъектов. Мини-ЭВМ, в качестве которой в Magiscan использована модель Data General Nova 64 Kb, поручены вопросы выделения на порогах квантов, классификации клеток и образца. Процессор изображения ведет обработку на высокой скорости.

Временная диаграмма алгоритма обработки анализатора Magiscan [248], примененного в качестве автоматической системы отбора клеток рака шейки матки, приведена на рис. 14. Ядра клеток, находящихся в поле обзора ( $256 \times 256$  мкм), обнаруживаются в течение 55 мкс. При этом время, требуемое для просмотра одного кадра, составляет 20 мкс. Представленный алгоритм позволяет исследовать до 500 клеток/с, что свидетельствует о целесообразности использования рассматриваемого анализатора для ранней диагностики опухолевых заболеваний.

Примером современной мощной микрокомпьютерной системы по обработке изображений служит анализатор IBAS (Interactive image analysis system), созданный фирмой Opton. Система состоит из двух частей: IBAS-1, работающей в полуавтоматическом

Т а б л и ц а 13. Основные функции программного обеспечения системы IBAS

| <i>Ввод</i>   | <i>Вывод</i>  |
|---|---|
| ТВ камера<br>Электронный микроскоп<br>Медленная развертка   | Черно-белое ВКУ<br>ЦВКУ с псевдоцветом  |
| <i>Преобразование изображения</i>   | <i>Исследуемые данные</i>   |
| Коррекция фона<br>Фильтрация (типа фильтр-мсаандр и фильтр-среднее)<br>Улучшение контраста по преобразованию гистограмм и использованию различных фильтров<br>Цифровая фильтрация:<br>ВЧ-фильтр, НЧ-фильтр, полосовой фильтр, фильтры Лапласа, Гаусса, псевдопластический | Линейные параметры: длина, угол<br>Структурные: площадь, периметр, число, максимальный диаметр, диаметр проекции, коэффициент формы, разность площадей, координаты центра, диаметр равновеликого шара, объем эллипсоида, оптическая плотность по всей площади или в выделенной части        |
| <i>Обработка и управление</i>   | <i>Статистические параметры</i>   |
| Стирание<br>Очертание<br>Наложение<br>Дополнение и исключение<br>Управление маркерным полем<br>Пороговое сегментирование<br>Сегментирование при помощи псевдоцветного поля и т. д.  | Математическое ожидание, асимметрия, дисперсия, анализ корреляции, Т-, Ф-тесты с нормальным гауссовым распределением, У-тест (Мани-Уитни), тест по Колмогорову — Смирнову<br>Анализ распределения, построение гистограмм с линейной и логарифмической шкалами<br>Двухпараметрический анализ |

режиме по накоплению и измерению данных, и IBAS-2, осуществляющей автоматический анализ изображения. Первый из приборов имеет диалоговую систему с оператором. Все команды выводятся на поле-меню телеэкрана, что позволяет оператору наблюдать за расчетом и ходом работы при каждом выполнении команды. В состав IBAS-1 входит планшет, обеспечивающий также ручной ввод геометрических размеров микрообъектов. При работе в сочетании с прибором IBAS-2 планшет используется как редактор интерактивного изображения, а также для контроля различных операций. Пульт выполняет функции алфавитно-цифрового ввода. С помощью специальных интерфейсов возможно подключение систем медленной развертки, таких, как оптико-механическое сканирующее устройство, электронный сканирующий микроскоп. IBAS-1 выполняет управление автофокусировкой и режимом сканирования. Подключение флоппи-дисков, ВКУ, графопостроителя осуществляется через стандартные интерфейсы.

Прибор IBAS-2 является процессором изображений, соединенным с телевизионным каналом через АЦП и ЦАП. Максимальный объем памяти может быть доведен до 16 Мб, что позволяет записать до 64 изображений (512×512 элементов на 256 уровнях квантования). Возможна запись цветных изображений путем их спектрального разделения с последующей записью на отдельные страницы памяти. Программное обеспечение IBAS-2 предоставляет

обширный анализ изображения (табл. 13). Необходимо отметить широкие возможности, предусмотренные в рассматриваемом анализаторе, по линейному и нелинейному увеличению контрастности, различной фильтрации изображения, подчеркиванию текстуры, уменьшению влияния шума, коррекции фона. Большой выбор способов сегментации, включающий выделение по одному, двум порогам, адаптивное выделение и многие другие способы сегментации, способствует оптимальному анализу микрообъектов.

#### АНАЛИЗАТОРЫ ИЗОБРАЖЕНИЯ ПЛАНШЕТНОГО ТИПА

Для обработки изображения микрообъектов в ряде случаев используют анализаторы планшетного типа Leitz-ASM (фирма Ernst Leitz, Канада), Morphomat-10 (Opton, ФРГ), Videoplan (Reichert-jung, Австрия), VID II (Analytical measuring systems, Англия). Основой таких приборов служит плоский экран в виде планшета, на котором устанавливаются фотографии или проецируются изображения микрообъектов. Планшет можно освещать снизу, что позволяет исследовать фотонегативы микрообъектов. Ввод информации выполняется ручным способом путем обводки контура изображения микрообъекта курсором или специальным электронным пером. На обратной стороне планшета нанесена сетка электродов. При перемещении курсора по поверхности фотографии, лежащей на внешней стороне планшета, наводится электрический импульс. В зависимости от типа планшета это происходит за счет индуктивной или емкостной связи. В некоторых приборах подобного назначения на начальных стадиях их создания, использовались электромеханические датчики [32].

Разрешение планшетных систем, зависящее от плотности расположения электродов и конструкций курсора, составляет 0,1—0,5 мм (Videoplan, Leitz-ASM). Общее поле экрана имеет площадь до нескольких млн. точек съема. Часть поля планшета отводится под «меню», т. е. перечень команд и цифровое поле, что обеспечивает оператору эффективную связь с микро-ЭВМ, исключает необходимость знания языков программирования и уменьшает количество ошибок, так как к оператору по ходу проведения исследований поступают инструкции о последовательности работы.

Полученные сигналы о координатах положения курсора преобразуются в цифровую форму и затем используются для расчета различных морфологических параметров: количества объектов, линейных размеров, площади, проекций на осях X и Y, периметра микрообъектов. С помощью специальных программ могут быть определены стереологические и статистические параметры микрообъектов. Объем памяти в современных приборах (Videoplan) составляет 64 Кб, 16 Кб — видеопамять, 2 минифлоппи-диска.

К анализаторам микрообъектов, в которых распознавание объекта с учетом его формы, цвета, размера, пространственной ориентации выполняется человеком, а дифференциальный анализ вы-

бранного изображения возлагается на прибор, следует отнести модульную систему МОР. В этом приборе указанные параметры могут измеряться одновременно, что существенно сокращает время исследования объекта. В процессе измерения оператор вводит границы определяемого изображения в мини-ЭВМ. Поскольку фотография либо проекционное изображение слайда совмещается с плоскостью планшета, то координатная сетка, выполненная в виде намагниченных стальных проволочек, установленных под стеклом планшета, играет роль пространственной привязки. Импульсы тока с краев планшета вызывают магнитострикционную волну в проволоках, проходящую со скоростью 5 м/с, и, естественно,— импульс в приемной катушке, установленной в электронном карандаше. Таким образом, место расположения карандаша относительно краев планшета соответствует времени возникновения импульсов в катушке.

Данные измерения, полученные при обводке выделенного микрообъекта, хранятся в блоке памяти и с помощью компьютера могут использоваться для статистической обработки данных. Погрешность измерения координат точки  $0,1 \text{ мм} \pm \frac{1}{2}$  знака, для площади и длины погрешность составляет меньше 1 %.

Рассматриваемые приборы предназначены в основном для проведения научно-исследовательских работ, например изучения морфологических параметров цитологических препаратов. Клиническое применение таких приборов ограничено рядом недостатков, среди которых следует отметить низкую производительность. Скорость ввода информации (Videoplan) составляет до 100 мм/с, следовательно, обвод ста клеток потребует в среднем от 5 до 10 мин. Причем при обводе сложных границ клеток субъективная ошибка оператора возрастает до 5—10 % по сравнению с указанной в рекламе погрешностью прибора (Videoplan) — менее 1 %. Следует также отметить трудность измерения абсолютных размеров микрообъектов по их фотографиям. Недостатком приборов планшетного типа является относительный характер проведения денситометрических измерений.

Некоторые из указанных недостатков устранены в интерактивной системе анализа VID II (фирма AMS), служащей примером смешанного варианта построения анализатора с включением планшетного и телевизионного каналов. Изображение микрообъекта передается телевизионной камерой на видеоконтрольное устройство. С помощью курсора планшета оператор задает границы путем обвода микрообъекта по периметру или путем установки маркера в режиме нескольких точек. Положение маркера визуализируется на экране ВКУ и совмещается с изображением микрообъекта. Такое совмещение позволяет определить геометрические параметры, исключая фотографии микрообъектов. В режиме «двух» точек, когда линейный размер клетки определяется заданием двух, противоположащих на краях микрообъекта точек, или «четырех», расположенных по периметру, тогда определяется площадь. Для обработки накопленных в памяти данных используют-

ся стандартные программы обработки. В системе VID II применены микро-ЭВМ с памятью 64 Кб и 2 флоппи-диска. Стоимость прибора составляет 8000 фунт. ст.

Применение телевизионного канала не только ускоряет процесс измерения, но и обеспечивает возможность непосредственного исследования биологических объектов в динамике. Например, подвижность сперматозондов может определяться за счет измерения их линейных перемещений между исследуемыми кадрами.

### КАЛИБРОВКА АНАЛИЗАТОРОВ

Из практики применения анализаторов известно, что их калибровка при работе с микроскопическими объектами производится при помощи объект-микрометра проходящего света типа ОМП, представляющего собой плоскопараллельную стеклянную пластинку с нанесенными на ней параллельными штрихами на расстоянии друг от друга 10 мкм в пределах измерения 1000 мкм.

Через микроскоп увеличенное изображение штрихов объект-микрометра выводится на телеэкран. Затем способом, присущим данному методу, выделяется на телеэкране выбранное оператором количество штрихов, по которому подсчитываются линейные размеры геометрической фигуры, очерченной световым пером. По этим линейным размерам расчетным путем определяются площадь и периметр указанной фигуры, которые служат контрольными для калибровки анализатора.

Ошибка линейных измерений, производимых на телеэкране, значительна и складывается из неточности совмещения контуров фигуры с изображением штрихов объект-микрометра, обусловленной паралаксом, зернистостью люминофора и искажениями изображения, вносимыми телевизионной установкой при передаче. Вследствие этого относительная погрешность измерений с помощью анализаторов, откалиброванных при помощи объект-микрометра, достигает  $\pm 10\%$ .

Известен тестовый образец, конструктивно выполненный в виде диапозитива, представляющего собой фотографию алюминиевой пластины, в которой просверлено несколько групп круглых отверстий, различающихся по величине [193]. При этом оптическая плотность всех кругов на диапозитиве равна 1. Описанный образец позволяет применить для определения геометрических параметров контрольных фигур разнообразные средства измерения, повышая точность калибровки, что, в свою очередь, снижает погрешность рабочих измерений до  $\pm 6\%$ .

Такой тестовый образец с успехом может применяться для калибровки канала анализатора с диапроектором или анализатора планшетного типа, предназначенного для анализа фотографического изображения клетки (фотодиапозитив или фотонегатив). Недостатком его, однако, является то, что он не позволяет при калибровке учесть влияние погрешностей, вносимых в обработку

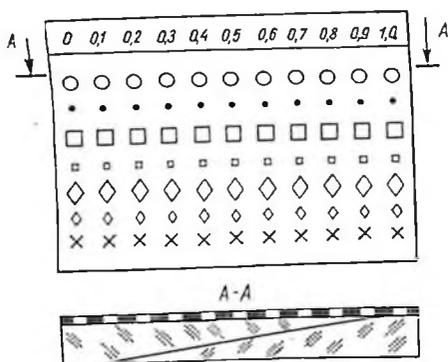


Рис. 15. Тестовый образец

контрольных фигур, соизмеримых с размерами клеток и их элементов, невозможно.

Для повышения точности калибровки анализаторов разработаны калибровочные тестовые образцы для каналов с диапроектором и микроскопом. Тестовые образцы для канала диакопирования представляют собой фотопозитивы (фотонегативы), на которых зафиксированы идентичные по форме, но различающиеся по оптической плотности наборы правильных геометрических фигур, размеры которых варьируют в диапазоне, соизмеримом с размерами изображения клеток и их элементов на фотоснимках.

Для калибровки анализатора и получения морфометрических характеристик в абсолютных единицах ( $\text{мкм}$ ,  $\text{мкм}^2$ ) разработан и включен в состав анализатора «Интеграл-2МТ» [87] тестовый образец, выполненный на стеклянной подложке, размеры которого соответствуют размерам предметных стекол (рис. 15). Подложка содержит различающиеся по оптической плотности участки, на каждый из которых путем вакуумного напыления нанесены в виде окон геометрические фигуры, размер которых соизмерим с размерами клеток и их элементов (5—100  $\text{мкм}$ ).

Из опыта практической работы с телевизионным анализатором изображения типа «Интеграл-2МТ» были выбраны наборы тестовых (контрольных) фигур в виде кругов, прямоугольников, ромбов и скрещенных X-образных прямоугольников, достаточно точно отражающих особенности конфигурации нормальных и опухолевых клеток и их элементов. Аттестованные образцы входят в состав телевизионных анализаторов «Интеграл-2МТ» как для применения при калибровке, так и для тестирования в процессе цитологических исследований. Калибровка анализатора по площади и периметру исследуемых клеток сводится к нахождению калибровочных коэффициентов по этим же параметрам. Все вычислительные операции производятся микро-ЭВМ, входящей в состав комплекса, заносятся в память и обрабатываются по формулам прикладной статистики. В итоге определяется математическое ожидание указанных коэффициентов, которые учитывают все выявленные ос-

видеосигнала сложностью конфигураций реальных объектов и непостоянством их оптической плотности.

Следует также отметить, что указанный образец нецелесообразно применять для анализаторов с микроскопом. Дело в том, что при работе с последним, как правило, используется увеличение, большее 10, а при этом на калибровку значительно влияет зернистость фотопленки. Кроме того, по той же причине получить на пленке изображения

новые факторы, влияющие на достоверность полученных результатов. Микро-ЭВМ, учитывая эти коэффициенты, выдает истинное значение площади или периметра исследуемых объектов в абсолютных единицах. Относительная погрешность измерения площади и периметра аттестованных тестовых фигур на анализаторе, откалиброванном описанным методом, составляет  $\pm 2\%$ .

Оценка работоспособности телевизионного тракта анализатора осуществляется также с помощью маркирующих сеток и тестового изображения (шахматное поле), получаемых на видеоконтрольном устройстве. С этой целью используется импульсный генератор для создания испытательного изображения. Рассматриваемое тестирование позволяет определить нелинейные и геометрические искажения телевизионного тракта, а также выбрать рабочую часть экрана с наименьшими искажениями.

Для проверки вычислительного канала анализатора «Интеграл-2МТ», состоящего из ЭВМ «Электроника-60», блока обработки видеосигнала и ВКУ, предусмотрен тестовый контроль памяти маркера. Кроме того, в приборе обеспечен вывод символьной информации знакогенератора на дисплей, введен расчет контрольных сумм для проверки программы, предусмотрен опрос регистров внешних устройств. Как отмечалось, проверка оптического канала осуществлялась при калибровке прибора.

Перечисленные мероприятия по контрольно-калибровочному и программному обеспечению телевизионного анализатора «Интеграл-2МТ» повышают надежность функционирования комплекса, облегчают его ремонт и профилактику, а также упрощают эксплуатацию прибора медицинским персоналом.

Применение в цитологической практике представленных выше приборов позволяет выявить тонкие изменения в клетке, что недоступно порой даже опытному цитологу при визуальной оценке. Примером могут служить случаи предопухолевых и ранних опухолевых заболеваний. С появлением подобной техники стала возможной разработка количественных методов диагностики. Значительную роль эти приборы играют в отработке методологии выделения признаков и объективизации их статистического описания, без которого невозможны автоматизация морфологической оценки и классификация. Особенно эффективным этот метод анализа может стать при исследовании текстуры клетки. Телевизионные анализаторы позволяют исследовать корреляционную зависимость оптической плотности в различных точках текстурного поля и состояние хроматина, что исключается при визуальной оценке.

Следует отметить большие перспективы применения этого метода анализа для разработки банка цитодиагностических стандартов при создании методов ранней диагностики на основании объективных критериев нормальных и патологических клеточных препаратов и изучения их связи с историей болезни. В то же время необходимо указать, что попытки создания анализаторов для скрининга (профилактических массовых экспресс-исследований) на базе этого метода пока безуспешны.

## ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Просвечивающий электронный микроскоп был изобретен в 1932 г., однако его практическое использование в цитологии началось только в 50-х годах с появлением специальных приборов (ультрамикротомов) для получения сверхтонких срезов. Разрешающая способность современных электронных микроскопов превышает таковую светового примерно в 1000 раз.

Таким образом, цитологическая наука получила новый инструмент, с помощью которого можно изучать природу микроскопических структур, видимых в световом микроскопе, а также обнаруживать новые субмикроскопические структуры (ранее невидимые) и изучать их как в физиологических условиях, так и при воздействии различных патологических факторов. С помощью просвечивающего электронного микроскопа была изучена тонкая структура клеточных органелл и неклеточного вещества клеток животных и растительных организмов, бактерий и вирусов, молекул носителей наследственной информации — ДНК и РНК — даже локализовать в молекуле ДНК отдельные гены.

50—70-е годы нашего столетия были «золотым веком» электронной микроскопии, которые ознаменовались открытием новых субклеточных структур и описанием их изменений при различных патологических состояниях. Этот период можно определить как расцвет описательной электронной микроскопии, обычно оперировавшей терминами «значительные» или «слабые» изменения тех или иных субклеточных структур, основанными на чисто субъективном представлении исследователя.

Необходимость объективизации электронно-микроскопических исследований вызвала появление так называемой количественной электронной микроскопии, основанной на использовании стереологических методов для измерения субклеточных структур. Пионером в этой области был Weibel, разработавший основы морфометрии в электронной микроскопии, ставшие классическими [17, 302].

Для морфометрического исследования используются универсальные измерительные сетки Вейбеля, Стефанова и их модификации, которые накладываются на негативы или фотографии, снятые с экрана электронного микроскопа. Наиболее часто используется сетка, содержащая  $P_0=144$  тест-точки и имеющая длину

тест-линии  $l_0 = 2$  см. Методические измерения строятся так, что в итоге обычно определяются относительные величины, т. е. объемные доли, площади поверхностей и число измеренных органелл в единице объема цитоплазмы или ядра измеряемой клетки. Для этого измеряются число тест-точек  $P_i$ , приходящихся на профили измеряемых органелл, и число пересечений тест-линий  $t_i$  с контурами этих органелл, а также число самих профилей  $n$  на единицу площади среза.

Далее, с учетом электронно-микроскопического увеличения изображения результаты, полученные при подсчете срезов из нескольких блоков, суммируются для каждого экспериментального животного, а соответствующие цифры подставляются в основные формулы, используемые в морфометрии [1, 17]. Статистическая обработка морфометрических данных проводится по общепринятым методикам с вычислением средних величин и их среднеквадратичных отклонений. С помощью морфометрического метода можно получить большой объем информации, который достигается за счет длительной «ручной» обработки электронно-микроскопических фотографий.

В качестве примера приведем перечень морфометрических параметров, использованных для анализа изменений гепатоцитов в процессе посмертного аутолиза [46].

| Наименование   | Условное обозначение |
|--|----------------------|
| Объемная доля митохондрий (М) в цитоплазме                         | $\rho_M$             |
| Суммарная площадь поверхности М в единице объема цитоплазмы        | $S_{MM}$             |
| Средний объем М  | $V_M$                |
| Число М в единице объема цитоплазмы                                | $N_M$                |
| Средняя площадь поверхности одной М                                | $S_M$                |
| Фактор формы М   | $F_M$                |
| Объемная доля матрикса М в цитоплазме                              | $\rho_{MM}$          |
| Суммарная площадь поверхности внутренних мембран и крист М         |                      |
| в цитоплазме   | $S_{BMM}^{ц}$        |
| в митохондриях   | $S_{BMM}^M$          |
| Объемная доля лизосом (Л) в цитоплазме                             | $\rho_L$             |
| Суммарная площадь поверхности мембран Л в цитоплазме               | $S_L$                |
| Средний объем Л в цитоплазме                                       | $V_L$                |
| Число Л в цитоплазме   | $N_L$                |
| Средняя площадь поверхности одной Л                                | $S_L$                |
| Объемная доля зернистой цитоплазматической сети (ЗЦС) в цитоплазме | $\rho_{шр}$          |
| Суммарная площадь поверхности мембран ЗЦС                          | $S_{шр}$             |
| Средняя арифметическая толщина цистерн ЗЦС                         | $h_{шр}$             |
| Объемная доля пластинчатого комплекса (ПК) в цитоплазме            | $\rho_r$             |
| Суммарная площадь поверхности мембран ПК в цитоплазме              | $S_r$                |

Приведенный перечень можно значительно расширить как за счет добавления морфометрических параметров других эктоплазм-

матических органелл, так и компонентов ядра. Отсюда вытекает необходимость автоматизации этих измерений с помощью вычислительной техники. Существует ряд полуавтоматических систем, основанных на ручном обводе анализируемой структуры оператором и дальнейшем ее автоматическом анализе с помощью ЭВМ.

Одной из наиболее простых является полуавтоматическая система для ввода и обработки контурных характеристик исследуемых объектов, созданная в Институте проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР на базе ИВК-1 (СМ-3) с использованием аппаратуры КАМАК и координатомера «Контур» [4]. Программное обеспечение разработано в рамках операционной системы РАФОС. Запись на магнитный диск координат контура осуществляется программой, написанной на макроассемблере, что позволяет работать в фоновом-операционном режиме. Вычисление по координатам различных параметров, характеризующих контур, осуществляется набором программ.

В настоящее время работают 5 программных комплексов для вычисления следующих морфометрических характеристик: периметра обводимого контура, его площади, коэффициента формы, площади кольца, расстояния между двумя точками на исследуемом поле. Статистическая оценка этих данных включает среднее арифметическое, дисперсию, среднеквадратичное отклонение и стандартную ошибку среднего арифметического значения. Результаты вычислений выдаются на печать в миллиметрах или микронах. Каждый из программных комплексов позволяет записать и просчитать до 100 контуров за 1 ч. Ошибка результатов состоит из ошибки ввода данных (ручной обвод), аппаратурной ошибки и ошибки вычислений. Общая ошибка результатов до 10 %.

Более совершенной универсальной системой планшетного типа для полуавтоматического анализа изображения является Videoplap, выпускаемая фирмой Reichert-Jung (Австрия). Она состоит из планшета, базисного блока компьютера со световым карандашом и памятью на магнитных дисках и видеомонитора. Анализируемое изображение обводится оператором с помощью светового карандаша. Обрабатывается до 20 типов структур, результаты измерения выражаются в форме таблиц или графиков на видеомониторе. Во время измерения одновременно вычисляются суммарное значение, среднее арифметическое и стандартное отклонение, процентное значение и распределение повторяемости.

Анализатор может комбинироваться с периферийными устройствами, в том числе просвечивающим или сканирующим электронным микроскопом, обладающими телевизионной камерой. В этом случае используется устройство для измерений на телеизображении — ОВЕРЛЕЙ, при помощи которого изображение передается прямо на видеомонитор. Этот прибор исключает необходимость фотографирования образца и значительно уменьшает процент ошибки при измерениях.

К функциям прибора, используемым для анализа электронномикроскопического изображения, относятся: измерение длины,

расстояния между двумя точками, площади, периметра, количества структур, вычисление объемной плотности, плотности поверхности, средней линейной величины, среднего линейного расстояния, средней (объемной) кривизны фактора формы и т. п. [296].

Еще в 1968—1971 гг. были предприняты попытки количественного математического анализа электронно-микроскопических объектов на приборе Quantimet 720E. Этот прибор был разработан на базе установки Quantimet, используемой в световой микроскопии. При его использовании для анализа электронно-микроскопического изображения обычный телевизионный микроскоп заменяется электронным. В качестве преобразователя электронно-оптического изображения используется плумбикон. Возможность использования этой системы для анализа электронно-микроскопического изображения ограничена анализирующей системой, применяемой для анализа светооптического изображения и позволяющей производить подсчет небольшого числа параметров дискретных микрочастиц [280].

Фирмой Opton (ФРГ) разработан ряд приборов для количественной электронной микроскопии начиная с анализатора размера частиц TGZ-3 и кончая устройством MICROVIDEOMAT-2 с полностью автоматизированным анализом ряда стереометрических параметров. Прибор TGZ-3 состоит из приспособления для превращения фотографического изображения в цифровую форму, счетчика и перфоратора для дальнейшей машинной обработки полученных данных.

MICROVIDEOMAT-2, используемый с электронным микроскопом EM-10, позволяет автоматически определять такие стереометрические параметры, как процент площади, занимаемой одним или двумя компонентами электронно-микроскопического изображения, длина, число частиц и их классификация путем сканирования изображения телевизионной камерой и электронным проявлением контрастов либо с помощью прямой связи электронного микроскопа с адаптером (передаточный флюоресцентный экран, специальная оптика и линейная телевизионная трубка), либо с помощью оценки увеличенных фотографий на микроскопе (Zoom System TVR) [286]. В первом случае плумбикон вносит при преобразовании определенную ошибку, обусловленную неравномерностью толщины слоя люминофора на площади мишени, а также толщины стеклянной подложки и напыленного слоя металла и пр.

Таким образом, существуют два методических подхода к количественному анализу электронно-микроскопического изображения. Первый из них — полуавтоматический с использованием негативов или электронных микрофотографий, на которых нужный объект очерчивается исследователем и анализируется ЭВМ, второй — полностью автоматический, когда производится количественный анализ непосредственно электронно-микроскопического изображения, минуя фотографический процесс.

Наиболее распространены в настоящее время первый метод. Число приборов, позволяющих автоматически производить коли-

чественный анализ изображения непосредственно в процессе электронно-микроскопического исследования, крайне ограничено, они еще несовершенны и малодоступны в связи с очень высокой стоимостью. Это обусловлено целым рядом технических и методических трудностей, возникающих в процессе реализации автоматизированных систем в электронной микроскопии.

Можно условно выделить по крайней мере три типа задач, которые позволяют с помощью электронно-вычислительной техники решать некоторые проблемы электронной микроскопии. Задачи первого типа — подсчет дискретных элементов электронно-оптического изображения, второго — выделение и расчет площадей, диаметров, периметров (клеток, ядер, различных органелл), а также их соотношений, третьего — разработка методов количественного описания электронно-оптических изображений [65].

Рассмотрим каждую из названных задач. Выделение и подсчет дискретных элементов электронно-оптического изображения в связи со сложностью электронно-микроскопической картины клетки представляет собой информативный признак, который не дает полного представления об ультраструктурной характеристике клетки и может использоваться только для решения определенного класса задач (подсчета изолированных митохондрий, лизосом, ядер и т. п.).

Создание автоматических методов расчета в процессе электронно-микроскопических исследований различных морфометрических показателей — площадей, диаметров, объемов и т. п. — задание, наиболее близкое к нуждам медико-биологических исследований.

Разработка различных методов количественного описания электронно-микроскопического изображения представляет немалый интерес с точки зрения требований, которые предъявляет электронно-вычислительная техника к «сжатию», кодированию информации для дальнейшей машинной обработки (систематизации, идентификации и т. п.). К задачам этого типа следует отнести электронно-микроскопическое определение некоторых физических показателей, например массы сухого вещества и оптической плотности. Кстати, определение массы сухого вещества аморфных объектов уже сейчас можно проводить с помощью интегрирующей фотометрии электронно-микроскопических негативов на приборе фирмы Orton IPM-2 (интегративный фотометр).

Поскольку перечисленные выше задачи достаточно сложны, очевидно, необходимо сосредоточить внимание на разработке полуавтоматизированных систем, где выделение изучаемых структур проводит сам оператор последующей их автоматической обработкой и анализом при помощи ЭВМ. Тандем «человек — ЭВМ» не только пока необходим, но и может оказаться оптимальным с точки зрения максимального использования опыта исследователя, быстродействия и объема памяти ЭВМ.

Таким образом, знакомство с существующими системами автоматической обработки цитологических электронно-микроскопиче-

ских объектов показывает, что наиболее актуальным направлением является разработка специального комплекса автоматизированной аппаратуры для анализа информации, получаемой непосредственно в процессе электронно-микроскопического исследования с целью решения в первую очередь задач второго и третьего типов — по морфометрии изучаемых объектов и их математическому описанию.

Одна из первых попыток в этом направлении была сделана в 1973 г., когда группа исследователей Сумского завода электронных микроскопов и Института проблем криобиологии и криомедицины АН УССР разработала конструкцию электронного микроскопа-анализатора ЭМВ-100 А на базе серийного электронного микроскопа ЭМВ-100 М [88]. Превращение электронно-оптического изображения в электрические сигналы производится с помощью метода сканирования, который не имеет недостатков, свойственных плюмбикону. Сканирование электронно-оптического изображения проводится по строкам и кадрам с помощью электромагнитной отклоняющей системы. В зоне формирования электронно-оптического изображения расположен специальный датчик — сцинтилляционный счетчик с чувствительностью порядка  $10^{-13}$  —  $10^{-14}$  а/см<sup>2</sup>.

Электронно-оптическое изображение сканируется по строкам и кадрам относительно неподвижной диафрагмы сцинтилляционного счетчика. Амплитуда электрического сигнала, полученного на выходе блоков трансформации, зависит от величины электронно-оптической плотности изучаемого объекта по линии сканирования. Впоследствии трансформированный электрический сигнал изучается с помощью анализатора импульсов АИ-128—2. Результаты в виде гистограммы распределения амплитуды печатаются на цифровом устройстве БЗ-15. Технические возможности описанного электронного микроскопа-анализатора дают возможность использовать его для количественного описания электронно-микроскопических объектов и решения задач, связанных с систематизацией объектов.

Авторы считают, что полученное при сканировании изображения изменение величины электронно-оптической плотности определяется ультраморфологическими особенностями исследуемого образца [38]. Эту зависимость можно представить в аналитической форме в виде функции плотности вероятности распределения амплитуды. Для количественной характеристики данной функции рассчитывают первые четыре момента (математическое ожидание, дисперсия, асимметрия, эксцесс).

Достоверность результатов, полученных с помощью описанного методического подхода, определяется тремя основными погрешностями: режима работы электронного микроскопа; методически, обусловленными приготовлением препаратов для электронно-микроскопического исследования; статистическими, определяющимися ограниченностью выборки и дискретностью квантования по времени и уровню. В связи с этим при использовании данного

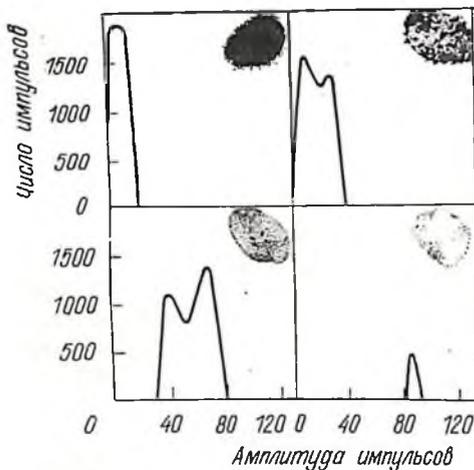


Рис. 16. Четыре типа митохондрий в гетерогенной популяции.

новных типов митохондрий с различной ультраструктурной характеристикой (рис. 16).

Для решения задач второго типа с помощью микроскопа-анализатора был разработан другой режим работы прибора — амплитудно-временной, при котором электронно-оптическое изображение превращается в «цифровую матрицу» с приданием каждому элементу изображения пространственной ординаты [38]. Для реализации режима предложено специальное приспособление на базе анализатора импульсов АИ-128—2. Этот режим электронного микроскопа-анализатора не только дает возможность ввести в ЭВМ информацию об исследуемом объекте для дальнейшего машинного анализа ряда морфометрических показателей, но и позволяет решать более сложные задачи распознавания образа с использованием алгоритмов типа секущих площадей или объективной классификации.

В настоящее время в нашей стране выпускается просвечивающий электронный микроскоп ЭМВ-100 АК (рис. 17) с возможностью количественного машинного анализа изображения. Система анализа и обработки информации состоит из устройства накопления и обработки информации УНО-1024, коррелятора, блока привода перфоратора и ленточного перфоратора ПЛ-150. УНО-1024 предназначено для проведения амплитудного, корреляционного анализа и вывода полученной в электронном микроскопе информации об анализируемом объекте на перфоратор ПЛ-150. Вывод гистограммы осуществляется на осциллографическую трубку УНО-1024, цифropечатающее устройство БЗ-15 М и перфоратор ПЛ-150.

Блок привода перфоратора обеспечивает вывод информации устройства накопления и обработки информации УНО-1024 на ленточный перфоратор, вывод сканограммы изображения на вось-

прибора необходимо строго придерживаться стандартизации режимов работы микроскопа, условий подготовки биологических объектов, а также использовать статистически достоверную выборку для каждого цикла экспериментов.

С использованием электронного микроскопа-анализатора был проведен анализ ультраструктуры изолированных митохондрий, подвергнутых низкотемпературному воздействию [80]. В процессе исследования показана возможность выделения в гетерогенной популяции четырех ос-

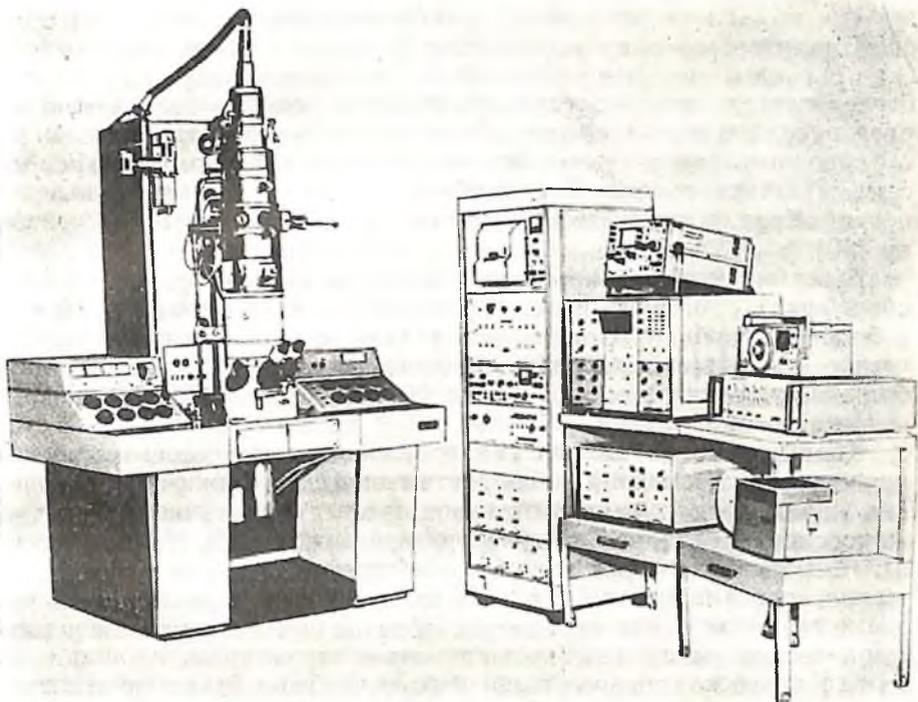


Рис. 17. Электронный микроскоп ЭМВ-100 АК

мидорожечную перфоленту, коммутацию кодов амплитуды импульсов и корреляционной функции при амплитудном и корреляционном режимах анализа изображения в электронном микроскопе. Информация с перфоленты может быть введена в ЭВМ для дальнейшей машинной обработки по ранее разработанным программам.

Хотя сканирующий (растровый) электронный микроскоп был сконструирован всего на три года позже просвечивающего, его практическое использование началось лишь в 1965 г. после выпуска серийного микроскопа Stereoscan (Англия). С 1966 г. производство сканирующих электронных микроскопов было начато в Японии фирмой Jeol, которая выпустила ряд моделей сканирующего микроскопа JSM. В настоящее время сканирующие электронные микроскопы выпускаются во многих странах, в том числе в СССР Сумским заводом электронных микроскопов.

Принцип сканирующей электронной микроскопии основан на сжатии электронного луча до чрезвычайно малых размеров и превращении его в электронный зонд диаметром от нескольких микрон до нескольких нанометров. Благодаря отклонению электронного луча острие зонда последовательно проходит через все участки объекта. При этом в процессе взаимодействия электронов с образцом возникает ряд сигналов (из которых обычно исполь-

зуются вторичные электроны), энергия которых преобразуется сцинтиллятором в энергию световых фотонов, а затем в электрические сигналы, которые усиливаются фотоумножителем. Зонд пробегает поверхность исследуемого объекта подобно телевизионной развертке. Электронный пучок электронно-лучевой трубки демонстрационного блока также образует развертки, которые синхронны с движущимся зондом. Таким образом, каждая точка на поверхности образца соответствует точке на экране катодной трубки [40].

В сканирующем микроскопе сочетается высокая разрешающая способность просвечивающего электронного микроскопа (3—10 нм) с большой глубиной фокуса, что делает возможным стереоскопическое изображение сложных топографических поверхностей с большим увеличением (от 100 до 100 000 раз) и высоким разрешением.

Количественный анализ сканированного электронно-микроскопического изображения в полуавтоматическом режиме практически ничем не отличается от используемых для трансмиссионной микроскопии методов, которые приведены выше. В 1973 г. фирма JEOL разработала анализатор изображений для сканирующего микроскопа (Image analyzer) для измерений в автоматическом режиме геометрических параметров образца: числа, площади и размера частиц, распределения их по этим параметрам, площади того или иного компонента в процентах. Составной частью системы является миникомпьютер. Условия измерений задаются через теле-тайп. Анализатор изображений может состыковываться со всеми микроскопами серий JSM, JXA и сканирующими приставками к просвечивающим микроскопам этой фирмы. Анализатор имеет пять программ. 1. Интегрирование фазы. Полная площадь идентифицированной на изображении фазы измеряется, а затем вычисляется площадь в процентах. Кроме того, вычисляется средняя площадь участков в процентах при комбинировании с программой ступенчатого сканирования.

2. Распределение частиц по размеру. Измеряется максимальная длина индивидуальных частиц. Распределение их по размеру получают в виде гистограммы.

3. Измерение площади частицы. Индивидуально измеряется площадь идентифицированных на изображении частиц.

4. Распределение площадей частиц. Измеряется площадь частиц, затем получают распределение ее в виде гистограммы.

5. Ступенчатое сканирование. Осуществляется измерение отдельных участков образца посредством ступенчатого сканирования.

Новые функции (измерения периметра, формы и другие, более сложные операции) могут также выполняться при развитии математического обеспечения без изменения конструкции прибора [7].

В последние годы за рубежом получили большое распространение так называемые аналитические электронные микроскопы, к которым прилагаются работающие на принципе рассеивания

энергии рентгеновский спектрометр (EDS) и (или) анализатор энергии электронов (ASEA), позволяющие кроме визуального наблюдения проводить элементный анализ избранной микрозоны образца размером несколько нанометров за очень короткое время. В связи с тем что оба этих прибора работают в сканирующем режиме, они являются составными частями сканирующего электронного микроскопа. Некоторые фирмы, например JEOL, Hitachi (Япония) и Philips (Голландия), выпускают электронные микроскопы, работающие как в просвечивающем, так и в сканирующем режиме и позволяющие проводить и элементный анализ образца (микроскопы JEM-1200 EX, H-800, EM-420 и др.).

Рентгеновский спектрометр, работающий на принципе рассеивания энергии, фирмы JEOL (EDS) позволяет проводить качественный, полуколичественный и количественный анализы химических элементов от  $^{11}\text{Na}$  до  $^{92}\text{U}$  в зоне 20 нм. Для биологических образцов используется детектор горизонтального типа.

Анализатор энергии электронов той же фирмы (ASEA) позволяет производить элементный анализ микрозоны образца путем измерения потери энергии пучка электронов, проходящих через образец. В принципе, этот прибор дает возможность определить химические элементы от  $^3\text{Li}$  до  $^{92}\text{U}$ , однако имеет наиболее высокую чувствительность в зоне легких элементов — от  $^3\text{Li}$  до  $^8\text{O}$ . Оба прибора работают в автоматическом режиме с выводом результатов анализа на дисплей или печатающее устройство [199].

## РАДИОАВТОГРАФИЯ

Радиоавтография (ранее автордиография) представляет собой метод обнаружения радиоактивных изотопов, основанный на фотохимическом действии  $\alpha$ - и  $\beta$ -ионизирующего излучения. Для этого объект проводится в соприкосновение с фотографической эмульсией, на которой  $\alpha$ - и  $\beta$ -частицы вызывают почернение в виде треков по ходу пробега частиц, которые после проявления эмульсии обнаруживаются как цепочки зерен восстановленного серебра.

Радиоавтографию в биологии впервые применил Е. С. Лондон в 1904 г. для обнаружения радия в тканях животных. В последующие годы метод использовался для изучения накопления, распределения и выведения из организма малых количеств радиоактивных изотопов в различных органах и тканях. С появлением меченных радионуклидами соединений применение метода радиографии (гистоавтордиографии) позволило изучать степень интенсивности процессов синтеза различных биологически активных соединений, в первую очередь нуклеиновых кислот и белков, что принципиально отличается от большинства описательных морфологических методов.

В 50—60-е годы XX в. появилось множество исследований, использовавших анализ радиоавтографов в световом микроскопе для изучения динамики процессов, происходящих в ядре и цито-

плазме, их взаимоотношения и различной выраженности в физиологических условиях и при разных патологических состояниях. Однако отнесение центров интенсивного синтеза веществ целиком к ядру или цитоплазме, а не к тем органеллам, в которых они фактически локализуются, значительно снижает ценность этого метода.

Несмотря на этот недостаток, с помощью свето-оптической радиоавтографии был получен ряд результатов, открывших новую эру в цитологии. В первую очередь, к ним следует отнести открытие в 1951 г. митотического цикла клетки, центральным событием которого является синтез ДНК.

В качестве меченых соединений в радиоавтографии наиболее широко используются меченные  $^3\text{H}$  и  $^{14}\text{C}$ , а также  $^{32}\text{P}$  и  $^{131}\text{I}$ . Это предшественник ДНК  $^3\text{H}$ - и  $^{14}\text{C}$ -тимидин, предшественник липидов  $^3\text{H}$ -глицерин, предшественник углеводов  $^3\text{H}$ -галактоза и многие другие.

В задачу настоящего раздела не входит подробное описание теоретических основ и методов приготовления радиоавтографов, которое имеется в специальных исследованиях [13, 21, 44, 73]. Оценка синтетических процессов в клетках производится путем подсчета в поле зрения микроскопа количества гранул восстановленного бромистого серебра, расположенных над ядром или цитоплазмой клетки. Подсчет обычно проводится вручную, с использованием любого механического счетчика, обычно — счетчика форменных элементов крови.

Этот процесс довольно легко автоматизируется с помощью любого анализатора изображений, имеющего дисплей, на котором можно ограничить поле зрения. Среди отечественных анализаторов пригодны установки «Интеграл-2» и «Морфоцвет», разработанный и выпущенный малой серией Опытным производством Института проблем онкологии им. Р. Е. Каецкого АН УССР. Среди импортных приборов следует упомянуть разработанный фирмой MILLIPORE (США) еще в 1970 г. ПМС (Particle Measurement Computer System), а также серию анализаторов изображения фирмы Micromasurements Ltd. System I—III Image Analyser, использующихся иногда в сочетании с прибором этой же фирмы Image Editor [205].

В отличие от свето-оптической электронно-микроскопическая радиоавтография позволяет наблюдать синтез нуклеиновых кислот, белка, ферментативные реакции и т. д. не вообще в ядре и цитоплазме клетки, а конкретно в тех органеллах, в которых они происходят. Таким образом, создание электронно-микроскопической радиоавтографии ознаменовало один из важнейших этапов в эволюции морфологии, а именно момент, когда две исторические линии ее развития — непрерывное повышение точности структурного анализа и постоянное стремление к все более полной функциональной оценке морфологических изменений, до сих пор идущие параллельно, скрестились, что открыло принципиально новые возможности для дальнейшего изучения биологических про-

цессов в норме и патологии. В настоящее время электронно-микроскопическая радиоавтография считается наиболее современным методом структурно-функционального анализа [68].

Точность локализации гранул восстановленного серебра на той или иной клеточной органелле, вернее, точность локализации источника излучения зависит от разрешающей способности электронно-микроскопической авторадиографии. С использованием наиболее широко употребляющегося радионуклида  $^3\text{H}$  она лишь всего в 2—4 раза выше радиоавтографии с использованием светового микроскопа. Это резко контрастирует со 100-кратным увеличением разрешающей способности электронного микроскопа по сравнению со световым, но зависит как от природы регистрирующей системы (фотоэмульсии), так и от природы ионизирующего излучения. Так, если для световой радиоавтографии разрешающая способность равна примерно 0,1 мкм [130], то для электронно-микроскопической с использованием специальных мелкозернистых ядерных эмульсий и проявителей — в среднем 0,2—0,4 мкм. Следует иметь в виду и относительно невысокую эффективность ЭМ-радиоавтографии — 10—20 %.

Особенности и основные отличия ЭМ-радиоавтографии от световой изложены в монографиях Роджерса [64], Jacob and Budd [196], Д. С. Саркисова и соавт. [68].

С помощью ЭМ-радиоавтографии наиболее детально изучены синтез ДНК в ядерном хроматине и митохондриях, синтез РНК в ядрышке и перенос ее в гранулярный эндоплазматический ретикулум, синтез РНК в митохондриях, синтез коллагена в цистернах гранулярного эндоплазматического ретикулума фибробластов, показана роль аппарата Гольджи в окончательном формировании белковых секретов, синтез углеводов и липидов. При изучении локализации и интенсивности ферментных реакций используется меченый субстрат (как, например,  $^{32}\text{P}$ ), меченый глицерофосфат (при постановке реакции на кислую фосфатазу) или меченый ингибитор реакции (например,  $^3\text{H}$ -динизопропилфлюорофосфат).

Основными сдерживающими факторами развития ЭМ-радиографии в нашей стране являются недостаточный выпуск и невысокое качество (недостаточная мелкозернистость) отечественных ядерных эмульсий типа М и Р, а также ограниченный набор меченных радионуклидами предшественников (особенно для ферментных реакций).

В большинстве исследований, использующих метод электронно-микроскопической радиоавтографии, приводится качественная оценка уровня биосинтетической активности клеток и их органелл. Количественное определение степени функциональной активности биологических структур на основе данных электронно-микроскопической ауторадиографии подразумевает подсчет числа гранул восстановленного серебра над клеточными органеллами, которые свидетельствуют о местах интенсивного биосинтеза того или иного субстрата. В связи с тем что количество таких гранул на ультратонком срезе сравнительно невелико, этот процесс обычно не

нуждается в автоматизации, если речь идет об определении уровня процессов биосинтеза в одном срезе. Задача значительно усложняется, если ставится цель определить интенсивность этих процессов в объеме всей органеллы.

Д. С. Саркисов и соавт. [68] упоминают о двух видах трудностей при попытках количественного анализа биосинтетических процессов в целой органелле. Во-первых, это отсутствие точных данных о пространственной конфигурации различных органелл клетки. Так, например, исходное предположение об округло-овальной форме митохондрий, из которого исходят многие исследователи, может привести к довольно грубым ошибкам. Еще в 1967 г. Д. С. Саркисовым и Б. В. Втюриным было выдвинуто предположение о наличии в животной клетке немногочисленных митохондрий, имеющих червеобразную форму. В 1973 г. Hartmann и Avers [183] на основании реконструкции митохондрии дрожжевой клетки по 150 срезам пришли к заключению, что в этой клетке имеется всего одна митохондрия с ветвистым строением. Подобные работы на клетках высших животных пока отсутствуют.

Во-вторых, трудности количественной оценки функциональной активности той или иной органеллы усугубляются тем, что в различных срезах уровень синтетической активности в одной и той же органелле часто существенно различается. Из этого следует, что точные сведения о функциональной активности органеллы можно иметь, анализируя особенности биосинтеза в каждом серийном срезе и реконструируя по этим срезам исследуемую структуру. При таком подходе можно получить информацию об общем объеме биосинтетической активности в данной органелле, а также о внутриорганойдной топографии этой активности в момент исследования.

Таким образом, по мнению Д. С. Саркисова и соавт., для электронно-микроскопической радиоавтографии в настоящее время наиболее перспективным подходом к количественной обработке полученных данных является стереологическая реконструкция органеллы на основе серийных срезов. Этого можно достичь путем полной автоматизации процесса ультратомирования с получением достаточно большого количества серийных срезов (в идеале — получение серийных срезов всей клетки). Современные конструкции ультратомов фирм LKB (Швеция) и Reichert (Австрия) в значительной степени уже позволяют решить эту задачу.

Изучение серийных срезов каждой клетки в электронном микроскопе значительно увеличит объем работы и потребует автоматизации анализа электронно-микроскопического изображения.

## КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИСПЕРСИОННОГО АНАЛИЗА

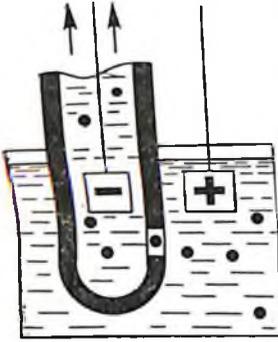
В 1952 г. был открыт кондуктометрический метод подсчета микрочастиц. В зарубежных работах эти приборы получили название счетчиков Култера [59] — по имени изобретателя — W. H. Coulter. Кондуктометрический метод дисперсионного анализа относится к электронным способам проточного типа, регистрирующим изменения сопротивления микроотверстия, через которое пропускается суспензия в момент прохождения частицы.

В последующем счетчике быстро нашли применение в различных областях медицины, промышленности; сейчас подобные приборы выпускаются во всех промышленно развитых странах мира. Лидирующее место в их производстве занимают Coulter Electronics, Nucel, TOA Electronic Co и другие формы. Такая популярность рассматриваемого прибора обусловлена широким диапазоном решаемых задач и простотой эксплуатации. Контроль газов, жидкостей, порошковых веществ, анализ чистоты продуктов различных отраслей промышленности (химическая, пищевая, атомная), автоматический анализ клеток крови, бактерий, исследование клеток и тканей — вот не полный перечень областей применения анализаторов дисперсионного анализа [60, 61].

Рассматривая принципы работы счетчика Култера, необходимо прежде всего отметить, что исследование микрочастиц возможно, если они находятся в суспензии. Поэтому требования подготовки буфера и очистка системы в процессе измерения играют при данном методе важную роль. В качестве буфера обычно используют физиологический раствор (вода + 0,99 NaCl) либо 4 %-ный тиоцианат аммония в изопропиловом спирте, а также другие растворы, являющиеся слабыми электролитами. Принцип работы кондуктометрического датчика легко понять по рис. 18. Сопротивление между пластинами составляет обычно несколько тысяч ом. Когда клетка входит в отверстие, сопротивление между электродами увеличивается. Это объясняется уменьшением проводящего объема отверстия, так как клетки на постоянном и переменном токе низкой частоты фактически неэлектропроводны.

