

Використання Фрактальних Характеристик Щільності Хроматину Ядра Клітини для Визначення Стану Інтерфази

О. Шумейко

Д.т.н., проф.

Дніпровський державний технічний університет

Кам'янське, Україна

Shumeiko_a@ukr.net

Г. Шевченко

К.т.н., доц.

Науковий центр Noosphere

Дніпро, Україна

she-genn@yandex.ua

С. Герасименко

Науковий центр Noosphere

Дніпро, Україна

gerasimenko-stanislav@yandex.ru

Using the Fractal Characteristics of the Density of the Chromatin of the Cell Nucleus to Determine the Interphase State

O.Shumeyko

Prof.

Dniprovs'k State Technical University

Kamenske, Ukraine

Shumeiko_a@ukr.net

G.Shevchenko

PhD.

Noosphere Research Center

Dnipro, Ukraine

she-genn@yandex.ua

S.Gerasimenko

Noosphere Research Center

Dnipro, Ukraine

gerasimenko-stanislav@yandex.ru

Анотація—Запропоновано метод використання характеристик зміни щільності розподілу хроматину в ядрі клітини, що дозволяє отримати ефективні алгоритми виділення на цифрових зображеннях клітин в стані інтерфази.

Abstract—Research fractal properties of the distribution of chromatin in the nucleus of human cells is important for early diagnosis of cancer. The study of the density distribution of chromatin in the cell nucleus is complicated by the fact that this value is different in different periods of the life of the cell. In studying the problems of the state of chromatin during interphase important life cycle of cells.

The results obtained using the characteristics of changes in the density distribution of chromatin in the cell nucleus, yield

efficient algorithms for digital images highlight cells in interphase state.

Ключові слова—мітоз клітин; медичні зображення; фрактали.

Keywords—cell mitosis; medical images; fractals.

I. ВСТУП

Дослідження (в тому числі, з метою ранньої діагностики раку) фрактальних властивостей розподілу хроматину в ядрах клітин людини, останнім часом, набуло інтерес у фахівців [1,2,3]. Інтерес до даної тематики обумовлений, перш за все, можливістю автоматизації процесу діагностування, який зводиться до аналізу

цифрових зображень відповідних клітин людини [4,5]. Таким чином, одним з ключових елементів даного підходу є виділення області з цифрового зображення, що містить ядро клітини, з метою подальшого аналізу виділеного фрагмента. Вивчення розподілу щільності хроматину в ядрі клітини ускладнене тим фактом, що ця величина є різною в різні періоди життя клітини (див., наприклад, [9]). В період інтерфази в клітині відбувається процес біосинтезу білка, подвоюються всі найважливіші структури клітки. Уздовж вихідної хромосоми з наявних у клітині хімічних складових, синтезується її точна копія, подвоюється молекула ДНК. Подвоєна хромосома складається з двох половинок-хроматид. Кожна з хроматид містить одну молекулу ДНК. Інтерфаза в клітинах рослин і тварин в середньому продовжується на протязі 10-20 годин. Потім настає процес розподілу клітини - мітоз. Мітоз є неперервним процесом, але для зручності його розбивають на чотири стадії в залежності від того, як виглядає в цей час хроматин ядра. У мітозі виділяють профазу, метафазу, анафазу і телофазу. У профазі відбувається вкорочення і потовщення хромосом внаслідок їх спіралізації. У метафазі завершується утворення веретена поділу, яке складається з мікротрубок двох типів: хромосомних, які зв'язуються з центромерами хромосом, і центросомних (полосних), які тягнуться від полюса до полюса клітини. В анафазі хроматиди подвоєні, в інтерфазі хромосоми розходяться до полюсів клітини. У цей момент в клітині знаходяться два диплоїдних набору хромосом. У телофазі відбуваються процеси, зворотні тим, які спостерігаються в профазі: починається деспіралізація (розкручування) хромосом. Навколо хромосом у кожного полюса з мембранних структур цитоплазми формується ядерна оболонка, в ядрах виникають ядерця. Руйнується веретено ділення. На стадії телофази відбувається поділ цитоплазми (цитотомія) з утворенням двох клітин. В результаті мітозу з однієї клітини виникають дві дочірні з тим же набором хромосом, що і в материнській клітині.