Модуляция величины сопротивления в цепи между пластинами, вызванная движением клеток, приводит к появлению импульсов, амплитуда которых зависит от ряда факторов. Прежде всего,

Рис. 18. Схема работы кондуктометрического датчика



амплитуда импульсов пропорциональна величине тока и изменению сопротивления:

$$U = I_0 \Delta R. \quad (19)$$

В ряде работ отмечается, что изменение сопротивления датчика при прохождении клетки прямо пропорционально её объему. В проспекте «Coultronics France» [59] утверждается, что в счетчиках ТА-2 электрический импульс «не зависит от природы, формы, плотности и цвета частиц». Такой вывод не корректен. Однако, когда объем клетки мал по сравнению с объемом отверстия датчика, а удельное сопротивление клетки выше удельного сопротивления буфера, то для определения изменения сопротивления могут быть использованы формулы

$$\frac{\Delta R_1}{R_1} \approx \frac{V_K}{V_1}, \quad (20)$$

и

$$\Delta R \approx \frac{\rho_1 V_K}{S_1^2}, \quad (21)$$

где  $\rho_1$  — удельное сопротивление датчика;  $V_K$  — объем клетки;  $S_1$  — площадь поперечного сечения отверстия датчика. Как видим из формулы, кроме объема клетки, амплитуда импульса прямо пропорциональна удельному сопротивлению буфера и обратно пропорциональна площади поперечного сечения отверстия датчика.

Пренебрежение влиянием формы и ориентацией клетки при определении изменения сопротивления датчика обуславливает приближенный характер приведенных выше формул. С целью исключения таких допущений был рассмотрен вопрос о зависимости сопротивления датчика [212] от формы для цилиндрических частиц

$$\frac{\Delta R_1}{R_1} = \frac{V_K}{V} \cdot \frac{1}{1 - \frac{S_K}{S_1}} = \frac{V_K}{V} \left[ 1 + \frac{S_K}{S_1} + \left( \frac{S_K}{S_1} \right)^2 + \dots \right] \quad (22)$$

и сферических частиц

$$\frac{\Delta R_1}{R_1} = \frac{V_K}{V} \left[ 1 + \frac{1}{5} \frac{S_K}{S_1} + \frac{843}{1120} \left( \frac{S_K}{S_1} \right)^2 + \dots \right]. \quad (23)$$

Как видно из формул, поправка величины сопротивления становится значительной при сравнительно больших размерах клеток. Определение сопротивления датчика при движении клеток с различной формой и ориентацией может быть выполнено по

выражению

$$\frac{\Delta R_1}{R_1} = \frac{V_{\kappa}}{V} \cdot \frac{f}{1 + \eta} \frac{1 - \frac{\rho_1}{\rho_2^*}}{\left(1 - \frac{V_{\kappa}}{lS_1}\right) \left(1 - \frac{\rho_1}{\rho_2}\right) + f \frac{\rho_1}{\rho_2}}, \quad (24)$$

где  $l$  — длина отверстия датчика;  $\eta$  — отношение сопротивления датчика к эквивалентному сопротивлению нагрузки;  $f$  — фактор формы;  $\rho_2^*$  — приведенное удельное сопротивление клетки. Отсюда объем клетки при условии, если  $V \gg V_{\kappa}$ , а  $\rho_2 \gg \rho_1$ , может быть записан в виде

$$V_{\kappa} = \frac{S^2 (1 + \eta)}{I_0 \cdot \rho_1 \cdot f} \cdot U_g. \quad (25)$$

Кондуктометрические датчики рекомендуется использовать для счета и анализа микрочастиц, диаметр которых находится в пределах 0,5—800 мкм. Исследование в таком большом диапазоне размеров требует сменных датчиков, так как диаметр отверстия датчика должен превышать в 2—3 раза диаметр самой большой из измеряемых клеток. Обычно соотношение диаметров клеток и отверстия выбирается в пределах 0,015—0,45. Если клетки будут слишком маленькими, то влияние шума станет настолько существенным, что затруднит процесс измерения. В случае, когда клетка перекрывает половину отверстия, отверстие часто засоряется, прерывая измерение. Исходя из этих соображений в современных кондуктометрических счетчиках предусматривается целый набор датчиков (табл. 14).

Ток кондуктометрического датчика обусловлен характером его протекания через электролиты. Среди основных факторов, влияющих на величину тока, можно отметить приложенное напряжение, концентрацию и температуру электролита, материал электродов и т. д. Поляризационные эффекты вызывают нелинейную зависимость тока от приложенного напряжения. Причем стабильный режим работы обеспечивается в случае, когда приложенное к электродам напряжение выше какого-то критического значения, зависящего от электродной и электрохимической поляризации. При малых величинах тока датчики работают неустойчиво.

При определении объемов несимметричных клеток большое влияние оказывает их форма. Фактор формы, введенный в формуле (7), позволяет исключить эту погрешность. Значения коэффициента формы определяются по экспериментальным данным [61]. Сле-

Таблица 14. Параметры датчиков

| Диаметр, мкм |        | Электрическое сопротивление, КОМ | Максимальная концентрация частиц, клетки/мл |
|--------------|--------|----------------------------------|---|
| отверстия    | клетки |                                  |   |
| 30           | 0,4—10 | 36,00                            | $1,5 \times 10^6$                           |
| 50           | 0,8—24 | 28,00                            | $320 \times 10^3$                           |
| 70           | 1,1—30 | 17,00                            | $116 \times 10^3$                           |
| 100          | 1,4—42 | 13,00                            | $40 \times 10^3$                            |
| 140          | 2—60   | 10,00                            | $15 \times 10^3$                            |
| 200          | 2,7—80 | 8,00                             | $5 \times 10^3$                             |
| 280          | 4—120  | 6,00                             | $1,8 \times 10^3$                           |
| 400          | 6—180  | 4,30                             | 625   |
| 500          | 8—240  | 3,25                             | 228   |



Рис. 19. Два потока эритроцитов в проточной камере

выбирать отверстие цилиндрической формы. Во-вторых, в режиме счета клеток длина отверстия составляет обычно 0,8—1,0 его диаметра, в то время как в режиме анализа размеров клеток отношение длины к диаметру отверстия датчика выбирается в пределах 1,0—2,0. Такой выбор объясняется тем, что в удлиненном отверстии легче получить однородное поле и, следовательно, уменьшить ошибку измерения, обусловленную формой частицы. С другой стороны, длинные отверстия быстрее засоряются, а также повышают вероятность одновременного прохождения нескольких клеток.

С целью изучения процесса прохождения клеток вдоль отверстия были изучены фотографии потока окрашенных клеток [203, 204]. Показано, что амплитуда и форма электрического импульса зависят от пути, по которому клетки проходят отверстие, от вращения клетки, состояния мембраны, влияющей на её проводимость, от гидродинамической фокусировки клеток. Для исследования были созданы специальные камеры проточного типа, отличающиеся друг от друга тем, что в камерах формируются горизонтальный и вертикальный потоки клеток по отношению к оптической оси объектива микроскопа. Прохождение эритроцитов в двухпотоковой камере приведено на рис. 19. Верхняя струя клеток состоит из окрашенных эритроцитов, отцентрифугированных и суспензированных в 1,9%-ном физиологическом растворе. Нижняя струя представляет эритроциты, помещенные в плазму. Анализируя фотографии, можно сделать вывод о существенном различии в прохождении эритроцитов. Если в нижней струе клетки при скорости 3—4 м/с изменяют форму, то в верхней струе эритроциты претерпевают незначительные изменения.

Среди факторов, влияющих на результаты кондуктометрических измерений, следует отметить термообработку, вирусное заражение клеток, облучение ионизирующей радиацией. Известно, что фиксация клеток уменьшает электрическое сопротивление клеток, а это сказывается на уменьшении амплитуды при измерении счетчиком Култера.

Кондуктометрический метод исследования может быть выполнен как на постоянном, так и на переменном токе. При токе низ-

дует, однако, отметить, что представленные значения фактора формы были получены при моделировании процесса прохождения клеткой отверстия датчика, поэтому не учитывают особенностей конструкции датчика. В то же время большую роль играет отношение длины к диаметру отверстия датчика. Во-первых, для достоверности рекомендуется

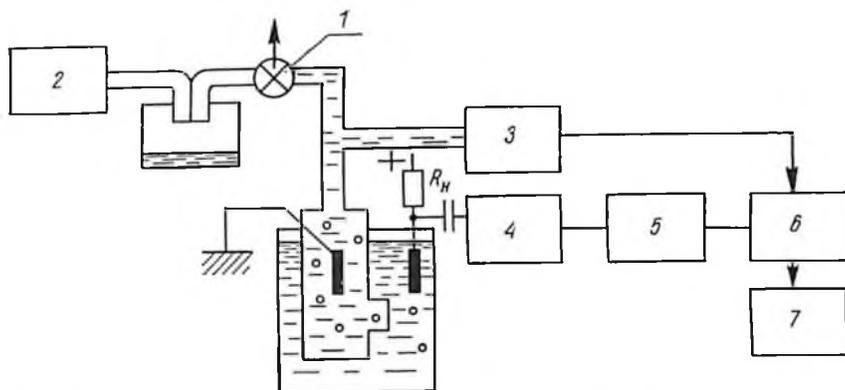


Рис. 20. Структурная схема кондуктометрического счетчика:

1 — кран, 2 — источник разряжения, 3 — узел определения дозы, 4 — импульсный предусилитель, 5 — компаратор, 6 — устройство управления и обработки, 7 — осциллоскоп

кой частоты клетки фактически неэлектропроводны. При повышении частоты начинает проявляться реактивное сопротивление клеток, что позволяет измерять емкостную часть импеданса клеточных мембран. Такие работы пока не получили широкого распространения, однако представляют несомненный интерес для изучения влияния внешних факторов на реактивную часть сопротивления клеточных мембран.

В формуле определения объема клеток (23) символом  $\eta$  обозначено отношение сопротивления датчика к эквивалентному сопротивлению нагрузки. При равенстве этих сопротивлений амплитуда импульсов датчика составляет половину максимального значения. Поскольку рассматриваемый параметр является характеристикой используемого усилителя и не зависит от размеров клеток, то его влияние может быть исключено путем калибровки прибора по эталонным микрообъектам. В качестве таких эталонов часто используют полистироловые латексы, пыльцу и споры растений, куриные эритроциты.

Основные узлы кондуктометрического счетчика представлены на рис. 20. К электродам, изготавливаемым обычно из платины или нержавеющей стали, подводится электрическое напряжение. Через микроотверстие меньшего сосуда создается разряжение. На рисунке представлен узел определения дозы, в качестве которого чаще всего используется ртутный насос. Уровень ртути в этом насосе поднимается при открытом кране 1 за счет источника разряжения 2. Кран затем закрывается, столбик ртути под силой тяжести опускается, всасывая суспензию из большого сосуда в меньший. Клетки проходят через микроотверстие. Объем исследуемой жидкости определяется контактами, при замыкании которых ртутью вырабатываются импульсы, управляющие временем счетчика. Электрические импульсы датчика усиливаются импульсным предусилителем 4. В компараторе 5 их амплитуда сравнивается с опорными значениями. Результаты дискриминации амплитуды

импульсов представляются на дисплее в виде гистограмм объема клеток. В устройстве управления и обработки выполняется анализ импульсов всех клеток, а также управление работой счетчика.

В качестве примера конструкции кондуктометрического анализатора рассмотрим счетчик S·plus IV/VI L.M.G. фирмы Coultronis. Этот прибор предназначен для проведения гематологических анализов 120 образцов за 1 ч, автоматической распечатки 18 параметров и получения лейко-, эритро- и тромбоцитарного распределения. Каждый из двух датчиков имеет три микроотверстия, позволяющие производить измерение по трем, совершенно независимым цепям. Таким образом, одновременно получают три значения каждого параметра. Для повышения статистической достоверности средние значения полученных данных сравниваются. Если усредненные значения не совпадают, общий результат отменяется. Расчет статистических характеристик выполняется для каждого параметра — соответственно для 75 000 эритроцитов, 10 000 лейкоцитов, 3000 тромбоцитов. Каждый результат исследований отображается на экране дисплея счетчика. Прибор снабжен печатающим устройством, с помощью которого на бумаге в трех экземплярах воспроизводятся результаты статистического анализа и кривые распределения параметров. В состав счетчика S·plus IV/VI включается устройство CASH, предназначенное для обеспечения автоматического исследования 32 образцов без присутствия оператора. Задачами контейнера-кассы являются автоматическая подача образцов, их взбалтывание и всасывание исследуемой крови с помощью иглы. Работа CASH может быть проконтролирована оператором. Для проверки работы счетчика фирма поставляет эталонные образцы крови, которые могут быть помещены в контейнер либо во время загрузки диска кассы, либо в процессе работы. Необходимая доза исследуемой крови составляет 100 мкл. Режимы чистки системы подачи крови автоматизированы.

Примеры полученных распечаток результатов представлены на рис. 21. Лейкоцитарная кривая здорового человека, обозначенная сплошной линией, отображает распределение лейкоцитов по объему. Морфологический анализ этой кривой дает возможность определить в количественном и процентном соотношении совокупность трех типов клеток: лимфоцитов (LY), моноцитов (MO), гранулоцитов (GR). Концентрация лейкоцитов определяется в  $\text{мм}^3$ . Известно, что в норме диапазон изменения лейкоцитов составляет  $(4,5-10) \cdot 10^3$  на  $1 \text{ мм}^3$ . Изменение концентрации лейкоцитов, либо изменение формы лейкоцитарной кривой имеет клиническое значение, так как в том и другом случае отображает изменения состава крови. Гистограммы, совмещенные на одном рис. 21, а, для лейкоцитов в норме (кривая 1), при остром лейкозе (кривая 2) и хроническом миелоцитарном лейкозе (кривая 3) свидетельствуют о существенном различии формы лейкоцитарной кривой для рассматриваемых случаев.

Гистограмма эритроцитарного распределения показана на рис. 21, б. Эритроцитов по сравнению с лейкоцитами в  $10^3$  раз

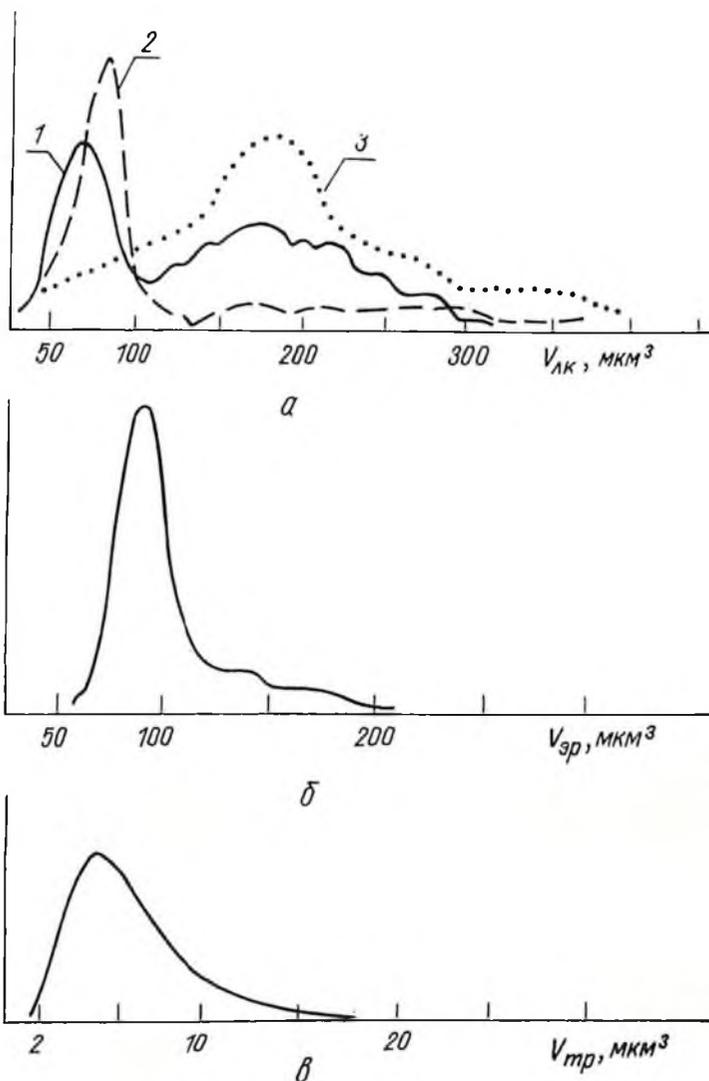


Рис. 21. Гистограммы распределения по объемам лейкоцитов (а), эритроцитов (б), тромбоцитов (в)

больше, поэтому значение, указанное под рисунком, необходимо умножить на  $10^6 \cdot \text{мм}^3$ . Выведены также значения гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцита и т. д. Тромбоцитарное распределение представлено на рис. 21, в.

К автоматическим счетчикам также относятся модели приборов Култер С-880 и С-560. В аббревиатуре названия первой цифрой кодируется число измеряемых параметров, двумя последующими — время анализа. Для обоих приборов доза измеряемой капиллярной крови составляет 44,7 мкл. В приборе С 880 исполь-

зуется алгоритм обработки, согласно которому вся поверхность под кривой распределения разбивается на пять зон. Исходя из разбивки вычисляется количество клеток и обнаруживаются возможные аномалии в кривой распределения. В рассматриваемом приборе, как и в модели S-plus IV/VI, введено тройное измерение параметра. Результаты трех подсчетов сравниваются и, если данные сравнимы, то среднее значение принимается как окончательное. В модели С 560 производится двойной подсчет для каждой клетки. Расхождение между двумя подсчетами вызывает отмену результатов.

Полуавтоматические счетчики М430/М 530 обеспечивают измерение 4 и 5 параметров за время анализа 30 с. Эти приборы предназначены для рядовых гематологических лабораторий. Они позволяют измерять количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, гематокрита, средний клеточный объем.

Исследования, посвященные кондуктометрическим измерениям, показывают, что распределение объема микрочастиц может иметь сложную форму кривой, порой далекую от гауссового распределения. К примеру, эритроцитарная кривая здорового человека бимодальна. Обработка таких характеристик может выполняться различным образом. В счетчиках Т2, например, каждому виду клеток лейкоцитарного распределения отводилась своя зона: лимфоцитам — в диапазоне 35—99 мкм<sup>2</sup>, моноцитам — от 99 до 160, гранулоцитам — больше 160 мкм<sup>2</sup>. Процентное содержание клеток определяется отношением количества клеток в указанных пределах к общему количеству исследуемых клеток. Для обработки кривых распределения может также использоваться метод представления асимметричной кривой рядом кривых с гауссовым распределением, в результате суперпозиции которых воссоздается форма первоначальной кривой распределения. Выше было отмечено, что для подсчета клеток используется определенная доза суспензии. Такой способ позволяет получить распределение клеток по объему, что имеет большое практическое значение для тех случаев, в которых требуется определить количество микрочастиц по объему, например при контроле степени загрязнения. В случае, когда суспензия характеризуется незначительной концентрацией, целесообразнее задавать время исследования либо ограничивать общее число частиц, либо число клеток в определенном канале. Программа таких измерений более гибкая и не зависит от концентрации суспензии. Если объем клеток в пробе значительно варьирует, проведение кондуктометрических измерений с помощью одного датчика становится невозможным. Такую пробу разделяют на несколько фракций с помощью сит и в дальнейшем исследуют отдельно, подбирая соответствующий датчик.

Хранение результатов измерения в памяти прибора позволяет сравнивать нормальные препараты с исследуемыми, а также исключать фон, определенный заранее при анализе чистого электролита. Отображение полученных распределений объема клеток может быть выполнено в интегральной и дифференциальной фор-

ме. При интегральной производится подсчет на каждом уровне квантования, при дифференциальной — на экране дисплея визуализируется разность количества клеток соседних уровней квантования.

Необходимо отметить, что за 30 лет метод кондуктометрического дисперсионного анализа цитологических проб превратился в один из самых распространенных. Современная гематологическая лаборатория немыслима без кондуктометрических счетчиков, позволяющих анализировать десятки тысяч клеток в секунду при коэффициенте вариации несколько процентов в широком диапазоне объема клеток. Эти достоинства метода позволяют предположить, что сфера применения таких приборов будет расширяться и они найдут достойное место при создании автоматизированных систем как для дифференциальной диагностики, так и для скрининга.

## ПРОТОЧНЫЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Клетка как гетерогенная, полидисперсная система не однородна по свойствам. Сканирующие методы анализа, в том числе телевизионный, являющиеся высокоразрешающими, обеспечивают получение достаточно полной информации об особенностях строения клеток. Однако исследования на этих приборах сопряжены с низкой производительностью труда.

Отказ от сканирующих устройств при изучении клеток и использовании движения самих микрочастиц при неподвижном фотоприемнике привел к развитию приборов проточного типа [137]. Проточный метод анализа послужил толчком развития нового направления количественных методов исследования в иммунологии, биохимии, вирусологии. Несмотря на дороговизну и сложность эксплуатации первых промышленных образцов, уже в 1979 г. в различных лабораториях мира было более 500 проточных цитофлюориметров [270, 271]. В настоящее время наибольшее распространение получили Impulscytophotometer — ICP (Phywe AG), Cytofluorograf Systems (Ortho diagnostics systems), Fluorescence Activated cell sorter — FACS (Becton — Dickinson). Все возрастающий интерес к этим приборам можно объяснить рядом достоинств, свойственных проточному анализу: быстродействием, высокой достоверностью полученных результатов, малой погрешностью измерения, гибким программным управлением сортировкой.

Импульсный цитофотометр ICP-21 был первым проточным анализатором, освоенным зарубежной промышленностью. Скорость потока клеток в этом приборе составляла 1000 клеток/с. При этом обеспечивались регистрация флуоресценции клеток, построение гистограмм с коэффициентом вариации менее 2%. Содержание ДНК можно измерять меньше 1 пг (например, в одной хромосоме). Прибор построен по принципу действия люминесцентного микроскопа, в котором излучение ртутной лампы высокого давления (с мощностью 100 Вт) фокусируется с помощью объектива Zeiss Neofluar 63/1.25, предназначенного для работы с масляной иммерсией.

Флуоресценция клеток концентрируется этим же объективом и за счет дихроичных зеркал разделяется на различные ФЭУ. В дальнейшем узел пикового детектора формирует прямоугольные импульсы длительностью 3 мкс. Амплитуда этих сигналов соответствует максимальному значению амплитуды флуоресценции. Мно-

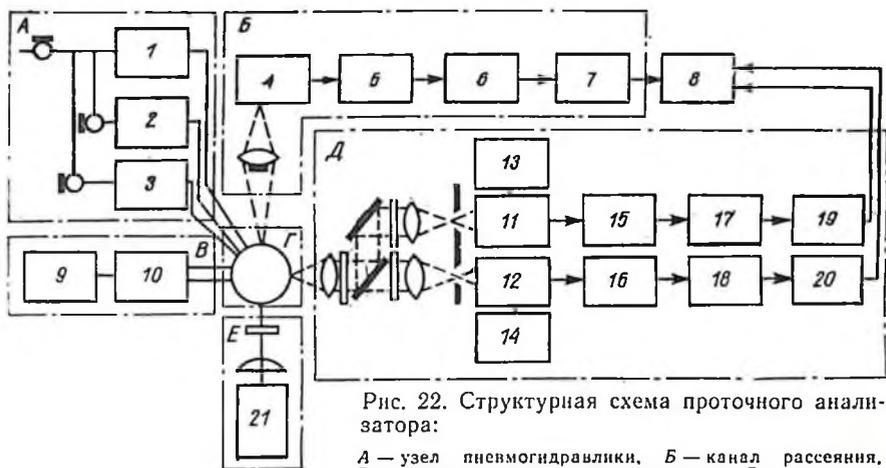


Рис. 22. Структурная схема проточного анализатора:

*А* — узел пневмогидравлики, *Б* — канал рассеяния, *В* — узел ультразвукового генератора, *Г* — проточная камера, *Д* — канал флюоресценции, *Е* — источник. 1, 3 — ресиверы оболочек и суспензии с клетками, 4 — фотоприемник, 8 — многоканальный анализатор, 9 — генератор, 10 — ультразвуковой преобразователь, 11, 12 — ФЭУ, 13, 14 — блоки питания, 5, 15, 16 — предусилители, 6, 17, 18 — усилители, 7, 19, 20 — интеграторы, 21 — источник (лазер)

гоканальный анализатор преобразует эти импульсы в цифровую форму и обеспечивает вывод на дисплей в виде гистограммы  $128 \times 128$ . В ИСП обеспечивается возможность построения двухпараметрических гистограмм, например ДНК и протенна, для каждой клетки.

На примере многопараметрического проточного анализатора, структурная схема которого приведена на рис. 22, рассмотрим основные узлы подобных приборов. Пневматический узел *А* обеспечивает регулировку давления воздуха, чем обуславливается прохождение клеток друг за другом в тонкой струе суспензии (с диаметром десятки — сотни микрон). В канале рассеяния *Б* регистрируется часть рассеянного излучения. Прямое попадание излучения исключается. Дробление струи суспензии с клетками выполняется с помощью ультразвукового генератора *В* с преобразователем, в качестве которого чаще всего используется пьезокерамика. При прохождении клетки через каплю она заряжается, а затем отклоняется в электростатическом поле, обеспечивая сортировку и разделение смешанных популяций клеток. Проточная камера *Г* служит для гидродинамической фокусировки струи. Канал флюоресценции *Д* расположен перпендикулярно к направлению распространения излучения. Функционально он предназначен для сбора флюоресцентного сигнала от клеток и предварительной обработки электрических импульсов. Дихроичные зеркала разделяют флюоресцентный сигнал на части, отличающиеся друг от друга длиной волны. И наконец, прибор имеет источник излучения, в качестве которого могут быть использованы лазеры или ртутные лампы высокого давления.

Проанализируем конструктивные особенности известных проточных цитоспектрофотометров.

## ПРОТОЧНЫЕ КАМЕРЫ

Одной из основных частей проточных анализаторов является проточная камера. Для того чтобы клетки в потоке следовали друг за другом с равномерной скоростью и сохранением ориентации в пространстве, используется гидродинамическая фокусировка. Поток клеток в этом случае заключается внутри потока, состоящего из физиологического раствора, образуя коаксиальную двухпоточковую систему. Скорость внешнего потока больше скорости внутреннего, что обеспечивает стабильность положения клеток в плоскости, перпендикулярной к направлению распространения потока.

За счет гидродинамической фокусировки клетки проходят по центру камеры. Проточная камера ИСР приведена на рис. 23, *а*. Излучение в ней фокусируется на отверстие диаметром 200 мкм. Движение клеток направлено по оси луча и навстречу ему. После прохождения фокальной плоскости перпендикулярно направленный поток жидкости изменяет ход клеток и выводит их из зоны облучения. При использовании конструкции проточной камеры типа 23, *б* лазерный луч фокусируется обычно на клетки, расположенные близко от сопла камеры. Существует также трехпоточковая камера типа 23, *в* с капилляром, имеющим плоскопараллельные кварцевые стенки. Достоинством этой конструкции является исключение рассеяния лазерного луча, что вызывается цилиндрической формой самого потока. Как будет показано ниже, это играет важную роль в обеспечении высоких значений параметра сигнал/шум при исследовании рассеяния клеток.

Во всех конструктивных решениях проточных камер, представленных на рис. 23, клетки вводятся в камеру через капилляр. Фи-

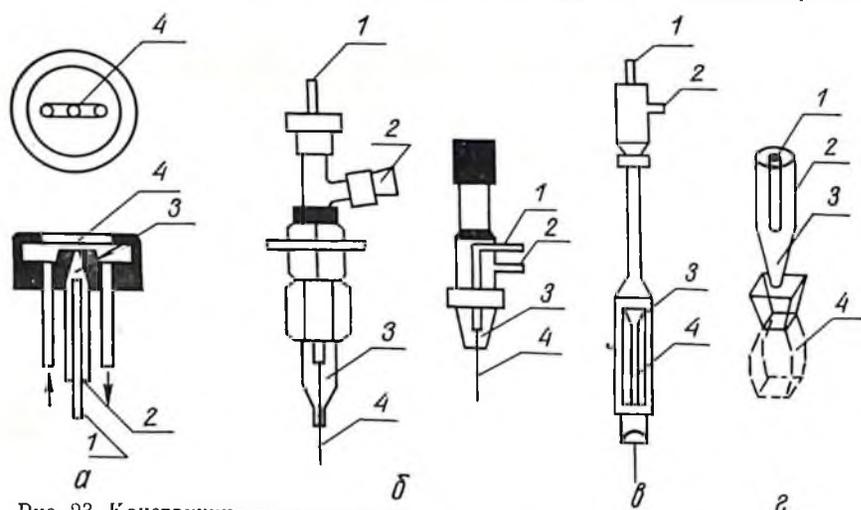


Рис. 23. Конструкция проточных камер:

система ИСР (*а*), двухпоточковая (*б*), трехпоточковая (*в*), трехпоточковая с ориентированной струей (*г*). 1 — капилляр с клетками, 2 — входной патрубок с буфером, 3 — область гидрофокусировки, 4 — область фокусировки излучения

зиологический раствор подается через входной патрубков. В области сужающегося конуса происходит гидродинамическая фокусировка потока с клетками. Лазерный луч фокусируется на клетки в области, прилегающей к выходному концу конуса либо капилляра с плоскопараллельными стенками. Диаметр выходного отверстия конусного наконечника составляет 80—100 мкм (Original Stauford cell-sorter) или 70 (Facs Systems). С целью исключения загрязнения буфер (дистиллированная вода или физиологический раствор) пропускают через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Использование проточных камер типа данных на рис. 23, б ограничивает оптические свойства системы, в то время как камера типа показанный на рис. 23, в предусматривает сложную технологию изготовления проточной кюветы с параллельными стенками и необходимость промывки стенок во время эксплуатации. Создание жидкостной оболочки с определенной конфигурацией стенок исключает применение специальной оптической кюветы [150, 151]. Система с прямоугольно сформированной жидкостной струей представлена на рис. 23, г.

### КАНАЛ РАССЕЯНИЯ

Лазерный луч при прохождении через клетку частично поглощается, частично рассеивается. Это зависит от различных факторов: размера, формы, ориентации, поглощения, коэффициента преломления клетки. Сложный характер индикатрисы рассеяния зависит от субклеточных структур (митохондрий, ядрышек, рибосом и т. д.), размеры которых соизмеримы с длиной волны. Измерение рассеяния выполняется приемником по схеме рис. 24.

При прохождении клетки через капилляр 1 на нее фокусируется лазерный луч 2 двумя способами, один из которых показан на рис. 24.

Измерение флюоресценции сигнала выполняется приемником 3, чувствительным к излучению с длиной волны флюоресцентного сигнала. Известно, что возбуждающий луч имеет более короткую волну по сравнению с флюоресцентным излучением. Это накладывает жесткие требования фильтрации отраженного излучения от флюоресцентного. Такое требование обычно выполняется включением в оптическую схему дихроичных фильтров. При сканирующих методах необходимо учитывать время сохранения постоянства интенсивности флюоресценции. Для проточных систем это ограничение не так критично, так как время нахождения клетки в лазерном луче при ее продвижении не превышает десятка микросекунд.

При исследовании рассеяния клеток в потоке необходимо также учитывать скорость потока, форму лазерного луча, фокусировку и длину волны излучения. Многофункциональная зависимость рассеяния от перечисленных параметров порождает сложный, комплексный характер его проявления в пространстве и времени. Известен ряд работ [129, 223, 225], посвященных этой проблеме. Для упрощения теоретического расчета в качестве модели клетки

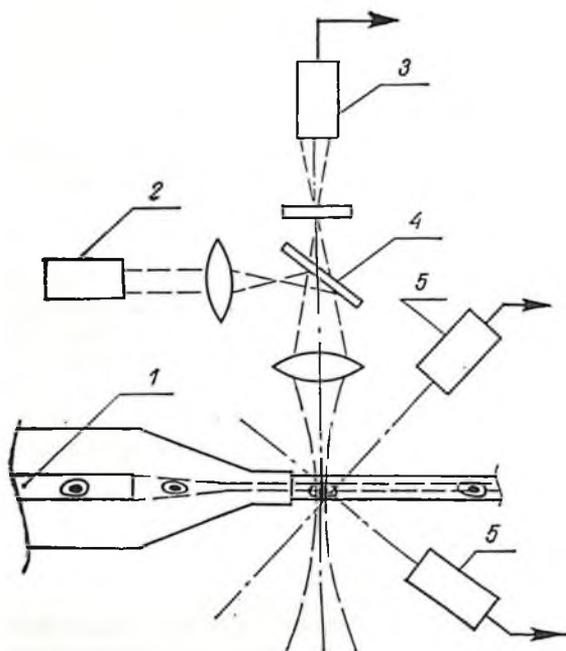


Рис. 24. Схема измерения рассеяния и флуоресценции клеток в потоке:

1 — суспензия с клетками, 2 — источник, 3 — фотоприемник флуоресценции, 4 — дихроичное зеркало, 5 — фотоприемник рассеяния

выбирается либо однородная частица сферической формы, либо двухсферная частица, имитирующая ядро и цитоплазму, с различающимися коэффициентами преломления. При этом коэффициент преломления для живых клеток  $n=1,392$  (для ядра),  $n=1,3703$  (для цитоплазмы) относительно воздуха, а для фиксированных клеток действительная часть коэффициента преломления для ядра выбирается равной 1,4735, для цитоплазмы — 1,4525. Предполагается также, что клетки облучаются однородным лазерным лучом с длиной волны 0,633 мкм.

Представим некоторые результаты теоретических и экспериментальных исследований для живых и фиксированных клеток, отличающихся друг от друга по параметрам. Прежде всего, следует отметить, что рассеянное излучение можно регистрировать в любом направлении от точки пересечения клеткой лазерного луча. Исходя из этого будем называть рассеяние, регистрируемое по направлению распространения лазерного луча, «0°-рассеянием», в направлении, перпендикулярном к этому направлению, — «90°-рассеянием», а в обратном — «180°-рассеянием».

Величина регистрируемого рассеяния клетки существенно изменяется от угла расположения приемника. С увеличением угла наблюдения амплитуда резко падает, причем повышение телесного угла сбора выше 10° приводит фактически к незначительному росту общей интегральной мощности рассеянного излучения. Зависимость рассеяния от диаметра клетки представлена на рис. 25. В качестве клетки принимается двухсферная модель с коэффициентом преломления сфер, равным реальным клеткам ядерно-цитоплазматического соотношения ЯЦО-0,72. Из рисунка видно, что с ростом диаметра клеток увеличивается «0°-рассеяние». По ходу характеристики наблюдаются осцилляции. Причем для фиксированных клеток они больше, чем для живых.

Эти осцилляции могут стать причиной искажения гистограммы

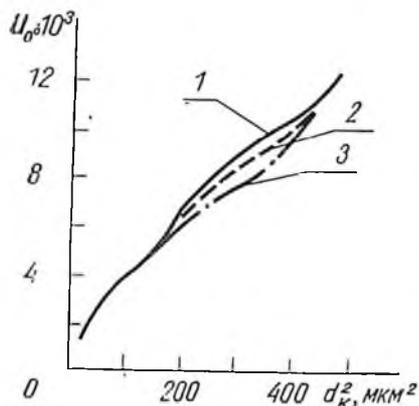


Рис. 25. Интегральная мощность « $0^\circ$ -рассеяния» в зависимости от квадрата диаметра двухсферной модели «живой» клетки при  $\Theta^\circ = 1,7^\circ - 20,3^\circ$ :  
1 — ЯЦО 0,67, 2 — ЯЦО 0,72, 3 — ЯЦО 0,77

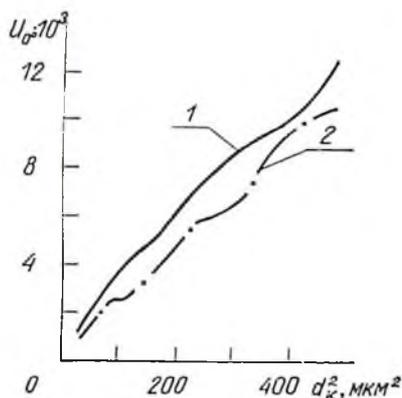


Рис. 26. Интегральная мощность « $0^\circ$ -рассеяния» в зависимости от квадрата диаметра двухсферной модели клетки при ЯЦО = 0,72 и  $\Theta^\circ = 1,7^\circ - 20,3^\circ$ :  
1 — живая клетка ( $n=1,392$ ;  $n=1,3703$ ), 2 — фиксированная клетка ( $n=1,4755$ ;  $n=1,4525$ )

рассеяния и даже вызвать появление «паразитных» пиков в связи с тем, что отдельные группы клеток, например в диапазонах их диаметров 7—10 и 14—18 мкм, обуславливают практически равную интегральную мощность. Этот эффект характерен в большей мере для фиксированных клеток. Кривые зависимости интегральной мощности « $0^\circ$ -рассеяния» от размера клеток при различных ядерно-цитоплазматических отношениях представлены на рис. 26. Очевидно, увеличение ЯЦО для клеток в диапазоне диаметров 12—20 мкм приводит к уменьшению интегральной мощности.

Интегральная мощность « $90^\circ$ -рассеяния» по величине на три порядка меньше интегральной мощности « $0^\circ$ -рассеяния», поэтому при ее регистрации рекомендуется применение фотоэлектронных умножителей. В диапазоне изменения диаметра клеток 1—22 мкм интегральная мощность « $90^\circ$ -рассеяния» растет пропорционально увеличению диаметра клеток. Изменение ЯЦО для живых или фиксированных клеток сказывается незначительно на ходе кривой зависимости интегральной мощности « $90^\circ$ -рассеяния» от диаметра клетки. Повысить интегральную мощность « $90^\circ$ -рассеяния» можно за счет увеличения угла сбора.

Существенная зависимость интегральной мощности « $90^\circ$ -рассеяния» наблюдается от коэффициента преломления. Кривые интегральной мощности « $90^\circ$ -рассеяния» для моделей живых ( $n=1,392$ ;  $n=1,3702$ ) и фиксированных ( $n=1,4755$ ;  $n=1,4525$ ) клеток при ЯЦО 0,72 представлены на рис. 27. Представляет интерес исследование внутриклеточных морфологических изменений, например увеличение белков, липидов или накопления микрополисахаридов в клетке, путем анализа « $90^\circ$ -рассеяния».

Кривые зависимости интегральной мощности «180°-рассеяния» от диаметра клеток представлены на рис. 28. Живые клетки обуславливают значительные осциллирующие характеристики, в то время для фиксированных клеток интегральная мощность «180°-рассеяния» не зависит от ЯЦО и коэффициента преломления. По сравнению с «90°-рассеянием» показатель преломления более существенно сказывается на «180°-рассеянии». Следует, однако, отметить, что исследование «180°-рассеяния» сопряжено с малым уровнем сигналов и влиянием отражения падающего лазерного луча от оптических элементов, проточной камеры и т. д.

Зависимость интенсивности рассеяния от угла измерения называют индикатрисой рассеяния. Каждая клетка характеризуется своей индикатрисой, участки которой обусловлены определенными морфологическими изменениями. Перемещая приемник в пространстве, можно снять мощность рассеяния в зависимости от угла ориентации  $\Theta^\circ$ . На рис. 29 представлены такие характеристики для сферических частиц диаметром 19,6 мкм из латекса. Сравнение теоретических данных, полученных на основании применения теории Lozenza — Mie, и экспериментальных показывает их удовлетворительное совпадение.

Использование матричных фотоприемников, состоящих из нескольких датчиков, позволяет одновременно проанализировать рассеяние в нескольких точках во время пересечения клеткой лазерного луча в проточном анализаторе. Полученные сигналы от каждого приемника будут в

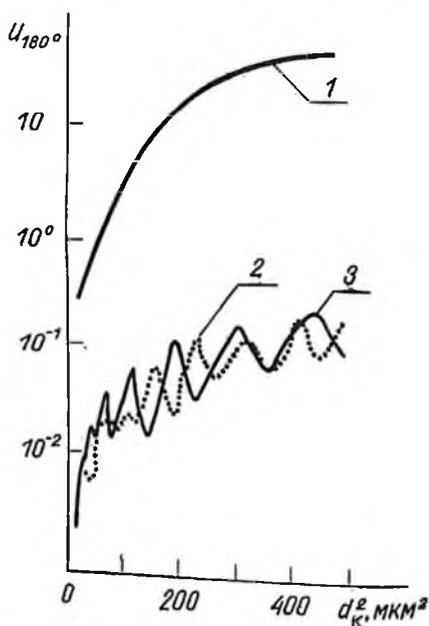
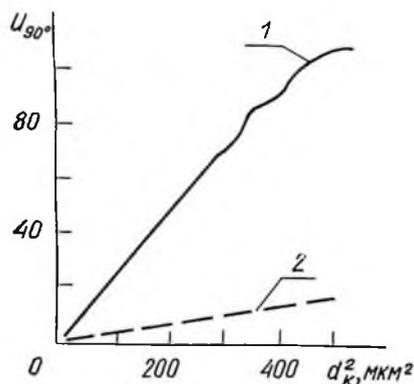


Рис. 27. Интегральная мощность «90°-рассеяния» в зависимости от квадрата диаметра двухсферной модели клетки при ЯЦО=0,72: 1 — живые клетки, 2 — фиксированные клетки.

Рис. 28. Интегральная мощность «180°-рассеяния» в зависимости от квадрата диаметра двухсферной модели клетки: 1 — ЯЦО=0,67—0,77 (фиксированные клетки), 2 — ЯЦО=0,72 (живые клетки), 3 — ЯЦО=0,67 (живые клетки).

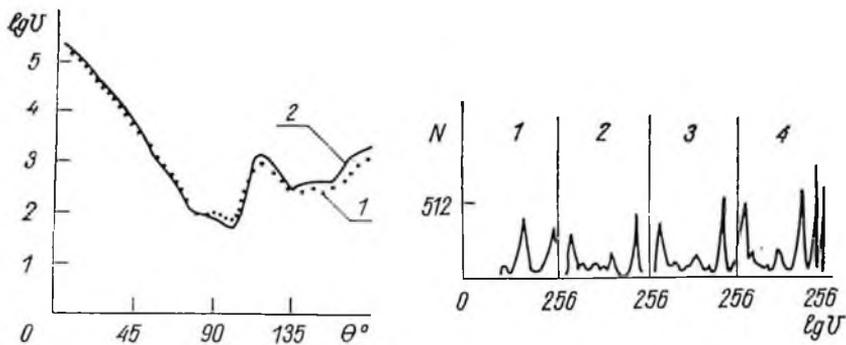


Рис. 29. Интенсивность рассеяния латексных частиц диаметром 19,5 мкм в зависимости от угла измерения в эксперименте (1) и теоретическая — (2)

Рис. 30. Гистограммы интенсивности рассеяния латексных частиц с диаметрами 1,1; 5,0; 10,0; 15,6; 19,6 мкм для разных углов измерения  $\Theta^\circ$ :

1 —  $11,7^\circ$ , 2 —  $29,2^\circ$ , 3 —  $35^\circ$ , 4 —  $46,6^\circ$

этом случае различаться, о чем свидетельствуют гистограммы интенсивности рассеяния суспензии с несколькими типами латексов, различающихся по диаметру частиц для разных  $\Theta^\circ$ -углов расположения фотоприемников. Причем при больших  $\Theta^\circ$ -углах, как видно из рис. 30, удается зарегистрировать пики от частиц с различными диаметрами. Например, при  $\Theta^\circ=11,7^\circ$  на гистограмме видны только частицы с диаметром 1,1 и 5,0 мкм, в то время как при  $\Theta^\circ=46,6^\circ$  четко разделены все пять групп частиц. Автор отмечает, что при регистрации при углах более  $45^\circ$  отношение сигнал/шум было низким, что не позволило проводить исследования.

Если при анализе рассеяния использовать не монохроматический источник, а излучение, в котором присутствует несколько составляющих с разными длинами волн, то каждая из них вызовет свое поле рассеяния. Однопараметрическая гистограмма рассеяния при облучении многоволновым источником может быть получена путем фильтрации с помощью интерференционных фильтров.

Рассеяние микрообъектов является результатом ряда физических явлений: дифракции на краях клетки и ядра, преломления в ядре, цитоплазме и окружающей среде, отражения на границах, поглощения клетки. Идентификация клеток выполняется сравнением картин рассеяния исследуемых клеток с рассеянием известных. При обратной задаче по информации о рассеянии воссоздают структуру строения микрообъектов.

Теоретическое исследование сферических моделей показало, что интегральная интенсивность рассеяния при малых углах пропорциональна кубу диаметра частиц. Следовательно, фотоприемник, измеряющий малоугловое рассеяние, обеспечивает информацией о распределении клеток в популяции по объему. С ростом размера частиц и индекса преломления расчетные значения общей интенсивности рассеяния, полученные при различных теоретических

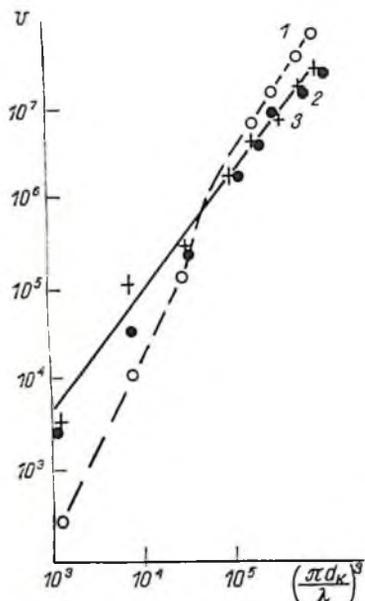


Рис. 31. Зависимость общей интенсивности рассеяния как функции при  $\Theta^\circ = 0,5^\circ$ :  
 1 —  $n=1,02$ , 2 —  $n=1,1$ , 3 —  $n=1,2$ .

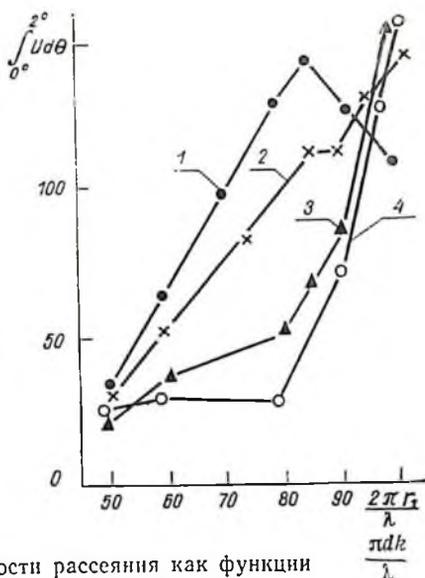


Рис. 32. Интенсивность рассеяния при  $\Theta^\circ = 2^\circ$  и  $n_1/n_2 = 1,05/1,03$ :  
 1 —  $r_1/r_2 = 0,3$ , 2 —  $r_1/r_2 = 0,5$ , 3 —  $r_1/r_2 = 0,7$ , 4 —  $r_1/r_2 = 0,9$

подходах, приближаются к дифракционному расчету. Однако при уменьшении показателя преломления эта закономерность несколько нарушается (рис. 31).

Рассеяние двухсферной (покрытой) частицы имеет лепестковую структуру, в которой узкие (высоочастотные) лепестки модулируются низкочастотной огибающей, чья форма зависит от размеров ядра и клеточки. Структура первого узкого лепестка обуславливается в основном размерами клеточки.

Угловое положение первого минимума огибающей определяется выражением:

$$\sin(\Theta_{\min}) = \frac{\lambda}{r_2 - r_1}, \quad (26)$$

где  $r_1$  — радиус внутренней сферы;  $r_2$  — радиус внешней сферы;  $\lambda$  — длина волны излучения.

Угловая зависимость рассеяния света при больших  $\Theta^\circ$  свидетельствует о повышении вклада эффектов преломления и отражения, в то время как в формировании малоуглового рассеяния доминирующую роль играет дифракция. Интенсивности рассеянного света, собранного в угол  $\Theta^\circ - \Theta^\circ - 2^\circ$ , зависят от размера клеточки (рис. 32). При постоянном соотношении индексов преломления внутренней и внешней сфер интегральная интенсивность рассеяния существенно зависит от ЯЦО. Используя два фотоприемника, раз-

несенных на незначительный угол в центральной лепестке, можно уменьшить влияние ЯЦО. Соотношение выходных сигналов фотоприемников может быть применено для измерения диаметра целой клетки при изменяемой величине ЯЦО (рис. 33).

Большое влияние на величину интегральной интенсивности рассеяния оказывает индекс преломления. Это видно из кривых рис. 34, характеристик интенсивности рассеяния при изменении ЯЦО для нескольких отношений коэффициентов преломления ядра и цитоплазмы. При постоянных значениях соотношения коэффициентов преломления рассеяния могут использоваться для измерения  $r_1/r_2$  в диапазоне 0,4—0,8. Если учесть, что индекс преломления изменяется в результате фиксации внутриклеточной активности или других факторов, то малоугловое рассеяние может служить методом измерения коэффициентов преломления при небольших изменениях ЯЦО.

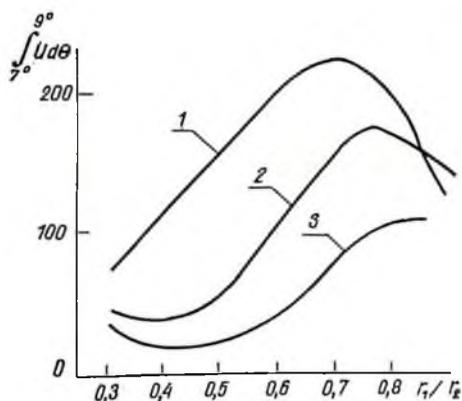


Рис. 34. Интенсивность рассеяния в зависимости от ЯЦО при  $\frac{2\pi r_1}{\lambda} = 85$ :

1 —  $n_1/n_2 = 1,06/1,04$ , 2 —  $n_1/n_2 = 1,05/1,03$ , 3 —  $n_1/n_2 = 1,04/1,025$

Рис. 35. Форма импульсов для двух эпителиальных клеток:

1 — рассеяние, 2 — флюоресценция

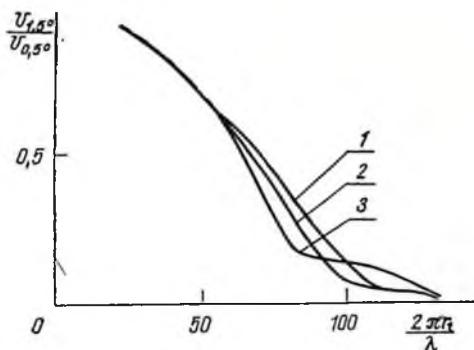
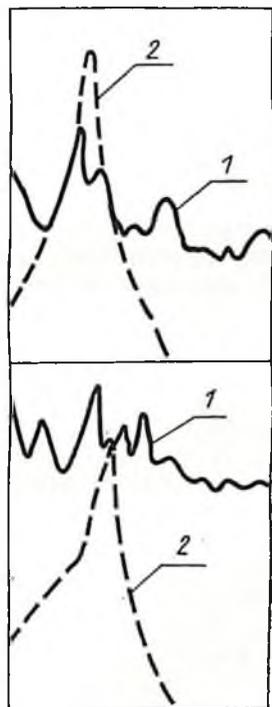


Рис. 33. Соотношение интенсивностей рассеяния двух приемников с  $\Theta^\circ = 1,5^\circ$  и  $\Theta^\circ = 0,5^\circ$ ,  $n_1/n_2 = 1,05/1,03$  и углу  $0,45^\circ$ :  
1 —  $r_1/r_2 = 0,3$ , 2 —  $r_1/r_2 = 0,5$ , 3 —  $r_1/r_2 = 0,7$



В реальных проточных системах луч лазера фокусируется цилиндрическими линзами и имеет неоднородное распределение энергетической плотности по сечению. Клетка при движении в потоке и пересечении узкого луча в фокальной плоскости облучается как бы по частям. Следовательно, величина рассеяния будет изменяться со временем прохождения клетки. Если размеры луча меньше размера клетки (режим slit scan flow), то необходимо учитывать, что в каждый момент времени сканирования узкий луч облучает тонкий диск, изменяющийся в размерах и представляющий поперечное сечение клетки. Из приведенного выше анализа канала рассеяния можно предположить, что форма электрического импульса фотоприемника, обусловленная малым угловым рассеянием, будет отражать размер и форму облучаемого диска, в то время как рассеяние под большим углом будет содержать информацию о внутренних неоднородностях каждого «поперечного сечения» клетки. В настоящее время должного внимания вопрос рассеяния движущимися клетками в режиме узкого луча не получил, хотя хроматиновая субстанция ядер представляется одним из информативных признаков для цитологической диагностики. В какой-то степени это можно объяснить проблемой создания специальных процессоров с длительностью строка в 10—20 нс и необходимостью использования амплитудоцифровых преобразователей с частотой десятки — сотни мегагерц.

Теоретические данные, полученные при моделировании рассеяния в режиме узкощелевого сканирования с помощью дифракционной теории [182], свидетельствуют о структурной информативности импульсов рассеяния движущейся клетки. Эпителлиальные клетки, окрашенные акридиновым оранжевым, сканировались в одном направлении узким лучом, имитируя движение клетки в потоке. Сигналы флуоресценции и рассеяния, полученные при сканировании двух клеток, приведены на рис. 35. Для первой клетки пики рассеяния соответствуют границам ядра и цитоплазмы, для второй, кроме них имеются пики, соответствующие неоднородностям в цитоплазме.

### ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ КАНАЛ

В проточных системах исследуются обычно собственная и вторичная флуоресценции. Как отмечалось в гл. 1, при вызванной флуоресценции используются метки-флюорохромы, определенным образом связанные с различными клеточными органеллами и субстратами. Интенсивность флуоресценции исследовалась во многих работах [6, 10, 39].

Если предположить, что толщина и квантовый выход флуоресцирующего вещества в клетке постоянны, то интенсивность флуоресценции будет пропорциональна концентрации метки. Таким образом, измерение интенсивности флуоресценции дает информацию о концентрации важнейших компонентов клетки: ДНК, РНК, белках и липидах. Следует, однако, учитывать, что предположение

о постоянстве толщины и квантового выхода автоматически исключает влияние рассеяния. В то же время интенсивность флюоресценции пропорциональна поглощенной части возбуждающего излучения. В свою очередь, рассеяние ослабляет проходящий пучок, влияя на интенсивность флюоресценции. Отсюда следует, что флюоресценция клетки, являющейся полидисперсной системой, рассеяние которой имеет сложный характер, не может быть использована для расчета количества веществ в клетке в абсолютных значениях, так как учесть влияние всех факторов, воздействующих на ее амплитуду, не представляется возможным. Интенсивность флюоресценции относительная характеристика динамических изменений в клетке, обусловленных воздействием внутренних и внешних факторов на ее жизнедеятельность.

Собственная флюоресценция происходит без использования флюорохромов за счет свечения аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина) и белков при возбуждении в области спектра 280—300 нм [10]. Спектр флюоресценции наблюдается также в ультрафиолетовой области (300—400 нм). На субклеточно-органомном уровне наиболее ярко светятся митохондрии. Следует отметить, что безъядерные эритроциты не флюоресцируют.

Флюоресценция, кроме рассмотренных параметров интенсивности и спектра, обладает поляризацией. Если в качестве источника излучения используется лазер, характеризующийся линейной поляризацией, то флюоресценция клеток также поляризована. Изменение поляризации прослеживается во время роста и деления клеток, ферментных реакций и т. д.

Изучение поляризации флюоресценции может дать информацию о тонких механизмах и процессах, происходящих в клетке. Отмечается практическая ценность подобных данных и показывается, что исследование цитоплазматической структуры лимфоцитов позволило обнаружить существенные отличия при лейкозах [132, 253]. На основе этих данных была предпринята попытка создать флюоресцентный поляриметр, предназначенный для измерения степени деполаризации света. С помощью предлагаемой методики обнаруживались злокачественные клетки на ранних стадиях malignизации, в частности при заболеваниях крови. При облучении лимфоцитов (окрашенных флюоресцендиацетатом — FDA) поляризованным светом измерялась степень деполаризации. Затем в образец вводили специфические белки и повторяли измерения. Сравнение результатов измерений до и после введения белков позволяет, по данным авторов, судить о развитии ракового процесса у пациента. Степень поляризации определялась по отношению разности к сумме горизонтальной и перпендикулярной составляющих флюоресценции, как показано в гл. 1. Однако отмечается, что дальнейшего развития предлагаемая методика не получила, что, видимо, объясняется неучтенным влиянием различных факторов подготовки препаратов. Тем не менее исследование деполаризации флюоресценции клеток является одним из эффективных методов определения цитоплазматической микровязкости, ферментных

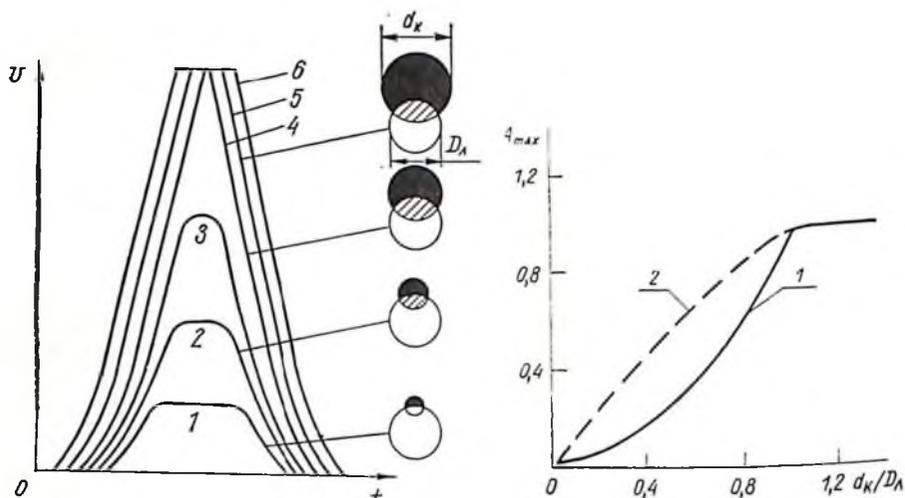


Рис. 36. Форма видеопульса флюоресценции в зависимости от отношения  $d_k/D_l$  при постоянной скорости потоков и круглой форме луча:  
 1 — 0,4, 2 — 0,6, 3 — 0,8, 4 — 1,0, 5 — 1,2, 6 — 1,4

Рис. 37. Зависимость максимальной амплитуды видеопульса от соотношения диаметров клетки и луча:  
 1 — равномерная интенсивность по лучу, 2 — распределение интенсивности по закону Гаусса

реакций, тонких процессов дифференцировки и деления клеток, который пока не получил должного развития.

Электрический импульс, обусловленный флюоресценцией клетки во время пересечения ею лазерного луча, может быть зарегистрирован под любым углом по отношению к направлению излучения. При условии равномерного распределения плотности мощности по сечению лазерного луча круглой формы амплитуда импульса флюоресценции пропорциональна части луча, падающей на площадь поперечного сечения клетки и перпендикулярной к его направлению. Длительность импульса по его основанию рассчитывается по формуле

$$d_k + D_l = vt, \quad (27)$$

где  $v$  — скорость потока суспензии;  $d_k$  — диаметр клетки,  $D_l$  — диаметр лазерного луча.

В зависимости от соотношения диаметров клетки и луча существенно меняется форма импульса флюоресценции (рис. 36).

Полученные импульсы могут быть проанализированы с целью определения максимальных амплитуды, площади, длительности. Рассмотрим указанные параметры на примере простой модели: круглого лазерного луча с равномерно распределенной плотностью мощности по сечению и круглой клетки с равномерно распределенным флюоресцентным веществом по площади. Зависимость приве-

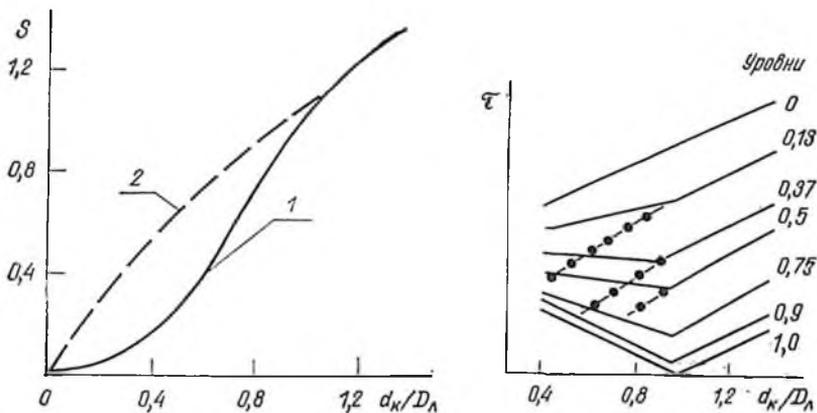


Рис. 38. Зависимость площади видеопульса от соотношения диаметров клетки и луча:  
 1 — равномерная интенсивность по лучу, 2 — распределение интенсивности по закону Гаусса

Рис. 39. Зависимость длительности видеопульса от  $d_k/D_l$  для различных уровней квантования при равномерной интенсивности по лучу: — амплитудонезависимый анализ, фиксированный уровень

денных значений максимальной амплитуды импульса флюоресценции от соотношения диаметров клетки и луча приведена на рис. 37. Приведенные данные указывают что значение максимальной амплитуды растет с увеличением диаметра клетки до значения, когда диаметры луча и клетки становятся равны. Кривая роста максимальной амплитуды  $A_{max}$  в зависимости от роста отношения диаметров  $d_k/D_l$  после точки  $d_k = D_l$  претерпевает излом и значение максимальной амплитуды остается постоянным, несмотря на увеличение размера клетки. Если в модель внести изменения и предположить, что плотность мощности изменится по сечению луча по закону Гаусса, то кривая указанной зависимости существенно спрямляется. Поскольку в реальных проточных цитофлюориметрах используются одномодовые лазеры с гауссовым распределением плотности, мощности, можно ожидать, что характеристика преобразования в режиме максимума амплитуды будет более линейризована по сравнению с рассмотренной выше моделью.

Площадь импульсов при увеличении диаметра клетки возрастает подобно максимальной амплитуде, за исключением характера изменения хода кривой в области  $d_k > D_l$  (рис. 38). Следует также отметить, что изменение скорости протока сказывается на площади импульса, в то время как максимальное значение амплитуды является параметром, независимым от скорости протока. Определение длительности импульса может служить характеристикой размера клетки. Ее значение определяется на двух уровнях: фиксированном уровне амплитуды импульса (уровень квантования) и на заранее заданном ее относительном уровне. Амплитудонезависимый анализ длительности (рис. 39) для круглого луча с равномерной

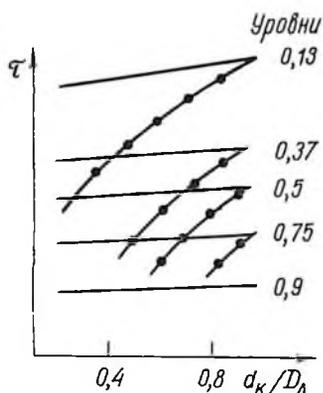


Рис. 40. Зависимость длительности видеопульса от  $d_k/D_\lambda$  для различных уровней квантования при распределении интенсивности по закону Гаусса — амплитудонезависимый анализ, фиксированный уровень

плотностью мощности по его сечению показывает, что при размерах клетки меньше диаметра луча величина длительности импульса в зависимости от уровня квантования имеет сложный характер. Если при низких уровнях квантования длительность уменьшается прямо пропорционально снижению размера клетки, то при высоких она даже растет, хотя размер клетки падает.

При фиксированных уровнях квантования это явление не наблюдается. Однако следует отметить, что диапазон изменения существенно зависит от значения фиксированного уровня. Из сказанного выше можно сделать вывод, что амплитудонезависимый анализ длительности импульса может привести к существенной ошибке, поэтому в случае  $d_k < D_\lambda$  использовать его не рекомендуется.

Учет гауссового распределения плотности по сечению луча оказывает существенное влияние на зависимость длительности импульса от отношения диаметров клетки и луча при амплитудонезависимом анализе. Характеристики в этом случае свидетельствуют о линейной зависимости рассматриваемых параметров (рис. 40).

## ОПТИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ПРОТОЧНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ

В цитологии применяются анализаторы с двумя группами оптических схем: узкощелевые (slit scan) и с широким лучом. Предложенное деление условно, потому что принципиального различия для такой классификации не существует, за исключением соотношения диаметров клетки и луча. При режиме slit scan параметр  $d_k/D_\lambda < 1$ . Узкощелевой режим предназначен для тех случаев, когда внутренняя структура клетки представляет интерес. Это высокоразрешающий метод.

На примере импульсного цитоанализатора 1СР-21 рассмотрим основные принципы построения оптических систем [173]. Основной частью прибора является люминесцентный микроскоп, на столике которого размещена проточная камера (см. рис. 23). Излучение ртутной лампы фокусируется на отверстие, через которое подается суспензия клеток. В момент появления клетки в плоскости отверстия на фотоприемнике регистрируется импульс, амплитуда которого зависит от интенсивности флуоресценции. При использовании интерференционных зеркал можно исследовать флуоресценцию на различных длинах волн, в том числе определить спектр собственной флуоресценции (без дополнительной окраски флуорохромом). Погрешность при таком методе измерения обусловлена в

основном шумами дугового источника света, нестабильностью положения клетки относительно центра отверстия, а также трудностью фокусировки светового пятна с равномерной интенсивностью по всей площади отверстия.

Схематически оптическая схема проточного анализатора [276—278], представляемого как пример проточной системы типа slit scan, приведена на рис. 41. В качестве источника используется Ag-лазер либо ртутная лампа. Лазерный луч с помощью цилиндрической линзы фокусируется на предметном стекле микроскопа в полоску 3 мкм. Суспензия с клетками подается на предметное стекло под углом 70°. Следует отметить способ измерения рассеяния лазерного луча клетками. Использование объектива позволяет собрать рассеянное и флюоресцентное излучение в конусе темного поля, расположенного внутри конуса прошедшего лазерного луча.

Угол сбора 90°. С помощью диафрагмы его можно регулировать. Подача суспензии осуществляется под давлением, создаваемым с помощью шприца, приводимого в движение двигателем. С целью исключения агрегации шприц установлен иглой вверх. Внутри шприца предусмотрено устройство типа магнитной мешалки, обеспечивающей равномерную концентрацию суспензии во время исследования. Стабильность источника питания не менее 0,2 %, при этом коэффициент вариации определяемых параметров 0,2 %.

В приборе Cytofluorograf Systems 30/50 (рис. 42) положение клетки стабилизируется за счет гидродинамической системы. Проточная камера 1, 2 установлена внутри цилиндрического пьезоизлучателя 3, который обуславливает дробление суспензии на капли [32]. Во внутреннем капилляре находится суспензия клеток, которая подается под давлением из сосуда 5. Сжатый воздух поступает из магистрали или компрессора через редуктор 6. Во внешний капил-

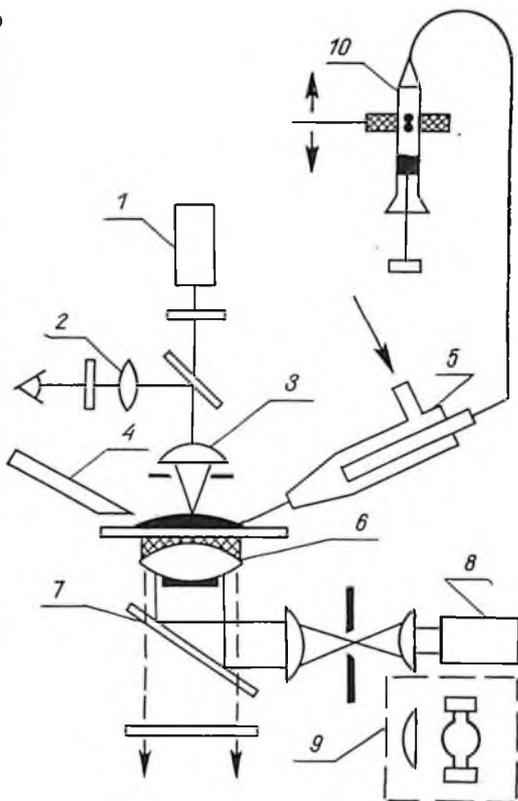


Рис. 41. Оптическая схема проточного цитофлюориметра:

1 — ФЭУ, 2 — канал наблюдения, 3 — объектив (25;  $A=0,35$ ), 4 — отсос, 5 — проточная камера, 6 — инвертируемый объектив (40x;  $A=1,3$ ), 7 — дихроичное зеркало, 8 — лазер, 9 — ртутная лампа, 10 — шприцевая система подачи суспензии с магнитной мешалкой

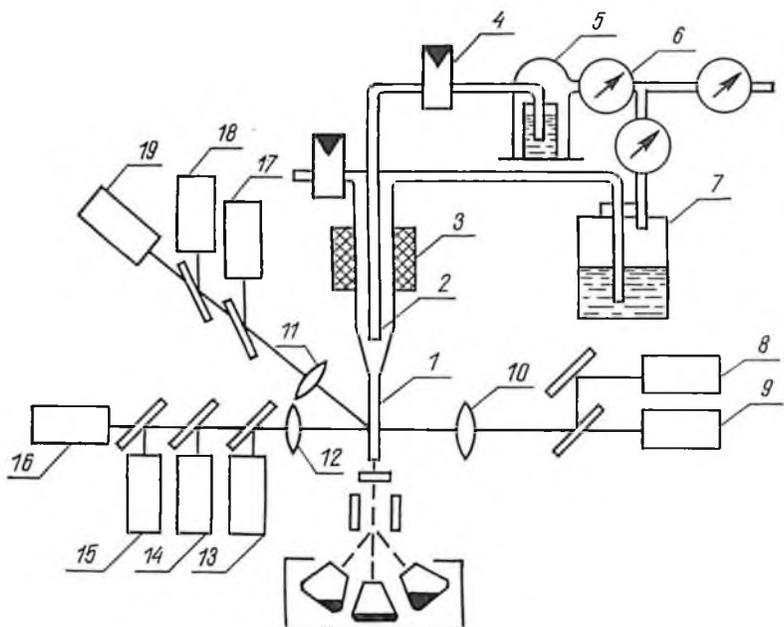


Рис. 42. Оптическая схема цитофлюорографа 30/50

ляр подается физиологический раствор из сосуда 7 также за счет избыточного давления. Излучение двух лазеров (He—Ne и Ar) совмещается на одной оптической оси и фокусируется на проходящий поток клеток с помощью цилиндрических линз 10 в виде узкой полоски. Прошедшая часть лазерного излучения собирается линзами 11, 12, установленными под углом  $90^\circ$  друг к другу, с помощью интерференционных зеркал и волоконных световодов на ФЭУ. Причем по каналу 13 воспринимаются потери лазерного луча, по всем остальным каналам может регистрироваться либо флюоресцентный сигнал, либо сигнал рассеяния в зависимости от типа зеркал. Большое внимание уделяется обеспечению параллельности плоских стенок четырехгранной кюветы с целью исключения бликов и достижения высокого оптического разрешения.

В проточных анализаторах размеры частиц определяются, как было отмечено, по длительности электрического импульса в каналах рассеяния, поглощения или флюоресценции. Предварительная калибровка с помощью биологических эталонов или латексных микрочастиц позволяет определять размеры в абсолютных единицах. Однако изменение скорости потока суспензии вносит существенную погрешность, уменьшение которой возможно в многолучевых проточных приборах с несколькими лазерами или же в схемах с раздвоением лазерного луча. В оптической схеме цитофлюориметра, в котором воплощен указанный метод коррекции, линейно поляризованное излучение He—Ne лазера 4 преобразуется в поляризованное по кругу с помощью четвертьволновой пластинки 5

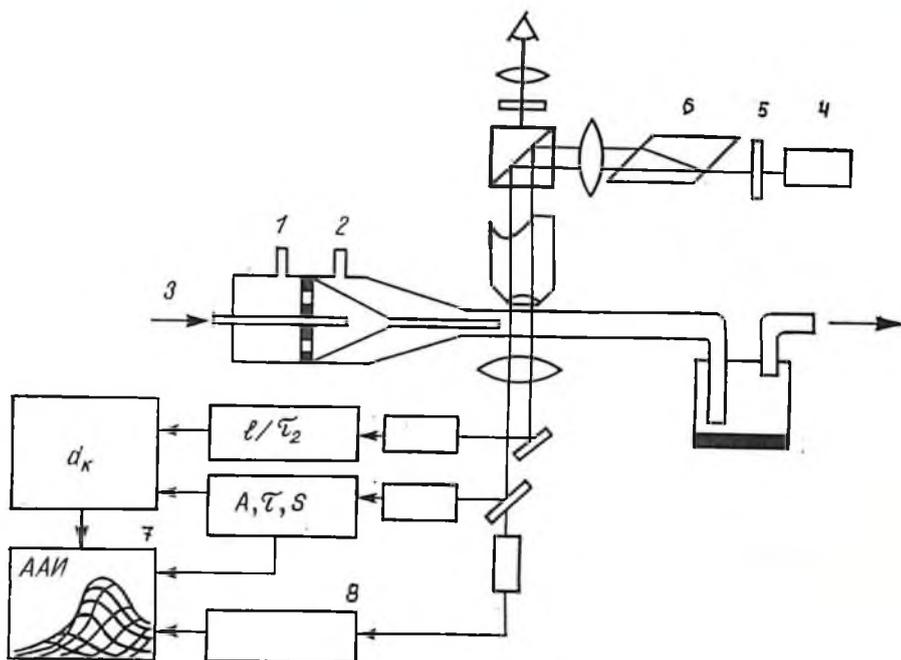


Рис. 43. Оптическая схема цитофлуориметра на базе микроскопа:

1, 2 — оболочка, 3 — суспензия с клетками, 4 — лазер, 5 — четверть волновая пластина, 6 — кристалл кальцита, 7 — амплитудный анализатор, 8 — усилитель канала рассеяния

(рис. 43). С помощью кристалла кальцита *б* луч лазера разделяется на две равноинтенсивные части, отстоящие друг от друга на несколько десятков микрон. При пересечении клеткой полученных лучей образуются два импульса с временным промежутком между ними  $\tau_2$ .

Для определенной скорости задается окно для интервала  $\tau_2$ . В случае изменения скорости потока появляется отклонение от заданного значения и электронные устройства вносят поправку в результат определения диаметра клеток. Контроль за скоростью потока определяется по формуле

$$d_k = \frac{\tau_1}{\tau_2} \cdot l - D_l, \quad (28)$$

где  $\tau_1$  — длительность импульса на самых малых уровнях квантования;  $\tau_2$  — временной интервал между импульсами;  $l$  — расстояние между фокальными точками лучей;  $D_l$  — диаметр лазерного луча.

Поправка вносится после определенного периода интегрирования. Динамическая коррекция позволяет получить распределение абсолютных размеров клеток без калибровки внешними эталонами путем введения поправки на скорость потока.

С целью повышения эффективности сбора флуоресцентного сигнала и исключения влияния ориентации клеток были предложены

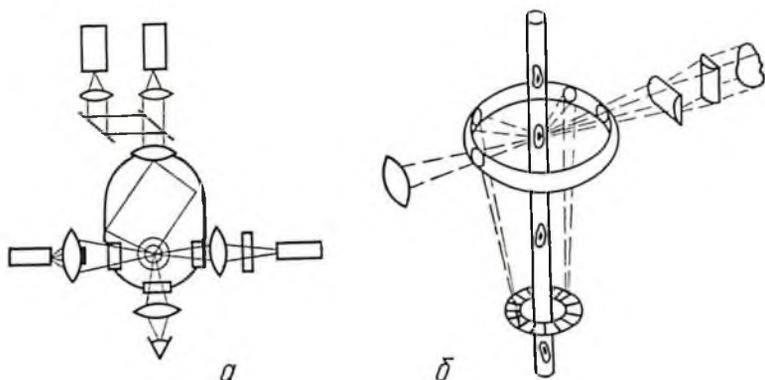


Рис. 44. Оптические схемы проточных систем с отражателями:  
 а — эллипсоидальным, б — кольцевым

эллипсоидальные отражатели, окружающие проточные камеры [272]. Внутренние поверхности этих отражателей покрываются золотой пленкой с целью повышения отражательной способности стенок. Для ввода лазерного излучения в стенках отражателя имеются отверстия, закрытые кварцевыми окнами. Точка пересечения клетками лазерного луча, сфокусированного в виде полоски  $5 \times 50$  мкм, совмещается с фокусом эллипсоида. Второй фокус совмещается с апертурой приемника, рассеянное излучение исключается оптическим фильтром (рис. 44, а). Такая проточная система позволяет повысить эффективность энергосброса до 60 % по сравнению с известными проточными системами, характеризуемыми энергосбросом от 2,5 до 30 %.

Модификация рассматриваемой системы приведена на рис. 44, б [111]. В этой конструкции используется только часть эллипсоидальной поверхности отражателя в виде кольца. Отраженные части рассеянного и флуоресцентного сигналов направляются на кольцевой фотоприемник, обеспечивая регистрацию индикатрисы излучения при величине угла  $0^\circ - 360^\circ$ . Кольцевой секционный фотоприемник, который может быть применен в этом случае, позволяет исследовать тонкую структуру рассеянного излучения.

При необходимости облучения клеток в широком диапазоне длин волн применяют несколько лазеров. С помощью интерференционных зеркал излучение от лазеров ориентируется так, чтобы клетки при прохождении в потоке пересекали лучи одновременно или последовательно. Если лучи лазеров сведены в одну фокальную точку, то импульсы на фотоприемниках появляются в одно время, если фокальные точки от лазерных лучей разнесены по ходу потока, то получается некоторая задержка появления последующих импульсов, равная расстоянию между фокальными точками, деленному на скорость потока. Проточные системы при таком возбуждении назовем многолучевыми. Введение этого термина позволит упростить в дальнейшем понимание работы прибора.

В случае применения красителей, спектры возбуждения которых

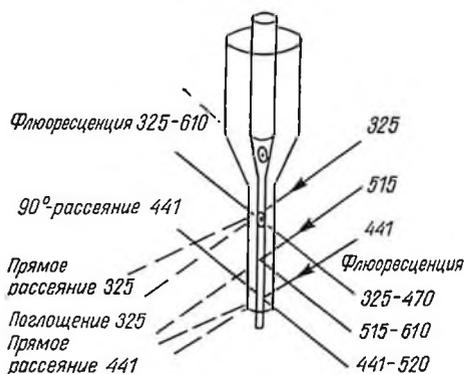


Рис. 45. Многолучевая проточная система

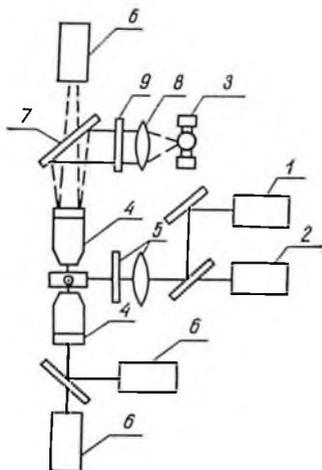


Рис. 46. Оптическая схема трехлучевой проточной системы:

1 — Ar-лазер, 2 — Sr-лазер, 3 — ртутная лампа, 4 — объективы, 5 — цилиндрические линзы, 6 — ФЭУ, 7 — дихроничное зеркало, 8 — конденсор, 9 — фильтр

существенно отличаются друг от друга, а спектры флюоресценции перекрываются, исследовать флюоресценцию каждого красителя методом интерференционных зеркал не представляется возможным. Для этого целесообразно рекомендовать использование оптической схемы с пространственно разнесенными лазерами и возбуждением флюоресценции клеток в разных точках струи, обеспечивающим временное разделение импульсов флюоресценции.

Способ возбуждения клеток несколькими лучами реализован в Cytofluorograph, в состав которого включены аргоновый и гелий-кадмиевый лазеры (488 и 441 нм соответственно), и системе FACS-II с аргоновым и криптоновым лазерами (488 и 350 нм).

В проточных камерах, возбуждаемых тремя лазерными лучами, расстояние между которыми составляет 100 мкм, каждый луч фокусируется в полоску 20 мкм (рис. 45). Выбраны следующие лазеры: гелий-кадмиевый (325 нм), аргоновый (515, 441 нм) и гелий-неоновый. При возбуждении клеток излучением с длиной волны 345 нм измеряются ослабление (extinction), малоугловое рассеяние, а также флюоресценция на длине волны 470 нм. Красная флюоресценция (610 нм) возбуждается на длине волны 515 нм. Малоугловое и «90°-рассеяние» определяются на длине волны 441 нм. Основным достоинством многолучевых проточных систем является возможность исследования корреляции множества признаков для суспензии клеток (клинического материала), представляющей смесь различных популяций.

Для точной классификации клеток в смешанных популяциях порой необходимо исследовать ряд параметров: размеры клетки и ядра, коэффициенты формы, состояние ядерного и цитоплазматического

ческого матрикса и цитоплазматических гранул для каждой клетки. Задача автоматизации цитологических исследований обуславливает многопараметрический анализ клеток и приводит к созданию сложных проточных систем.

В качестве примера можно привести результаты исследования суспензии клеток слизистой оболочки цервикального канала, окрашенного двумя красителями: DAPI и SR 101, связывающихся с ДНК и протеином. Указанные флюорохромы селективны. DAPI обеспечивает яркую флюоресценцию белого света при возбуждении 350 нм, SR 101 — красную при возбуждении 500 нм. Суспензия клеток цервикального материала дает четкую картину с ярко светящимися белым светом ядрами и красной цитоплазмой.

Проточная камера, представленная на рис. 46, включает два лазера: аргоновый (488 нм), криптоновый (530 нм) и ртутную лампу (100 Вт). Оптическая схема прибора выполнена по принципу люминесцентного микроскопа с эписвещением. Известно, что спектр ртутной лампы имеет несколько полос. Лазеры излучают только на определенных длинах волн. В связи с этим наличие нескольких источников расширяет диапазон облучения клеток начиная с ультрафиолетового участка. Кроме того, обеспечивается возможность более широкого выбора флюорохромоов. При таком исполнении прибор становится многофункциональным. Его разработка упрощается в связи с использованием серийных микроскопов, обеспечивающих применение высокоапертурных объективов и конденсорных линз. Правда, высокоапертурные объективы имеют малую глубину фокуса. Отсюда вытекают дополнительные требования к проточным камерам, в качестве которых рекомендуется применять прямоугольные капилляры или систему стекания струи по покровному стеклу микроскопа. И тем не менее рассматриваемая камера имеет существенные преимущества, обеспечивая исследования тонких микрообъектов типа хромосом, повышенный энергосбор излучения, уменьшение погрешности измерения, обусловленной ориентацией клеток, при обработке импульсов по площади.

### КАНАЛ СОРТИРОВКИ

Известны два типа сортировщиков клеток: механический и электронный. Общий принцип работы указанных устройств заключается в том, что клетки, взвешенные в жидкости, сначала анализируются оптическим способом, а затем клетки, электрические импульсы которых удовлетворяют заданным требованиям, выделяются из суспензии.

Проточная камера механического клеточного сепаратора напоминает обычный капилляр прямоугольной формы, за исключением Т-образной на выходном конце [217]. В плоскости изображения клетки устанавливается диафрагма, ее длина соизмерима с каналом камеры, а ширина может регулироваться с целью изменения разрешения, т. е. параметра  $d_{\text{к}}/D_{\text{л}}$ . Во время продвижения клетки по каналу на фотоэлектронном умножителе, установленном за диа-

фрагмой, появляется электрический импульс, который запускает сепараторный механизм. Микроклапаны, входящие в состав сепаратора, подсоединены к выходным концам Т-образной камеры. По приходящему сигналу их состояние изменяется, соответственно действуя на направление движения клетки. Повреждение клеток в микроклапанах не наблюдается. Фокальная точка объектива располагается на некотором удалении от точки сепарации. К недостаткам указанной системы сортировки следует отнести невысокую скорость, обусловленную инерционностью микроклапанов, а также обратным микродвижением жидкости во время их переключения. Поэтому механический клеточный сепаратор рекомендуется использовать при невысоких концентрациях микрообъектов в суспензии.

Принцип построения электронного сортировщика заключается в формировании однородных капель из ламинарного потока суспензии, заряде капель и их электростатическом отклонении. Каплеобразование осуществляется за счет акустического возмущения струи. Пьезоизлучатель устанавливается на проточную камеру, образуя с ней резонансную систему, колеблющуюся обычно на частоте 35—45 кГц. Эти колебания способствуют разрыву струи на определенном расстоянии от сопла камеры с образованием однородных капель. От момента пересечения луча клеткой до момента отрыва капли проходит обычно несколько сотен микросекунд. За это время в электронном устройстве осуществляются обработка электрических импульсов согласно правилу сортировки и формируется зарядный импульс, с амплитудой, составляющей сотни вольт. Теоретически и экспериментально было доказано, что отклонение капель после прохождения отклоняющих пластин зависит прямо пропорционально от полученного заряда. Величина отклонения капли определяется выражением

$$\Delta = \frac{q}{m} Et' \left( t'' + \frac{t'}{2} \right), \quad (29)$$

где  $m$  — масса капли;  $q$  — ее заряд;  $E$  — напряженность электростатического поля;  $t'$  — время пролета относительно отклоняющих пластин;  $t''$  — время пролета от пластин до собирающих сосудов.

Приведенная формула получена без учета аэродинамического сопротивления, влияния размеров капли и частоты акустических колебаний. Повышение частоты способствует уменьшению размера капли, а также ее заряда.

В известных проточных анализаторах с сортировкой предусматривается разделение суспензии на три фракции, одна из которых не отклоняется, а две другие отклоняются к знаку «плюс» или «минус» амплитуды зарядного импульса. Существует возможность создания сортировщика, способного точно разделять суспензию, разделяя клетки на большее количество фракций согласно их параметрам. Минимальное расстояние между такими клетками может быть не менее 30 их диаметров, что обусловлено растеканием капли с клеткой после падения на плоскую поверхность.

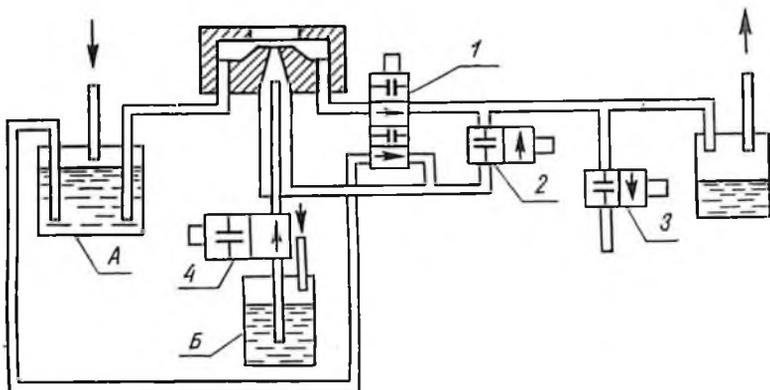


Рис. 47. Схема пневмогидравлической системы

Для микропозиционирования клеток компьютерная система должна управлять амплитудой зарядного импульса, задавая координаты положения клеток на предметном стекле. Предложение заманчиво тем, что реальное положение клеток будет отражать гистограмму исследуемого параметра.

Точность сортировки зависит от однородности каплеобразования. Акустические волны синхронизируют этот процесс, четко локализуя место разрыва потока. Присутствие клеток, особенно больших, в каплях вносит некоторое возмущение клеток. Если диаметр потока соизмерим с диаметром самых больших клеток, то происходит стабилизация положения клеток при продвижении большим размером вдоль оси потока.

### ПНЕВМОГИДРАВЛИЧЕСКИЙ КАНАЛ

Для обеспечения равномерной скорости протекания потока используется пневмогидравлическая система. В качестве примера приводится упрощенный ее вариант (рис. 47). Из сосуда А за счет избыточного давления поступает буфер. При прохождении буфера по камере суспензия с клетками подается из сосуда Б. В системе предусмотрены четыре гидравлических клапана (табл. 15).

Во время работы камеры клапаны 1, 4 открыты, обеспечивая прохождение буфера и суспензии через камеру. В момент засорения капилляра переключатели переводятся в положение «Очистка». При этом обратным ходом буфера промывается диафрагма камеры и через клапана 2 и 3 частица, обусловившая засорение, удаляется в сливной сосуд.

Таблица 15. Режимы работы ПГБ

| Режим   | Клапаны |     |     |     |
|---------|---------|-----|-----|-----|
|         | 1-й     | 2-й | 3-й | 4-й |
| Работа  | +       | -   | -   | +   |
| Очистка | -       | +   | -   | -   |

## ЭЛЕКТРОННАЯ СИСТЕМА

Согласно структурной схеме проточного анализатора сигналы фотоприемников поступают на предусилители и усилители (рис. 48). Возможны два способа обработки усиленных сигналов: аналоговый и цифровой. При аналоговой обработке импульс интегрируется и подается на амплитудный анализатор, регистрирующий максимальную амплитуду. Результаты исследования отображаются на экране дисплея в виде гистограммы максимальной амплитуды импульсов. При цифровой обработке амплитудоцифровой преобразователь формирует цифровую форму импульса в виде 8-битового слова [173]. В представленной схеме два 8-битовых слова от двух каналов измерения образуют 16-битовый адрес, указывающий один из 65536 входов просмотровой таблицы. Параллельно с этим информация подается на многопараметрический анализатор импульсов таким же образом, как в приборе FACS-IV. Правило сортировки формируется с помощью микрокомпьютера, при этом параметры гистограммы передаются с амплитудного анализатора, записываются в блок памяти изображения и воспроизводятся на цветном видеоконтрольном устройстве. Количество клеток кодируется цветом, имитируя частоту событий цветом изображения. Оператор с помощью джойстика и интерфейса обращается к микрокомпьютеру, задавая зоны и правила для сортировки клеток. На экране цветного дисплея отображается курсор, вычерчивающий границы отобранных зон. Память изображения организована из трех страниц  $256 \times 256 \times 1$  бит. Основным достоинством такого управления сортировкой является возможность выделения подпопуляции клеток по многопараметрической плоскости данных даже

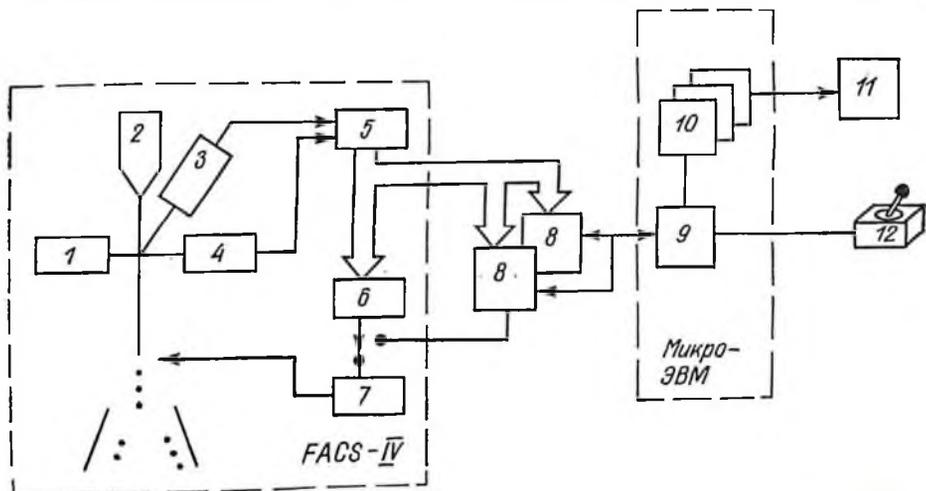


Рис. 48. Структурная схема макета проточного анализатора с двумя просмотрowymi таблицами (на базе FACS-IV):

1 — лазер, 2 — проточная система, 3, 4 — ФЭУ, 5 — АЦП, 6 — многопараметрический анализатор, 7 — устройство сортировки, 8 — просмотровая таблица, 9 — процессор, 10 — память изображения, 11 — ЦВКУ, 12 — джойстик (кнопель)

в случае перекрывающихся кластеров. По сравнению с прямоугольными электронными окнами прибора FACS-IV рассматриваемая система обеспечивает высокие эффективность и чистоту сортировки.

### ПОГРЕШНОСТИ

Требования к параметрам проточных систем определяются их применением. При решении определенных медико-биологических задач порой особое внимание уделяется какому-то одному параметру даже за счет ослабления требований к другим. Например, коэффициент вариации при исследовании ДНК должен быть не хуже 1 % для пика  $G_1$ . В то же время при определении антител на поверхности клетки важнее зарегистрировать слабую флюоресценцию. Поэтому при разработке и настройке прибора для иммунологического анализа необходимо добиться высоких чувствительности и помехозащищенности схем. В этом случае на исследуемой амплитуде слабого сигнала начинают сказываться флюоресценция фильтров и потока, паразитное рассеяние, собственная флюоресценция клеток и их положение в потоке. Все эти факторы ограничивают точность измерения.

В системах, предназначенных для изучения микрообъектов типа хромосом, бактерий, вирусов, следует максимально сужать размер луча, используя иммерсионные объекты и диафрагмы в плоскости изображения. Поскольку точность измерений обычно не превышает 1—2 %, то в проточных системах достаточно использовать 256-канальные амплитудные анализаторы и 8-разрядные АЦП.

Большое влияние на точность измерений оказывает ориентация клеток. Важно стабилизировать их положение в потоке. Известно, что клетки ориентируются большим размером вдоль оси потока. Однако в поперечной плоскости они могут находиться в любом положении при условии симметричности выходного окна сопла. Если окно выполнено в виде прямоугольника, то большинство клеток ориентируется за счет асимметричности дополнительных сил гидродинамической струи. Причем клетки будут выстраиваться большим размером параллельно большей стороне прямоугольного окна. Такое конструктивное решение позволяет добиться устойчивой ориентации более 90 % клеток.

Эффективность систем сортировки всецело зависит от процесса отрыва капель. Присутствие клеток дестабилизирует его. Это сказывается на положении капли, ее размере и величине заряда и как следствие — на траектории полета капли. Разброс в размерах клеток приводит к различной величине этого отклонения. Причем большие клетки вызывают ускоренный отрыв капель. Ультразвуковые колебания, передаваемые от пьезоизлучателя, ускоряют процесс разрыва струи и самое главное — синхронизируют его. Дробление струи происходит на определенном расстоянии, зависящем от амплитуды колебаний. При уменьшении мощности увеличивается длина, на которой происходит этот отрыв.

---

## КОГЕРЕНТНО-ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Открытие лазеров привело к зарождению нового подхода в изучении клеток, базирующегося на методах когерентной оптики. Появились способы и приборы для исследования строения и подвижности микрообъектов в средах, в которых они обычно находятся, что было невозможно при сканирующих методах анализа. Исключение специальных методов обработки, присущих электронной и оптической микроскопии, включающих фиксацию, обезвоживание и окраску, способствовало повышению точности измерения параметров живых клеток. С появлением лазера арсенал методов цитологических исследований пополнился нелинейной лазерной спектроскопией сверхвысокого разрешения, характеризующейся высокой чувствительностью при измерении спектров флюоресценции, лазерной спектроскопией в сочетании с масс-спектрометрией с чрезвычайно тонкой чувствительностью по обнаружению незначительных концентраций веществ в клетке, лазерным доплеровским способом измерения подвижности биочастиц, голографическим способом отображения и т. д.

В этой главе обсуждаются некоторые вопросы микрохирургии клетки, кратко рассматриваются методы лазерного спектрального микроанализа, а также дифракционный анализ клеток.

### МИКРОХИРУРГИЯ КЛЕТКИ И ЛАЗЕРНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Сочетание в одном приборе лазера с микроскопом привело к созданию микроманипулятора, позволяющего проводить микрохирургические операции на уровне клетки. Фокусировка когерентного монохроматического излучения в пятно, диаметр которого ограничивается дифракционным пределом, позволяет достигнуть энергетических плотностей, намного больших по сравнению с таковыми для излучения некогерентных тепловых источников. Уникальность микролучевой лазерной установки заключается также в возможности концентрации энергии на малых площадях, составляющих доли микрона, и кратковременности воздействия. Длительность импульса лазера с модулированной добротностью составляет пикосекунды. Аналогов среди некогерентных источников по созданию такого «микроукола» до лазера не было.

Механизм воздействия лазерного излучения на клетку имеет сложную природу [119]. Появление микролучевых лазерных приборов способствует решению многих вопросов. Например, было определено, что повреждение органелл клетки вызывается при воздействии сфокусированным лазерным лучом либо за счет поглощения, либо за счет фотохимических процессов. Эффект влияния лазерного излучения зависит также от сенсibilизатора, которым окрашивается клетка до облучения. Поскольку органеллы характеризуются избирательным поглощением красителя, для которого может быть подобран лазер, обеспечивающий максимальное поглощение, то опосредованно можно таким образом воздействовать на органеллы, не поглощающие лазерное излучение. Этот метод воздействия назван вторичным индуцированным эффектом.

Кроме названных эффектов, следует отметить влияние акустической составляющей при воздействии импульсного лазерного излучения, термокоагуляцию, ионизацию, влияние электрической составляющей сильного электромагнитного поля [118, 119, 230].

Как отмечалось, получение минимального диаметра лазерного луча, прошедшего через объектив микроскопа, зависит от параметров объектива и длины волны излучения (см. гл. 1). Теоретически можно получить пятно с радиусом порядка длины волны [145]. Взаимодействие лазерного излучения с микрообъектом при высоких плотностях мощности, достигаемых в результате такой острой фокусировки, приводит к образованию плазменных факелов, испарению и выбросу вещества с поверхности микрообъекта с образованием кратеров. Наблюдаемые эффекты в основном зависят от плотности мощности, режима и длины волны излучения лазера и не зависят от поляризации и когерентности, так как основной вклад во взаимодействие вносит тепловое превращение излучения. При облучении сфокусированным лазерным лучом одиночной клетки наблюдается локальная область воздействия, размеры которой меньше размеров сфокусированного пятна. Это объясняется тем, что энергетическая плотность по сечению луча распределена обычно неравномерно (по закону Гаусса). Отсюда эффективное поглощение, связанное с изменением состояния вещества клетки, происходит только в определенной части лазерного пятна.

Известные до настоящего времени микролучевые лазерные комплексы использовались для решения следующих задач:

микроманипуляционных воздействий сфокусированным лазерным лучом на структурные элементы (в том числе повреждение отдельных органелл) с целью исследования их функционального назначения и изучения физиологических режимов клетки;

исследования эффектов взаимодействия лазерного излучения с биоструктурами клетки.

Метод микрооблучения дает возможность избирательно облучать компоненты живой клетки. Избирательность лучевого поражения определяется не только тонкой пространственной локализацией, но и специфичностью действия света различных длин волн. Подбирая длину волны излучения, можно поражать в зоне облу-

чения определенные компоненты, например нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК), белки, содержащие ароматические аминокислоты, пигментированные или окрашенные витальными красителями структуры.

В микролучевой установке [29] лазерный луч с помощью конденсатора фокусируется на объекте снизу (рис. 49, а). Наблюдение и фоторегистрация производятся через окуляр. В этом приборе предусмотрен измеритель лазерного излучения. Часть луча, прошедшего через объект, ответвляется с помощью делительной пластины и подается на баллистический калориметр или фотодиодный детектор.

Оптическая схема установки выполнена по другому принципу (рис. 49, б). Лазерный луч в этом случае подается сверху через окуляр и объектив, в схему включен модулятор с зеркалом. Зеркало вращается с определенной скоростью. Когда отверстие зеркала находится на оси микроскопа, лазерный луч фокусируется на объекте. Если же зеркало перекрывает оптическую ось, то изображение полностью ответвляется от зеркальной поверхности на телевизионную камеру и отображается на видеоконтрольном устройстве. Мелькание изображения на экране ВКУ не наблюдается, если частота модуляции превышает частоту кадровой развертки. Освещение объекта, как и в предыдущей схеме, производится снизу монохроматом либо обычной лампой накаливания.

К достоинствам рассматриваемой схемы следует отнести возможность непрерывного наблюдения изображения объекта и защиты глаз оператора от лазерного излучения.

При использовании аргонового лазера ( $P=1$  Вт,  $t=1$  мкс), объектива  $\times 100$  и окуляра  $\times 10$  было получено пятно с диаметром 0,5 мкм, причем энергия в пятне на фокальной плоскости была порядка 10—15 кДж.

В случае, когда лазер имеет запас мощности, для микролучевой установки может быть выбрана схема, в которой модулятор с вращающимся зеркалом заменен на интерференционный фильтр, отражающий часть лазерного луча (свыше 90 %) по направлению к объекту и пропускающий меньшую часть на измеритель (рис. 49, в). Освещение объекта осуществлено снизу от источника.

Измерение на этой установке показало, что на объект поступает примерно 53 % выходной энергии лазера. Наименьший размер укола получали при обрезании «хвостов» гауссова распределения энергии, используя нейтральные фильтры. Введением нейтрального 50%-ного фильтра диаметр укола снижался от 1 до 0,5 мкм.

Лазерный микролучевой аппарат [89] позволяет производить точное облучение выбранных участков микрообъекта, а также измерять поглощенную микрообъектом энергию излучения. Схема электрическая структурная лазерного микролучевого аппарата приведена на рис. 49, г. В системе используются неподвижное сменное дихроничное зеркало и диск-ловушка с непрозрачными светопоглощающими выступами и вырезами.

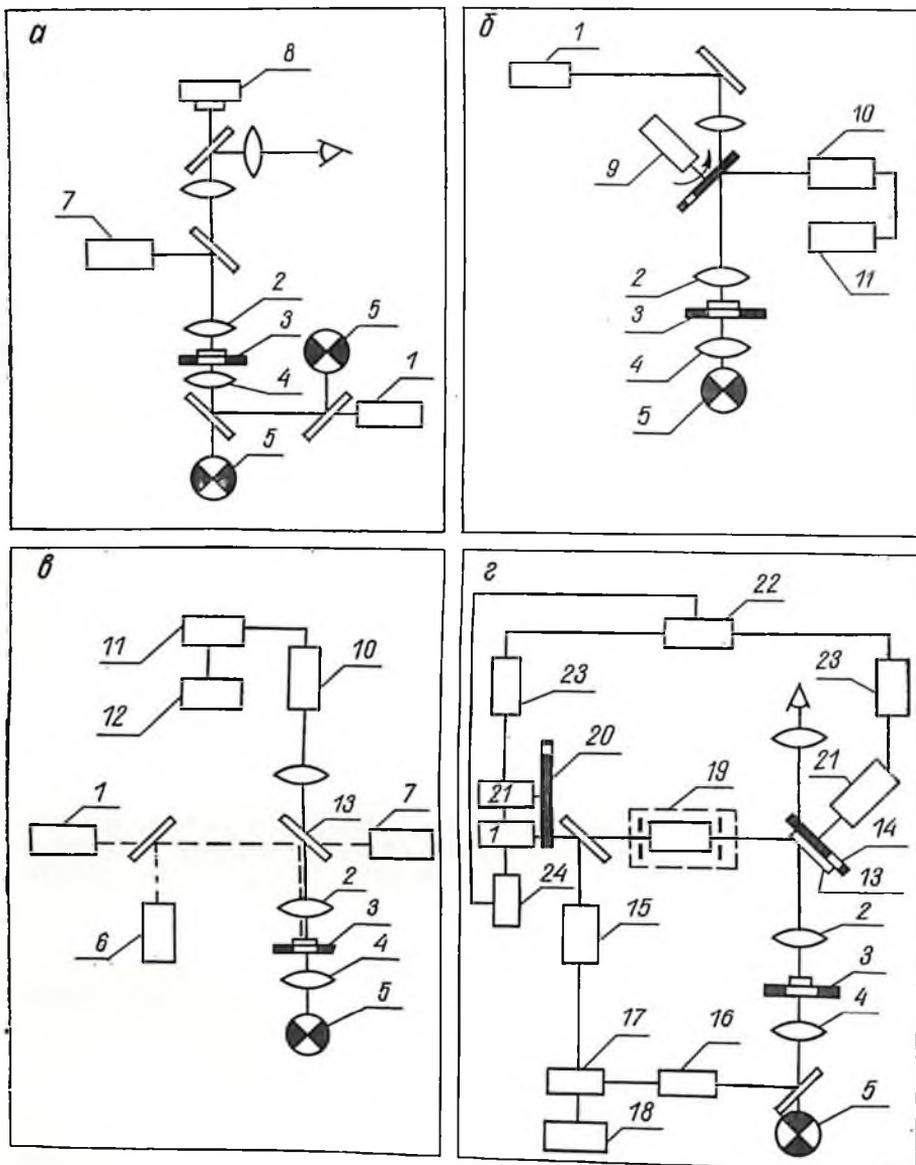


Рис. 49. Оптические схемы микролучевых лазерных установок а — г:

1 — лазер, 2 — объектив, 3 — объект, 4 — конденсор, 5 — подсвет, 6 — имитатор, 7 — измеритель, 8 — фотоаппарат, 9 — модулятор, 10 — телевизионная камера, 11 — ВКУ, 12 — видеоманитофон, 13 — дихроичное зеркало, 14 — телевизионная камера, 15, 16 — фотоприемники, 17 — схема сравнения, 18 — регистратор, 19 — фокусирующая система, 20 — второй диск, 21 — двигатель, 22 — синхронизатор, 23 — коммутаторы, 24 — блок питания

Измеритель поглощенной энергии выполнен в виде двух светоделительных пластин, одна из которых установлена на выходе конденсора, двух фотоприемников излучения, выходы которых соединены со входами схемы сравнения. Выход схемы сравнения соединен с регистрирующим прибором.

Аппарат работает следующим образом. Излучение лазера через фокусирующую систему передается на дихроичное зеркало. Отразившись от него, излучение фокусируется объективом на микрообъекте. Световая информация об объекте через объектив и зеркало передается в окуляр. Безопасность работы исследователя обеспечивается тем, что между зеркалом и окуляром помещается диск-ловушка, который вращается синхронно с подобным диском, установленным на выходе лазера, работающим в режиме непрерывной генерации. При работе лазера в импульсном режиме вращение диска синхронизировано с частотой повторения импульсов излучения, а диск, установленный после лазера, в этом случае не работает. Форма и размеры выступов и вырезов дисков выбираются с учетом формы и длительности импульсов излучения оптического квантового генератора и с учетом задержки отраженного от микрообъекта излучения. Синхронное перемещение дисков-ловушек осуществляется шаговыми двигателями, которые управляются синхронизатором с коммутаторами.

При измерении энергии излучения, поглощенной микрообъектом, осуществляется сравнение величин падающей на микрообъект и прошедшей через него энергии. Для этого часть излучения отводится светоделительными пластинами и направляется на входы фотоприемников, сигналы с которых подаются в устройство сравнения. Разностный сигнал, пропорциональный поглощенной микрообъектом энергии излучения, подается в регистрирующий прибор.

Один из вариантов исполнения оптико-механической системы светоделения [90] выполнен в виде двух соосных пучков лазерного излучения коаксиально расположенных отражающих конусов (внутреннего и внешнего), обращенных отражающими поверхностями один к другому, а вершинами к выходу пучка оптического квантового генератора. Пучок лазерного излучения генератора формируется отражающими конусами в кольцеобразный и зеркалом направляется в объектив микроскопа, который фокусирует излучение на объекте периферийной частью. Центральной частью объектива формируется изображение микрообъекта, которое наблюдается в окуляре микроскопа. Освещение микрообъекта производится с помощью источника света и конденсора микроскопа. Приведенная система позволяет одновременно производить наблюдение и облучение микрообъекта.

Высокие значения плотности мощности, которые достигаются при фокусировке лазерного излучения, позволяют применить лазер в области атомного спектрального анализа. Атомы веществ образцов при воздействии мощного лазерного излучения переходят в газообразное состояние, ионизируются и испускают характерные линейчатые атомные спектры. Известны два метода определения

оптических атомных спектров: абсорбционный и эмиссионный. При атомном абсорбционном спектральном анализе зондирующий луч пропускается через облако паров, образующихся над местом воздействия лазерного луча. Плотность мощности лазерного излучения подбирается такой, чтобы образовывались нейтральные атомы. Это позволяет регистрировать спектры поглощения. Анализ спектра выявляет состав элементов в облаке паров образца. При плотностях мощностей  $10^8$ — $10^9$  Вт/см<sup>2</sup> облако паров облученного вещества превращается в светящийся факел. Эмиссионный спектр этого свечения является линейчатым атомным, зависящим от химических элементов, присутствующих в образце. Это излучение регистрируется лазерным эмиссионным спектральным микроанализатором, состоящим из микролучевой лазерной установки, совмещенной со спектрографом.

Микроанализ атомного состава образца может быть выполнен с помощью масс-спектрометра, принцип работы которого заключается в пространственном разделении ионов в электрическом и магнитном поле. В этих приборах лазер играет роль источника образования плазмы. Ионы, образовавшиеся при испарении микрочастей клетки, ускоряются электрическим полем и в электростатическом анализаторе фокусируются по энергиям. В магнитном анализаторе они распределяются по массам и в дальнейшем регистрируются на фотопленке. Такой прибор позволяет послойно анализировать клетку по глубине до сотен микрон. Причем одновременно определяется состав элементов периодической таблицы Д. И. Менделеева [15]. Масс-спектральные исследования ионов позволяют определить наличие  $10^{-12}$  г элемента в клетке. Такой точный микроанализ элементов представляет особый интерес при исследовании сложных, многокомпонентных биологических микрообразцов, их идентификации.

Сочетание лазера и микроскопа послужило основой создания микролучевых лазерных видеоцифровых анализаторов, предназначенных для изучения структурных особенностей клеток. Фактически только после применения лазера стала возможной разработка таких тонких методов медико-биологического исследования, как флюоресцентный фотолиз [180]. Суть метода заключается в облучении локальных участков живых клеток, например поверхности их мембран, и последующего измерения времени восстановления флюоресценции после фотопросветления. Определение трансформационной диффузии и переноса веществ с поверхности в глубь клеток имеет большое значение в решении ряда проблем, в том числе при выявлении взаимодействия гормонов и факторов роста с рецепторами поверхности клеток, исследовании аномального механизма регулирования роста раковых клеток, движения органелл клеток.

Оптическая схема цифрового флюоресцентного микроскопа по способу возбуждения флюоресценции напоминает микролучевую систему, представленную на рис. 50. Включение в схему пространственной фильтрации лазерного луча, чувствительного видеотеле-

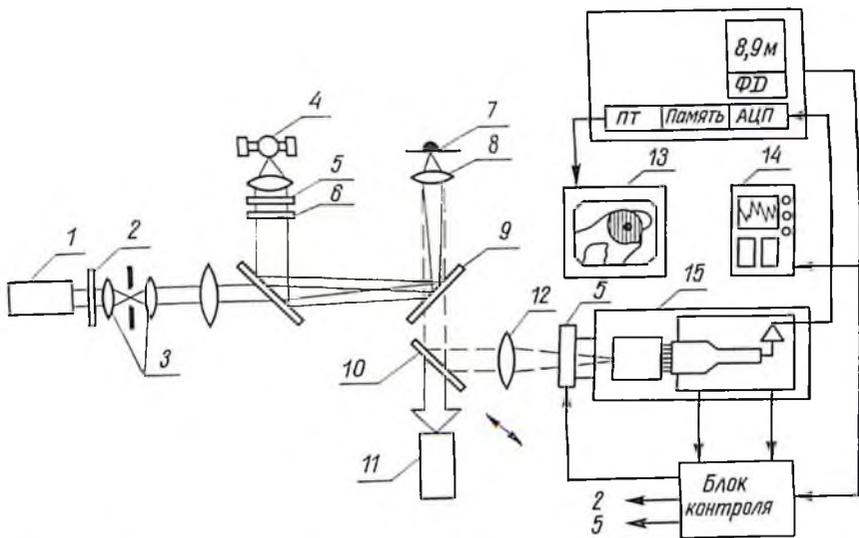


Рис. 50. Оптическая схема цифрового видеолуминесцентного микроскопа: 1 — Ag-лазер, 2 — электромагнитный затвор, 3 — пространственный фильтр, 4 — ртутная лампа, 5 — электромагнитный затвор, 6 — фильтр возбуждения, 7 — клетка, 8 — объектив, 9 — дихроничное зеркало, 10 — выдвижное зеркало, 11 — ФЭУ, 12 — монитор, 13 — ВКУ, 14 — осциллограф, 15 — фотоприемник

визуального канала регистрации и мини-ЭВМ позволило применить рассматриваемую систему для быстрых фотометрических измерений флюоресценции в реальном масштабе времени, а также изучения пространственно-временных характеристик внутренних процессов клеток.

В качестве фотоприемника в схеме использован видикон, соединенный волоконно-оптическим переходником с электронно-оптическим преобразователем. Для защиты фотоприемника от лазерного излучения с большой интенсивностью предусмотрен электромагнитный затвор, управляемый блоком контроля и микро-ЭВМ. Поступающий видеосигнал преобразуется в цифровую форму в матрице  $320 \times 256$  элементов разложения. Предусмотрено несколько режимов обработки полученной информации: усреднение по нескольким кадрам, вычитание и сложение кадров. Контроль обработки изображения выполняется с помощью просмотрных таблиц и дисплея. Данные изображения накапливаются на дисках, в качестве которых используются 10 Мб накопитель на винчестерском диске и 1,25 Мб накопитель на гибких флоппи-дисках (ФД). В состав микро-ЭВМ также входят: плата памяти 256 Кб, плата последовательного ввода/вывода, 16-битовая плата параллельного ввода/вывода. Основные программы написаны на языке высокого уровня FORTRAN, в то время как подпрограммы для контроля системы подготовлены на языке ассемблера MACRO-II. Накопленные данные в числовой форме на стандартных дисках микро-ЭВМ позволяет выявить различие между двумя изображениями, разде-

ленными по времени, выделить градиенты интенсивности изображения и определить относительные скорости движения участков в клетке. Может быть использован любой формат отображения данных: псевдоцветное отображение изображения, псевдотрехмерная проекция интенсивности уровней квантования (изоморфная карта), контурное отображение распределения уровней квантования и, наконец, черно-белая фотография клеток с возможностью просмотра на любом уровне квантования.

Широкое применение лазер нашел в биохимии. Известно, что при фотосинтезе происходят быстрые реакции биологических молекул. Это вызвано тем, что световая энергия, поглощенная пигментным веществом, преобразуется в химическую и затем передается хлорофиллу, у которого время жизни молекул в возбужденном состоянии не превышает десятка пикосекунд. Следовательно, продолжительность воздействующего светового импульса должна быть еще короче. Таким требованиям удовлетворяет лазер, который послужил основой создания лазерной пикосекундной спектроскопии, предназначенной в основном для изучения быстрых реакций.

Лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния используется при изучении структурных изменений сложных молекул. Если частота падающего лазерного излучения соответствует полосе поглощения рассеивающей молекулы, то интенсивность дополнительных полос в спектре максимальна. Частотный сдвиг комбинационных линий зависит от колебательных процессов самих молекул и является ее индивидуальной характеристикой. Подбирая длину волны воздействия перестраиваемого лазера, можно исследовать амплитуду и частотный сдвиг комбинационных линий. Метод лазерного комбинационного рассеяния был использован для исследования гемоглобина, цитохромов и белков, имеющих в составе хромофоры.

### ДИФРАКЦИОННЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Дифракционная картина клетки не является ее изображением в традиционном смысле, это характерное пространственное распределение энергии, обусловленное суммарным эффектом дифракции от каждой точки клетки. Реконструкция «портрета» клетки в дифракционную картину может быть выполнена методом преобразования Фурье. Оптическая схема устройства, обеспечивающего такое преобразование, представлена на рис. 51. Для работы на этом приборе необходимо подготовить фотографии клеточных препаратов либо спроектировать изображение клеток на специальное видеопреобразующее устройство, не показанное на рисунке. Следует помнить, что качество спектра преобразования зависит от разрешения, контрастности и качества фотонегатива.

Луч лазера фильтруется от бликов и засветок путем применения линзы и диафрагмы (диаметром несколько микрон) и коллимируется с помощью линз (см. рис. 51). Известно, что простран-

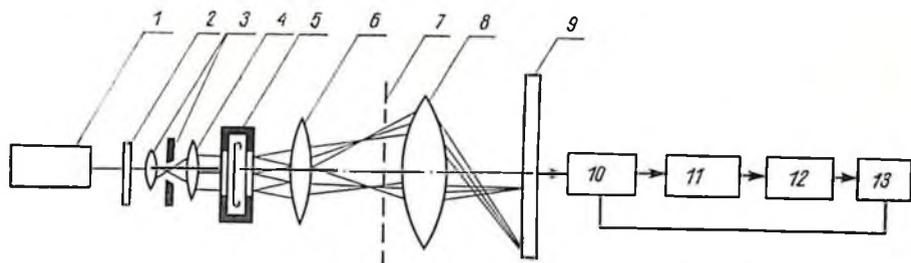


Рис. 51. Структурная схема устройства обработки изображения клеток на основе преобразования Фурье:

1 — He — Ne — лазер, 2 — затвор, 3 — диафрагма и линза пространственного фильтра, 4 — коллиматор, 5 — камера, 6 — линза преобразования, 7 — плоскость Фурье преобразования, 8 — линза (микроскоп), 9 — детектор, 10 — мультиплексор, 11 — АЦП, 12 — интерфейс, 13 — мини-ЭВМ

ственная фильтрация лазерного луча связана с потерей мощности излучения. Например, для достижения перепада энергетической плотности по сечению лазерного луча меньше 5 % приходится мириться с уменьшением мощности до 90 %.

Подготовленный фотонегатив закрепляется в специальной камере. Влияние неоднородности пленки ослабляется путем заполнения камеры жидкостью, параметры которой подбираются для обеспечения минимальных отражений. Когерентное излучение рассеивается на фотоизображении клетки. Затем прошедшая часть луча диафрагмируется и собирается трансформационной линзой. На расстоянии, равном фокальной длине этой линзы, поперечное распределение излучения становится Фурье-преобразованным, т. е. происходит перераспределение энергетической плотности по сечению луча. Амплитуда излучения на плоскости преобразования Фурье не зависит от положения клетки на фотопленке, в то же время зависят от ее размеров, формы и состояния текстуры. Маленьким деталям «портрета» клетки соответствуют большие пространственные частоты, и наоборот: большие детали обуславливают пространственные частоты, расположенные вблизи центра, т. е. в низкочастотной области спектра.

Известно, что изменений в спектре преобразования при движении клетки не происходит. Расположение частот на плоскости детектора описывается выражением

$$l = \frac{\lambda \cdot f \cdot \nu}{m}, \quad (30)$$

где  $f$  — фокусное расстояние трансформационной линзы;  $\lambda$  — длина волны лазера;  $m$  — увеличение микроскопа;  $\nu$  — пространственная частота (циклов/мм).

Двухмерный пространственный спектр преобразования Фурье повышается с помощью объектива с малым фокусным расстоянием и большим увеличением, позволяющим получить на плоскости детектора максимальные пространственные частоты.

В качестве детектора может быть использовано устройство, объединяющее маску и фотоэлектронный умножитель. Маска в этом

случае играет роль фильтра пространственных частот. Если на плоскости маски нанесен пространственный спектр эталона, то наложение спектров эталона и исследуемой клетки позволяет оценить степень их совпадения. Обеспечение быстро сменяющихся масок, подготовленных заранее для каждого типа встречающихся клеток, служит основой для идентификации при клеточном анализе. Придание маске кругового вращения вокруг собственной оси позволяет исследовать неоднородность дифракционной диаграммы в пределах  $360^\circ$ . В качестве фотоприемника спектра Фурье-преобразования чаще всего применяется специальный твердотельный электронно-оптический детектор, содержащий множество чувствительных зон. На одной из его половин размещены 32 полукольцевых полупроводниковых участка, на другой — 32 клиновидных. Электрические сигналы, образующиеся при облучении этих элементов, снимаются с участков, расположенных по периметру детектора. Каждый полукольцевой элемент принимает сигнал определенной пространственной частоты в зависимости от удаленности от центра фотоприемника. Формирование сигнала по углу выполняется клиновидными элементами. Компенсация разброса чувствительности элементов осуществляется введением поправочных коэффициентов. Вместо полупроводниковых элементов может использоваться волоконный жгут, рабочие концы которого разводятся на фотоприемники.

С детектора видеосигнал передается через мультиплексор (см. рис. 51) и аналогоцифровой преобразователь, далее на интерфейс и мини-ЭВМ. При последовательном переключении элементов, выполняемом под контролем мини-ЭВМ-опрос осуществляется только одного элемента при заземлении остальных, что позволяет ослабить взаимное их влияние.

Такой детектор настраивается на первом этапе вообще без освещения. Для каждого элемента программно подбирается уровень смещения. На втором этапе настройки при равномерном освещении определяется коэффициент усиления предусилителей, стоящих после каждого элемента.

Известна схема преобразования Фурье с микроскопом. В таком варианте вместо специальной камеры с фотонегативом препарата исследуемой ткани применяется оптическое преобразующее устройство, в котором прозрачность жидкокристаллического фоточувствительного слоя изменяется прямо пропорционально оптической плотности изображения клеток, проецируемого с помощью микроскопа. При одновременном пропускании через этот слой когерентного излучения наблюдается дифракция лазерного света подобно тому, как при проекции через фотонегатив клеточного препарата. Смена «портретов» клеток обуславливает изменение изображения на жидкокристаллическом слое. Следует помнить, что рассмотренная система чувствительна к «механическим помехам». В первую очередь необходимо компенсировать вибрации при процессах фотографирования, регистрации пространственных спектров, а также обеспечить стабилизацию подсветки микроскопа. Чем более

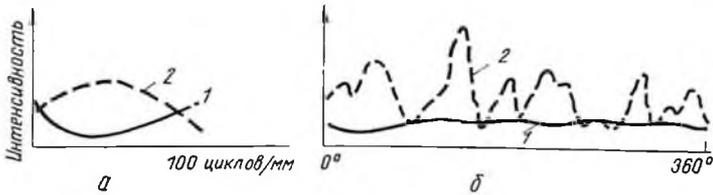


Рис. 52. Интенсивность в радиальном (а) и угловом (б) направлениях дифракционной картины (при преобразовании Фурье) нормальной (1) и опухолевой клеток (2)

вся система развязана от «паразитных» вибраций, тем большего разрешения по пространственным частотам можно достигнуть. Увеличением изображения клеток на фотопленке можно избежать потери деталей изображения. Однако пространственный спектр в этом случае будет иметь малый динамический диапазон пространственных частот, а дифракционное изображение клетки будет небольшим. Следовательно, особого преимущества в разрешении таким образом не обеспечить.

Среди параметров, характеризующих радиальную и угловую компоненты преобразования Фурье, которые наиболее эффективно описывают нормальные и опухолевые клетки, можно назвать: общую энергию спектра преобразования Фурье, крутизну произведения квадрата радиальной частоты на среднее радиальное распределение, угловое распределение интенсивности в определенном диапазоне пространственных частот и т. д. [314]. В качестве примера представлены интенсивность радиального распределения для нормальной и опухолевой клеток. Изменение интенсивности при угловом сканировании для нормальной и опухолевой клеток приведено на рис. 52. Кривые существенно отличаются друг от друга: зависимость углового сканирования опухолевой клетки дает более значительное расхождение спектра по сравнению с радиальной кривой. Было найдено, что более эффективное отличие спектра преобразования в радиальном направлении наблюдается на пространственной частоте 100 циклов/мм, а в угловом — в области 500

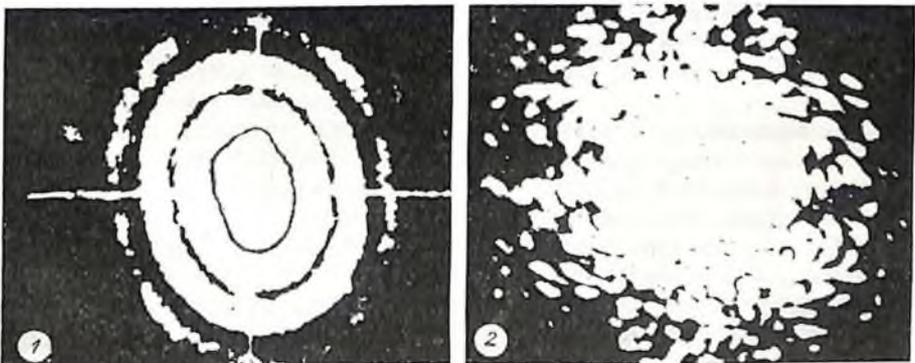


Рис. 53. Дифракция нормальной (1) и опухолевой (2) клеток плоского эпителия

Анализ фотографий спектров нормальной и опухолевой клеток показывает, что спектр нормальной клетки характеризуется симметрией (1), в то время как атипичной (2) размыт (рис. 53).

Результаты спектрального анализа преобразования Фурье могут использоваться для классификации клеточных препаратов с применением дискриминантного анализа перечисленных выше параметров. Скорость, простота обработки данных с помощью преобразования Фурье дают право считать подобный метод и созданные приборы на его основе перспективными для цитологических исследований. Внедрение лазерных методов в цитологию, в том числе голографии, позволяет исключить фиксацию и окраску образцов, производить измерение живых объектов, автоматизировать стереометрические измерения, упростить интегральные методы определения параметров клеток.

## ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Система программного обеспечения является неотъемлемой частью современных цитологических анализаторов. Это мозг приборов. При разработке анализаторов большое значение имеет оптимальное сочетание аппаратурных и программных средств, ибо от этого зависят построение прибора и его основные характеристики, в том числе быстродействие, многофункциональность, точность и стоимость. Программы анализа позволяют охватить широкий диапазон задач обработки. За счет введения дополнительных программных модулей можно расширить область применения уже созданных приборов без каких-либо аппаратурных доработок. Однако следует отметить, что создание пакетов программ связано с большими трудозатратами и необходимостью отыскания новых методов автоматической обработки и машинной интерпретации цитологической информации [11]. Например, на разработку программ системы TICAS было затрачено около 100 человеко-лет [178].

Одна из основных целей обработки результатов цитологических исследований заключается в решении важных задач клинической диагностики, среди которых следует отметить: создание скоростных и точных средств анализа параметров клеток, определение их корреляционных связей, выявление которых невозможно без применения ЭВМ, идентификация и классификация препаратов. Процесс обработки можно условно разбить на три этапа: определение параметров одной клетки, оценка свойств клеточной субпопуляции и, наконец, рассмотрение всех субпопуляций данного препарата с установкой диагностического решения. При изложении данной главы будем придерживаться такой же последовательности в рассмотрении материала.

Качество описания клеток и эффективность распознавания их типа являются основными факторами оптимальности алгоритмов достоверной классификации клеток и дифференциальной диагностики патологических процессов. При определении морфологических параметров принципиальное значение имеет вопрос сегментации клеток. Прежде, чем измерить морфологические параметры клеток, выполнить их статистическую обработку и классификацию, следует научиться отделять клетки от фона и друг от друга. Существуют различные методы сегментации клеток. В первых анализаторах [3] типа Quantimet-720 выделение цитоплазмы от фона или

ядра от цитоплазмы осуществлялось аппаратными средствами по минимальному значению оптической плотности, соответствующей их границам. При автоматическом или полуавтоматическом режиме исследовались те клетки, оптическая плотность которых отличалась от фона на определенную величину, что позволяло минимизировать погрешности детектирования и уменьшало влияние неоднородности фона. С целью одновременного получения амплитуды видеосигнала сканирующей и окружающих ее точек были разработаны специальные автодетекторы, позволяющие до поступления информации в ЭВМ произвести корректировку сигнала.

Известен метод программного определения порога для соответствующего выделения границ ядра и цитоплазмы по гистограмме оптической плотности. Для понимания этого метода допустим, что клетка обрамлена электронной стробирующей рамкой, выделяющая прямоугольную часть раstra с клеткой. Гистограмма оптической плотности, представляющая зависимость количества элементов разложения при последовательном изменении уровней квантования, имеет обычно два минимума, которые используются для разделения границ цитоплазмы и ядра клетки. К сожалению, в гистограммах оптической плотности может присутствовать несколько минимумов, обусловленных как текстурой клетки, так и неоднородностью фона. По соседству с клеткой могут находиться микрообъекты неклеточного происхождения, по оптической плотности сравнимые с клеткой. С целью исключения недостатков рассматриваемого метода была предложена сегментация по принципу оконтуривания [250]. При изменении оптической плотности анализируется характер поведения видеосигнала. Значение порогов оптической плотности, соответствующих резкому перепаду контрастности при минимальном изменении контуров, принимается за порог, определяющий границы клетки.

Метод фиксированного порога сегментации имеет ряд недостатков, обуславливающих существенную погрешность при исследовании хроматиновой субстанции клеток. Если порог выбран с большими значениями оптической плотности, то будут выделяться только пучки, расположенные на вершине видеоимпульса, соответствующие конденсированным частицам хроматина. Порог с меньшими значениями оптической плотности выделит конденсированные частицы в определенных областях склонов видеоимпульса. В том и другом случае будут наблюдаться потери информации. Для полной оценки состояния хроматиновой субстанции предложена методика адаптивного порога [208], величина которого при сканировании в каждый момент времени зависит от оптической плотности не только исследуемой точки, но и окружающих ее восьми. Если среднее значение оптической плотности окружения ниже таковой измеряемой точки, то величина порога уменьшается. В противном случае результат измерения исключается. Метод адаптивного порога позволяет описывать степень гранулированности хроматина и его конденсацию.

Рассмотренные методы сегментации относятся к монохромати-

ческим источникам излучения. Как показано в предыдущих главах, при цитологических исследованиях широко используются многоцветные изображения, что повышает точность распознавания клеток. Был предложен метод сегментации, позволяющий осуществить выделение клеток вагинального препарата, окрашенного по Папаниколау, по результатам сканирования на двух длинах волн: 610 (красная) и 535 нм (зеленая) [237]. На плоскости двухпараметрической гистограммы формируются определенные области (кластеры) с соответствующими медианными векторами. Последующая сегментация клеток выполняется путем определения, к какому из кластеров они принадлежат. Сравнение результатов сегментации по двухпараметрическим гистограммам и визуальной оценке препаратов подтверждает эффективность этого метода. Рассмотренные примеры сегментации охватывают широкий круг методов начиная выделением клеток на фиксированном уровне с помощью аппаратурных решений и заканчивая их выделением по результатам многопараметрического анализа спектральных характеристик. Расширение фронта задач сегментации объясняется новыми возможностями обработки информации о клетке, которые обеспечиваются внедрением ЭВМ в цитологические исследования.

Перейдем теперь к рассмотрению параметров клеток, многообразие которых можно разделить на четыре группы: геометрическую, денситометрическую, спектральную и текстурную. Методы измерения и расчета ряда параметров достаточно подробно описаны в работах [1, 3, 105, 281], а также в предыдущих главах, поэтому остановимся только на рассмотрении коэффициента формы (из геометрической группы) и текстурной группе параметров.

Формула расчета коэффициента формы записывается в виде

$$f = \frac{P^2}{S}; \quad f' = \frac{P^2}{4\pi S}, \quad (31)$$

где  $S$  — площадь клетки;  $P$  — периметр клетки.

Величина площади определяется суммой длительностей видеопульсов, образующихся при сканировании клетки. Периметр измеряется как сумма длин дуг, заключенных между строками.

Наименьшим коэффициентом формы обладает идеально круглая клетка. По мере отклонения от формы круга значение этого коэффициента растет. Таким образом, коэффициент формы может служить количественной мерой полиморфизма клеток (табл. 16).

При морфологическом анализе микроскопических изображений клеток в ряде случаев используют каче-

Таблица 16. Значение коэффициента формы

| Фигура                     | Коэффициент формы |              |
|----------------------------|-------------------|--------------|
|                            | $P^2/S$           | $P^2/4\pi S$ |
| Круг                       | 12,56             | 1,00         |
| Шестигранник               | 13,83             | 1,10         |
| Прямоугольник              | 16,00             | 1,27         |
| Полукруг                   | 16,82             | 1,34         |
| Эллипс (с осями 1 : 3)     | 18,84             | 1,50         |
| Прямоугольник (1 : 4)      | 25,00             | 1,99         |
| Кольцо (с радиусами 2 : 1) | 37,70             | 3,00         |

ственное описание состояния хроматиновой субстанции. Хроматин характеризуется большой вариабельностью сложной и неоднородной картины распределения ядерного материала, отличающегося контрастностью, цветом, структурой, включающей пространственное расположение и размер гранул. В цитологической практике прибегают к семантическому описанию текстуры хроматина: однородная, мелкозернистая, глыбчатая и т. д. Оценка эффективности применения текстуры хроматина в качестве диагностического критерия [281] показала, что идентификация по пяти классам патологического процесса выполняется с вероятностью 0,7489 %. По сравнению с другими, в основном ядерными, параметрами хроматин уступал в результативности диагностики. Это можно объяснить тем, что качественное описание является неполным, так как оператору трудно описать корреляционные зависимости оптической плотности и состояния хроматиновой субстанции в различных точках текстурного поля.

Необходим математический подход к описанию текстуры, включающий синтез структурного и статистического анализов в одном методе. Причем алгоритм распознавания должен быть независимым от окраски и метода приготовления препаратов. Очень важной проблемой является изучение состояния картины изображения, стадии дифференцировки клетки в связи с развитием патологического процесса и определения степени воздействия внешних факторов на клетку.

Среди методов количественной оценки хроматина важное место занимают методы гранулометрического, градиентного, ортогонального трансформационного и марковского анализов [251]. При гранулометрическом анализе для выделения параметров хроматина и подчеркивания его структуры сегментация ядра выполняется с помощью адаптивного порога. В результате расчета определяются геометрические и оптические свойства гранул: площадь, минимальная, максимальная и средняя оптическая плотность, радиальное расстояние от центра ядра, а также характерные особенности, касающиеся лишь ядерных структур: общее число гранул, общее число на единицу площади, общая интегральная оптическая плотность всех гранул и их общая площадь [26, 207]. Гранулометрический анализ, выполненный в этих работах, показал, что при опухолевых процессах наблюдается повышенное количество гранул на единицу площади в центре ядра клеток печени, в то время как в норме гранулы сосредотачиваются в основном по краям. Центральные расположенные гранулы опухолевых клеток имеют сравнительно большие размеры и более высокое содержание ДНК по сравнению с нормальными клетками.

Для сегментации хроматина были использованы также другие методы [78, 224], в том числе метод трансформации. Предложенный математический анализ [224] основывается на выделении гранул хроматина по заданным амплитудам и длительностям пиков или провалов вершины видеоимпульса. В результате гранулометрических измерений определяются статистические параметры

и гистограммы распределения площади гранул, длин областей, расположенных между гранулами. Измерение выполняется с помощью анализатора изображений, обеспечивающего машинную обработку текстуры хроматина.

При марковском анализе расчет параметров структуры ядра выполняется по разности оптической плотности между соседними элементами изображения. Оптическая плотность в каждой точке, как известно, зависит от оптической плотности лежащих рядом точек. Большой перепад приводит к большей амплитуде, которая зависит также от направления сравниваемых точек и величины шага. Для характеристики структуры всего изображения строится матрица смежности, т. е. плотность вероятности переходов уровней квантования. В качестве признаков, описывающих текстуру, применяют 21 параметр [251], среди которых отметим следующие:

Контраст- $T_1$ , являющийся мерой изменчивости оптической плотности

$$T_{к_0} = \sum_{n=1}^{N-1} n^2 \left( \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N P_L(i, j) \right), \quad (32)$$

где  $N$  — число уровней квантования (оптической плотности);  $i, j$  — уровни оптической плотности;  $P_L(i, j)$  — вероятность встречи уровня оптической плотности  $i$  с уровнем  $j$  при поэлементном разложении изображения;  $L$  — шаг.

Второй угловой момент, определяющий гомогенность изображения,

$$T_y = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N [P_L(i, j)]^2. \quad (33)$$

Коэффициент корреляции

$$T_k = \left\{ \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N [(i, j) P_L(i, j)] - \mu_x \mu_y \right\} / \sigma_x \sigma_y, \quad (34)$$

где  $\mu_x, \mu_y$  — среднеарифметические, а  $\sigma_x, \sigma_y$  — среднеквадратическое отклонение  $P_x(i) = \sum_{j=1}^N P_L(i, j)$  и столбцов  $P_y(j) = \sum_{i=1}^N P_L(i, j)$ .

Энтропия

$$T_s = - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N P_L(i, j) \lg P_L(i, j). \quad (35)$$

Обратный дифференциальный момент

$$T_g = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \frac{P_L(i, j)}{1 + (i-j)^2}. \quad (36)$$

Коэффициент вариации

$$T_B = \frac{\sigma \rightarrow [P_L(i, j)]}{\mu \rightarrow [P_L(i, j)]}. \quad (37)$$

### Диагональный момент

$$T_{\text{дм}} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \sqrt{0,5(i-j)P_L(i, j)}. \quad (38)$$

Информативная значимость этих параметров различна, более того, многие из них коррелированы. Кроме того, на выбор параметров влияет шаг сканирования. Определено, что при исследовании 150 ядер клеток при шаге сканирования 0,125 мкм для классификации текстуры требовалось 6—8 параметров, в то время как при шаге 1,75 мкм требуемое число параметров повышалось до 20, что обеспечивало одинаковые результаты. Сравнение комплекса указанных параметров показало, что для классификации текстуры хроматина наибольшей результативностью обладают параметры, включающие диагональный момент и коэффициент вариации.

Для характеристики микрообъектов [51] предложен расчет статистических параметров, названного показателем рельефности  $\rho$ :

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^n |i-j|}{n-1}, \quad (39)$$

где  $i, j$  — оптическая плотность соседних элементов изображения;  $n$  — число элементов;  $\Theta$  — текстурный коэффициент:

$$\Theta = \frac{\sum_{i=1}^n |i-j|^2}{(n-1)\bar{X}}, \quad (40)$$

где  $\bar{X}$  — среднеарифметическое отклонение оптической плотности по всему полю изображения.

Оценка указанных параметров на примере описания особенностей структуры бинарной модели свидетельствует о том, что показатель рельефности отражает характер структурных перестроек диффузно расположенного материала, в то время как текстурный коэффициент позволяет выделить гранулярность текстуры. Авторы работы отмечают зависимость величины текстурного коэффициента от ориентации исследуемого изображения. Вероятно, для исключения анизотропии рассматриваемого коэффициента  $\Theta$  следует брать усредненное значение текстурного коэффициента в направлениях 0, 45, 90°.

Для анализа текстуры была предложена автокорреляционная модель [65, 78, 86]. Известно, что автокорреляционная функция отражает размер, контрастность и периодичность расположения элементов изображения. При анализе Фурье изображение преобразуется из пространственной области в пространственно-частотную. Однако из-за слабой периодичности внутренней структуры указанные методы пока не нашли широкого применения для характеристики текстуры хроматина.

Перейдем теперь к вопросам классификации препаратов. Выделение отдельной клетки носит случайный характер, поэтому ее па-

параметры не могут охарактеризовать препарат в целом. Классификация образца зависит от множества клеток. Чем больше объем выборки, тем точнее результат. Однако объем выборки ограничен рядом факторов, в том числе производительностью анализатора. Если на проточных приборах исследуются обычно миллионы клеток одного образца, то при сканирующих методах объем материала не превышает обычно сотни клеток. Однако даже при этой ограниченной выборке, если учесть, что каждая клетка характеризуется десятками параметров, объем информации, подлежащей обработке, остается весьма большим.

Полученные параметры клеток могут быть сгруппированы и представлены в форме таблиц, диаграмм, графиков. Наиболее часто цитометрические данные даются в виде однопараметрических гистограмм, представляющих статистическую оценку плотности распределения. По оси абсцисс откладывается измеряемый параметр, значение которого разбито на каналы, а по оси ординат — частота появления параметра в каждой из них. Количество рекомендуемых каналов определяется формулой

$$N = 1 + 3,32 \lg n, \quad (41)$$

где  $n$  — число измеренных клеток;  $N$  — число каналов гистограмм.

Отношение количества измеренных клеток в одном из каналов к общему их числу определяет плотность вероятности. Полученная частотная гистограмма позволяет сжать большой объем информации о клетке в компактную форму и выявить малые сдвиги исследуемого параметра. Реальные гистограммы бывают самой различной формы: с нормальным, биномиальным и пуассоновским распределением. На практике чаще всего встречаются гистограммы с нормальным распределением. Функция плотности распределения в этом случае описывается законом Гаусса. Для характеристики нормального распределения могут быть использованы следующие статистические характеристики:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}, \quad (42)$$

$\bar{X}$  — среднеарифметическая величина: где  $n$  — число измерений;  
 $X_i$  — текущее значение параметра;

медиана  $\hat{X}$ , представляющая значение параметра, соответствующее середине упорядоченной выборки;

мода  $\hat{X}$ , равная величине параметра, соответствующего вершине кривой распределения.

При нормальном распределении величины  $\bar{X}$ ,  $\hat{X}$ ,  $\hat{X}$  равны. Другими словами, несовпадение их значений свидетельствует о несимметричности формы распределения.

К показателям характера изменчивости параметров, т. е. отклонения их значений от среднего, относятся другие характеристики: вариационный размах

$$R = X_{i_{\max}} - X_{i_{\min}}, \quad (43)$$

где  $X_{i_{\max}}$ ,  $X_{i_{\min}}$  — максимальное и минимальное значения параметра выборки;  
 среднеквадратичное отклонение

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}}, \quad (44)$$

при  $\leq 30$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}; \quad (45)$$

дисперсия

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}; \quad (46)$$

коэффициент вариации

$$CV = \frac{\delta}{\bar{X}} 100 \%; \quad (47)$$

коэффициент асимметрии

$$A = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^3}{n\sigma^3}; \quad (48)$$

эксцесс

$$E = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^4}{n\sigma^4}. \quad (49)$$

Гистограммы как способ представления данных при однопараметрическом анализе препаратов нашли широкое применение в цитологии. Они позволяют определить процентное содержание клеток в различных фазах клеточного цикла, что может быть использовано для контроля химиотерапевтического лечения, лучевого воздействия, а также диагностики злокачественных новообразований. Метод обработки [292] гистограмм ДНК основывается на том предположении, что исследуемая популяция клеток состоит из нескольких субпопуляций, имеющих нормальное распределение. В связи с этим распределение гистограммы  $y(i)$  аппроксимируется суммой гауссовых кривых

$$y(i) = \sum_{j=1}^k R(i, j) Y(j) + e(i), \quad (50)$$

где  $k$  — число, а  $j$  — индекс субпопуляций;  $i$  — номер канала;  $Y(j)$  — реальное распределение;  $e(i)$  — ошибка функции;

$$R(i, j) = 1/\sqrt{2\pi} \delta(j) \exp\{-0,5 [i - \bar{X}(j)]^2 / \delta(j)^2\}, \quad (51)$$

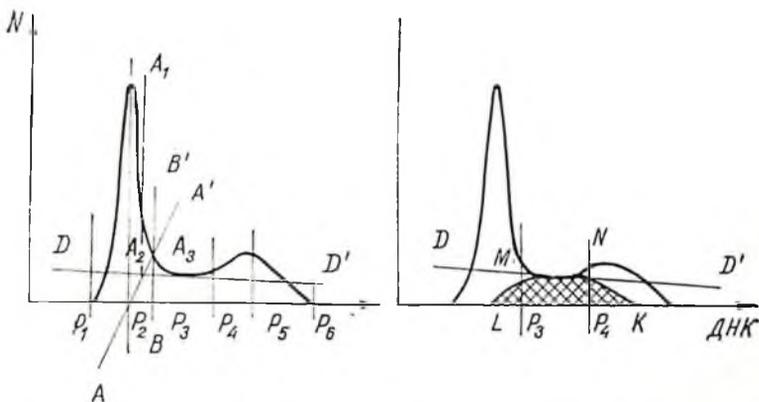


Рис. 54. Иллюстрация графического метода «трапеzонд» определения фаз клеточного цикла; заштрихованная область S-фазы

где  $\bar{X}(j)$ ,  $\delta(j)$  — среднееарифметическое и среднеквадратичное отклонение субпопуляций.

Программный анализ, выполненный авторами на микро-ЭВМ [292], позволяет оценить количество клеток в фазах цикла при различных патологических состояниях. Нахождение клеточных субпопуляций по многомодальной гистограмме выполняется методом наименьших квадратов [168] или наибольшего подобия [219]. Разработанная программа обработки [219] позволяет выявить по 250-канальной гистограмме две компоненты за 1 мин, а десять — за 20 в зависимости от степени перекрытия.

С целью определения S-фазных клеток в исследуемых образцах предложен графический метод «трапеzонд» [256]. Этот метод не требует машинной обработки, его можно отнести к экспресс-методам, обеспечивающим вполне удовлетворительную точность. Объяснение метода проведем по рис. 54, на котором приведена однопараметрическая частотная гистограмма ДНК. Каналы  $P_1$  и  $P_6$  соответствуют границам гистограммы. Согласно клеточному циклу первой субпопуляцией является  $G_1$  с модой  $P_2$ , а второй —  $G_2+M$  с модой  $P_5$ , отстоящей от  $P_2$  на двойном расстоянии. Нижняя граница  $G_1$  определяется кривой  $BB'$ , являющейся перпендикуляром из точки  $A_3$ , принадлежащей, в свою очередь, прямой  $AA'$ . Прямая  $AA'$  соединяет точки  $P_2$  и  $A_2$ . Последняя определяется пересечением прямых  $DD'$  и  $A_1A_2$ . Линия  $A_1A_2$  является касательной к боковой стороне пика  $G_1$ , а  $DD'$  — касательной к середине S-фазы. Граница  $P_4$  определяется выражением

$$P_4 = \frac{P_2 P_5}{P_3} \quad (52)$$

Величина S-фракции определяется суммой площадей прямоугольника  $P_3 P_4 M N$  и треугольников  $P_3 M L$  и  $P_4 N K$ .

Экспериментально по результатам клинической проверки было найдено, что длины сторон этих треугольников составляют

$$LP_3 = 0,66 (P_3 - P_1); \quad KP_4 = 0,66 (P_6 - P_4). \quad (53)$$

Графический метод «трапезоид» показал удовлетворительное совпадение результатов с автоматическими методами программного расчета S-фазы. Более того, для значений S-фазных клеток, характерных для клинических образцов (ниже 0,3), этот метод предпочтителен [256]. К достоинствам графического метода относятся также его простота, повторяемость результатов при работе различных операторов и возможность применения для анализа многозональных диплоидно-анеуплоидных гистограмм.

При анализе ДНК необходимо учитывать критерии анеуплоидии, выражающиеся во множественности пиков  $G_1$ , сдвиге пика  $G_1$  относительно нормального положения или в увеличении коэффициента вариации пика  $G_1$ . Согласно решению комиссии общества аналитической цитологии [190], с 1984 г. введен параметр  $D_1$  (индекс ДНК), характеризующий отношение моды исследуемого пика  $G_1$  к моде  $G_1$  диплоидных клеток. Клетки с нормальным диплоидным карiotипом имеют индекс ДНК, равный единице. Для определения изменения положения пика  $G_1$  должен быть обязательно приведен пик эталона, в качестве которого наиболее целесообразно использовать диплоидные клетки исследуемого образца. Коэффициент вариации вычисляется для каждого пика  $G_1$ . Понятие анеуплоидии ДНК по рекомендации комиссии должно использоваться только в случае, если в исследуемом материале присутствует более двух пиков  $G_1$ .

Гистограмма универсальна как способ представления результатов системного анализа препарата. Любой из измеряемых параметров клеток — геометрический, денситометрический, текстурный, спектральный — может быть представлен в виде гистограммы. Если исследуемые препараты исследовать через определенные промежутки времени, а полученные гистограммы представить в трехкоординатной системе, третья координата которой имеет масштаб времени, то совокупность полученных гистограмм позволит характеризовать динамику изменения анализируемых параметров.

Изучение гистограмм клинических препаратов позволяет установить закономерности, характеризующие доброкачественные, предраковые и раковые процессы, и выразить критерии классификации в виде цифровой информации. Известно, что при раке шейки матки площадь ядер клеток увеличена [105]. Если построить гистограмму среднеарифметического значения площади ядер для сотни препаратов с диагнозом норма и рак шейки матки, то получим две кривые плотности вероятности. Допустим, что четкого раздела между зонами I- $\alpha$  и I- $\beta$  нет и в области соприкосновения кривых наблюдается перекрытие. В случае введения границы раздела нормы и рака шейки матки часть нормальных препаратов  $\alpha$  будет ошибочно считаться патологической а часть препаратов  $\beta$  с диагнозом рака шейки матки принята за нормальную. Это так называемые ложноположительная (II рода) и ложноотрицательная (I рода) ошибки (знак ошибки определяется направлением по отношению к оси абсцисс). Увеличивающиеся значения от границы определяют ложноположительную ошибку, а уменьшающаяся —

ложноотрицательную. Для оценки классификации может быть предложен ряд параметров:

$$f = 1 - \frac{\alpha + \beta}{2}; \quad (54)$$

$$h = \frac{1 - \alpha}{1 - \alpha + \beta}; \quad (55)$$

$$g = \frac{1 - \beta}{1 - \beta + \alpha}; \quad (56)$$

где  $f$  — коэффициент эффективности, представляющий собой правильно классифицированные препараты;  $h, g$  — коэффициенты воздействия ошибок.

Ложноотрицательная и ложноположительная ошибки взаимосвязаны: при изменении порога и увеличении одной из ошибок, уменьшается другая. Кумулятивные кривые ложноположительной и ложноотрицательной ошибок для среднееквadraticного отклонения  $\sigma$  и среднеарифметического значения  $\bar{X}$  площади ядер представлены на рис. 55. По данным, обобщающим исследование 120 препаратов (более 12 000 клеток), можно по наименьшей величине ошибки дифференциальной диагностики определить пороговую величину статистического параметра и наоборот [54]. Например, при  $\sigma = 40$  отн. ед. из 100 раковых препаратов 7 будут отнесены к нормальным, в то время как 38 % нормальных препаратов ошибочно будут классифицированы как патологические. Такой процент препаратов с дисплазией будет оценен как нормальный в случае, когда классификация будет проводиться по принципу «рак — не рак», т. е. нормальные и диспластические препараты рассматриваются как нераковые,  $\alpha$  увеличится до 58 %.

С возрастанием порогового значения среднееквadraticного отклонения  $\alpha$  уменьшается, а  $\beta$  растет. Так, при  $\sigma = 48$  отн. ед. для раковых препаратов увеличивается до 10 %, для диспластических образцов составляет 54, в то время как для нормальных препаратов  $\alpha$  равна 17 % (вместо 38 %). При классификации «рак — не рак»  $\alpha$  равна 35 %.

До сих пор анализ клеток и препаратов ограничивался рамками однопараметрического подхода. Однако сложность рассматриваемых морфологических систем, их разнообразие диктуют необходимость одновременного учета многих параметров для описания многомерности процессов, протекающих в этих системах. Многопараметрический анализ позволяет более глубоко изучить структурно-функциональные особенности клеток, а следовательно, препарата в целом.

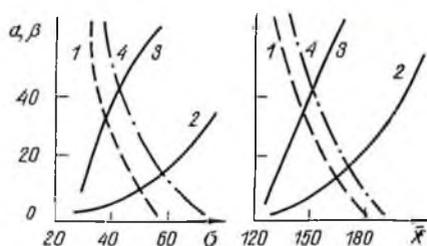


Рис. 55. Кумулятивные кривые вероятностей ложноположительной и ложноотрицательной ошибки среднееквadraticного отклонения  $\sigma$  и математического ожидания  $\bar{X}$  площади ядер: 1 — норма, 2 — рак, 3 — дисплазия, 4 — норма + дисплазия ( $X, \sigma$  — в отн. ед.,  $\alpha, \beta$  — %)

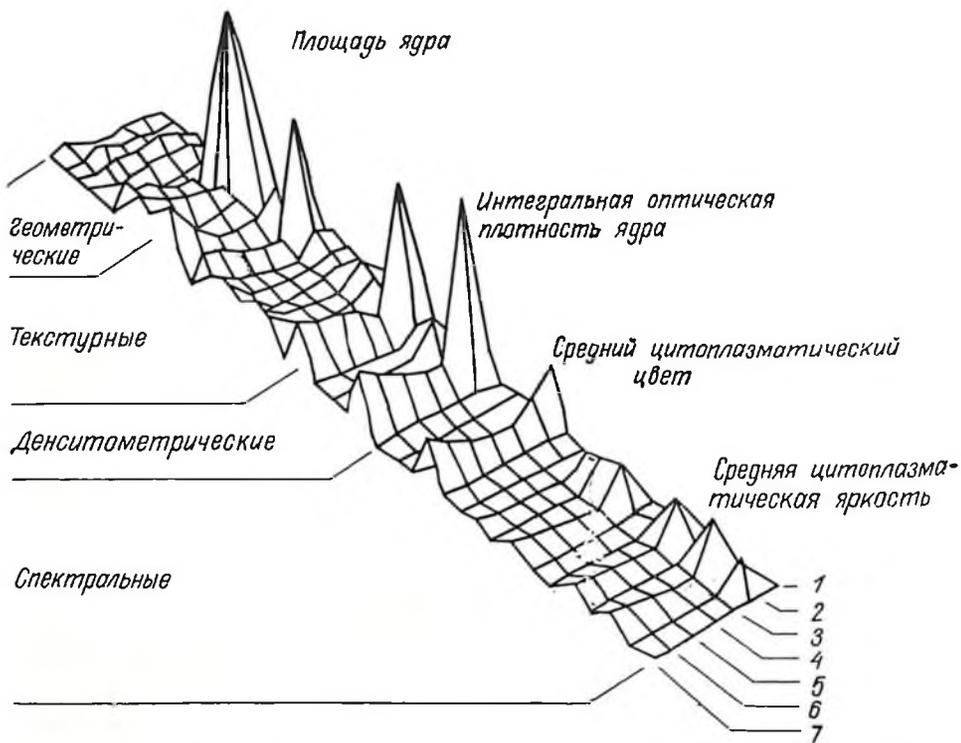


Рис. 56. Диаграмма эффективности выделения 41 параметра семи типов клеток костного мозга:

1 — миелобласты, 2 — промиелоциты, 3 — незрелые миелоциты, 4 — зрелые миелоциты, 5 — метамиелоциты, 6 — кольцевые клетки, 7 — полиморфно-ядерные нейтрофилы

В качестве примера своеобразия закономерности изменения параметров для различных типов клеток на рис. 56 приведены диаграммы эффективности выделения 41 признака для семи типов клеток костного мозга человека [268]. Ряд параметров, в том числе интегральная оптическая плотность, средняя цитоплазматическая яркость и т. д., наиболее характерно выражена для промиелоцитов. Тектурные параметры, в свою очередь, позволяют выделить незрелые миелоциты и полиморфно-ядерные нейтрофилы. Спектральные характеристики подчеркивают также незрелые миелоциты. Параметры коррелируют друг с другом, например интегральная оптическая плотность и размер ядра. В результате анализа определены десять, наиболее информативных параметров, обеспечивающих классификацию указанных клеток с высокой степенью точности, и выявлены этапы трансформации клеток.

При многопараметрическом анализе важную роль играет ограничение количества параметров, которые используются для классификации клеток. Когда субпопуляции клеток полностью разделены на двухпараметрической плоскости, для классификации достаточно двух параметров. При перемешивании зон субпопуляций

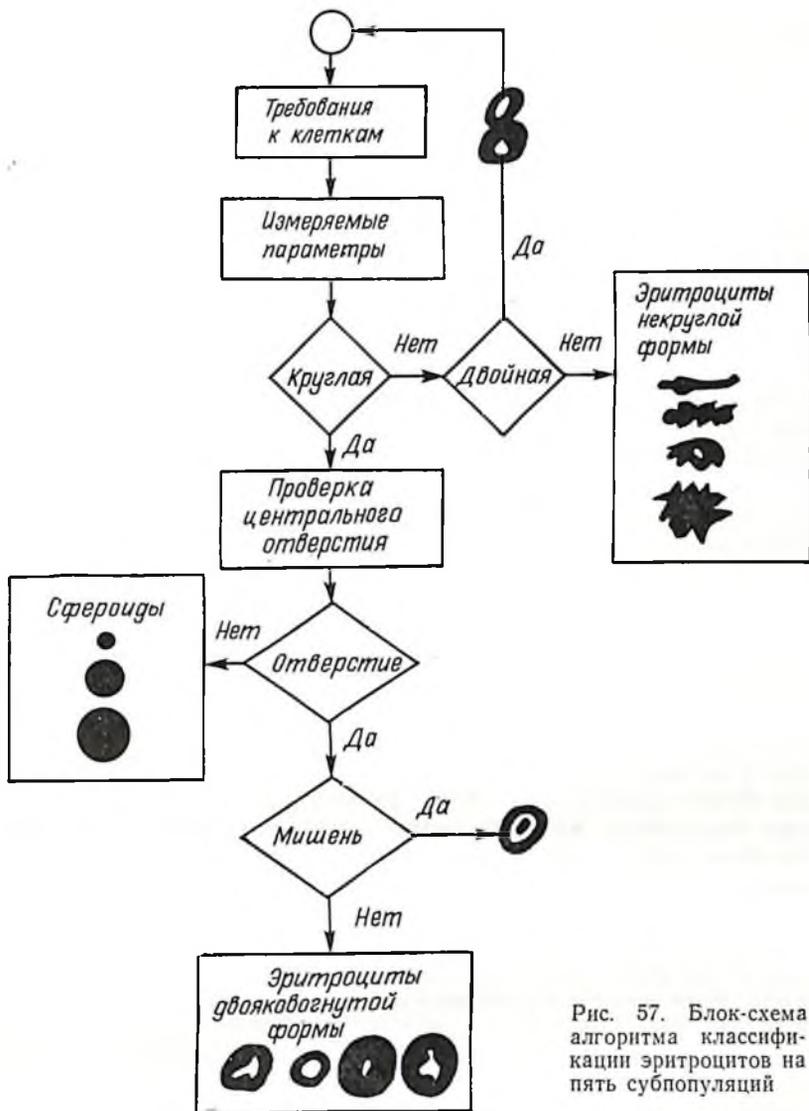


Рис. 57. Блок-схема алгоритма классификации эритроцитов на пять субпопуляций

было показано, что для надежной классификации достаточно 5—6 некоррелированных параметров [105]. Естественно, они должны иметь диагностическую значимость.

Автоматический метод анализа был применен для классификации эритроцитов [107, 178]. Алгоритм дифференциального анализа включал операции поэтапного сравнения параметров исследуемой клетки с пороговыми значениями, которые определены экспериментально (рис. 57). Этот алгоритм имеет несколько участков: на первом согласно требованию ограничения по площади исключаются микрообъекты с площадью, меньшей определенной нижней

границы. Затем проводится измерение коэффициентов формы клеток и определяется степень округленности. Проверка площади некруглых клеток позволяет исключить из анализа двоячные эритроциты. Классификация некруглых эритроцитов проводится по четырем классам, принимая во внимание индекс удлиненности. Для круглых клеток выявляется присутствие центрального отверстия. В случае его отсутствия клетки классифицируются как сфероциты, которые по площади и плотности гемоглобина подразделяются на три класса. На следующем этапе проводится анализ величины центрального пятна. Эритроцит с темной областью в центральном пятне классифицируется как клетка в виде «мишени». Дальнейший анализ сводится к сравнению с пороговыми значениями содержания гемоглобина, площадей клеток и центральных отверстий, что дает возможность сгруппировать четыре класса двояковыпуклых эритроцитов. Проведенные исследования нарушений форм эритроцитов и определение процентного их содержания при различных заболеваниях крови свидетельствуют о возможности использования рассматриваемого алгоритма для диагностики разных форм анемий, внутрисосудистого гемолиза и наследственного эллиптоцитоза.

Для повышения эффективности цитологической диагностики и создания алгоритма распознавания пограничных состояний шейки матки использовался многопараметрический анализ морфологических данных с применением метода кусочно-линейной дискриминантной функции. При такой математической обработке морфологические параметры представляются в виде значений координат в пространстве признаков. Если анализировать два параметра, то это будет плоскость с осями, на которых откладываются указанные параметры. Каждый исследуемый препарат на этой плоскости обозначается одной точкой. Построение совокупности точек и сопоставление с вариантом диагноза позволяют определить границы дискриминантных функций в аналитической форме. Если граница раздела представляется прямой, то для классификации используется метод, принадлежащий к линейно-дискриминантному анализу, если граница описывается кривой,— то к нелинейно-дискриминантному [105].

Для оценки возможности и целесообразности применения метода КЛДФ были построены диаграммы распределения образцов в плоскостях  $\sigma$ ,  $\bar{X}$ , представленные на рис. 58. Анализ диаграмм свидетельствует, что пространство признаков разделено на три области, в которых сосредоточиваются образцы с соответствующими диагнозами. В области у начала координат располагаются нормальные препараты, в отдаленной — с диагнозом рак, а в средней зоне — в основном образцы, характеризующие диспластические изменения эпителия с некоторым числом образцов названных выше классов. Отсюда следует, что между выбранной системой признаков  $\sigma$ ,  $\bar{X}$  и системой диагнозов существует выраженная корреляционная связь. Использование диаграмм распределения высших моментов (асимметрии, эксцесса, медианы, интерсекстильной

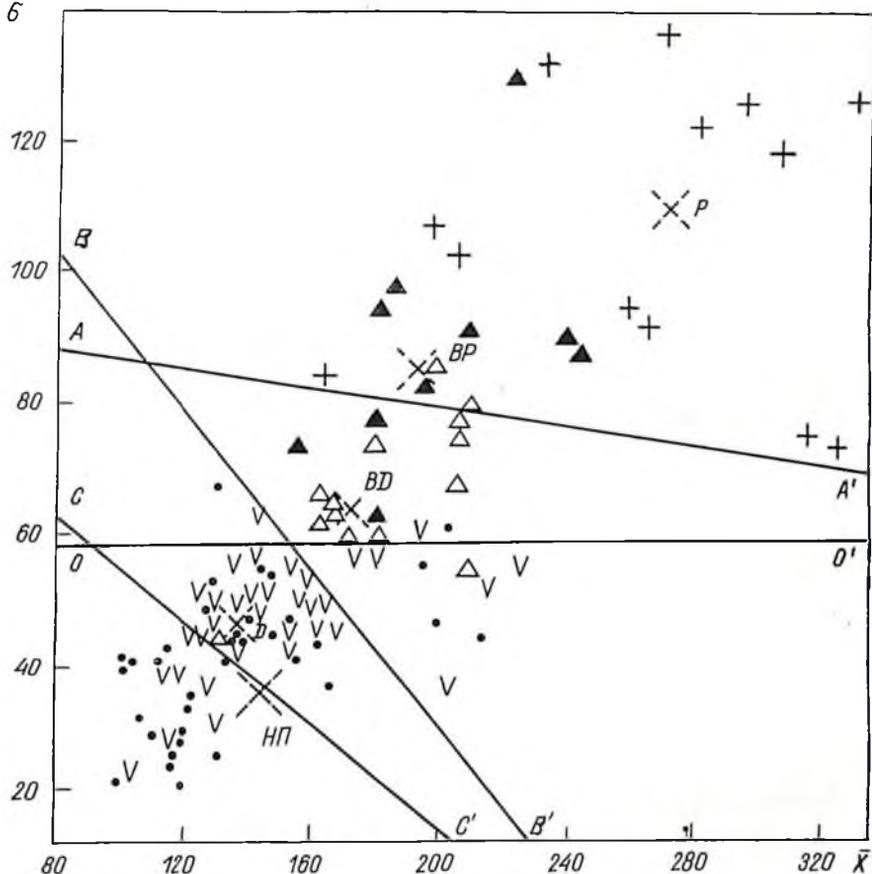


Рис. 58. Зависимость среднеквадратического отклонения  $\sigma$  от математического ожидания площади ядер  $\bar{X}$ :

+ — рак, ▲ — внутриэпителиальный рак, Δ — выраженная дисплазия, V — дисплазии умеренная и слабая, ● — нормальные процессы

широты) не способствует улучшению диагностики, так как на них наблюдается существенное «перемешивание» образцов, исключающее возможность разграничения областей с определенными диагнозами. Методика формирования алгоритма распознавания по методу КЛДФ включает определение численных значений коэффициентов линейных уравнений прямых, разделяющих определенные области соответствующих диагнозов. Так, прямая  $AA'$  отграничивает верхнюю часть плоскости рис. 58 содержащую наибольшее число раковых препаратов (преинвазивные и инвазивные формы рака шейки матки), от лежащей ниже с предраковыми образцами. Следовательно, выполнение условия влечет за собой постановку диагноза рак

$$\sigma + 0,067 \bar{X} > 94. \quad (57)$$

Для выделения области с выраженной дисплазией проведем пограничную линию  $BB'$ , откуда следует неравенство

$$\sigma + 0,7 \bar{X} > 175. \quad (58)$$

Следующим этапом является ограничение области доброкачественных патологических процессов линией  $CC'$

$$\sigma + 0,37 \bar{X} > 93. \quad (59)$$

Отсюда алгоритм постановки диагноза записывается в следующем виде:

1. Если выполняется неравенство (57), то ставится диагноз «рак».

2. В противном случае надо проверить неравенство (58) и при выполнении его, а также условия  $\sigma > 59$  поставить диагноз атрофического кольпита.

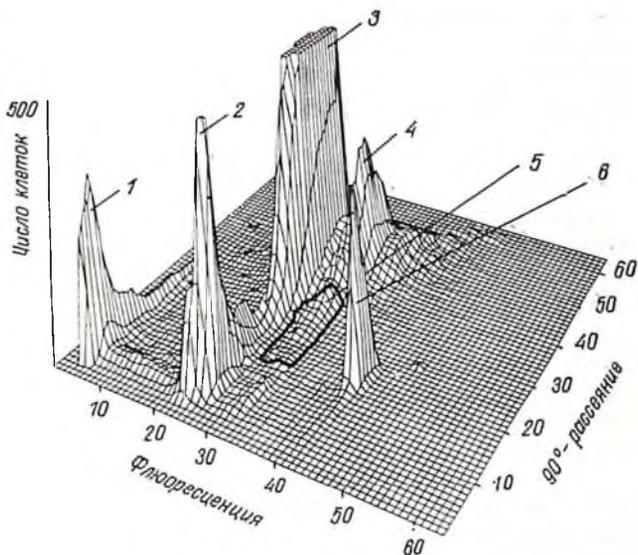
3. Если неравенство (58) не выполняется, то следует проверить неравенство (59), при выполнении неравенства (59) — поставить диагноз слабой и умеренной дисплазии, в противном случае — отнести к нормальным. Метод КЛДФ позволяет достаточно четко определить группу выраженных диспластических процессов, причем  $\alpha$  и  $\beta$  не превышают 16 %. Труднее дифференцировать умеренную и слабую дисплазию и доброкачественные процессы.

Для зоны доброкачественных процессов  $\beta$  составляет 26 %, а  $\alpha = 42$  %. Это свидетельствует о существенном «перемешивании» указанных диагнозов, что, в свою очередь, подтверждает мнение морфологов о целесообразности объединения слабой и умеренной степени дисплазии в одну группу — простая дисплазия.

В ходе анализа диаграммы  $\bar{X}$  определилась обособленная группа, которая занимает промежуточную зону между начальной и выраженной дисплазиями. Согласно анамнестическим данным, эти препараты принадлежат женщинам 40—50 лет с менопаузой 5—20 лет и соответствуют диагнозу атрофического кольпита. Увеличение площади ядра в этом случае достигает 10—15 %.

Отображение результатов двухпараметрического анализа в изометрической проекции повышает наглядность корреляционных зависимостей исследуемых параметров. Изометрическая регистрация результатов нашла широкое применение при проточном методе анализа, так как для ее осуществления требуется множество исследуемых клеток. Процесс построения двухпараметрических гистограмм в изометрической проекции заключается в том, что по третьей оси откладывается количество клеток, имеющих определенные значения координат на параметрической плоскости, соответствующее значениям параметров этих клеток, т. е. оценивается совместная вероятность. Таким образом, получается объемная фигура на плоскости двух параметров. Пример такой гистограммы [57, 279] приведен на рис. 59. На одной из нижних осей гистограммы цервикально-вагинального образца отложена амплитуда флюоресценции, на другой — рассеяние клеток под углом  $90^\circ$  (окраска хромомицином  $A_3$ ). Левый пик 1 вызван бактериями и

Рис. 59. Двухпараметрическая гистограмма цервикально-вагинального образца



обломками клеток, пик 2 — лейкоцитами, самый большой пик 3 обуславливается эпителиальными клетками. Клетки карциномы *in situ* и инвазивной карциномы занимают область между пиками 2 и 3. Они содержат повышенное количество ДНК. Пик 4 вызван конгломератами (скоплениями) клеток. Исходя из представленной «объемной» гистограммы, видно, что использование рас-

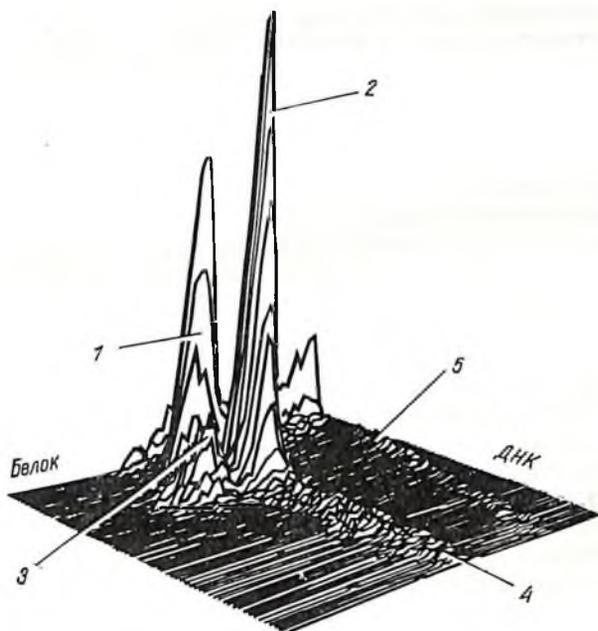


Рис. 60. Гистограмма клеток крови в изометрической проекции в зависимости от содержания ДНК и белка:

1 — лимфоциты, 2 — гранулоциты, 3 — моноциты, 4 — эозинофилы, 5 — эритроциты

сеяния и флюоресценции позволяет разделить различные типы клеток, в том числе злокачественные. Это, в свою очередь, создает возможность разработки алгоритма диагностики предраковых и раковых процессов.

Результаты гематологических исследований в виде гистограммы в изометрической проекции приводятся на рис. 60. Перед анализом кровь гемолизировали и окрашивали флюорохромами: пропидиум йодидом и FITC. Псевдотрехмерная проекция интенсивности двух параметров — красной и зеленой флюоресценции — имеет многовершинную структуру, что позволяет выделить четыре класса лейкоцитов: эозилимфоциты, нейтрофилы, моноциты, эозинофилы и эритроциты. В режиме интерактивной машинной графики оператор может вносить коррективы в это построение, за счет быстрого взаимодействия с ЭВМ выполнять обзорные структуры под разными углами наблюдения, определять статистические параметры выбранных зон.

Задача классификации препаратов относится к известной проблеме распознавания образов, решение которой начинается с деления пространства признаков на подпространства. Исследуемые объекты — гетерогенные системы со взаимосвязанными признаками. Следовательно, плоскости, разделяющие пространство признаков, таких объектов имеют сложную форму. Для разработки соответствующих классификаторов нужны априорные знания о законах распределения признаков. Аналитический подход в решении этой задачи пока не получил широкого распространения, что объясняется фактически отсутствием математических моделей.

В настоящее время диагностика цитологических препаратов выполняется на основе статистического подхода. Идея и методика построения простых классификаторов может быть проиллюстрирована на следующих примерах.

С целью решения задачи распознавания по двум признакам исходное пространство, т. е. область, занимаемая всеми препаратами, делится на отдельные зоны (например, прямоугольные участки на двуметрической гистограмме). Каждая из этих зон характеризуется вероятностью распределения препаратов по цитологическому диагнозу. Теперь, чтобы определить к какому классу относится вновь исследуемый препарат достаточно вычислить значение признаков и указать зону попадания достаточного значения соответствующей данному препарату. Качество постановки точки, соответствующую данности зон на которые разбито пространство признаков, сложности алгоритма диагностики, наличие областей, в которых не выполняется свойство линейной делимости препаратов. По мере накопления банка данных количество зон может быть увеличено, так как растет количество точек внутри «конфликтных» областей, а следовательно может быть уточнена граница раздела. В конечном итоге, вероятностное описание данных выражается аналитическими функциями, что несомненно скажется на объективизации и повышении качества дифференциальной диагностики.

Примером реализации такой программы служит телевизионный

анализатор «Интеграл-2МТ», в котором в качестве информативных параметров диагностики злокачественных заболеваний шейки матки используется: математическое ожидание и среднеквадратическое отклонение площади ядер. Минимальный объем выборки — 100 клеток. Диагноз выполняется путем определения вероятности отнесения препарата к следующим категориям: норма, умеренная и выраженная дисплазия, рак.

Современные анализаторы, обработка данных в которых выполняется микропроцессорами, позволяют воплотить идею интерактивного классификатора. В таких приборах информация о препаратах выводится на экран ВКУ, т. е. пространство признаков представляется в виде двупараметрической гистограммы, либо ее изометрической проекции. С помощью диалоговой системы оператор разделяет пространство признаков на области, при этом никаких аналитических расчетов не требуется. Визуальное представление «конфликтных» областей облегчает выбор границ и их коррекцию. После завершения этапа обучения координаты границ вводятся в ПЗУ и в дальнейшем используются для классификации в автоматическом режиме. Если исследуемая пара признаков не обеспечивает требуемой точности разделения, необходимо продолжить графический выбор информативных признаков. Графический метод классификации способствует существенному упрощению алгоритма распознавания и уменьшению продолжительности времени анализа. Однако отметим, что ему присуща некоторая погрешность за счет субъективной интерпретации данных при нахождении адекватного решающего правила разделения препаратов.

Когда простые линейные классификаторы не обеспечивают требуемой точности, рекомендуется использование их комбинации, а для ограниченных «конфликтных» областей, в которых препараты перемешиваются, применяют более сложные алгоритмы, например, известное правило «ближайшего соседа». Использование результатов многопараметрической обработки результатов цитологических исследований влечет за собой также усложнение и создание новых распознающих систем, методов распознавания, разработку критериев оптимального деления пространства признаков, моделирование и оценку эффективности сложных классификаторов.

Моделирование реальных изображений клеток представляется полезным на этапе разработки методов сегментации, создания алгоритмов реконструкции изображения клеток, а также классификации препаратов. Такой подход позволяет сократить объемные морфологические исследования, с помощью ЭВМ оперативно и точно проверить теоретические модели, разработать критерии оценки функциональной активности клеток на разных стадиях дифференцировки малигнизации. Проиллюстрируем возможность изучения морфологических изменений эпителиальных клеток с помощью анализа изображений текстуры моделей. Известно, что двумерные изображения и сканограммы, полученные при одномерном сканировании, неадекватно передают информацию о компактизации хроматина интерфазных ядер, являющимися трехмерными микрообъ-

ектами. Математическая модель для оценки эффективности описания распределения поглощающего вещества в ядрах пока не создана, поэтому целесообразно использовать простые модели, реально описывающие изображения клеток. Так как текстура определяется совокупностью точечных элементов изображения, характеризующихся определенными значениями оптической плотности и пространственного распределения, был рассмотрен ряд моделей клеток с гранулярным и равномерным распределениями хроматина ядер, имитирующих их характерные особенности, свойственные различным стадиям заболеваний. В ходе анализа моделей производилось изменение фона, размера и расположения гранул, а также границ моделей.

Разработанное программное обеспечение состоит из двух подпрограмм. С помощью первой формируется банк данных, с помощью второй — выводятся информационные таблицы. По программе обработки массивов оцифрованных данных выполнялась нормировка путем деления на медиану фона и вычислялись параметры пиков и впадин по следующему алгоритму: высота пика определялась как разность максимальной высоты пика и большего значения амплитуды впадин, расположенных по обе стороны пика, с учетом краевых нулевых значений. При этом единственный пик в строке, сформированный ее краевыми значениями, не учитывался. Основание определяется длительностью пика, сформированного по основанию, соответствующего впадине с большей амплитудой, если сравнивать впадины по обе стороны пика. Глубина впадины равна разности амплитуды меньшего пика, формирующего впадину, и амплитуды впадины. Представленный алгоритм определения пиков и впадин позволяет исключить влияние формы ядра на статистические параметры текстуры. Разработанные программы позволяют определить следующие характеристики:

1. Площадь ядра
2. Объем ядра — сумма всех строк
3. Количество пиков
4. Суммарная площадь всех пиков по основанию
5. Отношение основания пиков к площади ядра
6. Сумма отношения высот
7. Сумма площадей всех гранул
8. Отношение площади гранул к объему ядра
9. Удельное относительное основание гранулы
10. Удельный относительный объем гранулы
11. Удельная относительная высота гранулы
12. Количества впадин
13. Суммарная площадь всех впадин по основанию
14. Отношение основания впадин к площади ядра
15. Сумма отношения глубин впадин
16. Сумма площадей всех впадин
17. Отношение площади впадин к объему ядра
18. Удельное относительное основание впадины
19. Удельный относительный объем впадины

## 20. Удельная относительная высота впадины.

Эти параметры были определены для двух режимов: А — двунаправленного и В — однонаправленного сканирования. Последний был получен методом узкой строки (в один элемент разрешения) при сканировании цифровой матрицы моделей клеток. Выделение пиков сканограмм осуществлялось также по указанному выше правилу. Результаты анализа текстуры позволили выделить следующие структурные параметры: 6, 11, 4, 5, 14, 16, 17, величины которых в 2—3 раза больше в случае моделей, имитирующих опухоли по сравнению с условной нормой, в то время как параметр 9 меньше. Количество пиков сканограммы при равномерной структуре хроматина больше по сравнению с гранулированным ядром, при этом основание, площадь и амплитуда существенно меньше. Цифровое изображение моделей клеток было также подвергнуто обработке локальным фильтром лапласианом, маска которого представляет «окно» —  $3 \times 3$  элемента разрешения. Трансформированные изображения, определяющие границы конденсированного хроматина, использовались для расчета параметров для режимов А<sup>1</sup> и В<sup>1</sup>. Результаты моделирования использовались для объяснения результатов программного анализа клеток реальных клинических образцов. Так, исследование 60 портретов клеток интерфазных ядер слизистой оболочки шейки матки подтвердило перспективность применения признаков, характеризующих гранулярную компоненту ядра, как наиболее чувствительных признаков, связанных с биосинтетической активностью клетки. Причем данные изменения существенно отличаются при пролиферативных процессах и раке шейки матки.

Представленные материалы в этой главе свидетельствуют о том, что обработка цитологической информации на современном этапе ограничивается рамками получения и накопления данных о клетках, их машинной интерпретацией в виде гистограмм и до некоторой степени классификацией. В связи с недостаточностью разработки методов математической статистики применительно к задачам клинической диагностики, связанным с многомерным анализом, полная автоматическая классификация препаратов является проблемой следующего этапа цитологических исследований.

Следует отметить, что рассмотренные вопросы анализа двухмерных «портретов» клеток относятся к проблеме цифровой обработки изображения, актуальность которой продиктована современными требованиями различных областей науки и техники. Трудность этого решения заключается в большом объеме обрабатываемых данных и вытекающей отсюда необходимости преобразования входной информации, включающей линейную и нелинейную фильтрацию, создание новых способов программно-алгоритмического обеспечения, разработки новых методов многомерного анализа.

## ПРИМЕНЕНИЕ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМ В БИОЛОГИИ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

Возможности применения методов количественной цитометрии в биологических и медицинских исследованиях очень широки. Они включают множество задач — начиная от поиска наиболее информативных морфометрических и цитоспектрофотометрических критериев оценки морфологических особенностей клеток анализа кинетики ДНК в клеточном цикле и кончая многопараметрическим изучением гетерогенных популяций исследуемых объектов. Данные задачи могут изучаться на различных экспериментальных моделях или клиническом материале, общие принципы остаются одинаковыми для тех и других объектов.

Благодаря фундаментальным исследованиям в области экспериментальной биологии и клинической медицины были получены факты, касающиеся кинетики клеточного цикла.

К настоящему времени уже накоплен определенный опыт работы по данному вопросу. Практически не существует ни одного органа или ткани человеческого организма, экспериментального животного, который бы не подвергался цитометрическому или цитоспектрофотометрическому анализу. На основании этих данных установлено, что содержание ДНК нормальных соматических клеток соответствует диплоидному набору хромосом (2с) и характеризуется одним модальным классом на ДНК-гистограмме. Значение этого параметра для одного и того же индивида может колебаться в пределах 30 %. Наиболее выраженные вариации в содержании ДНК наблюдаются в клетках пролиферирующих органов — печени и селезенки. Эти данные были получены при определении содержания ДНК в ядрах клеток различных органов и тканей фенотически здоровых людей (130 проб — по 5—14 от каждого случая) [233].

В изучаемых объектах схематически представлены фазы митотического цикла и распределение ДНК в различных тканях (рис. 61). Рассчитывалась кинетика клеточной пролиферации, а в патологически измененном органе — степень выраженности процесса, особенно в случае раковой опухоли.

Благодаря использованию в исследованиях сканирующих и проточных цитофотометров определены важные данные, касающиеся классификации клеток по фазам митотического цикла, а также получены результаты, позволяющие оценить продолжи-

тельность и дисперсию соответствующих фаз цикла  $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2+M$ . Однопараметрический анализ кинетики клеточного цикла по изучению содержания ДНК показал возможности количественной цитометрии и открыл широкие перспективы относительно его использования для исследования и углубления знаний по изучаемому вопросу.

В настоящее время появились данные, которые значительно расширяют традиционное представление, касающееся распределения клеток в четырех последовательных фазах цикла. Одновременное изучение двух параметров — ДНК и белка, ДНК и РНК — дает существенно больше информации о кинетике клеточного цикла, так как позволяет разделить сливающиеся фазы цикла, такие, как  $G_0+G_1$  и  $G_2+M$ , а также идентифицировать дополнительные фазы в пресинтетическом ( $G_1$ ) и постсинтетическом ( $G_2$ ) периодах. При анализе пресинтетического периода в эксперименте и клиническом материале была показана возможность использования АО (ДНК и РНК) для дополнительной классификации  $G_1$ -периода на  $G1Q$ ,  $G1A$ ,  $G1B$  и  $G2A$ ,  $G2B$  [138, 139].

На культуре клеток HeLa с использованием меченых радиоактивных изотопов и проточной цитометрии выделены в постсинтетическом периоде клетки, относящиеся к ранней ( $G2A$ ) и поздней ( $G2B$ ) фазам клеточного цикла [124].

Pollack и др. [249] при цитометрическом анализе ДНК и белка (FITC/PI) в клетках трех различных экспериментальных моделей, включающих культуру лейкозных опухолевых клеток крыс EL4, микрокультуру лимфоцитов периферической крови человека HPBL, не стимулированных и стимулированных фитогемагглютинином (ФГА), а также материала солидной опухоли в виде перевивной аденокарциномы предстательной железы крыс R 3327=Q показал возможность разделения пресинтетического периода на три фазы, выделив в нем покоящиеся клетки  $G1Q$ , ранние  $G1A$  и поздние  $G2B$  клетки, в постсинтетическом периоде были соответственно выделены ранние  $G2A$  и поздние  $G2B$  клетки. Для задержки вхождения клеток в  $S$ -фазу использовали актиномицидин D, оксимочевину, для блока митотических клеток применяли колцемид.

В работе также широко представлены данные, свидетельствующие о возможности классификации пролиферирующих лимфоид-

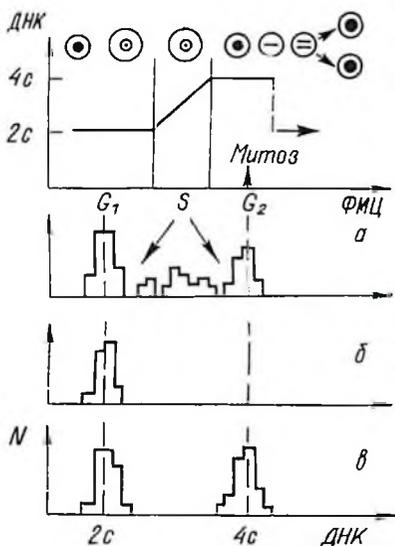


Рис. 61. Фазы митотического цикла (ФМЦ) и распределение содержания ДНК в различных тканях: 1 — пролиферирующая ткань, 2 — дифференцирующаяся ткань, 3 — полиплоидная ткань (печень)

ных и лейкозных опухолевых EL4-клеток в различные сроки культивирования на соответствующие S-фазы клеточного цикла с отдельным выделением в них M- и G<sub>2</sub>-фаз. Исходя из представленных данных, очевидно, что проточный цитометрический анализ по двум параметрам является одним из перспективных методов оценки кинетики клеточного цикла, позволяющий провести идентификацию клеток, находящихся в ранее неопределяемых фазах цикла (G<sub>1</sub>A, G<sub>1</sub>B и G<sub>2</sub>A, G<sub>2</sub>B), и определить клетки, находящиеся в фазах M и G<sub>2</sub>.

Приведенные выше работы Roti, Darzynkiewicz, Pollack с соавт. подводят исследователя к более четкому раскрытию механизмов, происходящих в клетке во время ее деления, созревания и дифференцировки, на основании распознавания 6 или даже 7 частей клеточного цикла при учете фазы покоящихся клеток.

В некоторых работах клинического направления используется двухпараметрический анализ клеточного материала с достаточно успешной классификацией патологических процессов, например при распознавании доброкачественных и раковых процессов мочевого пузыря, шейки матки, а также для классификации различных форм гемобластозов.

В современной литературе весьма широко представлены данные по цитоспектрофотометрическому изучению интеразных ядер. Следует отметить, что особую ценность представляют работы, направленные на изучение митотических клеток с последующим анализом хромосом. Известно, что изменения, регистрируемые в хромосомах, могут быть определяющими диагностическими маркерами опухоли, особенно на начальных этапах возникновения злокачественного процесса. Однако используемые методы анализа хромосомного материала сравнительно сложны и трудоемки. Поэтому в последнее время наряду с обычными цитогенетическими методами исследования кариотипа нормальных и малигнизированных клеток стали применяться сканирующие и проточные цитометрические анализаторы. Приборы последнего типа обеспечивают достаточно высокую точность и скорость измерения, а также воспроизводимость результатов. Скорость анализа хромосом в протоке составляет 1000—2000 хромосом в секунду. Проточный цитометрический анализ ДНК метафазных хромосом в суспензии является совершенно новым методом кариотипирования. Поэтому в исследованиях такого рода основной акцент делается на разработке эффективных методов сепарации интактных хромосом с сохранением их целостности и морфологической структуры.

В представленных работах чаще всего изучаемой моделью являются метафазные хромосомы, полученные из клеток китайского хомячка и человека, приготовленные для прямого кариотипирования, а также для анализа кариотипа с кратковременным или длительным культивированием клеток. Для анализа генетического материала используются однопараметрические проточные системы, где проводится анализ и сортировка хромосом по интенсивности флуоресценции в комплексе с такими флуорохромами,

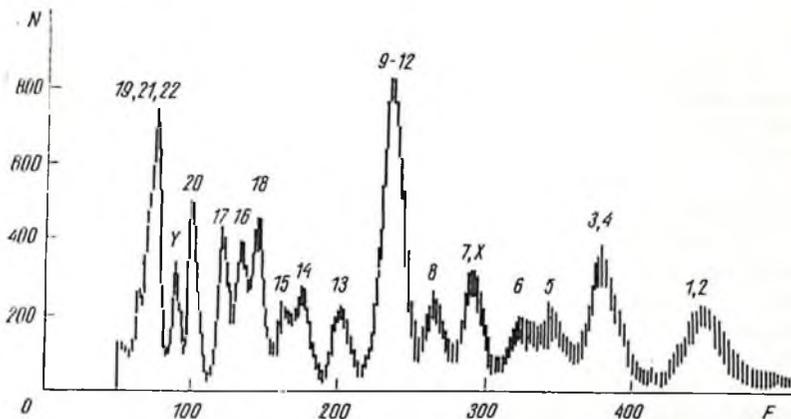


Рис. 62. Карнограмма 46 хромосом с четко разрешенными их пиками, выделенные из периферической крови донора мужчины

как PI, EtBr, Но 33258, а также применяются высокоразрешающие проточные цитометры с двухлазерной системой, которые обеспечивают бивариантный анализ ДНК, меченный двумя флюорохромами. Большей частью используют сочетание Но 33258, специфически связывающийся с АТ-богатыми участками ДНК, и хромомиици А<sub>3</sub>, селективно взаимодействующий с ГЦ-парами.

Данные, полученные при помощи автоматизированных систем, представляются в виде гистограмм, так называемых проточных карнограмм. О качестве анализа свидетельствует высокое разрешение гистограмм, которые характеризуются множественными узкими пиками, относящимися к различным классам хромосом. Количество пиков в большинстве случаев соответствует набору хромосом, которое характерно для данного индивидуума. При исследовании клеток зародыша китайского хомячка методом проточного карнотипирования на этапе экспоненциального роста были получены все 11 пиков, соответствующие 11 парам хромосом самки исследуемого животного [278].

Обычно применяемые цитогенетические методы не позволяют идентифицировать Y-хромосому из G- и F-групп хромосом человека. Применение проточной цитометрии позволяет решить эту задачу. Так, на лимфоцитах, выделенных из периферической крови доноров-мужчин, с кратковременным культивированием (52 ч) и добавлением колцемида была показана возможность определения позиции Y-хромосомы по интенсивности ДНК-флюоресценции (Но 33258) в виде пика на проточной карнограмме [157]. У 17 обследуемых доноров позиция Y-хромосомы на гистограмме варьировала. В некоторых наблюдениях пик Y-хромосомы находился между 19 и 20 хромосомами, в других — между 20-й и 17-й. В 70 % случаев Y-хромосома была контаминирована с 20-й. На рис. 62 представлена типичная флюоресцентная гистограмма для 22 пар соматических хромосом человека с обозначением позиций половых хромосом X и Y.

Из работ, посвященных хромосомному анализу, известно, что при использовании однолазерной проточной системы может быть идентифицировано около 15 хромосом человека, исключая Y-хромосому. Применение двухлазерной системы (FACS-II) позволяет по интенсивности флуоресценции распознать около 20 популяций хромосом в метафазных пластинках и, что особенно ценно, идентифицировать маленькие аутосомы человека [214]. В этом случае помимо названных выше флюорохромоов (Но 33258 и хромомицин А<sub>3</sub>) вводится в комплекс субстрат — флюорохром третий краситель: нетропсин или дистамицин А. Это способствует получению дополнительной информации о специфике хромосом, т. е. определению структурных особенностей нормальных и атипических хромосом. В результате бивариантного проточного анализа с дополнительной окраской хромосом авторам удалось на модели клеточной линии человеческих лимфобластов получить высокое разрешение метафазных пластин с последующим изучением структурной перестройки хромосом и идентификацией аномальных.

Проточный бивариантный анализ, используемый для кариотипа хромосом, апробирован на достаточно широком спектре клинического и экспериментального материала, включая опухоль прямой кишки, культуры клеток асцитической жидкости, лимфоцитов периферической крови и фибробластов человека [153].

Интенсивное развитие автоматизированных диагностических систем сканирующего и проточного типов способствует быстрейшему внедрению цитометрического метода исследования в клиническую практику. В процессе развития и освоения метода происходит его специализация по трем ведущим направлениям. Первое — это массовые профилактические осмотры населения с целью выявления ранних стадий заболеваний, второе — дифференциальная диагностика пограничных состояний и злокачественного роста, третье — контроль динамики опухолевого заболевания в ходе проведения лекарственной, лучевой и комбинированной терапии, а также хирургического метода лечения. Особенно плодотворно ведутся цитометрические исследования в области гематологии, гинекологии, урологии, пульмонологии, гастроэнтерологии, метод также используется для диагностики патологических процессов молочной и щитовидной желез.

Из истории количественной цитометрии известно, что одними из первых объектов изучения были форменные элементы крови и эпителиальные клетки слизистой оболочки шейки матки. Данное обстоятельство связано с доступностью получения диагностического материала, разнообразием клеточных элементов, характеризующих нормальное физиологическое состояние исследуемых объектов, а также с трудностью морфологической идентификации их при различных патологических процессах, особенно онкологических заболеваниях.

## ГИНЕКОЛОГИЯ

Достаточно большой опыт применения количественной цитометрии в области гинекологии позволяет выделить несколько этапов в развитии количественного метода оценки морфологических особенностей эпителиальных клеток шейки матки. Первый этап характеризуется исследованиями, в которых рассматривается возможность осуществления цитоскрининга, т. е. разграничение патологических процессов на две группы «норма — рак». Второй этап связан с дифференциацией пограничных состояний шейки матки по анализу одного, двух критериев диагностики с последующим применением корреляционного анализа, построением двух- и трехпараметрических диаграмм зависимостей изучаемых признаков. Третий этап исследований направлен на углубленную идентификацию клеток с изучением их структурных особенностей (интегральная оптическая плотность, содержание ДНК), отражающих определенные состояния шейки матки при диспластических, метапластических процессах, внутриэпителиальном и инвазивных формах рака. Полученные результаты могут послужить основой изучения механизмов перестройки эпителиального пласта в процессе его озлокачествления и определения природы злокачественной трансформации клетки. Характеризуя данное направление, можно подчеркнуть значимость цитометрических исследований и в области осуществления контроля качества цитологической и гистологической диагностики заболеваний шейки матки, а также оценки степени репарации ткани в процессе лечения.

Указанные этапы исследования базируются на общих принципах количественной цитометрии. В основу объективной оценки морфологических признаков клетки положены данные о структурных и размерных особенностях изучаемых объектов.

Исходя из фундаментальных исследований, посвященных оценке более чем 196 качественных и количественных признаков ядра и клетки и общего фона препарата, определяем что более значимы параметры, характеризующие морфологические особенности ядра [14, 195]. Поэтому при количественном анализе препаратов обычно исходят из информативности размерных и структурных характеристик ядра: изучают его площадь, периметр, объем, диаметр, определяют коэффициент формы и оптическую плотность, содержание ДНК, РНК и белка в нем.

Известно достаточно большое число работ, посвященных объективизации морфологических признаков клетки при различных патологических состояниях шейки матки. И несмотря на то, что исследуются цито- и гистологические препараты, оценка количественных параметров изучаемых объектов осуществляется различными автоматизированными системами, а объективные критерии анализа клетки представляются в относительных или абсолютных единицах измерения, удается обнаружить общие закономерности, характеризующие клетки в процессе малигнизации ткани. Совершенно однозначно определено, что в ряду доброкачественных,

предраковых и раковых процессов шейки матки происходят прогрессирующее увеличение размерных признаков ядра и усиление гетерогенности клеточной популяции [25, 35, 43, 114, 115, 202, 288, 305, 306] (табл. 17).

Динамика этих изменений прослеживается по анализу морфометрических и статистических данных, полученных при оценке размерных признаков ядра при доброкачественных, диспластических процессах различной степени выраженности, внутриэпителиальных и инвазивных формах рака шейки матки (рис. 63). Несмотря на достаточно высокую информативность изучаемых признаков, которые позволяют четко дифференцировать норму и опухоль, существует целый спектр пограничных состояний органа, которые требуют тщательной дифференциации процессов, особенно выраженной дисплазии, внутриэпителиального и инвазивного рака шейки матки. Для этой цели предложен метод двухпараметрической оценки размерных признаков ядра по наиболее значимым статистическим критериям (математическое ожидание и среднеквадратическое отклонение) с применением кусочно-линейной дискриминантной функции. Данный подход позволил выделить на диаграмме зависимостей компактные области, соответствующие трем группам патологии шейки матки, и создать алгоритм дифференциальной диагностики (см. гл. 8). Предложенный метод оценки морфометрических критериев позволил определить некоторые особенности, характеризующие группу диспластических процессов шейки матки. Установлена целесообразность объединения легкой и умеренной степени дисплазии в одну группу вследствие близости морфометрических данных и невозможности подразделения этих процессов на цитологическом уровне (табл. 18). В связи с этим предлагается классифицировать предраковые процессы шейки матки на две степени: простую и выраженную. Данная классификация будет способствовать более четкой диагностике и более рациональному методу лечения диспластических процессов шейки матки.

Двухпараметрический подход к оценке морфологических при-

Таблица 17. Дифференциальная диагностика доброкачественных, предраковых и ра

| Тип препарата   | Норма и доброкачественные процессы | Диспла                  |                   |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------|
|                 |                                    | легкая                  | умеренная         |
| Гистологический | 60—80                              | —                       | 41,1—113,4        |
|                 | 34,58±3,93<br>22,29±1,54           | 87,0±6,63<br>20,71±1,51 | 110,82±19,12<br>— |
| Цитологический  | 36,51±13,31                        | 178±32                  | 169±42            |
|                 | 70,0±19,6                          | —                       | 119±43,1          |
|                 | 80                                 | —                       | 162               |
|                 | 89,21                              | —                       | 141,81            |
|                 | 121,8±3,1                          | —                       | 182,43±5,7        |

знаков клеток более информативен, поскольку при сочетании выбранных признаков определяются компактные области, которые обычно соответствуют определенному классу клеток или же какому-то патологическому процессу шейки матки. Например, при изучении двухпараметрических диаграмм зависимостей по интенсивности ядерной флюоресценции и соотношению диаметров ядра и цитоплазмы различных клеточных субпопуляций поверхностного эпителия в норме, цилиндрического диспластических клеток, клеток карциномы *in situ* шейки матки удалось провести разделение между нормальными и патологическими процессами, а также по совокупности признаков дифференцировать элементы плоскоклеточного и цилиндрического эпителия на разных стадиях их дифференцировки [304].

Полученные данные послужили основой для разработки многопараметрического метода анализа цитологических образцов с выделением клеток, характеризующих различную степень дисплазии, внутриэпителиальный и плоскоклеточный рак. Определено, что разрешающий порог интенсивности флюоресценции ядер атипичных клеток в 2,5 раза выше, чем в нормальных клетках промежуточного слоя. Разработанная система может быть использована для цитоскрининговых программ, так как позволяет выявлять наличие атипичных клеток при незначительном их количестве — от 0,1 % и более [305].

Работы Bartels и Wied посвящены изучению и поиску диагностических маркеров диспластически измененных клеток, визуально классифицируемых как некератизированные, кератизированные, а также метаплазированные в трех диагностических категориях — при умеренной и тяжелой дисплазии, инвазивном раке и *Ca in situ* [114, 115, 307]. Исследования базировались на изучении размерных характеристик ядра и клетки, которые включали площадь и периметр ядра и цитоплазмы, большой и малый радиусы, расчетные показатели этих характеристик, общую оптическую плотность ядра, характер окраски ядерного хроматина.

ковых состояний шейки матки, основанная на морфометрических критериях площади ядра

| эзия       | Рак                 |              | Библиографический источник |
|------------|---------------------|--------------|----------------------------|
|            | внутриэпителиальный | инвазивный   |                            |
| —          | 32,2—154,8          | 47,7—108,8   | [43]                       |
| 98,2±17,1  | 209,64±49,83        | 162,15±11,44 | [288]                      |
| 53,72±9,66 | 58,7±18,04          | —            | [25]                       |
| 156±35     | 116±26              | 77,0±26,6    | [194]                      |
| —          | 111±43              | 221±82,8     | [191a]                     |
| —          | —                   | —            | [241]                      |
| —          | —                   | 226,26       | [45]                       |
| —          | —                   | 228,21±8,8   | [35]                       |

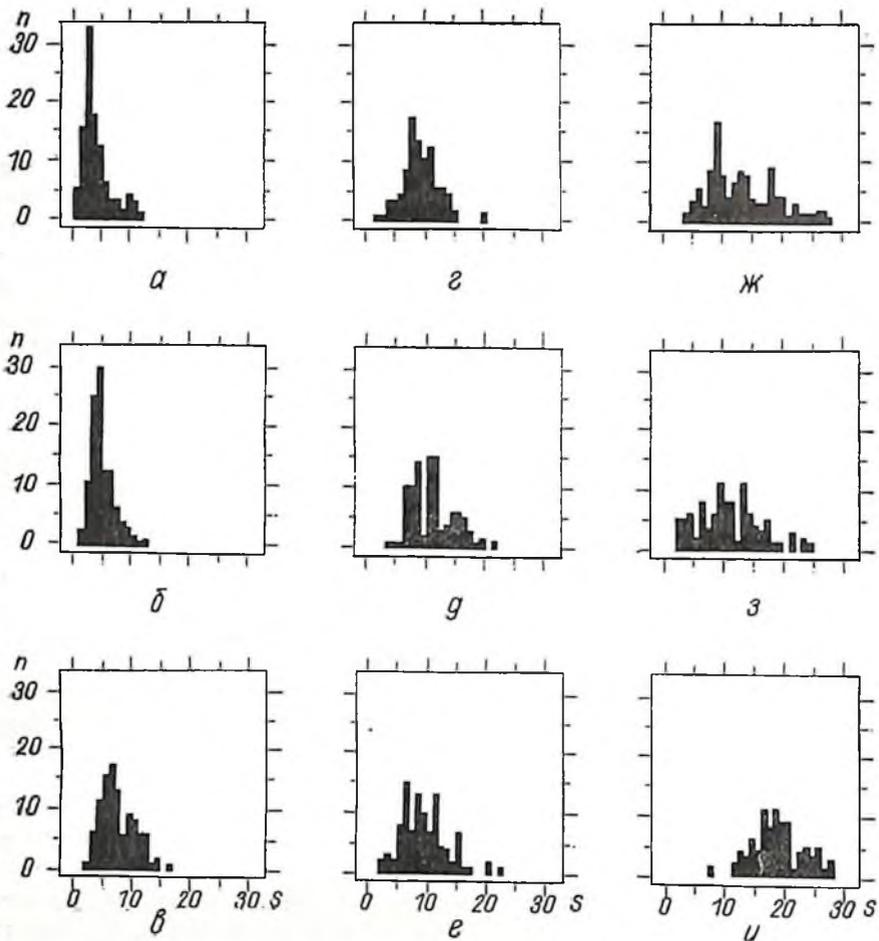


Рис. 63. Гистограмма распределения площади ядер клеток эпителия шейки матки в динамике развития патологического процесса:

*а, б, в* — доброкачественные, *г, д, е* — предраковые, *ж, з, и* — раковые процессы по вертикали — количество ядер, по горизонтали — их площадь (в относительных единицах)

Таблица 18. Обобщенные значения математического ожидания и среднеквадратического отклонения площади и периметра ядер 68 препаратов шейки матки, отн. ед.

| Диагноз              | Параметр |       |          |       |
|----------------------|----------|-------|----------|-------|
|                      | Площадь  |       | Периметр |       |
|                      | $M_x$    | $S_x$ | $M_x$    | $S_x$ |
| Норма                | 126,0    | 28,5  | 33,6     | 8,65  |
| Слабая дисплазия     | 157,3    | 49,9  | 44,7     | 11,70 |
| Умеренная дисплазия  | 144,8    | 48,4  | 44,8     | 13,60 |
| Выраженная дисплазия | 184,9    | 84,9  | 53,0     | 16,40 |
| Рак                  | 291,3    | 125,2 | 61,6     | 16,80 |

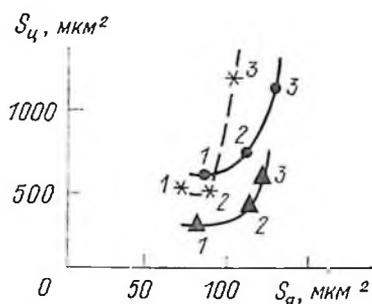


Рис. 64. Двухпараметрическая диаграмма зависимости площади ядра  $S_n$  и цитоплазмы  $S_c$  для кератизированных (\*), некератизированных (●), диспластических клеток из участков метаплазии (▲) для трех диагностических групп:

1 — инвазивный рак, 2 — выраженная дисплазия (внутриэпителлиальный рак), 3 — умеренная дисплазия

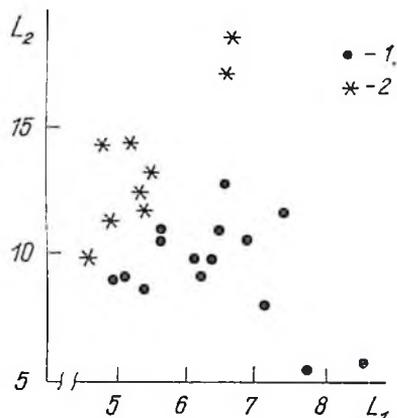


Рис. 65. Диаграмма зависимости вертикальной  $L_2$  и горизонтальной  $L_1$  осей цилиндрических клеток (мкм) при доброкачественных процессах (1) и аденокарциноме (2) шейки матки

В одной из работ обсуждается возможность определения так называемых цитодиагностических профилей, характерных для каждой изучаемой категории патологических процессов шейки матки. В качестве исходных данных используются площадь ядра и цитоплазмы, оптическая плотность ядра и спектральные свойства его, а также взаимосвязь характеристик на диаграмме двухпараметрической зависимости для каждого рассматриваемого случая. В качестве иллюстрации приведена корреляционная зависимость площади ядра и цитоплазмы кератизированных, некератизированных и метапластических клеток для трех диагностических категорий (рис. 64). Прослежена динамика изменения площади ядра и цитоплазмы. Отмечается общая закономерность убыли размера диспластических клеток при инвазивном раке шейки матки. Была осуществлена классификация процессов на основе данных о пропорциональном соотношении клеток с различными цитометрическими свойствами.

В дальнейшем перечисленные выше маркерные признаки диспластических клеток каждой категории были закодированы и с целью определения оценки выраженности того или иного признака проанализированы при помощи вариантно-аналитической системы ANOVA. Математический анализ показал, что различия в диагностической категории статистически выражены более значительно, чем в каждом индивидуальном случае. Более того, благодаря этому анализу стало возможным подразделение на 3 раз-

Таблица 19. Количественные параметры клеток в зависимости от патологии шейки матки

| Характеристика цилиндрических клеток | Диаметр ядра, мкм | Интегральная оптическая плотность, мкм <sup>2</sup> | ЯЦО, %   | Содержание ДНК |
|--------------------------------------|-------------------|---|----------|----------------|
| Нормальный случай                    |                   |   |          |                |
| Нормальные клетки                    | 5,44±0,15         | 15,0±0,8  | 50,2±1,3 | 2,03±0,06      |
| Атипичный случай                     |                   |   |          |                |
| «Нормальные» клетки                  | 6,26±0,14         | 17,4±7,0  | 44,4±1,6 | 2,09±0,07      |
| Атипичские                           | 6,56±0,15         | 20,1±8,5  | 50,8±1,3 | 2,23±0,06      |

личные субкатегории группу некератизированных дисплазий [115].

При детальном морфологическом изучении той или иной патологии шейки матки возникают определенные диагностические трудности при идентификации метапластических, диспластических, койлоцитарных клеток и атипических клеток, характеризующих внутриэпителиальную и инвазивную формы рака. Дополнительные методы оценки морфологии клеток, особенно с объективным количественным анализом, способствуют более совершенной классификации клеточных элементов и более четкой дифференциации патологических процессов шейки матки. В этом плане представляют большую ценность цитометрические исследования цитологических препаратов, направленные на идентификацию цилиндрических клеток при различных патологических состояниях шейки матки [259]. Морфометрическое изучение клеток эндоцервикальной области шейки матки проводили по анализу диаметра ядра и цитоплазмы, ЯЦО, формы клеток, интегральной оптической плотности ядра и содержания ДНК. В табл. 19 представлены количественные характеристики цилиндрических клеток в различном сочетании в зависимости от патологии шейки матки. Первая группа — нормальные цилиндрические клетки при отсутствии патологии, вторая — они же при патологических процессах, третья — атипические цилиндрические клетки при патологии шейки матки. Отмечено, что в цилиндрических клетках с признаками атипии изменялись все параметры в сторону увеличения по сравнению с двумя предыдущими группами.

Для уточнения характера протекания патологических процессов в эндоцервикальной части шейки матки также используют размерные параметры цилиндрических клеток (периметр и площадь ядра, горизонтальные и вертикальные оси ядра и цитоплазмы, а также соотношение этих величин). На основании количественного анализа гистологических препаратов установлены достоверные различия между группой доброкачественных процессов цервикального канала и аденокарциномы *in situ*. Несмотря на то что среди используемых параметров наиболее информативными были периметр ядра (27,9 и 35,0 мкм) и ядерно-цитоплазматическое отношение (46 и 58 %), для разграничения патологических

процессов более значимо двухпараметрическое соотношение горизонтальной и вертикальной осей ядра (рис. 65) [105].

Обычно оценка репаративных процессов, развивающихся в ткани шейки матки в ответ на воздействие лучевой терапии, лазерного и хирургического лечения, традиционно проводится по описательным критериям цитоморфологической диагностики. Большой результативности можно добиться при сочетании качественного анализа препаратов с цитоспектрофото- и морфометрическими методами исследования. Располагая данными цитоспектрофотометрии, проточной цитометрии по анализу содержания ДНК, можно дифференцировать процессы, возникающие в результате лучевых методов воздействия, и изменения, которые возникли в процессе трансформации клеток шейки матки [121, 225, 238]. На основании данных количественных характеристик клеток удается дифференцировать так называемый эффект постлучевой дисплазии, а также внести некоторую ясность в этиологию репаративных процессов ткани, т. е. определить, какие из двух типов клеток — цилиндрические или плоские — являются источником репарации ткани [120].

При совершенствовании различных методов лечения рака шейки матки необходим контроль эффективности проводимых мероприятий, особенно при неоперабельных формах заболевания, когда единственным методом лечения является лучевая терапия. Для более успешного лечения необходимо точно знать прогноз течения болезни для отбора лиц, которым предлагается более активное лучевое воздействие. В этом случае в качестве прогностического фактора применяют индекс плоидности ДНК. На основании данных об уровне плоидности у больных раком шейки матки со стадией процесса по классификации TNM  $T_6 - T_5$ , леченных различными комбинациями внутрисполостной и поверхностной радиотерапии, определено, что в 85 наблюдениях индекс плоидности ДНК был меньше 1,5, а в 86 — больше 1,5. Следует отметить, что величина индекса не коррелировала со стадийностью процесса и первичной излечиваемостью больных. Однако эти данные были полезны для прогноза течения болезни, так как отмечалась корреляция между величиной индекса плоидности и наступлением рецидива во всех наблюдениях. По данным количественной цитометрии определено, что при индексе плоидности меньше 1,5 только у 17 больных, а при индексе плоидности свыше 1,5 у 47-ми обнаружили рецидив заболевания и наличие отдаленных метастазов [197, 198].

В последнее время внимание исследователей привлекает такая патология шейки матки, как острые кондиломы, которые цитологически и гистологически характеризуются проявлением койлоцитарной атипии. По данным электронной микроскопии, предполагается, что пусковым механизмом развития кондилом является папилломо-вирусная инфекция человека. По-видимому, вирусному фактору принадлежит одна из ведущих ролей в этиологии возникновения рака шейки матки. Поэтому очень важны своевременное

Таблица 20. Средние значения размерных характеристик ядра и цитоплазмы нормальных, диспластических и койлоцитарных клеток

| Тип эпителиальных клеток     | Площадь, мкм <sup>2</sup> |                | ЯЦО         |
|------------------------------|---------------------------|----------------|-------------|
|                              | ядра                      | клетки         |             |
| Нормальные                   | 7,2±20,60                 | 2105,2±824,14  | 0,038±0,018 |
| Диспластические              | 92,3±80,86                | 279,3±232,96   | 0,358±0,275 |
| Койлоцитарные<br>(койлоциты) | 115,2±134,76              | 1752,1±1410,90 | 0,094±0,053 |

выявление и лечение кондиломатозных изменений эпителия. Однако существуют определенные диагностические трудности в правильной трактовке имеющихся изменений шейки матки, которые сопряжены со сложностью цитологической идентификации койлоцитарных клеток.

Определенных успехов в этом направлении можно добиться, используя цитометрические методы исследования образцов. Так, при сравнении морфометрических характеристик нормальных, диспластических и койлоцитарных клеток обнаружены существенные различия в размерных показателях ядра, цитоплазмы и ядерно-цитоплазматического отношения. Койлоциты отличаются большим размером ядра и более низким ядерно-цитоплазматическим отношением по сравнению с клетками классической дисплазии (табл. 20). Довольно высокое значение стандартного отклонения, видимо, отражает различные стадии созревания койлоцитарных клеток в сторону метапластического эпителия [105].

На основании данных проточной цитометрии установлено, что среди обследуемых пациентов с различной патологией шейки матки в 74,5 % случаев имеются кондиломатозные изменения. Установлен профиль типичной ДНК-гистограммы для данной патологии шейки матки с высоким содержанием ДНК в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе и ранней S-фазе клеточного цикла. Полагают, что наблюдаемые изменения в ДНК-гистограмме можно рассматривать как проявление папилломо-вирусной инфекции в этиологии кондиломы шейки матки [289].

Следует сказать, что с развитием методов проточной цитометрии исследователи уповали на возможность получения большей диагностической информации, чем с помощью сканирующих систем, особенно в области гинекологии, где существует реальная возможность проведения скрининговых программ. Однако по ряду причин этого не произошло, возможно, из-за достаточно высокой ложноотрицательной ошибки (ЛО). Определено, что для осуществления цитоскрининга посредством проточных анализаторов порог ЛО-ошибки не должен превышать 5 %. По данным разных авторов, исследующих гинекологический материал, ЛО-ошибка колеблется в достаточно большом диапазоне — от 0 до 15 %. Данное обстоятельство объясняется недостаточностью информации, полученной при исследовании суспензии клеток на однопараметро-

вом проточном анализаторе, — только содержание ДНК. Однако в некоторых ранних работах [198] и статьях Tsou с соавт. [289, 290] приводятся данные об успешной классификации образцов с получением типичных ДНК-гистограмм, соответствующих классификации Папаниколау.

Совпадение гистограмм с цитологическими заключениями отмечено в 56 % при норме, в 59 — при диспластических процессах легкой и умеренной степени, в 72 — при выраженной дисплазии, в 100 % случаев при раке. Приводятся данные по анализу содержания ДНК по фазам клеточного цикла для каждой диагностической категории (табл. 21). При анализе их отмечено, что большинство значительных изменений лежит по другую сторону области  $G_0/G_1$  на ДНК-гистограмме, т. е. основную информацию несет доля клеток, находящаяся в  $S + G_1/M$ -фазах клеточного цикла. Процентное содержание клеток в названных фазах клеточного цикла является хорошим ростовым индикатором клеточной пролиферации, особенно при злокачественном росте. Коэффициент вариации используется в качестве дополнительного фактора оценки полиплоидии в исследуемом материале [289].

Стремление повысить диагностическую ценность метода проточной цитометрии приводит к расширению диапазона исследуемых характеристик клеточной популяции. Большая результативность достигается при получении информации о двух и более параметрах клеток. При сочетании двух маркерных признаков, отражающих уровень содержания ДНК и РНК, ДНК и белка, появляется возможность классификации шести различных типов клеток цервикального образца [279], а также возможна классификация нормальных, диспластических и раковых процессов [294]. Значительно возрастает достоверность метода при изучении содержания ДНК, РНК и белка в образце эпителиальных клеток шейки матки. Компьютерный анализ при сортировке цитограмм и применение трехмерных гистограмм позволяют дифференцировать нормальные клетки и злокачественные. Однако и в данном случае ЛО-ошибка составляет достаточно высокую величину — 8,6 %. Исходя из изложенного, основным вопросом автоматического скрининга гинекологических образцов является уменьшение ЛО-ошибки. В связи с этим возлагаются большие надежды на возможности slit-scan техники, которая, вероятно, справится с этими трудностями.

Как известно, в последние годы возросла роль цитометрических методов исследования для профилактического обследования

Таблица 21. Данные проточной цитометрии по содержанию ДНК в соответствии с фазами клеточного цикла для каждой диагностической категории согласно классификации Папаниколау, % [298]

| Класс | Коэффициент вариации для $G_0/G_1$ | $G_0/G_1$  | $S + G_1/M$ |
|-------|------------------------------------|------------|-------------|
| I     | 3,0—10,0                           | $\geq 8,8$ | 0—19        |
| II    | 4,0—16,0                           | 71—89      | 20—30       |
| III   | 3,9—14,0                           | 67—70      | 31—64       |
| V     | 3,6—6,6                            | $< 67$     | $> 64$      |

женщин с целью выявления заболеваний наружных половых органов. Однако оценка ороговевающих клеток при различных заболеваниях вульвы производится субъективно. Nauth [235], применив современный подход к оценке клеток (орто-, пара-, «дискератозные») покровного эпителия вульвы, определил, что наиболее информативными показателями являются абсолютная величина ядра, клетки и степень цитоплазматического полиморфизма. Общепринятые критерии диагностики, такие, как ЯЦО и структура хроматина, в данном случае играют второстепенную роль. На основании объективных критериев оценки препаратов была построена масштабная модель клеточной кинетики при заболеваниях вульвы различного происхождения, включая норму, воспаление, дисплазию, внутриэпителиальный и инвазивный рак.

Несмотря на достаточно большой опыт применения цитометрии в гинекологии, несколько в стороне от количественного анализа находится диагностический материал, полученный из полости матки. Лишь в настоящее время внедряется метод изучения патологических процессов в эндометрии, что, видимо, связано с разработкой более совершенных способов получения клеток для цитологического исследования (см. гл. 2). В основном проводится морфометрическая оценка патогистологического материала по анализу критериев ядра и цитоплазмы, а также изучаются целые структуры, образованные клеточными элементами слизистой эндометрия. К этим параметрам относятся: периметр и площадь желез и их просветов, площадь эпителиальных колец, коэффициенты форм соответствующих контуров, расстояние между железами [75], объемные показатели всей железы, просвета желез, эпителия желез, стромы [2, 105]. Представленные данные достаточно результативны, поскольку по комплексу одиночных информативных параметров и двухпараметрической оценке признаков (объемный процент эпителия и удельная площадь внутренней поверхности желез) возможны классификация гиперпластических процессов в зависимости от степени выраженности, а также проведение дифференциальной диагностики гиперплазии и аденокарциномы. На основании морфометрических критериев Ваак и Oort [105] классифицировали процессы на высоко- и низкодифференцированный рак. Из девяти исследуемых параметров для сравнения приведем среднюю величину диаметра железы, размах колебания которой при высокодифференцированной аденокарциноме находится в пределах  $178,4 \pm 71,50$  мкм, а при низкодифференцированной аденокарциноме —  $316,8 \pm 113,84$ .

Из органов малого таза женщины самую большую диагностическую трудность вызывают заболевания яичников. Малый размер и сложность топографического расположения органа ограничивают применение аспирационной диагностической пункции для получения клеточного материала. В связи с этим диагноз обычно ставится по анализу операционного материала, в котором в большинстве случаев определяются злокачественные опухоли. Поэтому разработка способов получения материала и определение опти-

мальных критериев ранней диагностики патологических состояний яичников весьма актуальны.

При оценке цито- и морфологических препаратов пользуются цитоспектрофото- и морфометрическими показателями, которые отражают проявления ядерной и клеточной атипии. Среди них наиболее информативны площадь и периметр ядра, большой и малый диаметры ядра, ЯЦО, объемный процент эпителия, митотическая активность, содержание ДНК. Известно, что очень сложен вопрос морфологической идентификации клеток, которые характеризуют разнообразие переходных доброкачественных изменений, пограничные состояния и злокачественные опухоли яичников. При использовании морфометрических критериев оценки морфологических препаратов, индекса митотической активности ткани и величины объема эпителия (выраженной в процентах) возможна дифференциация доброкачественных, пограничных и злокачественных муцинозных опухолей яичника [103, 104]. При сопоставлении изучаемых параметров отмечено достоверное различие величин в разных группах муцинозных опухолей яичника. На основании этих данных возможна классификация изучаемых процессов с помощью ЭВМ с достоверностью до 93 %. При дальнейших исследованиях показано, что особую диагностическую ценность представляет сочетанный анализ параметров, т. е. для более четкой дифференциации патологических процессов яичника используют двухпараметрическую зависимость признаков индекса митотической активности и величины объемного процента эпителия. Если индекс митотической активности превышает 20 — вероятнее всего, опухоль является злокачественной. А если индекс митотической активности ниже 20, а объемный процент эпителия превышает 76, то наличие малигнизации более чем вероятно.

Помимо названных критериев для разграничения доброкачественных, пограничных и злокачественных опухолей яичников с успехом используется значение ЯЦО [2]. Этот показатель для нормального серозного эпителия близок к 0,5, а для нормального муцинозного — к 0,3. С нарастанием атипии отмечена значительная вариабельность индекса ЯЦО в сторону увеличения; при муцинозных аденокарциномах — до 0,6, при папиллярных — до 0,7.

В литературе имеются весьма ограниченные сведения об анализе содержания ДНК в различных опухолях яичников. Однако прослеживаются довольно четкие закономерности, характеризующие патологические процессы изучаемого органа. Методом проточной цитометрии установлено, что 95 % опухолей эпителиального генеза, включающих муцинозные, эндометриондные и I стадию серозных опухолей яичника, характеризуются диплоидным содержанием ДНК и только 5 % больных с III стадией серозной опухоли имеют анеуплоидное распределение ДНК [169, 170]. При дальнейшем изучении этого показателя у больных злокачественными эпителиальными опухолями выявлена поразительная устойчивость уровня пloidности как во времени, так и в пространстве: в 21 случае из 24 анализируемых образцов зафиксировано дипло-

идное содержание ДНК. При исследовании материала через 7—17 мес после операции во время обнаружения рецидивов или секционного материала также отмечался прежний уровень плоидности. Для более тщательного представления об устойчивости уровня плоидности эпителиального рака яичника клеточный материал был перевит животным с последующими серийными перевивками. В этом случае содержание ДНК оказалось таким же, как и в исходной опухоли [170]. Показано, что уровень содержания ДНК и степень клеточной анаплазии серозных опухолей яичника находятся в прямой корреляционной зависимости. С увеличением степени дифференцировки инвазивной аденокарциномы яичника происходит нарастание полиплоидии, и если для I степени характерен модалный класс клеток с диплоидным содержанием ДНК, то для II и III — сдвиг в анеуплоидную область ДНК с характерными дополнительными пиками в области 9—10с и 12с ДНК-гистограммы. Поэтому в сомнительных случаях при морфологическом изучении препаратов для определения степени малигнизации процесса рекомендуется использовать в качестве объективного теста содержание ДНК [156].

#### КРОВЕТВОРНАЯ СИСТЕМА

Клетки кроветворной системы активно изучаются методами количественной цитометрии. Это вполне закономерное явление, поскольку кровь — одна из систем гомеостаза, которая отражает воздействие на организм специфических и неспецифических факторов окружающей среды. Разнообразные клеточные элементы эритро-, лимфо- и миелоидного ряда различной степени зрелости привлекают внимание ученых с целью изучения заболеваний кроветворной системы.

При цитометрическом анализе клеточных элементов крови используют критерии, которые включают довольно широкий спектр параметров. Это в первую очередь цитохимические маркеры с использованием специфических красителей на РНК, ДНК, различных ферментных систем (эстеразу, фосфатазу). Используются также размерные критерии, которые включают объем, площадь, периметр и диаметр ядра и цитоплазмы клеток, а также ЯЦО.

Одно из первых применений автоматизированных систем диагностики было связано с подсчетом форменных элементов крови у здоровых пациентов и страдающих различными заболеваниями неопухоловой природы. В настоящее время большой арсенал измерительной техники позволил расширить круг интересов исследователей и практических врачей, в связи с чем появилась реальная возможность использования автоматизированных систем диагностики в клинической практике не только для дифференциального подсчета лейкоцитов и эритроцитов, но и для изучения функциональной активности клеток при различных патологических процессах.

Выделение различных клеточных субпопуляций лейкоцитов проводится на основании данных о размерах клеток и ферментной активности [94]. Флюориметрическое исследование лейкоцитов позволяет различить и количественно охарактеризовать три вида лейкоцитов: лимфо-, моно- и гранулоциты [94]. Анализ геометрических параметров клеток с учетом цветной оптической плотности и текстуры хроматина существенно увеличил достоверность исследования в пределах 90—100 % и позволил подразделить лейкоциты крови на пять основных классов: лимфоциты, моноциты, эозинофилы, палочко- и сегментоядерные нейтрофилы [31].

При использовании полностью автоматизированной системы Гемалог-Д исследуются 8 параметров: количество тромбоцитов, лейкоцитов, эритроцитов, концентрация гемоглобина, показатель гематокрита и три расчетных индекса эритроцитов. Помимо дифференциального счета форменных элементов крови проводится оценка ферментной активности клеток. Последнее исследование основано на определении специфических энзиматических свойств клеток крови и сортировке различных типов лейкоцитов по трем каналам: моноцитарному, базофильному и пероксидазному. Следовательно, прибор работает в двух режимах, один из которых направлен на отбор «норма — патология», а другой служит для определения различных вариантов лейкоза по цитохимической направленности бластных клеток (лимфоидной, миелоидной, миеломоноцитарной и моноцитарной) [69, 245].

При изучении системных заболеваний кроветворной ткани у детей и взрослых показано, что в основном цитометрические исследования направлены на дифференциальную диагностику различных типов лейкозов и лимфом, на изучение прогностических факторов в процессе терапии, продолжительности ремиссии и стойкости рецидивов.

При исследовании диагностического материала при острых и хронических формах лейкозов методами цитометрии обнаружены некоторые различия для клеточных элементов той или иной группы гемобластозов. Используя морфометрические методы оценки размерных признаков ядра и цитоплазмы бластных клеток, обнаружена строгая корреляция величины клеток и FAB (франко-американо-британской)-классификации лейкозов. При сопоставлении количественных данных, полученных при исследовании клеточных элементов при острых лимфобластном и миелобластном лейкозах, классифицируемых по морфологическим признакам на подгруппы  $M_1$ — $M_6$  согласно FAB-классификации, определены различия между двумя вариантами лейкозов, кроме подгруппы  $M_2$ . Регистрируемые различия в размере бластных клеток связаны с фазами клеточного цикла. Установлено, что клетки при остром миелобластном лейкозе в S-фазе цикла характеризуются большим размером ядра. Для этой же формы лейкоза, но подгруппы  $M_1$  характерна более малая доля клеток в S-фазе клеточного цикла [147].

На основании данных количественной цитометрии возможна

дополнительная классификация острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) на 3 типа:  $L_1$ — $L_3$ . Средние показатели ядерной поверхности (93,1) и общей клеточной поверхности (108,7) для ОЛЛ типа  $L_1$  значительно меньше, чем  $L_2$ -,  $L_3$ -типов. Величина этих показателей (127,6 — ядерная поверхность, 165,6 — общая клеточная поверхность) характеризуют более выраженную гетерогенность клеточной популяции при двух последних типах ОЛЛ [218].

Характерные особенности обнаружены при изучении объема лимфоцитов при различных формах лейкозов. На электронно-микроскопическом уровне при исследовании препаратов больных ОЛЛ, отмечены значительные и более выраженные колебания объема лимфоцитов по сравнению с величиной лимфоцитов у здоровых людей. Также обнаружено, что В-лимфоциты значительно крупнее, чем Т-клеточные формы или ни-Т, ни-В клетки [142]. При изучении на световом уровне этого количественного параметра оценки клеток, полученных от больных хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), показано, что средний объем лимфоцитов ( $206 \pm 14,4$  мкм<sup>2</sup>) и средний диаметр (7,3 мкм) значительно превышают объем лимфоцитов ( $166 \pm 19,3$  мкм<sup>2</sup>) и средний диаметр (6,8 мкм) клеток здоровых людей [213]. Несмотря на определенные различия объема лимфоцитов у здоровых и больных людей, данный критерий не имеет самостоятельного прогностического значения по отношению к длительности первой ремиссии, клинической стадии болезни и выживаемости больных.

В качестве критерия оценки материала использовались один или два диагностических параметра без их взаимосвязи. Вследствие однопараметрического подхода к анализу данных не были обнаружены определенные закономерности, отражающие характерные проявления той или иной формы лейкоза. Более результативным был анализ при комплексном подходе к оценке клеточных параметров 7 диагностических категорий системных заболеваний кроветворной ткани опухолевой и неопухолевой природы. В данном случае среди количественных критериев были размерные и структурные характеристики клетки: площадь ядра, цитоплазмы, всей клетки, ядерно-цитоплазматическое отношение, эксцентricность и форма ядра. Последний параметр вычисляется из соотношения квадрата периметра и площади ядра. Структурные особенности ядра и клетки выражались в абсорбционных характеристиках ядра в желтой области спектра, а цитоплазмы в двух — желтой и голубой.

На основании цитометрических исследований получены определенные количественные характеристики степени выраженности того или иного признака клетки для каждой диагностической категории лимфоидных клеток, полученных от больных ОЛЛ (1, 2, 3 типа), ХЛЛ, синдромом Сезари, лимфомой в лейкозной фазе, волосатоклеточным лейкозом, инфекционным мононуклеозом, а также от практически здоровых лиц. Полученные данные послужили основой для создания иерархической модели распределения лимфоидных клеток по 9 различным признакам с выделением

в них 26 классов. В последующем эти результаты были использованы для дифференциации лимфондных клеток в восьми различных диагностических категориях (рис. 66). С применением к этим данным метода дискриминантного анализа появилась возможность достаточно четкого дифференциального разграничения ХЛЛ и ОЛЛ [291].

Особую диагностическую трудность при идентификации исследуемого материала вызывают различные типы лимфом: лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина) и неходжкинские злокачественные лимфомы. В связи с этим целесообразно применять дополнительные методы оценки материала, которые могут помочь пролить свет на основную природу заболевания, идентичность опухолевой клетки и тип распространения заболевания в организме.

С целью изучения биологии опухолевого роста в неходжкинских лимфомах Т- и В-клеточного типа используется метод проточной цитометрии для обнаружения анеуплоидных клеточных фракций по содержанию ДНК и объему клеток [269]. Сочетание двух параметров дает лучшее представление о распределении клеток по фазам цикла, особенно в случае исследования смешанных популяций, состоящих из диплоидных и анеуплоидных клеток. Для оценки уровня плоидности использовали три потенциальных критерия, учитывающие определенный профиль ДНК-гистограммы и коэффициент вариации данного параметра. Первый критерий отражает многовершинность  $G_1$ -пика, второй — увеличение коэффициента вариации, но с единственным  $G_1$ -пиком и обычным его расположением на ДНК-гистограмме, третий — нормальный коэффициент вариации с единственным пиком  $G_1$ , но с атипичным его расположением на ДНК-гистограмме.

При изучении В- и Т-клеточных лимфом, которые были, в свою очередь, подразделены на субпопуляции по морфологическим характеристикам (В-клеточные лимфомы) и степени злокачественности (Т-клеточные лимфомы) в соответствии с гистологическими классификациями Люкса, Коллиза и Раппопорта, были определены некоторые биологические характеристики двух разновидностей

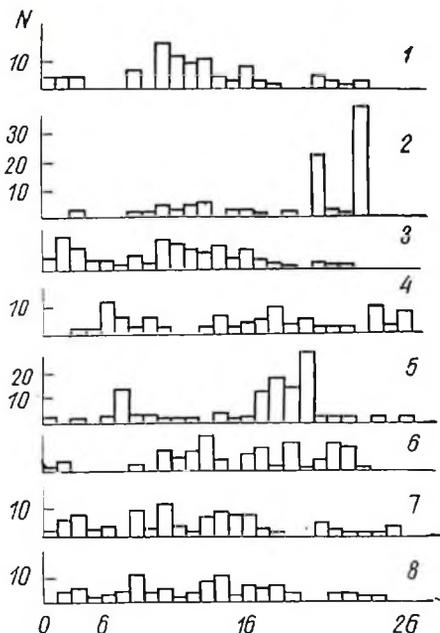


Рис. 66. Характерные профили гистограмм, построенные исходя из данных иерархической модели для 8 диагностических категорий:

1 — контроль, 2 — волосатоклеточный лейкоз, 3 — хронический лейкоз, 4 — острый лимфобластный лейкоз, 5 — острый лимфобластный лейкоз III тип, 6 — инфекционный мононуклеоз, 7 — синдром Сезари, 8 — лимфома в лейкозной фазе

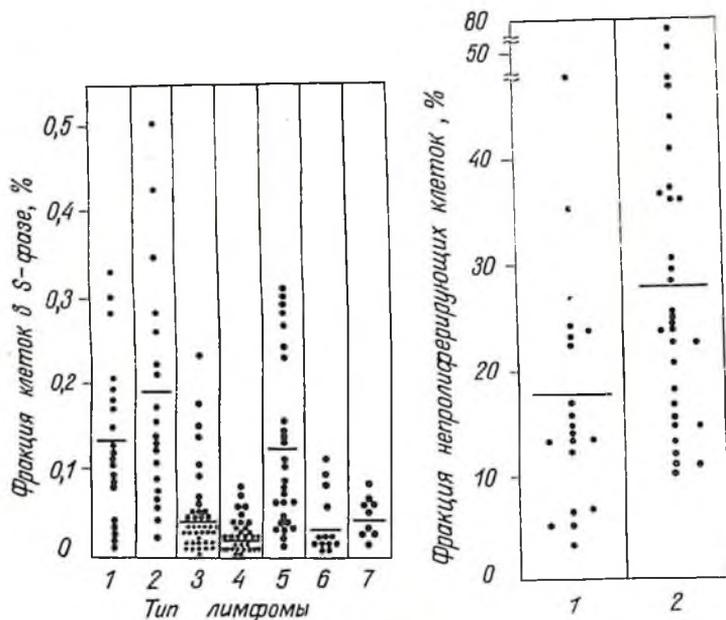


Рис. 67. Распределение клеток с S-фазным содержанием ДНК в зависимости от варианта неходжкинских лимфом (%):

1 — В-клеточная лимфома с крупными клетками, 2 — со средними клетками, 3 — с малыми клетками, 4 — с малыми зрелыми дифференцированными клетками, 5 — Т-клеточная злокачественная лимфома, 6 — бессимптомная лимфома, 7 — лимфатический узел

Рис. 68. Корреляция прогноза течения болезни с фракцией не-пролиферирующих клеток крови:

1 — отсутствие полной ремиссии (20 случаев), 2 — полная ремиссия (30 случаев)

тей лимфом. На основании оценки критериев анеуплоидности отмечено, что в В-клеточной форме лимфом чаще, чем в Т-лимфомах, наблюдается присутствие ядер с анеуплоидным содержанием ДНК. Несмотря на то что в основном наблюдаются популяции с околотетраплоидным содержанием ДНК, индекс пloidности характеризуется гипердиплоидным пиком.

По анализу доли клеток в S-фазе клеточного цикла определено, что среди различных биологических субпопуляций неходжкинских лимфом больше всего клеток в S-фазе было в В-клеточных лимфомах, различающихся по размеру клеток (крупные и средние), и злокачественных Т-клеточных (рис. 67).

Известно, что крупноклеточные неходжкинские лимфомы характеризуются большой морфологической неоднородностью. При помощи иммунологических маркеров установлено, что эта разновидность лимфом может быть разделена на несколько типов: Т-иммунобластный и В-иммунобластный, центробластный и истинный гистиоцитарный (гистиоцитарная саркома). Морфологическая идентификация субпопуляций крупноклеточных неходжкинских лимфом весьма затруднительна. При использовании некоторых

количественных ядерных и цитоплазматических параметров оценки клеток возможна дифференциация крупноклеточных лимфом. Сопоставление величины индекса ядерного контура клеток при гистиоцитарной саркоме позволяет дифференцировать эту опухоль и В-иммунобластную и центробластную лимфому. В свою очередь, два последних подтипа лимфом могут быть дифференцированы друг с другом на основании данных об относительной ядерной эксцентричности и величине, показывающей отношение количества ядрышек к поперечному сечению ядра (табл. 22) [105].

Несмотря на различные методы исследования диагностического материала при лимфогранулематозе и неходжкинских злокачественных лимфомах, в большинстве работ совпадают значения плоидности и выявляются общие закономерности, характеризующие эти процессы. Так, методом сканирующей цитометрии установлено, что при болезни Ходжкина в малых лимфоцитах содержится диплоидный набор хромосом. В клетках Березовского — Штернберга отмечаются различные варианты анеуплоидного распределения ДНК. Анеуплоидным содержанием ДНК обладают клетки, характеризующие лимфогранулематоз с низкой степенью злокачественности (центроцитарно-центробластные, центроцитарная неходжкинская злокачественная лимфома). Резко выраженная анеуплоидия отмечена также при иммунобластной неходжкинской злокачественной лимфоме, хроническом лимфолейкозе, особенно в крупных клетках — центро- и лимфобластах [95, 211].

Однако в целом, по данным разных авторов, клеточные популяции при лимфогранулематозе, хронических лимфо- и миелоидном лейкозах характеризуются диплоидным или околодиплоидным содержанием ДНК [113, 269]. При острых лейкозах и лимфомах частота выявления анеуплоидии составляет 15—30 %, при агрессивных неходжкинских и множественных миеломах — 50—60. Для сравнения следует отметить, что в солидных опухолях человеческого организма фракция анеуплоидных клеток составляет намного большую величину с колебаниями в пределах 60—100 %.

Следует отметить, что в настоящее время особенно актуальны исследования, проведенные с целью оценки эффективности различных методов лечения гемобластозов, а также определения наиболее оптимального срока проведения повторного курса лечения. Критерием оценки эффекта лечения является величина доли клеток в S-фазе клеточного цикла. Положительный эффект достигается при значительном снижении доли пролиферирующих клеток в S+G<sub>1</sub>/M-фазах. При проведении индукционной терапии и терапии консолидации у детей, больных ОЛЛ, на основании данных проточной цитометрии были отмечены два различных ответа на химиотерапевтическое воздействие. Один с положительным эффектом, где доля S-фазных клеток ( $19,9 \pm 2,3$ ) была значительно снижена по сравнению с наблюдаемой до лечения ( $50,8 \pm 3,5$ ). Во второй группе больных не было отмечено существенных изменений доли S-фазных клеток до ( $48,5 \pm 4$ ) и после ( $49,0 \pm 3,3$ ) химиотерапии. Такой ответ расценивается как лечение без успеха. До-

Таблица 22. Морфометрические параметры, характеризующие крупноклеточные

| Субпопуляционный подтип лимфом   | Площадь, мкм <sup>2</sup> |                  | ЯЦО              |
|----------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|
|                                  | ядра                      | цитоплазмы       |                  |
| Гистiocитарная саркома           | 55<br>(38—91)             | 125<br>(100—174) | 2,4<br>(2,0—3,1) |
| <i>B</i> -иммунобластная лимфома | 37<br>(27—47)             | 75<br>(55—108)   | 2,0<br>(1,8—2,2) |
| Центробластная лимфома           | 47<br>(30—57)             | 83<br>(52—102)   | 1,8<br>(1,6—2,0) |

полнительным прогностическим критерием является содержание клеток в околодиплоидной области ДНК-гистограммы. Существенное перераспределение клеток по фазам цикла может указывать на благоприятный исход болезни [49].

Ранее были обнаружены подобные закономерности при проведении химиотерапии у взрослых, больных острым миелобластным лейкозом. Пациенты с высокой фракцией *S*-фазных клеток имели более выраженное снижение числа синтезирующих клеток в течение курса лечения, чем больные с низкой фракцией клеток в *S*-фазе клеточного цикла [264].

Как упоминалось, цитометрические исследования могут быть полезны для определения продолжительности ремиссии и стойкости рецидивов у больных с различными формами лейкозов и лимфом. Для оценки этих состояний исходным критерием также является величина доли клеток с *S*-фазным содержанием ДНК. При изучении этого показателя у больных свыше 50 лет, у которых наблюдалось более 15 % клеток в *S*-фазе цикла, обнаруживалась более низкая скорость ответа на лекарственное воздействие, чем у пациентов с незначительной величиной доли клеток в *S*-фазе. Отмечено также, что увеличение клеток в ранней *S*-фазе является прогностическим признаком наступления быстрой ремиссии после 1 курса терапии. Показано, что увеличение процента клеток в *S*-фазе клеточного цикла более чем на 15 % — предвестник более короткой ремиссии и более низкой выживаемости больных ОЛЛ [192]. Значительно ниже она у больных неходжкинскими лимфомами, у которых обнаружено более 5 % клеток с *S*-фазным содержанием ДНК [127]. Малая фракция клеток в *S*-фазе цикла перед лечением и высокое значение показателя в период полной ремиссии указывают на пролонгированную ремиссию у больных миелобластным лейкозом [113].

Hillen при обследовании больных острым лейкозом обнаружил, что продолжительность полной ремиссии более короткая у пациентов с низкой фракцией клеток в *S*- и *G*<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла. У 10 из 14 больных, находящихся в состоянии ремиссии, отмечено прогрессивное уменьшение доли клеток в *S*- и *G*<sub>2</sub>-фазах цикла перед наступлением рецидива в течение 1—5 месяцев [191].

лимфомы различных субпопуляционных подтипов

| Индекс контура ядра | Площадь ядрышек, мкм <sup>2</sup> | Отношение количества ядрышек к площади ядра | Относительная эксцентричность ядра |
|---------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|
| 4,7<br>(4,5—4,9)    | —                                 | —   | —                                  |
| 4,0<br>(3,7—4,3)    | 3,1<br>(2,4—4,2)                  | 0,9<br>(0,8—1,0)                            | 0,4<br>(0,34—0,48)                 |
| 4,1<br>(3,8—4,3)    | 2,6<br>(1,7—4,2)                  | 1,4<br>(1,1—1,6)                            | 0,59<br>(0,51—0,65)                |

Противоречивость анализируемых результатов, видимо, можно объяснить недостаточностью информации, получаемой при использовании одного прогностического маркера. Более точную информацию о распределении клеток по фазам клеточного цикла и связи этих данных с прогнозом болезни можно получить, располагая данными о содержании ДНК и белка в клетках с последующей оценкой полученных результатов при помощи критерия Вилкоксона, дискриминантного анализа и корреляционных тестов. Это позволяет не только более точно оценить долю клеток с S-фазным содержанием ДНК, но и определить фракцию непродлиферирующих клеток у больных ОЛЛ. В работе Efronch и соавт. [148] показано, что одиночный анализ каждого показателя в более ранних исследованиях был недостаточно информативен, поскольку величина доли S-фазных клеток мало различалась у двух групп больных (50 наблюдений, критерий Вилкоксона — 1,732). Фракция непродлиферирующих клеток имела существенное различие ( $n=50$ , критерий Вилкоксона 2,722,  $P<0,01$ ). Исходя из комплексного анализа цитограмм по двум параметрам, корреляционного взаимоотношения процента клеток в S-фазе клеточного цикла и процента непродлиферирующей субпопуляции клеток, удалось выделить две группы больных в соответствии с достижением ими полной или частичной ремиссии (рис. 68). При более высоком значении фракции непродлиферирующих клеток у больных ОЛЛ отмечается наступление полной ремиссии и, наоборот, более малые значения данной величины свидетельствуют о неблагоприятном исходе болезни.

### МОЛОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА

С целью повышения диагностических возможностей цитологического метода при добро- и злокачественных опухолях молочной железы, определения их гистологических вариантов, разработки прогностических критериев заболевания — также используются данные морфометрии и цитоспектрофотометрии. При объективизации цитологических препаратов исходят из информа-

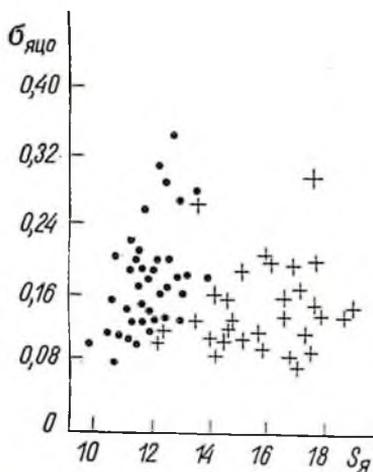


Рис. 69. Диаграмма двухпараметрической зависимости статистических параметров площади ядра  $S_n$  и среднеквадратического отклонения ядерно-цитоплазматического отношения  $B_{яц}$  клеток молочной железы:

● — доброкачественные процессы.  
+ — раковые процессы

около 5 % клеток приходится на гипердиплоидную область распределения ДНК [135].

На основании различий морфометрических параметров площади ядра, цитоплазмы и ядерно-цитоплазматического отношения появляется возможность проведения дифференциальной диагностики доброкачественных и раковых опухолей молочной железы [105]. На диаграмме двухпараметрической зависимости статистических критериев присутствуют компактные зоны, соответствующие двум группам патологии, и также отмечается некоторая область «перемешивания» значений (рис. 69). Область неполного разделения образцов указывает на морфологический переход клеток доброкачественных опухолей, приближающуюся к высокодифференцированному раку.

Для прогноза выживаемости больных раком молочной железы также можно воспользоваться данными количественной цитометрии. Ведущим диагностическим критерием является площадь ядер клеток цитологических препаратов молочной железы, полученных посредством аспирационной биопсии. При измерении 100 ядер и построении гистограммы для каждого препарата, при статистическом анализе учитывается только центральная область измерений — 80 %, первые и последние 10 значений в счет не идут. Таким образом определяется среднеарифметическое значение площади ядер на оставшейся части гистограммы. Помимо этого в

тивности следующих признаков: диаметр, периметр и площадь ядра и цитоплазмы, ЯЦО, текстура хроматина, содержание ДНК и РНК. На основании цитометрических исследований установлены некоторые закономерности, характерные для злокачественных форм опухолей молочной железы. Это вариабельность ядерно-цитоплазматического отношения, нарастание размера ядра и содержания ДНК. Между двумя последними показателями обнаружена корреляционная зависимость, характеризующаяся следующими особенностями. Показано, что клетки с некоторой атипией, которая выражается в увеличении площади ядра, распределяются различно по фазам клеточного цикла. Около 21 % клеток, находящихся в области 4с ДНК-гистограммы, имеют площадь ядер свыше 125  $\mu\text{м}^2$ . При площади ядер от 50 до 100  $\mu\text{м}^2$  основная масса клеток находится в  $G_1$ -фазе цикла и только

статистический анализ входит оценка состояния подмышечных лимфоузлов с целью определения в них метастазов. В результате учета всех данных статистический тест имеет следующий вид:  $0,03$  умноженное на среднее значение площади ядра, плюс эмпирический фактор, отражающий наличие метастазов в подмышечных узлах (1,9) или их отсутствие (0). Например, при среднем значении площади ядра  $105 \text{ мкм}^2$  и отсутствии метастазов в подмышечных лимфоузлах прогностический тест будет иметь величину,  $0,03 \times 105 = 3,15$ .

Используя приведенный выше подход, вычисляются кривые выживаемости для больных раком молочной железы (рис. 70). Анализируя представленные кривые, совершенно очевидно, что высокое значение статистического теста отражает плохой прогноз выживаемости больных. Этот результат вполне закономерен, так как характеризует два явления — ядерный полиморфизм опухолевых клеток и процесс метастазирования в подмышечные лимфатические узлы [187].

Показатель ДНК (количество ДНК в 1 клетке опухоли на количество ДНК в нормальной клетке) в различных типах злокачественных опухолей молочной железы значительно варьирует, однако чаще наблюдается тетраплоидия (60—80 %), доброкачественные опухоли, как правило, диплоидные. Также отмечено, что при I стадии ракового процесса 62 %, при II — 68,8, а при III стадии 100 % клеток находятся в S-фазе клеточного цикла. Эти данные свидетельствуют о том, что с нарастанием малигнизации значительно повышается анеуплоидия [133]. Иными словами, высокая плоидность коррелирует с клинической стадией и гистологической степенью злокачественности опухоли.

Полученные закономерности нашли подтверждение в исследованиях, проведенных методом проточной цитометрии [12, 166, 284].

Сравнительная оценка содержания ДНК в клетках молочной железы при доброкачественных и раковых процессах показала определенную зависимость между соотношением клеток по фазам цикла. Установлено, что с прогрессированием процесса количество диплоидных клеток в G<sub>1</sub>-фазе цикла убывает и при III—IV стадии ракового процесса составляет 64 %. Количество тетраплоидных клеток нарастает в 2 раза и составляет около 17 % общего количества клеток по сравнению с пролиферативной формой мастопатии и в 3 раза по отношению к неproлиферативной форме мастопатии.

Также наблюдается характерная динамика изменений по

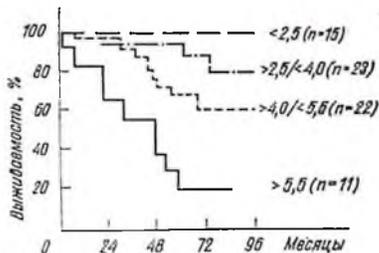


Рис. 70. Статистические кривые выживаемости (71 пациент) больных раком молочной железы в зависимости от прогностического теста и состояния лимфатических узлов (наличие или отсутствие метастазов)

Таблица 23. Зависимость содержания ДНК и РНК в клетках опухоли от степени злокачественности рака молочной железы ( $\bar{X} \pm m$ )

| Степень злокачественности | Распределение ядер в области, % |            |             |           | Клетки с повышенным содержанием РНК, % |
|---------------------------|---------------------------------|------------|-------------|-----------|--|
|                           | 2с                              | 3с         | 4с          | > 4с      |  |
| I<br>$n = 7$              | 84,5±1,8                        | 4,5±0,7    | 9,9±1,3     | 1,1±0,1   | 34,5±9,1                               |
| II<br>$n = 38$            | 68,3±3,2 *                      | 14,6±2,2   | 13,0±1,4    | 4,1±0,6 * | 43,9±3,4                               |
| $P$ II — III              | $P < 0,05$                      | $P > 0,5$  | $P < 0,001$ | $P > 0,5$ | $P < 0,5$                              |
| III<br>$n = 8$            | 52,6±3,9 *                      | 13,2±3,6 * | 29,2±4,5 *  | 5,0±1,1 * | 53,6±3,2                               |

Обозначения.  $n$  — число наблюдений; \* — различие средних величин относительно I степени злокачественности достоверно ( $P < 0,05$ ),  $P$  — достоверность различий между средними величинами II и III степени злокачественности.

содержанию ДНК и РНК в зависимости от степени злокачественности процесса (табл. 23).

Fossa с соавт. [166] методом проточной цитометрии исследовал биоптаты первичной опухоли молочной железы и установил, что высокая плоидность клеток коррелирует с клинической стадией злокачественного процесса и распространением метастазов в лимфатические узлы.

По типу гистологического строения опухоли (железистый, солидный и скirroзный рак) не было выявлено достоверных различий в распределении содержания ДНК и РНК [12, 189].

## ОРГАНЫ ПИЩЕВАРЕНИЯ

В гастроэнтерологии цитометрическому анализу в основном подвергается диагностический материал, полученный из слизистой оболочки пищевода, желудка и толстого кишечника. При количественной оценке препаратов ведущими диагностическими критериями являются периметр, площадь и объем ядра и цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическое отношение, ядерно-клеточное отношение, содержание ДНК и РНК, а также оптическая плотность ядра. Помимо этого измеряют поперечный и продольный диаметры ядра и клетки. Установлена значимость объективных критериев диагностики для определения степени выраженности диспластических процессов и проведения дифференциальной диагностики предраковых процессов, доброкачественных и злокачественных новообразований, а также в осуществлении цитоскрининга для обнаружения патологических процессов желудка и толстого кишечника.

С целью идентификации клеточных элементов слизистой оболочки толстого кишечника при полипозных изменениях пользуются дополнительными количественными критериями диагностики. При оценке степени выраженности пролиферации и атипии

клеток используют традиционные информативные критерии, какими являются площадь ядра и содержание ДНК. В результате этих исследований определена тесная взаимосвязь достоверного увеличения размерных признаков ядра и морфологического проявления атипичии клеток при аденомах толстой и прямой кишки. В зависимости от степени выраженности дисплазии показано прогрессирующее увеличение площади ядра от слабой ( $92,7 \pm 2,2$  мкм<sup>2</sup>) к тяжелой дисплазии ( $160,1 \pm 2,1$  мкм<sup>2</sup>). Аденоматозные изменения со слабой и умеренной дисплазией в большинстве случаев имеют диплоидное содержание ДНК (75,5—95 %) и незначительное увеличение доли синтезирующих клеток. Аденомы с тяжелой дисплазией характеризуются значительной пролиферативной активностью клеток, о чем свидетельствует высокий уровень анеуплоидности, который может колебаться в пределах 12,9—61,2 %. Если в исследуемом образце регистрируется высокое значение содержания ДНК, необходимо отнести данное лицо к группе с высоким риском заболевания для углубленного обследования с тщательным морфологическим контролем [29].

Исследования опухолей толстого кишечника методом проточной цитометрии показали их большую гетерогенность [247]. В обзоре G. Vañg представлены гистограммы, полученные на основании проточной цитометрии ядер, выделенных из клеток слизистой оболочки нормального эпителия и аденокарциномы толстого кишечника (рис. 71) [108]. Отмечается, что распределение значений ДНК в атипичном эпителии значительно шире, чем в нормальном, поэтому такая разница может представлять диагностический интерес.

При изучении цитологических препаратов при предраковых и раковых процессах пищевода показана значительная вариабельность размерных признаков ядра

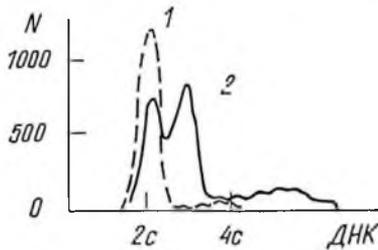


Рис. 71. Гистограммы распределения содержания ДНК в ядрах клеток слизистой оболочки толстого кишечника:

1 — норма, 2 — аденокарцинома

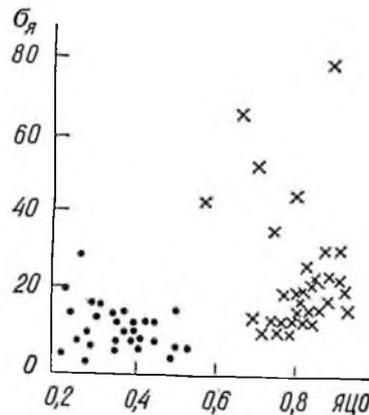


Рис. 72. Двухпараметрическая диаграмма зависимости результатов морфометрического исследования диагностического материала, полученного при эндоскопии желудка пациентов с доброкачественными (1) и раковыми (2) процессами,  $\sigma_{я}$  — среднее квадратическое отклонение площади ядра, ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение

с прогрессирующим возрастанием параметров от легкой ( $50,5 \text{ мкм}^2$ ), умеренной ( $50,5—149,9 \text{ мкм}^2$ ) к тяжелой дисплазии ( $50,5—199,9 \text{ мкм}^2$ ), плоскоклеточного рака: неороговевающий —  $518,8 \pm 26,6 \text{ мкм}^2$ , плоскоклеточный ороговевающий —  $435,1 \pm 27,1$ . Подобные закономерности характерны для уровня плоидности, который при легкой дисплазии находится в пределах диплоидного набора хромосом, умеренная дисплазия характеризуется околотетраплоидным и гексаплоидным набором хромосом, при раке преобладают анеуплоидные ядра.

По значениям содержания ДНК можно определить степень дифференцировки рака пищевода. Так, неороговевающий рак характеризуется гипероктаплоидией и превышает аналогичные показатели при плоскоклеточном ороговевающем раке, имеющем гексаплоидный набор хромосом. Автор полагает, что на основании данных о полиплоидии, отражающей пролиферативную активность эпителиальных клеток с резко выраженными морфологическими признаками атипии, можно судить о происходящих изменениях эпителиального пласта слизистой оболочки пищевода в сторону малигнизации [81, 82].

При изучении гистологических препаратов, отражающих различные патологические процессы желудка, определена вариабельность размерных признаков ядра и клетки. Показатели прогрессивно увеличиваются при гастрите, полипе и наибольшего значения достигают при раке. Если в норме средние показатели размеров ядра составляют  $48 \text{ мкм}^2$ , клетки — 128, то при раковых процессах — 241 и  $386 \text{ мкм}^2$  соответственно [153].

Похожие закономерности обнаружены при количественной оценке цитологических препаратов различных патологических состояний желудка. Используя такие статистические критерии, как ядерно-цитоплазматическое отношение и среднеквадратическое отклонение площади ядра, возможно проведение дифференциальной диагностики доброкачественных и раковых опухолей желудка [105]. На диаграмме зависимости двух статистических критериев четко выделены области, соответствующие двум группам патологии желудка (рис. 72). Характеристика такого количественного показателя, как содержание ДНК, совершенно однозначна при интерпретации картин, касающихся доброкачественных опухолей. В большинстве случаев доброкачественные опухоли характеризуются диплоидно-тетраплоидным набором хромосом с преобладанием стволовой линии ДНК в области 2с. По данным А. С. Петровой и др. [53], покровно-ямочный эпителий без признаков пролиферации ( $95,7 \pm 0,3 \%$ ), пролиферирующий покровно-ямочный эпителий ( $88,1 \pm 0,7 \%$ ), пролиферирующий покровно-ямочный эпителий с атипией клеток ( $71,5 \pm 2,6 \%$ ), несмотря на некоторое убывание клеток с диплоидным набором хромосом, имеют преобладающий процент клеток в  $G_1$ -фазе клеточного цикла. Последний процесс характеризуется появлением полиплоидных клеток ( $5,4 \pm 0,4 \%$ ). В. Б. Золотаревский и др. [28], характеризуя диспластические и метапластические процессы покровно-ямочного

Таблица 24. Распределение ДНК в ядрах клеток рака желудка ( $M \pm m$ ), %

| Гистологическое строение опухоли      | Содержание ДНК, % |                |                 |                |
|---------------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|----------------|
|                                       | 2с                | 3с             | 4с              | 4с             |
| Аденокарцинома ( $n = 29$ )           | $73,8 \pm 2,30$   | $9,6 \pm 1,20$ | $9,6 \pm 0,91$  | $7,0 \pm 0,90$ |
| Недифференцированный рак ( $n = 16$ ) | $83,9 \pm 1,55$   | $6,2 \pm 0,58$ | $6,0 \pm 0,600$ | $3,9 \pm 0,90$ |

эпителия слизистой оболочки желудка, также показали, что основной процент клеток приходится на  $G_1$ -фазу цикла.

В процессе озлокачествления ткани желудка происходит нарастание клеточной атипии, которое находит отражение в перераспределении клеток по фазам цикла. Общей закономерностью в данном случае является увеличение количества клеток с анеуплоидным содержанием ДНК. Однако следует отметить, что, по данным разных авторов, наблюдается некоторый разброс анализируемых значений. Так, по данным Enchev et al. [153], при раке количество диплоидных клеток существенно уменьшается и составляет всего 15 % общего числа, появляется значительный процент (31 %) клеток, характеризующихся октаплоидным содержанием ДНК.

По данным отечественных авторов, процент октаплоидных клеток (8—16с) находится в пределах 0,7—33,3, в зависимости от гистологического типа рака, количество же диплоидных клеток значительно больше и составляет в среднем около 67,7 % [28]. Анализ данных по исследованию ДНК в различных гистологических типах рака желудка показал, что по изучаемому вопросу также имеется довольно противоречивые сведения. Так, в некоторых работах установлено, что аденокарцинома и недифференцированные формы рака не имеют существенных различий в распределении содержания ДНК и характеризуются широким разбросом значений — от 2с до 16с и выше [2].

Однако методом проточной цитометрии установлено, что при аденокарциноме и недифференцированном раке желудка имеются определенные различия в соотношении клеток в зависимости от содержания в них ДНК (табл. 24). Также установлено, что каждая форма опухоли имеет характерный вид ДНК-гистограммы [53].

По данным сканирующей цитометрии, установлено, что внутри одного и того же типа опухоли в зависимости от степени клеточного атипизма также наблюдается различное соотношение клеток по фазам цикла. Показано, что тубулярная аденокарцинома I и II степени клеточного атипизма характеризуется значительным числом диплоидных клеток (95 и 86,8 % соответственно) и небольшим — тетраплоидных (13,4 и 19,3 % соответственно) и октаплоидных. На гистограммах в этом случае отмечен 1 модальный пик в области 2с — 3с.

При тубулярной аденокарциноме III степени клеточного атипизма происходят убыль диплоидных клеток (56,6 %), нарастание тетраплоидных клеток (до 40,1 %), а также появляются единичные клетки с октаплоидным содержанием ДНК. Гистограммы характеризуются более широким разбросом значений, что свидетельствует об усилении синтеза ДНК в опухолевых клетках и анеуплоидии.

При недифференцированном раке с солидным характером роста отмечено почти равное количество диплоидных ( $45,6 \pm 5,2$ ) и тетраплоидных клеток ( $52,2 \pm 5,3$ ) [28].

Более ранние данные также свидетельствуют о различии двух гистологических типов рака желудка по содержанию ДНК [24]. Более высокое содержание ДНК, которое в среднем на ядро составляет 11,4с, характерно для аденокарциномы (кишечно-клеточный рак), для клеток недифференцированного рака (диффузный тип) свойственно более низкое значение ДНК — до 6с, 4с в среднем на ядро.

Показано, что переход к инвазивному росту рака желудка может сопровождаться снижением уровня плоидности, т. е. модальный класс клеток сдвигается в область 2с [28, 53]. На основании изучения взаимоотношений кинетики клеточной пролиферации и плоидности клеток выделены две группы рака желудка [206]. Одна из них характеризуется преимущественно диплоидным набором хромосом и включает опухоли с диффузным или фильтрующим ростом, другой свойственна полиплодия и объединяет она опухоли типа аденокарциномы с резким клеточным полиморфизмом.

## ОРГАНЫ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

В урологии основным объектом исследования методом количественной цитометрии является диагностический материал, полученный из полости мочевого пузыря [105, 158, 300]. Это обстоятельство связано с доступностью получения материала и возможностью проведения цитоскрининга для обнаружения рака мочевого пузыря, а также для динамики наблюдений за лицами, работающими в промышленности, связанной с производством анилиновых красителей.

При оценке клеток методом сканирующей цитометрии основными диагностическими критериями являются площадь и диаметр ядра и цитоплазмы, соотношение этих величин, форма ядра, а также содержание ДНК.

Установлено, что при исследовании цитологических препаратов, приготовленных из мочи, по взаимосвязи двух диагностических критериев — интенсивности ядерной флюоресценции и соотношения диаметров ядра и цитоплазмы — можно выделить группы риска по малигнизации эпителия мочевого пузыря [128]. Более того, при морфометрической оценке площади ядер и цитоплазмы, а также их соотношений при анализе гистологических препаратов

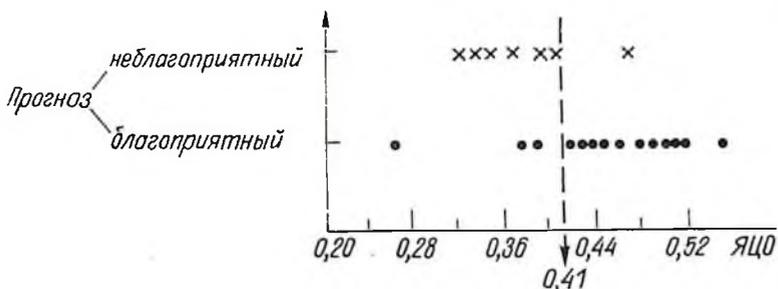


Рис. 73. Диаграмма прогноза болезни у лиц с различным типом папиллом мочевого пузыря по данным морфометрического исследования гистологических препаратов:

1 — доброкачественные процессы. 2 — раковые процессы

появляется возможность прогноза болезни у лиц с начальными формами озлокачествления папиллом мочевого пузыря. У лиц с неблагоприятным исходом болезни значительно увеличивается площадь ядра ( $82 \pm 42$  мкм<sup>2</sup>) и цитоплазмы ( $288 \pm 124$  мкм<sup>2</sup>) по сравнению с лицами, имеющими благоприятный прогноз течения болезни на протяжении 5 лет, у которых среднее значение площади ядра составляет  $69 \pm 34$  мкм<sup>2</sup>, а цитоплазмы —  $158 \pm 82$ . Отсюда ядерно-цитоплазматическое отношение для первой группы больных составляет  $0,38 \pm 0,1$ , а для второй —  $0,45 \pm 0,11$ . Исходя из данных диаграммы пороговое значение ядерно-цитоплазматического отношения равно 0,41 (рис. 73). При помощи этого метода возможна дифференциация обычно плохо диагностируемой опухоли мочевого пузыря на две группы. Следует отметить, что значенные площади ядра свыше 80 мкм<sup>2</sup> также является прогностическим критерием для выявления лиц с более злокачественной формой роста, какой является переходноклеточная карцинома мочевого пузыря.

При использовании объективных критериев диагностики также появляется возможность установления уровня злокачественности в развитых опухолях мочевого пузыря как на тканевом, так и на клеточном уровне. Располагая данными количественного анализа, можно установить разницу между низкодифференцированными и высокодифференцированными клетками опухолей мочевого пузыря [2].

Определенную диагностическую трудность при морфологической оценке препаратов представляют случаи с *Ca in situ*. Благодаря анализу морфометрических критериев диагностики удалось установить, что данный вид патологии весьма близок по значениям, характеризующим клеточные элементы низкодифференцированного рака [240].

При использовании метода проточной цитометрии показано, что величины значений содержания ДНК позволяют четко дифференцировать низко- и высокозлокачественные опухоли. Установлено, что опухоли с низким уровнем злокачественности имеют содер-

Таблица 25. Распределение клеток по фазам клеточного цикла в образце слизистой оболочки мочевого пузыря пациентов с опухолью II и III стадии злокачественного процесса (приведены данные только для анеуплоидных субпопуляций), %

| Диагноз                         | Процент анеуплоидных клеток, фаза |              |                    |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------------|
|                                 | G <sub>1</sub>                    | S            | G <sub>2</sub> + M |
| II стадия                       |                                   |              |                    |
| (n = 15)                        |                                   |              |                    |
| A — C                           | 85,28 ± 2,85                      | 11,03 ± 3,11 | 6,48 ± 1,45        |
| P <sub>1</sub> — P <sub>3</sub> | 85,68 ± 1,37                      | 9,01 ± 1,87  | 7,16 ± 1,11        |
| T                               | 85,55 ± 1,36                      | 8,71 ± 1,06  | 7,1 ± 0,88         |
| III стадия                      |                                   |              |                    |
| (n = 7)                         |                                   |              |                    |
| A — C                           | 74,67 ± 3,95                      | 19,52 ± 2,91 | 11,47 ± 2,72       |
| P <sub>1</sub> — P <sub>3</sub> | 78,19 ± 0,53                      | 16,05 ± 2,06 | 9,28 ± 1,77        |
| T                               | 73,35 ± 2,84                      | 18,68 ± 3,48 | 13,53 ± 1,34       |

Обозначения: A — C — нормальная слизистая оболочка; P<sub>1</sub> — P<sub>3</sub> — слизистая оболочка вокруг опухолевого очага; T — опухоль.

жание ДНК, близкое к диплоидному, в то время как высокозлокачественные опухоли практически всегда анеуплоидны. На примере изучения переходноклеточного рака показано, что с увеличением степени злокачественности происходит увеличение фракции клеток в S- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла, причем это явление наблюдается не только в опухолевой ткани, но и в слизистой оболочке, окружающей очаг (табл. 25), что связано с увеличением пролиферативной активности клеток.

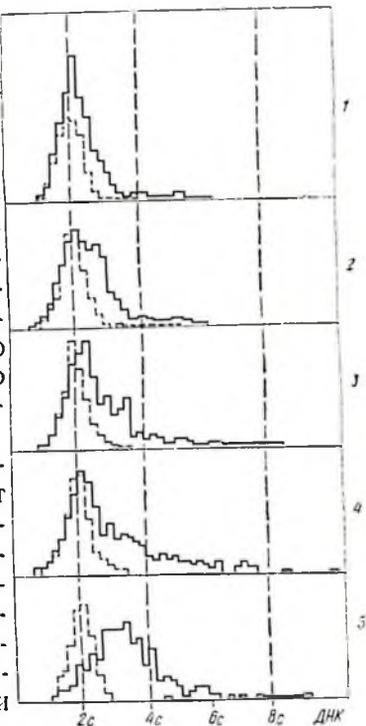
На основании данных о содержании ДНК в клетках слизистой оболочки мочевого пузыря при выраженном раковом процессе второй стадии появляется возможность определения биологических особенностей роста опухоли, которая характеризуется наличием двух различных клеточных популяций. Одна из них имеет низкую частоту инфильтрации и характеризуется диплоидным содержанием ДНК подобно клеткам опухоли первой стадии злокачественного процесса. Вторая клеточная популяция характеризуется анеуплоидией и большим процентом клеток, находящихся в S- и G<sub>2</sub>-фазах цикла, с высокой скоростью инвазии в окружающие ткани [161].

Несмотря на определенную трудность, связанную с получением материала из предстательной железы, а также почечной ткани, в литературе имеются данные по цитометрическому анализу клеток, полученных из этих органов [116, 125].

Для изучения морфологических особенностей аденомы и аденокарциномы почки использовали метод ретроспективного анализа материала по оценке содержания ДНК клеточных элементов гистологических препаратов. Установлено, что с увеличением степени злокачественности происходит значительный сдвиг стволовой

Рис. 74. Гистограммы распределения содержания ДНК в гистологических препаратах опухоли почки с различной степенью злокачественности:

1 — аденома, 2—5 — аденокарцинома почки соответственно I, II, III и IV степени



линии ДНК из диплоидной в анеуплоидную область распределения относительного содержания ДНК (рис. 74). Полученные данные указывают на информативность анализируемых критериев и могут быть использованы для совершенствования постановки гистологического диагноза и предсказания клинического исхода болезни для пациентов с аденокарциномой почки [116].

Методом проточной цитометрии установлено, что уровень плоидности может быть диагностическим критерием определения степени выраженности патологического процесса, развившегося в предстательной железе (рис. 75). Практически все клеточные популяции при доброкачественных процессах характеризуются диплоидным содержанием ДНК, при наличии ракового процесса происходит смещение ствовой линии ДНК в околодиплоидную и тетраплоидную область гистограммы. Анализ соотношения клеток по фазам цикла в аденокарциноме простаты позволил установить две разновидности опухоли. Одна из них имеет клоны клеток в основном с диплоидными и околодиплоидными ядрами, вторая характеризуется тетраплоидной и октаплоидной ствовой линией в распределении ДНК [122, 176].

## ОРГАНЫ ДЫХАНИЯ

С целью повышения диагностической эффективности цитологического и гистологического методов исследования патологических процессов, развивающихся в верхних и нижних отделах

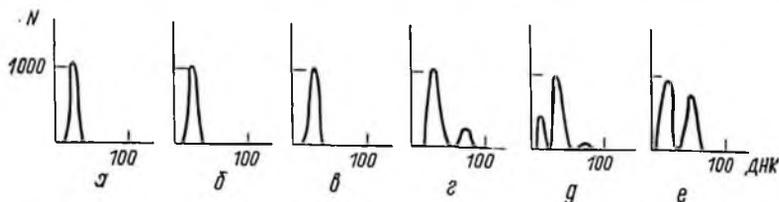


Рис. 75. Гистограммы распределения содержания ДНК в клетках предстательной железы:

а — норма, б — воспаление, в — начальная гиперплазия, г — микрокарцинома, д — плоскоклеточный рак, е — низкодифференцированный рак

респираторного тракта, используют различные объективные критерии оценки клеточных элементов. Среди количественных параметров наиболее информативными являются площадь ядра, его большая и малая диаметры, оптическая плотность ядра, размеры цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическое отношение, содержание ДНК и белка.

При изучении предопухолевых состояний, рака гортани и глотки на клеточном, тканевом уровне методами количественной цитометрии обнаружены закономерности, которые выражаются в нарастании ploидности клеток и гетерогенности клеточных популяций в процессе малигнизации эпителиальной ткани. Также показано, что содержание ДНК в клеточных ядрах инвазивного рака несколько ниже, чем при внутриэпителиальном раке гортани [2].

Среди различных отделов респираторного тракта более распространенным объектом исследования являются легкие. Это обстоятельство связано не только с относительной доступностью получения диагностического материала, но и с высоким риском развития рака легких как у мужчин, так и у женщин. В связи с этим ведется активный поиск диагностических критериев ранней малигнизации ткани, определяются объективные показатели, которые могут быть информативными для характеристики морфологических особенностей рака легкого различного гистогенеза.

Показано, что на основе объективных критериев оценки ядра и клетки на свето-оптическом и электронно-микроскопическом уровнях возможны определение различий между нормальными и малигнизированными клетками, а также установление различной степени катаплазии плоскоклеточного рака легких [83, 309]. При анализе логарифмов объемов ядер клеток также обнаружены статистически значимые различия для овсяноклеточного, мелко-клеточного рака и аденокарциномы легких [2].

При изучении цитологических и цитоморфометрических особенностей препаратов, приготовленных из мокроты больных раком легких, определены различия в клетках мелкоклеточного, овсяноклеточного рака.

Статистическая оценка величин показала достоверное различие для всех исследуемых параметров ( $P < 0,01$ ). Количественные значения четырех параметров исследуемых клеток показали реальную возможность использования морфометрии для дифференциальной диагностики двух разновидностей рака легкого (табл. 26). Полученные результаты были сопоставлены с выживаемостью больных для определения прогноза болезни в случае мелко-клеточного, овсяноклеточного рака легких [97].

Известно, что уровень ploидности в клетках отражает степень выраженности злокачественного процесса практически во всех тканях. В этом плане не исключение и ткань легкого. При изучении последовательности изменений в процессе канцерогенеза легочной ткани показано нарастание содержания ДНК в клетках. Отмечено, что при крупноклеточной малодифференцированной

Таблица 26. Значения морфометрических параметров для двух разновидностей рака легких

| Диагноз             | Площадь ядра, мкм <sup>2</sup> | Диаметр эллипса, мкм |         |       |
|---------------------|--------------------------------|----------------------|---------|-------|
|                     |                                | максимальный         | большой | малый |
| Мелкоклеточный рак  | 37,88                          | 7,37                 | 7,80    | 6,04  |
| Овсяноклеточный рак | 60,45                          | 9,23                 | 9,88    | 7,73  |

карциноме увеличение плоидности в клетках доходит до 6с — 10с. Методом компьютерного анализа установлена тесная взаимосвязь стадии канцерогенеза и увеличения плоидности в клетках эпидермоидного рака легких как у собак, так и у человека, что позволяет использовать собак в качестве объекта моделирования рака легких [242].

Опыт применения абсорбционной микроспектрофотометрии и проточной цитометрии показал, что большинство опухолей легких являются анеуплоидными. Обоснованные доказательства данной закономерности приведены в работе Olszewski et al. [239], где по анализу содержания ДНК и уровню плоидности построена сводная гистограмма для 32 случаев рака легкого и карциноидной опухоли (рис. 76). Уровень плоидности опухолевых клеток определяется отношением модальной величины содержания ДНК малигнизированных клеток к содержанию ДНК в доброкачественных клетках. Исходя из этого можно установить уровень плоидности для каждого типа опухоли. Так, уровень плоидности для карциноидной опухоли равен 2,0 для эпидермоидной карциномы — 2,9, для овсяноклеточной — 2,5. Для аденокарциномы и крупноклеточной карциномы уровень плоидности достигает значений 3,6 и 2,8 соответственно.

Доказательством анеуплоидности рака легких является обнаружение большого числа атипических клеток с высоким содержанием ДНК. Детальное исследование этого явления стало возможным с развитием метода проточной цитометрии, который позволяет определить процентное соотношение клеток в различных фазах клеточного цикла. Известно, что пролиферативный пул опухолевых клеток очень высок и более 50 % клеток регистрируется в S-фазе цикла.

Оценивая активность пролиферативного пула (S + G<sub>2</sub> + M) в спектре классифицируемых кар-

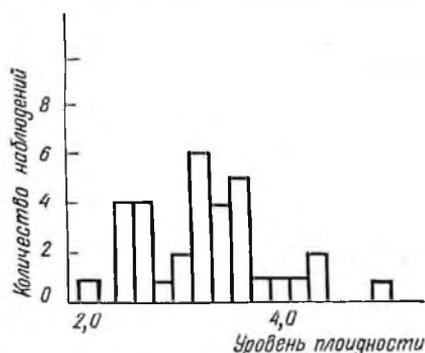


Рис. 76. Сводная гистограмма распределения содержания ДНК по уровню плоидности в препаратах рака легкого (32 случая) и карциноидной опухоли легкого (1 случай). Среднее значение уровня плоидности для всех наблюдений равно  $3,2 \pm 0,6$

Таблица 27. Распределение клеток по фазам цикла на основании содержания ДНК, %

| Гистологическое строение опухоли | Количество наблюдений | Фаза цикла  |           |          |
|----------------------------------|-----------------------|-------------|-----------|----------|
|                                  |                       | $G_0/G_1$   | S         | $G_2/M$  |
| Эпидермоидная карцинома          | 13                    | 54,9±11,7 * | 34,5±12,7 | 10,2±8,0 |
| Аденокарцинома                   | 16                    | 73,4±13,0   | 18,1±9,2  | 8,4±5,7  |
| Крупноклеточная карцинома        | 2                     | 78,1; 66,4  | 17,4; 9,9 | 4,5; 3,7 |
| Овсяноклеточный рак              | 1                     | 59,7 —      | 33,0 —    | 7,3 —    |
| Карциноидная опухоль             | 1                     | 97,8 —      | 0,8 —     | 1,4 —    |
| Всего                            | 33                    | 65,4±14,9   | 4,6±11,8  | 10,2±0,4 |

\* Дано среднее значение ± стандартное отклонение

цином легких, обнаружено, что он наиболее высок в эпидермоидной (табл. 27).

Эти данные имеют большое значение для клиники, поскольку позволяя регистрировать самые малые отклонения в процентном содержании клеток, относящиеся к различным фазам цикла, и могут служить прогностическим критерием для определения эффективности проводимого курса лечения у больных раком легких, что и было показано в работе Vindelov при наблюдении 30 больных с мелкоклеточным анапластическим раком легких. В процессе проведения курса терапии была установлена выраженная гетерогенность опухоли и обнаружено, что при рецидиве опухоли обычно доминируют клетки другой плоидности, чем в первичном очаге. Это, очевидно, связано с тем, что в процессе лечения сохраняется клон, менее чувствительный к данному препарату, т. е. имеющий иной характер синтеза ДНК, что позволяет ему дать развитие новой опухоли [297].

### ЭНДОКРИННЫЕ ЖЕЛЕЗЫ

Из желез внутренней секреции одним из основных объектов цитометрического изучения является щитовидная железа. При этом количественному методу исследования отводится решающая роль в предоперационной диагностике для определения уровня анаплазии опухолевой ткани. Установлено, что из большого спектра изучаемых признаков более информативными являются ядерно-цитоплазматическое отношение, периметр и площадь ядра. При использовании данных критериев оценки препаратов определено достоверное различие между клетками фолликулярной аденомы и фолликулярного рака щитовидной железы [105, 126].

В работе Kriete также была проведена классификация опухолей щитовидной железы на основании объективных критериев

диагностики и показано, что средние размеры ядер больше при раковых процессах, чем при аденоме. Однако наблюдаемые различия не всегда достоверны. Более надежным показателем является вариабельность признака, который учитывает расстояние между текстурными линиями при сканировании ядра. Данный критерий был более высоким для клеток карциномы и имел более низкие значения при аденоме, что указывает на более гомогенный состав клеток при доброкачественных процессах [209].

При морфометрической оценке раковых процессов щитовидной железы возможна классификация А-, В- и С-клеточного рака. Объективные характеристики морфологических особенностей клеток позволяют определить гистогенез рака на дооперационном этапе исследования материала [74].

Следует отметить, что в последнее время наблюдается возрастающий интерес к цитометрическим методам исследования не только в приведенных выше органах, где определяется тенденция систематического количественного анализа клеток, но и происходит адаптация метода к изучению патологических процессов развивающихся в ЦНС, периферической нервной системе, мягких тканях и костях, а также изучения морфологических особенностей мезотелиальных клеток в плевральной, перикардальной и асцитической жидкости.

Продолжительное время преобладало правило, что уровень плоидности в малигнизированных тканях всегда больше, чем в нормальных. При этом исходили из количественной оценки препаратов, исследуемых на сканирующих цитофотометрах. С развитием быстродействующих систем анализа проточного типа значительно возрос объем исследований, в результате были получены данные, которые позволили несколько иначе взглянуть на эту проблему. Установлено, что степень анеуплоидии значительно варьирует и зависит прежде всего от типа опухоли, информативности изучаемого признака или комплекса признаков, а также от разрешения измерительной техники. Установлено, что существуют злокачественные опухоли с диплоидным содержанием ДНК или же преобладающим процентом клеток в  $G_0/G_1$ -фазе клеточного цикла, что показано на материалах опухоли кишечника, желудка, легких и шейки матки. Это может быть связано с мозаичностью опухоли, что имеет место при колоректальных опухолях кишечника, или же объясняться «псевдодиплоидией» клеток опухоли, регистрируемой как результат недостаточности информации, получаемой при исследовании одного диагностического маркера, например ДНК. Следовательно, необходимо расширять диапазон изучаемых признаков с включением более информативных маркеров, таких, как РНК, белок, сульфгидрильные группы, ферментные системы и т. д., т. е. включение многопараметровых систем анализа нормальных и атипических клеток.

Таким образом, при завершении данной главы следует кратко подвести итоги по применению автоматизированных систем диагностики сканирующего и проточного типа в области клинической

Таблица 28. Цитометрические методы исследования доброкачественных и злокачественных опухолей различной органной локализации

| Орган                 | Направленность метода  |
|-----------------------|--|
| Молочная железа       | Дифференциация доброкачественных и раковых процессов, прогноз выживаемости                               |
| Желудок               | Дифференциация процессов, классификация злокачественных процессов  |
| Легкие                | Классификация злокачественных процессов, определение степени малигнизации, прогноз лечения               |
| Мочевой пузырь        | Определение степени малигнизации, прогноз выживаемости   |
| Предстательная железа | Дифференциация доброкачественных и раковых процессов   |
| Шейка матки           | Цитоскрининг доброкачественных и раковых процессов, прогноз выживаемости и лечения, идентификация клеток |
| Полость матки         | Определение степени малигнизации   |
| Яичник                | Дифференциация доброкачественных процессов, определение степени малигнизации                             |
| Меланома              | Прогноз выживаемости   |
| Щитовидная железа     | Дифференциация доброкачественных и раковых процессов   |
| Мезотелиальные клетки | Дифференциация доброкачественных и раковых процессов   |
| Почки                 | Определение степени малигнизации, прогноз выживаемости   |
| Кроветворная система  | Дифференциальный диагноз, прогноз лечения и выживаемости, ремиссия                                       |

цитологин, основные направления которых по идентификации клеток и классификации патологических процессов органов и систем организма систематизированы в табл. 28. Показаны актуальность и перспектива цитометрических методов изучения клеток на основе вычислительной техники, микропроцессорных систем и современных средств программного обеспечения, которые направлены на повышение эффективности цитологической, морфологической диагностики патологических процессов опухолевой и неопухолевой природы заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди проблем современной медицины ранняя цитологическая диагностика занимает одно из лидирующих мест. Проведенный анализ современных достижений в области разработки цитологических анализаторов и их внедрения в медицинскую практику обосновывает перспективу создания приборов для массовых профилактических осмотров по выявлению ранних форм опухолевых заболеваний и проведению гематологических исследований. Актуальность этой задачи, стоящей перед отечественной промышленностью, подтверждается тем, что ежегодно более 300 млн анализов крови выполняется вручную.

Материалы монографии указывают пути создания цитологических анализаторов для скрининга. Первый из них — повышение производительности телевизионных анализаторов и совершенствование алгоритма распознавания, второй — дальнейшая апробация проточного способа и улучшение методов подготовки клеточных суспензий. Эти направления разработки всецело зависят от достижений многопроцессорных систем, способных выполнять параллельную обработку большого объема входной информации. Как показано в гл. 8, немаловажную роль при этом играют многопараметрические способы обработки цитометрических данных, совершенствование которых — самостоятельная задача.

Следует, однако, отметить, что даже на современном этапе развития автоматических средств цитологической диагностики их использование существенно повышает эффективность ранней диагностики ряда заболеваний.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

|  |   |
|--|---|
| Но 33342, Но 33258, Но 33378, Но 33662 — Хехст |   |
| 7-амино-AMD                                    | — 7-аминоактиномицин D  |
| DIP1   | — 4'-6-бис(2'-амидазолин-4Н)-2-фенилиндол                           |
| DAPI   | — 4', 6-диамино-2-фенилиндол  |
| COFDA  | — карбоксифлюоресцендиацетат  |
| DANS   | — дансилхлорид  |
| FDA  | — флюоресцендиацетат  |
| SITS   | — 4-ацетамидо-4'-изотиоцианатостильбен-2,2'-дисульфониловая кислота |
| SR 101   | — сульфородамин 101   |
| TRITC  | — тетраметилродамин изотиоцианат                                    |
| XRITC  | — родамин 101 изотиоцианат  |
| EB   | — этидиумбромид   |
| PI   | — пропилиумйодид  |
| AO   | — акридиновый оранжевый   |
| FITC   | — флюоресцент изотиоцианат  |
| КИВУ   | — контролер интерфейса внешних устройств                            |
| ОЗУ  | — оперативное запоминающее устройство                               |
| ПЗУ  | — постоянное запоминающее устройство                                |
| АЦП  | — амплитудоцифровой преобразователь                                 |
| ВКУ  | — видеоконтрольное устройство                                       |
| ЦАП  | — цифроаналоговый преобразователь                                   |
| ЦП   | — центральный процессор   |
| МП   | — микропроцессор  |
| ВУ   | — внешнее устройство  |
| ППЗУ   | — перепрограммируемое постоянное запоминающее устройство            |
| ТБЛ  | — трубка бегущего луча  |
| ЦВКУ   | — цветное видеоконтрольное устройство                               |

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Автандилов Г. Г.* Морфометрия в патологии.— М. : Медицина, 1973.— 248 с.
2. *Автандилов Г. Г.* Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии.— М. : Медицина, 1984.— 288 с.
3. *Автоматизация анализа цитологических препаратов.*— Рига : Зинатне, 1975.— 271 с.
4. *Автоматизация морфометрических исследований с использованием информационно-вычислительного комплекса (ИВК-1) на базе СМ-3:* Информ. письмо.— Киев : Ин. пробл. онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР, 1982.— 11 с.
5. *Автоматизация цитологических исследований.*— Киев : Наук. думка, 1985.— 139 с.
6. *Агроскин Л. С., Папаян Г. В.* Цитофотометрия : Аппаратура и методы анализа клеток по светопоглощению.— Л. : Наука, 1977.— 295 с.
7. *Анализатор изображений для сканирующего микроскопа // 1973.*— 11, № 1.— С. 11—23.
8. *Андреев Г. А., Базарский О. В., Глауберман А. С. и др.* Анализ и синтез случайных пространственных текстур // Зарубеж. радиоэлектрон.— 1984.— № 2.— С. 3—33.
9. *Арсеньева М. Г.* Основы гормональной цитологической диагностики в гинекологии.— Л. : Медицина, 1963.— 184 с.
10. *Баренбойм Г. М., Доманский А. Н., Туроверов К. К.* Люминесценция биополимеров и клеток.— М. : Наука, 1966.— 232 с.
11. *Бартельс П. Х., Виед Д. Л.* Анализ на ЭВМ и биомедицинская интерпретация микрообъектов : современные проблемы и направления будущих исследований // ТИИЕР.— 1977.— 65, № 2.— С. 90—102.
12. *Богатырев В. Н.* Изучение содержания ДНК и РНК в клетках опухоли методом лазерной проточной цитофлюорометрии и иммунологических показателей у больных с новообразованиями молочных желез : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— М., 1983.— 25 с.
13. *Бойд Д. А.* Авторадиография в биологии и медицине.— М. : ИЛ, 1957.— 356 с.
14. *Брамберга Б. М., Зигаре И. Я., Плегере Д. П., Смитниекс Э. Х.* Терминологический словарь морфологических признаков клетки для автоматизации цитологической диагностики и оценки эффективности лечения.— Рига, 1970.— 160 с.
15. *Быковский Ю. А., Неволин В. И.* Лазерная масс-спектрометрия.— М. : Энергоатомиздат, 1985.— 128 с.
16. *Введение в количественную цитохимию.*— М. : Мир, 1969.— 439 с.
17. *Вейбель Э. Р.* Морфометрия легких человека.— М. : Медицина, 1973.— 164 с.
18. *Вольфсон Н. И.* Гистогенез рака шейки матки и влагалища.— Л. : Медицина, 1970.— 174 с.
19. *Ганина К. П.* Объективизация цитогенетических методов исследования в онкологии // Автоматизация цитологических исследований.— Киев : Наук. думка, 1985.— С. 21—27.
20. *Голов Л. Б.* Забор цитологического материала со слизистой оболочки шейки матки с помощью поролона // Лаб. дело.— 1977.— № 1.— С. 56.
21. *Грачева Н. Д.* Пособие по гистоауторадиографии.— Л. : Медгиз, 1960.— 211 с.

22. Деражне А. Б. Пресклинический рак шейки матки.— Л.: Медицина, 1972.— 221 с.
23. Дрофа В. А., Исаков В. Л., Калищук Я. В. и др. Цитологический анализатор «Интеграл» для исследования морфологических параметров клеток // Автоматизация цитологических исследований.— Киев: Наук. думка, 1985.— С. 29—33.
24. Жданов А. С., Несветов А. М. Сравнительная характеристика гистологических типов рака желудка по содержанию ДНК в ядрах опухолевых клеток // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1981.— № 10.— С. 467—469.
25. Железнов Б. И., Ежова Л. С. Количественная характеристика структурных изменений клеточных ядер при некоторых патологических состояниях шейки матки // Акушерство и гинекология.— 1982.— № 4.— С. 51—55.
26. Жуковицкий А. В., Коган Э. М., Кормилец М. В. и др. Метод автоматизированного количественного анализа структуры хроматина с помощью сканирующего цитофотометра.— М., 1983.— 19 с.— (Препринт / АН СССР, Биофизика; № 592).
27. Зеленин А. В. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой — М.: Наука, 1971.— 231 с.
28. Золотаревский В. Б., Склянская О. А. Сравнительная оценка дисплазии и раннего рака желудка по данным определения содержания ДНК // Арх. патологии.— 1984.— 46, Вып. 11.— С. 58—66.
29. Зубрихина Г. Н., Чистякова О. В., Роттенберг В. И., Зубриян Н. И. Импульсная цитофотометрия и морфометрия в исследовании полипов кишечника // Тез. докл. 25-летняя конф. онкологов.— Минск, 1985.— С. 83.
30. Иваницкий Г. Р., Литинская Л. Л., Шихматова В. Л. Автоматический анализ микробъектов.— М.; Л.: Энергия, 1967.— 223 с.
31. Иванов В. С., Кашаев З. Р., Кожеуров В. Т., Тамахин С. Н. Возможности автоматизации клинического анализа клеток крови // Автоматизация цитологических исследований.— Киев: Наук. думка, 1985.— С. 33—36.
32. Исаков В. Л. Автоматизация в цитологии.— Киев: Знание, 1983.— 15 с.
33. Исакова Л. М., Владимирова Л. В., Исаков В. Л., Шуклинов В. А. Количественный анализ красителей для автоматизированных исследований клеточных препаратов // Цитология.— 1982.— 24, № 7.— С. 839—843.
34. Исакова Л. М., Жесткова А. Е., Петрова А. С. Анализ способов получения цитологического материала при патологии шейки матки // Лаб. дело.— 1982.— № 3.— С. 6—9.
35. Исакова Л. М., Коханевич Е. В., Шуклинов В. А. Морфометрическое изучение дифференцировки эпителия слизистой оболочки шейки матки на ранних этапах канцерогенеза // Эксперим. онкология.— 1983.— 5, 2 — С. 41—44.
36. Исакова Л. М., Коханевич Е. В., Жесткова А. Е. и др. Унифицированный метод получения диагностического материала при патологии шейки матки: Информ. письмо.— Киев, 1984.— 2 с.
37. Капрельянец А. С. Метод автоматического количественного анализа ультраструктуры // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины.— Киев: Наук. думка, 1974.— С. 129—141.
38. Капрельянец А. С., Панков Е. А., Кобыляков В. А. и др. О перспективном направлении в анализе биологических электронно-микроскопических структур // III Всесоюз. симпоз. по электр.-микроскоп. приборостроению.— М., 1975.— С. 76—79.
39. Карнауков В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки.— М.: Наука, 1978.— 207 с.
40. Кимото С. Сканирующий электронный микроскоп как система // — 1972.— 10, № 2.— С. 1—26.
41. Козаченко В. П., Стасеева В. И. Дисплазия и внутриэпителиальная карцинома шейки матки // Вопросы онкогинекологии.— Воронеж, 1974.— С. 14—21.
42. Коханевич Е. В. Световая и флюоресцентная кольпоцервикоскопия, гистохимические и цитогенетические параллели в диагностике предопухолевых состояний и рака шейки матки: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Киев, 1970.— 29 с.
43. Коханевич Е. В., Ильяшенко Н. А. Комплексная диагностика и комбинированное лечение предрака и рака шейки матки.— Киев: Здоров'я, 1976.— 165 с.

44. Крымский Л. Д., Боцманов К. В. Авторадиография как метод современной функциональной морфологии // Арх. патол. анат.— 1971.— 33, Вып. 1.— С. 74—79.
45. Лобода В. И., Мельник А. И., Исаков В. Л. и др. Цитокарнометрические исследования в разработке автоматизированной диагностики рака шейки матки // Современные методы морфологического исследования в теоретической и практической онкологии.— Тбилиси: Мецниереба, 1978.— С. 135—137.
46. Лопухин Ю. М., Коган Э. М. Ультраструктурные основы жизнедеятельности печени, почек, сердца.— М.: Медицина, 1977.— 256 с.
47. Луппа Х. Основы гистохимии.— М.: Мир, 1980.— 343 с.
48. Мендельштам В. А., Свиндлер Е. А. Цитологическая диагностика женских половых органов.— Л.: Медицина, 1966.— 163 с.
49. Николаева Т. Г., Добрынин Я. В., Гаврилова И. Г., Махонова Л. А. Проточная цитофлуориметрия в оценке эффективности химиотерапии больных острым лимфобластным лейкозом детей // Автоматизация цитологических исследований.— Киев: Наук. думка, 1985.— С. 100—103.
50. Новые методы культуры животных тканей / Под ред. Ю. М. Оленова.— М.: Мир, 1976.— 255 с.
51. Папаян Г. В., Магакян Ю. А., Агроскин Л. С., Коралова Б. М. Использование данных сканирующей цитофотометрии для анализа распределения поглощающего вещества в клетке // Цитология.— 1982.— XXIV, № 11.— С. 1360—1367.
52. Петрова А. С. Современная клиническая цитология // Лаб. дело.— 1980.— № 7.— С. 395—399.
53. Петрова А. С., Зубрихина Г. И., Чистякови О. В., Лукина Т. А. Содержание ДНК в эпителии слизистой оболочки желудка при различных его заболеваниях // Ар. патол. анат.— 1981.— XLIII, Вып. 4.— С. 47—51.
54. Петрова А. С., Исакова Л. М., Исаков В. Л. Дифференциальная диагностика предраковых и раковых состояний шейки матки на основании многопараметрического анализа результатов цитологических исследований // Ар. патол. анат.— 1984.— XLVI, Вып. 8.— С. 13—17.
55. Петрова А. С., Широкова Т. А., Соломатина Т. Г. Особенности цитологической картины эндометрия здоровых фертильных женщины детородного возраста // Лаб. дело.— 1984.— № 8.— С. 474—477.
56. Пинчук В. Г., Панков Е. Я., Капрельянец А. С. Перспективы развития автоматического анализа биологических объектов в электронной микроскопии // Вестн. АН УССР.— 1977.— № 10.— С. 97—104.
57. Пинчук В. Г., Исаков В. Л., Мазур Л. А. Применение проточных анализаторов в онкологии // Вопр. онкологии.— 1983.— XXXIX, № 8.— С. 75—83.
58. Покровский В. А., Козаченко В. П., Куколева Н. И. и др. Дисплазия и внутриэпителиальная карцинома шейки матки.— М.: Медицина, 1970.— 246 с.
59. Проспект. Гранулометрия фирмы Культроникс-Франс-счетчик Культер ТА-2.— 1983.— 4 с.
60. Рабинович Ф. М. Кондуктометрический метод дисперсионного анализа.— Л.: Химия, 1970.— 176 с.
61. Рабинович Ф. М. Кондуктометрические счетчики частиц и их применение в медицине.— М.: Медицина, 1972.— 179 с.
62. Разработка основных принципов построения устройств визуального ввода информации для систем вычислительного комплекса по ранней диагностике злокачественных опухолей: Отчет.— Рига, 1974.— 148 с.
63. Ранняя онкологическая патология / Под ред. Б. Е. Петерсона, В. И. Чиссова.— М.: Медицина, 1985.— 320 с.
64. Роджерс Э. Авторадиография.— М.: Мир, 1972.— 318 с.
65. Розенфельд А., Дейвис Л. С. Сегментация и модели изображения // ТИИЕР, 1979.— 67, № 5.— С. 71—81.
66. Рошонок М. П., Порцете И. Я. Сравнительные данные пригодности различных способов приготовления цитологических препаратов для исследования в автоматизированном устройстве ТАСИ // Автоматизация цитологической диагностики опухолей.— Рига: Зинатне, 1976.— С. 53—66.
67. Рошонок М. П., Порцете И. Я. Методы приготовления и окраски цитологических препаратов для исследования в телевизионных анализаторах структур

- изображений (ТАСИ) // Автоматизация в клинической лабораторной диагностике: Материалы Всесоюз. пленума врачей-лаборантов (нояб. 1977 г.).— Рига, 1977.— С. 150—151.
68. Саркисов Д. С., Пальцын А. А., Втюрин Б. В. Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки.— М.: Медицина, 1980.— 263 с.
  69. Соловьева Е. А., Зубрихина Г. Н. Автоматический анализ клеток периферической крови // Автоматизация цитологических исследований.— Киев: Наук. думка, 1985.— С. 117—120.
  70. Ступко А. И., Кармилова В. А., Соколов С. Е. и др. Новый способ забора материала для автоматизации цитологических исследований в гинекологии // Там же.— С. 121.
  71. Тагер Д. М., Голов Л. Б., Войт Л. В., Селиманова Л. Г. К методике и ценности цитологического исследования эпителия шейки матки в условиях поликлиники // Материалы VIII гор. онкол. конф. (Москва, 19—20 мая 1977 г.).— М., 1977.— С. 70—72.
  72. Тайгер Г. У., Канклер-Беркли Х. Многоформатная электронная система сортировки биоклеток. I. Теоретические принципы // Приборы для науч. исслед.— 1984.— № 7.— С. 32—40.
  73. Тайгер Г. У. Многоформатная электронная система сортировки биоклеток. II. Устройство и работа // Там же.— С. 40—47.
  74. Тарасов С. С. Цитометрическая характеристика рака щитовидной железы // Автоматизация цитологических исследований.— Киев: Наук. думка, 1985.— С. 122.
  75. Тимошенко Я. Г., Полищук Л. З., Петунин Ю. И., Сунтело Л. П. Морфометрическое исследование и математическая оценка гетерогенности некоторых показателей при гиперпластических процессах и раке эндометрия // Там же.— С. 123.
  76. Тоомре М. Клиническая оценка эндоскопических, морфологических и вспомогательных методов диагностики при профилактических онкологических обследованиях: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Л., 1978.— 23 с.
  77. Фулдс С. В. Шприц для одержания цитологического материала с шейки матки // Педиатрия, акушерство і гінекологія.— 1972.— № 4.— 61 с.
  78. Харалик Р. М. Статистический и структурные подходы к описанию текстур // Тр. Ин-та инженеров по электрон. и радиоэлектрон.— 1979.— 67, № 5.— С. 98—121.
  79. Холст В. Рассеяние света малыми частицами.— М.: ИЛ, 1961.— 482 с.
  80. Чередниченко В. М., Капрельяц А. С., Кобыляков В. А. и др. Автоматический количественный анализ поврежденных ультраструктуры митохондрий, вызванных глубоким охлаждением ( $-196^{\circ}$ ) // Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины.— Киев: Наук. думка, 1974.— С. 142—153.
  81. Шибанова А. И. Примененные цитологические критерии в диагностике дисплазий пищевода // Лабораторная диагностика: Тез. докл. II Всесоюз. съезда врачей-лаборантов.— М., 1979.— С. 127—128.
  82. Шибанова А. И. Цитологический метод исследования в диагностике и оценке эффективности лечения предопухолевых процессов и рака пищевода: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1981.— 29 с.
  83. Ягузов А. С., Агамова К. А., Кац Л. А., Кобзева С. А. Морфометрические характеристики плоскоклеточного рака легкого (светооптические и электронно-микроскопические исследования) // Арх. патологии.— 1983.— 45, № 7.— С. 60—63.
  84. Ягузов А. С. Использование метода цитофлюориметрии в УФ-области спектра для исследований в биологии и медицине // Методические рекомендации.— Л., 1974.— 45 с.
  85. Яковлева И. А., Кукутэ Б. Г. Морфология и диагностика предрака и рака матки по биопсиям и соскобам.— Кишинев: Штиняца, 1979.— 121 с.
  86. Яновский К. А. Оптико-структурный машинный анализ изображений.— М.: Машиностроение, 1984.— 277 с.
  87. А. с. 1185240 СССР. Тестовый образец / М. М. Сукнов, В. Л. Исаков, Н. С. Холоденко.— Оpubл. 07.04.83.— Бюл. № 38.
  88. А. с. 399937 СССР. Электронный микроскоп — анализатор просвечиваемого

- типа, направленный на биологические объекты. / П. П. Барзилович, Н. С. Пушкарь, В. А. Кобыляков и др.— Оpubл. 29.11.71.— Бюл. № 39.
89. А. с. 644638 СССР. Чертежный прибор координатного типа / А. М. Подгурский, В. Л. Исаков, Я. Я. Попов и др.— Оpubл. 30.01.79.— Бюл. № 4.
  90. А. с. 431881 СССР. Аппарат для лазерной терапии / А. И. Коломийченко, В. Л. Исаков, М. И. Кругляк и др.— Оpubл. 15.06.74.— Бюл. № 22.
  91. А. с. 839494 СССР. Устройство для приготовления мазков биологических объектов / В. Л. Исаков, Л. М. Исакова, В. А. Шуклинов, Б. Г. Хльвинок.— Оpubл. 20.02.81.— Бюл. № 23.
  92. А. с. 839496 СССР. Устройство для сбора диагностического материала шейки матки / Л. М. Исакова, Е. В. Коханевич, В. Л. Исаков и др.— Оpubл. 20.02.81.— Бюл. № 23.
  93. А. с. 1043166 СССР. Состав для получения изолированных клеток кожи человека / Б. Н. Раппопорт.— Оpubл. 23.09.83.— Бюл. № 35.
  94. Adams L. R., Kamensky L. A. Fluorometric characterization of six classes of human leukocytes // Acta cytol.— 1974.— 18, N 5.— P. 389—391.
  95. Adler C. P., Riede U. N., Wurdak W., Zugmaier G. Cytophotometric measurements of the DNA in Hodgkin lymphomas and Non-Hodgkin lymphomas // Pathol. Res. and Pract.— 1984.— 178, N 6.— P. 579—589.
  96. Arndt-Jovin D., Jovin T. M. Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content // J. Histochem. and Cytochem.— 1977.— 25, N 7.— P. 585—589.
  97. Ashton P. K., Johnston W. W., Rossen E. H. Planimetric evaluation of small-cell carcinoma of the lung // Acta cytol.— 1983.— 27, N 5.— P. 557.
  98. Axel Z. Simple method for performing oblique CT-guided needle biopses // Amer. J. Roentgenol.— 1984.— 143, N 2.— P. 341—342.
  99. Ayre J. E. Selective cytology smear for diagnosis of cancer // Amer. J. Obstet. and Gynecol.— 1947.— 53, N 4.— P. 609—617.
  100. Ayre J. E. Cervical cytology in diagnosis of early cancer // JAMA.— 1948.— 136, N 8.— P. 513—516.
  101. Ayre J. E. The vaginal smear "precancer" cell studies using a modified technique // Amer. J. Obstet. and Gynecol.— 1949.— 58, N 6.— P. 1205—1219.
  102. Ayre J. E. A new device for detecting carcinoma of the uterus // Acta cytol.— 1970.— 14, N 2.— P. 111—115.
  103. Baak J. P. A., Blanco A., Kurver P. H. Quantitation of borderline and malignant mucinous ovarian tumours // Histopathology.— 1981.— 5, N 4.— P. 353—360.
  104. Baak J. P. A. Ovary: borderline or malignant tumor // Morphometry in diagnostic pathology.— 1983.— P. 60—62.
  105. Baak J. P. A., Oort J. Morphometry in diagnostic pathology.— Berlin. etc.: Springer, 1983.— 205 p.
  106. Bacus J. W., Wcens J. H. An automated method of differential red blood cell classification with application to the diagnosis of anemia // J. Histochem. and Cytochem.— 1977.— 25, N 7.— P. 614—632.
  107. Bahr G. F., Bartels P. H., Hale A. J., Wied G. L. Chapter IV. Descriptor definition and measurer of discriminatory power // Acta cytol.— 1975.— 15, N 2.— P. 116—122.
  108. Bahr G. F. Automated cytology // Diagnostic cytol. and its histopat. Bases.— 1978.— 2.— P. 1123—1164.
  109. Baisch H., Beck H. P., Christensen I. J., Hartmann N. R. et al. A comparison of mathematical methods for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry // Cell and Tissue Kinet.— 1982.— 15, N 3.— P. 235—249.
  110. Bamford D. S., Hall E. W., Newman M. R. An evaluation in 100 patients with postmenopausal bleeding // Acta cytol.— 1984.— 28, N 2.— P. 101—104.
  111. Barholdi M., Salzman C. C. The optical system of flow cytometry with the reflector // Appl. Opt.— 1980.— 19.— P. 1573.
  112. Barker E. A. Fine needle aspiration cytology // J. Med. Lab. Technol.— 1984.— 1, N 12.— P. 896—901.
  113. Barlogie B., Kaber M. N., Johnson T. S. et al. Cytometry for diagnosis and treatment of the cancer patient // Cancer Bull.— 1983.— 35, N 1.— P. 40—46.

114. *Bartels P. H., Bibbo M., Dytch H. E. et al.* Diagnostic marker Displas for intermediate cells from the uterine cervix // *Acta Cytol.*—1982.—26, N 1.—P. 29—34.
115. *Bartels P. H., Bibbo M., Dytch H. E. et al.* Marker features for malignancy in ectocervical cells statistical evaluation // *Cell Biophys.*—1983.—5, N 2.—P. 71—77.
116. *Bennington J. U., Mayall B. H.* DNA cytometry on four-micrometer sections of paraffin-embedded human renal adenocarcinomas and adenomas // *Cytometry*—1983.—4, N 1.—P. 31—39.
117. *Balfour K. B., Srigley J. R., Batsakis J. G. et al.* DNA flow cytometry of thyroid neoplasms // *Arch. Otolaryngol.*—1985.—111, N 1.—P. 34—38.
118. *Berns M. W., Cheng W. K., Floyd A., Ohnuki Y.* Chromosome lesions produced with an argon laser microbeam without dye sensitization // *Science.*—1981.—71, N 3974.—P. 903.
119. *Berus M. W., Rattner T. B., Meredith S., Witter M.* Current laser microirradiation studies // Thikd conferentie on the laser.—New York: Acad of Sciences, 1976.—P. 160—175.
120. *Bibbo M., Keebler C. M., Wied G. L.* The cytologic diagnosis of tissue repair in the female genital tract // *Acta cytol.* 1971.—15, N 2.—P. 133—137.
121. *Bibbo M., Alenghat E., Bahr G. et al.* A quality-control procedure on cervical lesions for the comparison of cytology and histology // *J. Reprod. Med.*—1983.—28, N 12.—P. 811—822.
122. *Bichel P., Frederiksen P., Ksaer T. et al.* Flow microfluorometry and transrectal fine-needle biopsy in the classification of human prostatic carcinoma // *Cancer.*—1977.—40.—P. 1206.
123. *Bijman J.* Optimization of mammalian chromosome suspension preparations employed in a flow cytometric analysis // *Cytometry.*—1983.—3, N 5.—P. 354—358.
124. *Blair O. C., Winward R. T., Roti J. L.* The effect of hyperthermia on the protein content of Hela cell nuclei: A flow cytometric analysis // *Radiat. Res.*—1979.—78.—P. 474.
125. *Blomm J. H. M., Kate F. J., Mostofi F. K., Schrode F. H.* Grading of prostatic carcinoma evaluation of single parameters and cytomorphometry // *Cancer prostate and kidney: Proc. NATO Adv. Study Inst., Erice, June 2—12, 1981.*—New York; London, 1983.—P. 109—115.
126. *Boon M. E., Lowhagen T., Blomk D. I. et al.* Computation of preoperative diagnosis probability for follicular adenoma and carcinoma of the thyroid on aspiration smears // *Anal. and Quant. Cytol.*—1982.—4, N 1.—P. 1—5.
127. *Braylan R. C., Diamond L. W., Powell M. L., Harty-Golder B.* Percentage of cells in the S-phase of the cell cycle in human lymphoma determined by flow cytometry // *Cytometry.*—1980.—1, N 2.—P. 171—174.
128. *Cambier M. A., Christy W. J., Wheelless L. L., Frank I. N.* Slit-scan cytofluorometry basis for automated prescreening of urinary tract cytology // *J. Histochem. and Cytochem.*—1976.—24, N 1.—P. 305—307.
129. *Calsimpoalas N.* Cell analysis.—New York: Plenum press, 1982.—336 p.
130. *Caro L. G.* High resolution autoradiography. II. The problem of resolution // *J. Cell Biol.*—1962.—15, N 1.—P. 189.
131. *Carrano A. V., Van Dilla B. A., Gray J. W.* Flow cytogenetics a new approach to chromosome analysis // *Flow cytometry and sorting* / Ed. by M. R. Melamed, P. F. Mullaney, M. L. Mendelsohn. New York: Wiley, 1979.—P. 421—451.
132. *Cerček L., Cerček B.* Apparent tumour specificity with the SCM-test // *Brit. J. Cancer.*—1975.—31.—P. 252.
133. *Chassevent A., Daver A., Bertrand G. et al.* Analyse d'ADN par cytométrie de flux dans les cancer du sein // *Bull. Cancer. (Paris)*—1984.—71, N 5.—P. 494—495.
134. *Christopherson W. M.* Cytologic detection and diagnosis of cancer: Its contributions and limitations // *Cancer.*—1983.—51, N 7.—P. 1201—1209.
135. *Cornelisse C. J., Van Driel-Kulker A. J., Meyer F., Ploem J. S.* Automated recognition of atypical nuclei in breast cancer cytology specimens by iterative

- image transformations // *J. Microsc. (Gr. Brit.)*.—1985.—137, N 1.—P. 101—110.
136. *Crissman U. A., Darzynkiewicz Z., Steinkamp J. A.* Development and application of techniques for simultaneous analysis of DNA, RNA and protein by flow cytometry // *Cell and Tissue Kinet.*—1983.—16, N 5.—P. 524.
  137. *Crosland-Taylor P. J.* A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube // *Nature*—1953.—171, N 3.—P. 37—38.
  138. *Darzynkiewicz Z., Traganos F., Melamed M. R.* New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry // *Cytometry*.—1980.—1, N 1.—P. 98.
  139. *Darzynkiewicz Z., Andreeff M.* Multiparameter flow cytometry. P. 1. Application in analysis of the cell cycle // *Clin. Bull.*—1981.—11.—P. 47.
  140. *Darzynkiewicz Z., Traganos F., Kapuscinski J. et al.* Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cell // *Cytometry*.—1984.—5, N 5.—P. 355—363.
  141. *Darzynkiewicz Z., Traganos F., Kapuscinski J., Melamed M. R.* Denaturation and condensation of DNA in situ induced by acridine orange in relation to chromatin changes during growth and differentiation of Friend erythroleukemia cells // *Ibid.*—1985.—6, N 3.—P. 195—207.
  142. *Davey F. R., Kurec A. S., Oates B. S.* Cell volumes of lymphoblasts in patients with acute lymphocytic leukaemia // *Clin. and Lab. Haematol.*—1985.—7, N 1.—P. 17—26.
  143. *Davis H. J.* The irrigation smear — accuracy in detection of cervical cancer // *Acta cytol.*—1962.—6, N 5.—P. 459—467.
  144. *Dexing Q., Yang Z., Hu Y. et al.* Multiple-hole needle for puncture biopsy an analysis of 420 cases // *Cancer*.—1984.—53, N 4.—P. 1011—1015.
  145. *Dyer D. L.* Optical limits in TV microscopy // *Research development*.—1973.—24, N 9.—P. 36—43.
  146. *Dyson J. B., MacLaughlin C. R., Surrey G. C.* Toslin. Responce of human cervical tumorous to radiotherapy determined by flow cytofluorometry // *Brit. J. Cancer*.—1983.—47, N 4.—P. 566.
  147. *Ejrench M., Bryon P. A., Fiere D. et al.* Quantitative cytology of acute adult leukemia // *Transplant Clin Immunol.*—XIII, Excerpta Medica.—1981.—P. 224—228.
  148. *Ejrench M., Bryon P. A., Fiere D. et al.* Cell Cycle protein content and nuclear size in acute myeloid leukemia // *Cytometry*.—1985.—6, N 1.—P. 47—53.
  149. *Ehud M., Yeonda E., Arnon N.* Rare complications after transabdominal fine medle aspiration // *Amer. J. Gastroenterol.*—1984.—72, N 6.—P. 458—460.
  150. *Eisert W. G., Dennenlochr M.* Nozzle design for the generation of plane liquid surfaces // *Cytometry*.—1981.—1, N 4.—P. 249—253.
  151. *Eisert W. G.* High resolution optics combined with high spatio reproducibility on flow // *Ibid.*—P. 254—259.
  152. *Enchev V. G., Raichev R. D.* Zytomorphometrische Untersuchungen bei normaler Magenschleimhaut, prakanzerosen Krankheiten und Magenkrebs // *Arch. Geschwulstforsch.*—1982.—52, N 8.—S. 641—647.
  153. *Enchev V. G., Tsanev K. G.* Comparative cytomorphometric and cytospectrophotometric investigations of gastric lesions // *Ibid.*—1985.—55, N 1.—P. 37—46.
  154. *Engelholm S. A., Spang-Thomsen M., Brunner N. et al.* Disaggregation of human solid tumors by combined mechanical and enzymatic methods // *Brit. J. Cancer*.—1985.—51, N 1.—P. 93—98.
  155. *Engh G. J., Trask B. J., Gray J. W. et al.* Preparation and bivariate analysis of suspensions of human chromosomes // *Cytometry*.—1985.—6, N 2.—P. 92—100.
  156. *Erhardt K., Auer G., Bjorkholm E. et al.* Combined marphologic and cytochemical grading of serous ovarian tumors // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.*—1985.—151, N 3.—P. 356—361.
  157. *Escobar C. J., Told P., Sattilaro R. T.* The despersal of cell from human gyne-

- colologic specimens : chemical agents // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 7.—P. 513—524.
158. *Evenson D., Klein F. A., Whitmore W. F., Melamed M. R.* Flow cytometric evaluation of sperm from patients with testicular carcinoma // *J. Urol.*—1984.—132, N 6.—P. 1220—1225.
  159. *Fantes J. A., Green D. K., Cooke H. J.* Purifying human Y chromosomes by flow cytometry and sorting // *Cytometry.*—1983.—4, N 1.—P. 88—91.
  160. *Farsund T.* Selective sampling of cells for morphological and quantitative cytology bladder epithelium // *J. Urol.*—1982.—128, N 2.—P. 267—271.
  161. *Farsund T., Hoestmark J. G., Laerum O.* Relation between flow cytometric DNA-distribution and pathology in human bladder cancer // *Cancer.*—1984.—54, N 9.—P. 1771—1777.
  162. *Feichter G. E., Tauber P. F., Zandowski J.* Clinical experience with a new endometria cell sampling kit (Isaacs cirty endometrium cell sampler) in the early detection of endometrial cancer // *Acta cytol.*—1982.—26, N 2.—P. 141—143.
  163. *Fischbach F., Krieglsteiner H. P., Zoos W. et al.* Tref sicherheit und Praktikabilität der Preveal—curette zur Fruherkennung des Endometrium karzinoms // *Geburtshilfe und Frauenheilk.*—1983.—43, N 10.—S. 611—615.
  164. *Fornage B., Touche D., Zemaire A. et al.* Apport en cancéologie de la ponction-espersion a l'aiguille fine d'organes abdominaux sous controle echographique en temps reel a propos de 265 observations // *Radiat. Ress.*—1984.—65, N 8/9.—P. 533—544.
  165. *Foster J.* Medical applications of image analysis with the Magiscan 2 // *Anal. and Quant. Cytology and Histology.*—1985.—7, N 3.—P. 192—196.
  166. *Fossa S. D., Thorud E., Shoaib M. C. et al.* DNA flow cytometry in primary breast carcinoma // *Acta pathol., microbiol. et immunol. scand.*—Sect. A.—1984.—92, N 6.—P. 475—480.
  167. *Freni S. C., Wiepjes L. J.* Preparing cell suspensions from cervical smears with pepsine and ultrasnic treatment // *Acta cytol.*—1975.—19, N 3.—P. 306—312.
  168. *Fried J.* Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry // *Comput. and Biomed Res.*—1976.—9,—P. 263—276.
  169. *Friedlander M. L., Taylor I. W., Russell P., Tattersall M.* Cellular DNA content — a stable feature in epithelial ovarian cancer // *Brit. J. Cancer.*—1984.—49, N 2.—P. 173—179.
  170. *Friedlander M. L., Russell P., Taylor I. W. et al.* Flow cytometric analysis of cellular DNA content as an adjunct to the diagnosis of ovarian tumours of borderline malignancy // *Pathology.*—1984.—16, N 3.—P. 301—306.
  171. *Fujita T., Tanaka K., Tokunaga J.* Sem atlas of cells and tissues.—Tokyo ; New York : Igaku-Shoin.—1981.—322 p.
  172. *Garcia I. L., Tolles W. E.* Ultrasonic disaggregation of cell clusters // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 7.—P. 508—512.
  173. *Goerttler K., Stohr M.* Quantitative cytology of the positive region in flow sorted vaginal smears // *J. Histochem. and Cytochem.*—1979.—27, N 1.—P. 567—572.
  174. *Goerttler K., Stohr M.* Highlighting of progress by research croups in cytology automation German Cancer Research Center // *Proc. of the II Int. conf. of the Autom. et cancer cytol and cell image analysis.*—Chicago, 1979.—P. 13—18.
  175. *Goerttler K., Ehemann V., Tschahargane C., Stohr M.* Monodispersal and deoxyribonucleic acid analysis of prostatic cell nuclei // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 3.—P. 560—564.
  176. *Gohde W.* Automation of cytofluorometry by use of the impulsmicrophotometer // *Fluorescence techniques in cell Biology / A. A. Thaer, M. Sernetz.* Berlin : Springer.—1973.—P. 79—88.
  177. *Gohde W., Dittrich W., Zinser K. H., Prieshot J.* Impulszytophotometrische Untersuchungen an atypischen Zellabstrichen aus Scheide und Cervix uteri // *Geburtshilfe und Frauenheilk.*—1972.—32, N 3.—S. 382—393.
  178. *Grebergy S. D.* Computer-assisted image analysis cytology // *Karger.*—New York, 1984.—201 p.

179. *Greenebaum E., Koss L. G., Sherman A. B et al.* Comparison of needle aspiration and solid biopsy technics in the flow cytometric study of DNA distributions of surgically reseeded tumors // *Amer. J. Clin. Pathol.*—1984.—82, N 5.—P. 559—564.
180. *McGregor G. N., Kapitza H. G., Jacobson K. A.* Laser-based fluorescence microscopy of living cell // *Laser Focus /electrooptics.*—1984.—N 11.—P. 85—93.
181. *Hajdu S. J., Melamed M. R.* Limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary neoplasms // *Acta cytol.*—1984.—28, N 3.—P. 337—345.
182. *Hardy J. A., Wheelless L. L.* Application of frannhofer diffraction theory to feature-specific detector design // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 7.—P. 857—863.
183. *Hartmann H., Avers Ch.* Mitochondria of yeast : ultrastructural evidence for giant branched organelle per cell // *Science.*—1983.—181, N 4101.—P. 749—751.
184. *Hedley D. W., Friedlander M. L., Taylor I. W. et al.* Method for analysis of cellular DNA content of paraffine Embedded pathological material using flow cytometry // *J. Histochem. and Cytochem.*—1983.—31, N 11.—P. 1333—1335.
185. *Hedley D. W., Friedlander M. L., Taylor I. W. et al.* DNA flow cytometry of paraffine-embedded tissue // *Cytometry.*—1984.—4, N 5.—P. 660.
186. *Hemstreet G. P., Enoch P. G., Rretlow T. G.* Tissue disaggregation of human renal cell carcinoma with further isopyknic and isokinetic gradient purification // *Cancer Res.*—1980.—40, N 4.—P. 1043—1049.
187. *Herman G. J., Vooijs G. P., Baak J. P. A., Boon M. E.* Quantitative cytologic and histologic techniques to assist in cancer evaluation // *Meth. Archiv. exp. Pathol. Basel.*—1984.—11.—P. 73—95.
188. *Herzog R. E., Ciprian C.* Cytophotometric determination of DNA in minimal invasive cancer of the human cervix uteri // *Gynecol. obstet. Invest.*—1983.—15.—P. 261—265.
189. *Herzog R. E., Schweikhart G., Mitze M., Beck T.* DNS-Gehalt und histologisches Grading bei Mammakarzinomen // *Tumor Diagn. und Ther.*—1985.—6, N 2.—S. 64—67.
190. *Hiddemann W., Schumann J., Andreef M. et al.* Convention on nomenclature for DNA cytometry // *Cancer Genetics and Cyto genetics.*—1984.—13, N 2.—P. 181—183.
191. *Hillen H., Burghouts J., Bron H. et al.* Value of pulce-cytophotometry for diagnosis and prognosis in acute leukemia // *Pulse-Cytophotometry II*, W. Gohae, J. Schumann, T. Buchner.—Europ. Press Medikon Ghent. : 1976.—P. 392—401.
192. *Holdrinet R. S. G., Pennings A., Drenthe-Schonk A. M. et al.* Flow cytometric determination of the S-phase compartment in bone marrow of adult patients with acute leukemia // *Acta haematol.*—1983.—70, N 6.—P. 369—379.
193. *Hongardy H. P.* Measurement of the performance of quantitative image analysing instruments // *Prah. Metallogr.*—1975.—N 2.—P. 36—42.
194. *Husain O. A., Allen R. W. B., Hawkins E. J., Taylor J. E.* The quantiment cytoscreen and the interactive approach to cancer screening // *J. Histochem. and Cytochem.*—1974.—22, N 7.—P. 678—684.
195. *Imasato Y., Yoneyama T., Wainabe S., Genehi H.* Feature evaluation for automated cancer cell identification // *Comput. in Biology and Medicine.*—1975.—N 3.—P. 245—255.
196. *Jacob J., Budd G. C.* Application of electron autoradiography to enzyme localization // *M. A. Hayat (ed).* *Electron Microscopy of enzymes.*—1975.—4.—P. 217—266.
197. *Jacobsen A.* Prognostic impact of ploidy level in carcinoma of the cervix // *Amer. J. Clin. Oncol.*—1984.—7, N 5.—P. 475—480.
198. *Jacobsen A., Bichel P., Vaeth M.* New prognostic factors in squamous cell carcinoma of cervix uteri // *Ibid.*—1985.—8, N 1.—P. 39—43.
199. *Jem-1200 EX: A new electron microscope for analytical microscopy // JEOL.*—1982.—Suppl.—P. 11—14.
200. *Jensen R. H.* Chromomycin A<sub>3</sub> as a fluorescent probe for flow cytometry of human gynecologic samples // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 7.—P. 573—579.
201. *Jimenez—Ayala M., Vilaplana E., Bengoa C. B. et al.* Endometrial and endo-

- cervical brushing techniques with a Medhosa cannula // *Acta cytol.*—1975.—19, N 6.—P. 557—563.
202. *Kasabova M.* Морфометричен анализ на нормални, дискарнотични и ракови клетки от гинекологични цитонамазки // *Акушерство и гинекол. (НРБ)*.—1984.—23, № 6.—С. 510—515.
  203. *Kachel V.* Basic principles of electrical sizing of cells and particles and their realization in the new instrument „Metricell” // *J. Histochem. and Cytochem.*—1976.—24, N 1.—P. 211—230.
  204. *Kachel V., Kordwig E., Glossner E.* Uniform lateral orientation, caused by flow forces, of flat particles in flowthrough systems // *Ibid.*—1977.—25, N 7.—P. 774—780.
  205. *Kam E. Y., Pitts E. D.* Computer assisted grain counting for autoradiography // *Comput. Programs Biomed.*—1984.—19, N 1.—P. 81—93.
  206. *Kamachi M., Morotomi N., Fujimoto T. et al.* Cytofluorometric analysis of the cell kinetics during late gastric cancer // *J. Cancer Clin.*—1984.—30, N 14.—P. 1759—1766.
  207. *Komitowski D., Zinser G.* Quantitative description of chromatin structure during neoplasia by the method of image processing // *Anal. and Quant. Cytol. and Histol.*—1985.—7, N 3.—P. 178—182.
  208. *Koper J. M., Christianse J. G. M.* The look-up table: a classifier for cell sorters // *Cytometry.*—1981.—1, N 6.—P. 394—396.
  - 208 a. *Kraus H., Schwarz J., Neumann G.* Discrimination of normal and dyskaryotic cells with a new high-resolution system (CIALIS) // *Anal. and Quant. Cytol.*—1982.—5, N 1.—P. 28—30.
  209. *Kriete A., Schaffer R., Harms H., Aus H. M.* Computerbased cytophotometric classification of thyroid tumors in inprints // *J. Cancer Res. and Clin. Oncol.*—1985.—109, N 3.—P. 252—256.
  210. *Krug H.* Impulszytophotometrische Untersuchungen an Tumormaterial // *Arch. Tschwulstforsch.*—1976.—46, N 2.—S. 110—115.
  211. *Krygier—Stojalowska A., Zwierzykowska A., Chosia M. et al.* Computer image analysis and DNA-cytophotometry of some type of malignant lymphoma with lower malignancy // *Folia histochem. et cytobiol.*—1984.—22, N 3/4.—P. 210—211.
  212. *Kubitschek H. E.* Electronic measurement of particle size // *Research.*—1960.—13.—P. 128.
  213. *Kuse R., Schuster S., Schubbe H. et al.* Blood lymphocyte volumes and diameters in patients with chronic lymphocytic leukemia and normal controls // *Blut.*—1985.—50, N 4.—S. 243—248.
  214. *Lalande M., Schreck R. R., Hoffman R., Latt S. A.* Identification of inverted duplicated 15 chromosomes using bivariate flow cytometric analysis // *Cytometry.*—1985.—6, N 1.—P. 1—6.
  215. *Ledley R. S.* Automatic pattern recognition for clinical medicine // *Proc. of the IEEE.*—1969.—57, N 11.—P. 20—28.
  216. *Leif R. C., Nordqvists S., Clay S. et al.* A procedure for dissociating ayre scrape samples // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 7.—P. 525—537.
  217. *Lenz P.* Mechanical cell separator // *Rev. Sci. Instrum.*—1980.—51, N 1.—P. 111—115.
  218. *Manel A. M., Bryon P. A., Gentilhomme O.* Etude morphometrique de 85 leucemies aigues lymphoïdes avec. A. S. M., leitz // *Biol. Cell.*—1983.—48, N 2/3.—P. 95.
  219. *Mann R. C., Hand R. E., Braslawsky G. R.* Parametric analysis of histograms measured in flow cytometry // *Cytometry.*—1983.—4, N 2.—P. 75—82.
  220. *Martin R. F., Holmes N.* Use of an 125 J—labelled R DNA ligand to probe DNA structure // *Nature.*—1983.—302.—P. 452—454.
  221. *Mazzini G., Giordano P., Riccardi A., Montecucco C. M.* A flow cytometric study of the propidium iodide staining kinetics of human leukocytes and its relationship with chromatin structure // *Cytometry.*—1983.—3, N 6.—P. 443—448.
  222. *Mazzini G., Giordano P., Montecucco C. M., Riccardi A.* A rapid cytofluorometric method for quantitative DNA-determination on fixed smears // *Histochem. J.*—1980.—12.—P. 153—p.

223. Meyer R. A., Brunsting A. Light scattering from nucleated biological cells // 1975.— 15, N 10.— P. 191—201.
224. Meyer F. Quantitative analysis of the chromatin of lymphocytes an Essay on comparative structuralism // Automation in hematology.— Berlin etc. : Springer., 1981.— P. 55—68.
225. Meyer A. A., Okagaki T. Microspectrophotometric study of post irradiat on dysplasia in vaginal smears // Cancer.— 1972.— 30, N 5.— P. 964—971.
226. Mie G. Beitrage zur optik truber medien, speziell kolloideler metallösungen // Ann. Phys.— 1908.— 25.— P. 377—400.
227. Moller U., Larsen J. K. DNA flow cytometry of isolated keratinized epithelia : a methodological study based on ultrasonic tissue disaggregation // Cell and Tissue Kinet.— 1979.— 12, N 2.— P. 203—211.
228. Montana J., Tolles W. E., Garcia G. L. et al. Cytologic cell collection, suspension andpreservation for automated screening procedures // Anal. and Quant. Cytol.— 1982.— 4, N 1.— P. 55—60.
229. Moore J. L., Williams A. R., Sanders M. Ultrasonic dispersal of mammalian cell aggregates // Exp. Cell. Res.— 1971.— 65, N 1.— P. 228—232.
230. Moreno G., Lutz M., Bessis M. Partial cell irradiation by ultraviolet and visible light conventional and laser jaurces // Rev. Exp. Pathol.— 1969.— 7.— P. 99—105.
231. Mukawa A., Kamitsuma V., Jisaki F. et al. Progress report on experimental use of CYBEST model 2 for practical gynecologic mass screening // Anal. and Quant. Cytol.— 1983.— 5, N 1.— P. 31—34.
232. Mullaney P. F., Dean P. N. The small angle light scattering of biological cells // Biophys. J.— 1970.— 10.— P. 764.
233. Muller E., Weidhase R. Impulscytophotometrische Untersuchungen zum DNS-Gehalt in Humanen Zellkernen // Wiss. Beitr. M.— Luther-Univ. Halle-Wittenberg.— 1983.— 32, N 2.— S. 3—8.
234. Nasiell K., Naslund I., Auer G. Cytomorphologic and cytochemical analysis in the differential diagnosis of cervical epithelial lesions // Anal. and Quant. Cytol.— 1984.— 6, N 3.— P. 196—200.
235. Nauth H. F. Quantitative and quantitative : Strukturanalyse der bei normalen, benignen, prokanzerosen und malignen Vulvalasionen exfoliierten Zellen // Geburtshille und Frauenheilk.— 1984.— 44, N 8.— S. 485—494.
236. Nishiya I. Field tests of the automated screening system by means of flow cytometry for efficient detection of cervical cancer in a large prefecture // Asian Med. J.— 1985.— 28, N 4.— P. 218—228.
237. Noguchi Y., Tenjin Y. A Scene-segmentation method for multispectral cell images // Anal. and Quant. Cytol.— 1984.— 6, N 3.— P. 211—219.
238. Okagaki T., Meyer A. A., Sciarra J. J. Prognosis of irradiated carcinoma of cervix uteri and nuclear DNA in cytologic postirradiation dysplasia // Cancer.— 1974.— 33 — P. 647.
239. Olszewski W., Darzynkiewicz Z., Claps M. L., Melamed M. R. Flow cytometry of lung carcinoma : A comparison of DNA stemline and cell cycle distribution with histology // Anal. and Quant. Cytol.— 1982.— 25, N 2.— P. 90—94.
240. Ooms E. C. M., Kurver P. S. H., Boon M. E. Morphometrical analysis of urothelial cells in voided urine of patients with low grate and high grate bladder tumours // J. Clin. Pathol.— 1982.— 35, N 10.— P. 1063—1065.
241. Oud P. S., Zahniser D. J., Haag D. J. et al. A new disaggregation device for cytology specimens // Cytometry.— 1984.— 5, N 6.— P. 509—514.
242. Pak H. G., Teplitz R. L., Ashdjian V. et al. Quantitative DNA determination by image analysis. II. Application to human and canine pulmonary cytology // Anal. and Quant. Cytol.— 1983.— 5, N 4.— P. 263—268.
243. Papanicolau G. N. A new procedure for staining vaginal smears // Science.— 1942.— 95, N 2462.— P. 438—439.
244. Parry J. S., Cleary B. K., Williams A. R. et al. Ultrasonic dispersal of cervical cell aggregates // Acta cytol.— 1971.— 5, N 2.— P. 163—166.
245. Patterson K. G., Goldstone A. H., Richards J. D. M., Cawley J. C. Studies of cell size in lymphoproliferative disorders // Brit. J. Haematol.— 1980.— 46, N 2.— P. 337—338.

246. *Perret V., Lev R., Pigman W.* Simple method for the preparation of single cell suspensions from normal and tumorous rat colonic mucosa // *Gut*.— 1977.— 18, N 5.— P. 382—385.
247. *Petersen S. E., Lorentzen M., Bichel P.* A mosaic subpopulation structure of human colorectal carcinomas demonstrated by flow cytometry // *Flow Cytometry* IY.— Oslo-Bergen-Trondheim, Universitets forlaget, 1980.— P. 412—416.
248. *Picock D., Jaylor C.* Use of the Magiscan image analyser in automated uterine cancer cytology // *Anal. and Quant. Cytol.*— 1980.— 2, N 3.— P. 145—211.
249. *Pollack A., Moulis H., Block N. L., Irvin G. L.* Quantitation of Cell Kinetic Responses Using Simultaneous Flow Cytometric Measurements of DNA and Nuclear Protein // *Cytometry*.— 1984.— 5, N 5.— P. 473—481.
250. *Poulsen R. S., Oliver L. H., Cahn R. L., Louis C., Toussaint G.* High resolution analysis of cervical cells—a progress report // *J. Histochem. and Cytochem.*— 1977.— 25, N 7.— P. 689—695.
251. *Pressman N.* Markovian analysis of cervical cell images // *J. Histochem. and Cytochem.*— 1976.— 24, N 1.— P. 138—144.
252. *Pretlow T. P., Glover G. L., Pretlow T. G.* Separation of lymphocytes and mast cells from the furth transplantable mast cell tumor in an isokinetic gradient of ficoll in tissue culture medium // *Cancer. Res.*— 1977.— 37, N 2.— P. 578—584.
253. *Price G. B., McCutcheon M. J., Taylor W. B., Miller R. G.* Measurement of cytoplasmic fluorescence depolarization of single cells in a flow system // *J. Histochem. and Cytochem.*— 1977.— 25, N 7.— P. 597—600.
254. *Rasey J. S., Nelson N. J.* Response of an in vivo- in vitro tumour to X— rays and cytotoxic drugs: effect of tumor disaggregation methods on cell survival // *Br. J. Cancer.*— 1980.— 41, N 2.— P. 217—221.
255. *Rinaldi L. M. J.* Isolation of living cells from animal tissues // *Int. Rev. Cytol.*— 1958.— 7, N 2.— P. 587—647.
256. *Ritch P. S., Shackney S. E., Schuette W. H., Talbot T. L., Smith C. A.* A practical graphical method for estimating the fraction of cells in S in DNA histograms from clinical tumor samples containing aneuploid cell populations // *Cytometry*.— 1983.— 4.— P. 66—74.
257. *Roug G. H., Grimm E.* An enzymatic method for the consistent production of monodispersed viable cell suspensions from human solid tumors.— *J. Surg, Oncol.*— 1985.— 28, N 2.— P. 131—133.
258. *Rosenberg J. Z., Russell C. W. S., Giles G. R.* Cell viability studies on the exfoliated colonic cancer cell // *Br. J. Surg.*— 1978.— 65, N 1.— P. 188—190.
259. *Rosenthal D. L., McLatchie C., Stern E. et al.* Endocervical columnar cell atypia coincident with cervical meoplasia characterized by digital image analysis // *Acta Cytol.*— 1982.— 26, N 2.— P. 115—120.
260. *Rutgers D. H.* Cell suspension preparation of solid tumours for flow cytometry // *Flow. Cytometry* IY. Proc. of the IY Int. Symp. on Flow Cytometry (Pulse Cytophotometry) Voss, Norway, Oslo June 4—8, 1978, Univ.— 1980.— P. 67—69.
261. *Ruiter D. J., Boon M. E.* Atypical indifferent (reserve) cells in the cervical epithelium and their exfoliative pattern // *Acta cytol.*— 1982.— 26, N 3.— P. 292—298.
262. *Sandhu L. C., Warters R. L., Dethlefsen L. A.* Fluorescence Studies of Hoechst 33342 with Supercoiled and Relaxed Plasmid pBR 322 DNA // *Cytometry*.— 1985.— 6, N 3.— P. 191—194.
263. *Sato A.* Flow Cytometric analysis of Cultured cells // *Acta Histochem. Cytochem.*— 1983.— 16, N 4.— P. 393—402.
264. *Scarffe S. H., Crowther D., Bread M. E. J. et al.* The relationship between the pre— treatment proliferative activity of bone marrow blaste and prognosis in adult acute myelogenous leukaemia // *Pulse— Cytophotometry* II. W. Gohde, S. Schumann, Buchner Eur. Press Medikon, Ghent.— 1976.— P. 411—417.
265. *Schenck U., Neugebauer D, Orto K. et al.* Monolayer preparation of curvical samples cytomorphicologic characteristics and differential cytology // *Ibid.*— 1981.— 3, N 4.— P. 285—288.

266. Schutte B., Reynders M. H. J., Bosman F. T., Blijham G. H. Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue // *Cytometry*.— 1985.— 6.— P. 26—30.
267. Segadal E., Iverseen Ole E. Endoscann, a new endometrial cell sampler // *Brit. J. Obstet. and Gynaecol.*— 1983.— 90, N 3.— P. 266—271.
268. Seigneurin D., Ganvin C., Brugal G. A quantitative analysis of the human bone marrow granulocytic cell lineage using the SAMBA 200 cell image processor. I. The normal maturation sequence // *Anal. and Quant. Cytol.*— 1984.— 6, N 3.— P. 168—179.
269. Shackney S. E., Levine A. M., Fisher R. I. et al. The biology of tumor growth in the non-Hodgkin's lymphomas: A dual parameter flow cytometry study of 220 cases // *J. Clin. Invest.*— 1984.— 73, N 4.— P. 1201—1214.
270. Shapiro H. M. Multistation multiparameter flow cytometry: A critical review and rationale // *Cytometry*.— 1983.— 3, N 4.— P. 227—243.
271. Shapiro H. M., Schildkraut E. R., Curbelo R. et al. Cytomat-R: A computer-controlled multiple laser source multiparameter flow cytophotometer system // *J. Histochem. and Cytochem.*— 1977.— 25, N 7.— P. 836—844.
272. Skoden-Hogenson M. J., Salzman G. C., Mullaney P. F., Brockman W. H. A high efficiency flow cytometer // *J. Histochem. and Cytochem.*— 1977.— 25, N 7.— P. 784—789.
273. Stocum H. K., Pavelic Z. P., Rustum Y. M. et al. Characterization of cells obtained by mechanical and enzymatic means from human melanoma, sarcoma and lung tumors // *Cancer Res.*— 1981.— 41, N 4.— P. 1428—1434.
274. Stocum H. K., Pavelic Z. P., Rustum Y. M. An enzymatic method for disaggregation of human solid tumors for studies of clonogeneity and biochemical determinants of drug action // *Cloning of human tumor stem cells.*— New York, Ziss.— 1980.— P. 331—343.
275. Soman S., Kaplow L. S. Disaggregation of bone marrow spicules for studies by flow cytometry // *Flow Cytometry IY: Proc. of the IY Int. Symp. on Flow Cytometry (Pulse Cytophotometry)*, Voss, Norway, June 4—8, 1979.— Oslo Univ. forl., 1980.— P. 59—62.
276. Steen H. B. A microscope — based flow cytophotometer // *Histochem.*— 1983.— 15, N 2.— P. 147—160
277. Steen H. B., Boye E., Skarstad K. et al. Application of flow cytometry on bacteria cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding // *Cytometry*.— 1982.— 2, N 4.— P. 249—257.
278. Steinkamp J. A. Flow cytometry // *Rev. Sci. Instrum.*— 1984.— 55, N 9.— P. 1375—1400.
279. Stohr M., Goerttler K. Dual laser flow analysis and sorting of cells including the uterine cervix // *The automation of uterine cancer cytology.*— Chicago, 1979.— P. 75—78.
280. Strang A. Direct image analysis in the electron microscopy // *J. Sci. Instr.*— 1969.— 2 (Ser. 27).— P. 18—25.
281. Tanaka N., Ikeda H., Veno T. et al. Fundamental study of automatic cyto — screening for uterine cancer // *Acta cytol.*— 1977.— 21, N 1.— P. 72—89.
282. Tanaka N., Veno T., Ikeda H. et al. CYBEST model 3: Automated cytologic screening system for uterine cancer utilizing image analysis processing // *Anal. and Quant. Cytol.* 1982.— 4, N 4.— P. 279—285.
283. Tanke H. J., Ploem J. S., Jonas U. Kombinierte Durchfließzytophotometrische und Bildanalyse zur automatisierten Zytologie von Blasenepithel und Prostata // *Aktuel. Urol.*— 1982.— 13, N 3.— S. 109—115.
284. Tanke H. J., Van Driel—Kulker A. H. J., Cornelisse C. J., Ploem J. S. Combined flow cytometry and image cytometry of the same cytological sample // *J. Microsc. (Gr. Brit.)*— 1983.— 130, N 1.— P. 11—22.
285. Tanke H. J., Van Ingen E. M., Ploem J. S. Acriflavine feulgen stilbene staining: a procedure for automated cervical cytology with a television based system (LEYTAS) // *J. Histochem. and Cytochem.*— 1979.— 27, N 2.— P. 84—86.
286. The comprehensive EM laboratory program // *Instruments for quantitative electron microscopy: Catalog OPTON Feintechnik GmbH.*— Oberkochen, 1982.— P. 15.

287. *Thomas R. A., Yopp T. A., Watson B. D.* Combined optical and electronic analysis of cells with the amac transducers // *J. Histochem. and Cytochem.*—1977.—25, N 7.— P. 827—835
288. *Томев И., Цанев К.* Цитоморфомегрично процване върху площите на клетката, ядрото, цитоплазмата и съотношенията между тях при норма, дисплазия, рак in situ и инвазивен рак на маточната шийка // *Онкология (НРБ)*.—1981.—18, N 3.— С. 123—131.
289. *Tsou K. C., Hong D. H., Varello M. et al.* Flow cytometric DNA analysis as a diagnostic aid for cervical condyloma and cancer // *Cancer*.—1984.—54, N 9.— P. 1778—1787.
290. *Tsou K. C., Pearson S., Atkinson B. F. et al.* Evaluation of a one — parameter flow analysis of cervical samplex for gynecology cancer screening // *Gynecol. Oncol.*—1983.—15, N 3.— P. 316—324.
291. *Tuan J., Sigaux F., Flandrin G.* Automated classification of lymphoid cells // *Anal. and Quant. Cytol. and Histology*.—1985.—7, N 1.— P. 38—46.
292. *Ubezio P.* Microcomputer experience in analysis of flow cytometric DNA distributions // *Comput. Programs. Biomed.*—1985.—19, N 2.— P. 159—166.
293. *Valet G.* Automatische Erkennung von Krebszellen // *Umschau*.—1984.—84, N 13.— S. 406—408.
294. *Van Driel—Kuler A. M. J., Stohr M., Goertler K., Tanke H. J.* Analysis by image processing of cells sorted by two-parameter flow cytometry // *Acta pathol. et microbiol. Scand. Sect. A.*—1981.—89, Suppl., N 274.— P. 453—457.
295. *Van Driel-Kulker A. H. J., Hesker W. E., Van Nellen J. et al.* Preparation of monolayer smear from paraffin-embedded tis sue for image cytometry // *Cytometry*.—1985.—6, N 3.— P. 268—272.
296. *VIDEOPLAN* — das fortschrittliche MeBsystem zur halbautomatischen Bildanalyse. Katalog.—Wien, Reichert, 1977.—12 S.
297. *Vindelov L. D.* Clonal heterogeneity of small-cell anaplastic carcinoma of the lung demonstrated by flow cytometric DNA-analysis // *Cancer Res.*—1980.—40, N 8.— P. 4295—4302.
298. *Vindelov L. D., Christensen I. J., Keiding N. et al.* Long-term storage of samples for flow cytometric DNA analysis // *Cytometry*.—1983.—3, N 5.— P. 317—322.
299. *Vindelov L. D., Christensen I. J., Nissen N. I.* A detergent-trypsin method for the preparation of niclei for flow cytometric DNA analysis // *Ibid.*— P. 323—327.
300. *Visseaux-Coletto B., Adnet J. J.* Apport d'une me'thode : de quantimetrie semi-automatique en cytologie urinaire a propos de vingt-huit cas // *Arch. anat. et Cytol. pathol.*—1984.—32, N 6.— P. 339—348.
301. *Wagner D., Sprenger E., Merkle D.* Cytophotometric studies in suspicious cervical smears // *Acta cytol.*—1976.—20, N 4.— P. 366—371.
302. *Weibel E. R.* Stereological methods // *Practical methods for biological morphology*.—London : Acad. press, 1979.—1.— P. 184.
303. *Wheless L. L., Onderdonk M. A.* Preparation of clinical gynecologic specimens for automated analysis // *J. Histochem. and Cytochem.*—1974.—22, N 7.— P. 522—525.
304. *Wheless L. L., Patten S. F.* Slit-scan cytofluorometry : basis for automated cytopathology prescreening system // *Acta cytol.*—1976.—17, N 5.— P. 391—394.
305. *Wheless L. L., Patten S. F., Berkan T. K. et al.* Multidimensional slit-scan prescreening system : preliminary results of a single blind clinical study // *Cytometry*.—1984.—5, N 1.— P. 1—8.
306. *Wied G. L., Bartels P. H., Nahr C. F., Oldfield D. G.* Taxonomic intra-cellular analytic system (TICAS) for cell identification // *Acta cytol.*—1968.—22, N 2.— P. 180—204.
307. *Wied G. L., Bartels P. H., Dytch H. E. et al.* Diagnostic marker features in dysplastic cells from the uterine cervix // *Ibid.*—1982.—26, N 4.— P. 475—483.
308. *Wittekind D.* Standardization of dyes and stains for automated cell pattern recognition // *Anal. and Quant. Cytol.*—1985.—7, N 1.— P. 6—30.
309. *Xavier P., Bernard A., Etienne C. et al.* Automated cytopathologic diagnosis of bronchial carcinoma. II. Preliminary results of classifying cyocent-

rifuged bronchial brushings // *Anal. and Quant. Cytol.*—1984.—6, N 1.—  
P. 30—36.

310. Zahniser D. J. Automation of pap smear analysis: (A review and status report) // *J. Pictorial data anal.*—Berlin, 1983.—P. 265—294.
311. *Pat* 1598593 FRG, GD1 N 33/16. Apparat fur diagnostische / L. Kamensky, M. Briarcliff.—Publ. 17.12.70.
312. *Pat*. 251394735 FRG, A61 B 10/00. Tupper zur Gewinnung von Abstrichmaterial / G. Schlufer, W. Schuster.—Publ. 24.03.77.
313. *Pat* 2559510 FRG, G01 N 33/116, G 01 N 1/28. Verfahren zur Gewinnung von Abstrichmaterial fur diagnostische Untersuchungen / G. Schlufer, W. Schuster.—Publ. 13.01.77.
314. *Pat*. 4213036 USA, G06 M 11/02. Method for classifying biological cells / R. Kopp, J. Mendelsohn, B. Pernick.—Publ. 15.07.80.
315. *Pat*. 344498 USA, JC<sup>3</sup> B 21 F 21/00. Apparatus for preparing single cell suspension / T. Claude, M. Curry, Elaine.—Publ. 01.11.83.
316. *Pat*. 3640268 USA, A61 B 10/00. Method and device for biopsy specimen collecting and handling / H. S. Davis.—Publ. 08.02.72.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |     |
|---|-----|
| Введение . . . . .  | 3   |
| Глава 1. Физические параметры клеток . . . . .  | 7   |
| Глава 2. Забор и подготовка клеточного материала для количественных цитологических исследований . . . . . | 17  |
| Анализ способов получения материала . . . . .   | 18  |
| Особенности подготовки суспензий . . . . .  | 25  |
| Способы дезагрегации исследуемого материала . . . . .   | 29  |
| Характеристика флуоресцентных красителей . . . . .  | 41  |
| Глава 3. Оптические сканирующие приборы . . . . .   | 51  |
| Оптико-механические анализаторы со сканированием микрообъекта . . . . .                                   | 57  |
| Анализаторы со сканированием источника . . . . .  | 58  |
| Анализаторы изображения . . . . .   | 63  |
| Анализаторы изображения планшетного типа . . . . .  | 71  |
| Калибровка анализаторов . . . . .   | 73  |
| Глава 4. Электронная микроскопия . . . . .  | 76  |
| Радиоавтография . . . . .   | 88  |
| Глава 5. Кондуктометрический метод дисперсионного анализа . . . . .                                       | 89  |
| Глава 6. Проточные анализаторы . . . . .  | 98  |
| Проточные камеры . . . . .  | 100 |
| Канал рассеяния . . . . .   | 101 |
| Флуоресцентный канал . . . . .  | 108 |
| Оптические схемы проточных анализаторов . . . . .   | 112 |
| Канал сортировки . . . . .  | 118 |
| Пневмогидравлический канал . . . . .  | 120 |
| Электронная система . . . . .   | 121 |
| Погрешности . . . . .   | 122 |
| Глава 7. Когерентно-оптические методы анализа . . . . .   | 123 |
| Микрохирургия клетки и лазерный спектральный анализ . . . . .   | 123 |
| Дифракционный метод исследования . . . . .  | 130 |
| Глава 8. Обработка результатов цитологических исследований . . . . .                                      | 135 |
| Глава 9. Применение автоматизированных систем в биологии и клинической медицине . . . . .                 | 156 |
| Гинекология . . . . .   | 161 |
| Кровотворная система . . . . .  | 172 |
| Молочная железа . . . . .   | 179 |

|   |     |
|---|-----|
| Органы пищеварения . . . . .              | 182 |
| Органы мочеполовой системы . . . . .      | 186 |
| Органы дыхания . . . . .                  | 189 |
| Эндокринные железы . . . . .              | 192 |
| Заключение . . . . .                      | 195 |
| Список сокращений и обозначений . . . . . | 196 |
| Список литературы . . . . .               | 197 |

Монография

ВИКТОР ЛЕОНИДОВИЧ ИСАКОВ  
ВАДИМ ГРИГОРЬЕВИЧ ПИНЧУК  
ЛЮДМИЛА МИХАЙЛОВНА ИСАКОВА

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ  
АВТОМАТИЗАЦИИ  
ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Утверждено к печати ученым советом  
Института проблем онкологии  
им. Р. Е. Кавецкого АН УССР*

Редактор *И. И. Никитина*  
Оформление художника *В. В. Жданова*  
Художественный редактор *А. Я. Вишневецкий*  
Технический редактор *В. А. Краснова*  
Корректоры *М. Т. Кравчук, Л. И. Регета,  
Л. Г. Бузиашвили*

ИБ № 8469

Сдано в набор 20.07.87. Подп. в печ. 30.12.87. БФ 26151.  
Формат 60×90/16. Бум. тип. № 1. Лит. гарн. Выс. печ.  
Усл. печ. л. 13,5. Усл. кр.-отт. 13,5. Уч.-изд. л. 15,33. Ти-  
раж 1350 экз. Заказ 7—2135. Цена 3 р. 40 к.

Издательство «Наукова думка», 252601 Киев 4,  
ул. Репина, 3.

Головное предприятие республиканского производствен-  
ного объединения «Полиграфкинг», 252057, Киев,  
ул. Довженко, 3.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»

В 1988 г.

ВЫПУСТИТ В СВЕТ КНИГИ:

*Гуслицер Л. П.* Эпидемиология злокачественных опухолей на Украине.— 15 л.— 2 р. 60 к.

В монографии представлены результаты изучения заболеваемости злокачественными опухолями населения УССР за 20-летний период. Показаны особенности распределения злокачественных новообразований по возрасту и полу, а также закономерности географического распространения (нозогеография) опухолей у населения областей УССР отдельно среди мужчин и женщин. Представлены данные о динамике заболеваемости злокачественными новообразованиями в УССР. Рассмотрены основные пути профилактики злокачественных опухолей.

Для научных работников и врачей.

*Бережная Н. М.* Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз.— 15 л.— 2 р. 60 к.

В монографии обобщены последние данные литературы о механизмах участия нейтрофилов в поддержании иммунологического гомеостаза в норме и при патологии и представлены собственные новые сведения о функциональной активности нейтрофилов, их метаболических и ультраструктурных особенностях при аллергических заболеваниях и канцерогенезе. Обсуждаются возможности включения нейтрофилов в поддержание иммунологического гомеостаза, использования их в терапии. Для иммунологов, онкологов, аллергологов, патофизиологов.

Ганина К. П., Зиневич А. К., Жеро С. В. Специальные методы исследования при предопухолевых и опухолевых процессах желудка.— 15 л.— 2 р. 70 к.

В монографии на основе данных литературы и собственного опыта охарактеризованы показания, противопоказания и основные патогномоничные признаки дифференциальной диагностики основных патологических процессов в желудке и распознавания начального рака. Исследуются изменения наследственного аппарата клетки, сопутствующие или предшествующие морфологическим проявлениям опухолевого процесса, возможности цитоморфологического определения индивидуальной чувствительности рака желудка. Выявлены наиболее значимые объективные признаки заболевания. Для онкологов, гастроэнтерологов, патоморфологов, цитологов.

*Предварительные заказы на эти книги принимают магазины книготоргов, «Книга—почтой» и «Академкнига».*

*Просим пользоваться услугами магазинов — опорных пунктов издательства: Дома книги — магазина № 200 (340048 Донецк 48, ул. Артема, 147 а), магазина «Книжковий світ» (310003 Харьков 3, пл. Советской Украины, 2/2), магазина научно-технической книги № 19 (290006 Львов 6, пл. Рынок, 10), магазина «Техническая книга» (270001 Одесса 1, ул. Ленина, 17) и магазина издательства «Наукова думка» (252001 Киев 1, ул. Кирова, 4). Магазины во Львове и Киеве высылают книги иногородним заказчикам наложенным платежом.*

3 р. 40 к.

В.Л. ИСАКОВ  
В.Г. ПИНЧУК  
Л.М. ИСАКОВА

# **Современные методы автоматизации ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В монографии рассмотрены основные направления и принципы конструирования современной аппаратуры для цитохимических исследований, представлены физические основы методов исследования клеток, разработанные на основе применения лазерной, телевизионной, электронной и вычислительной техники.

НАУКОВА ДУМКА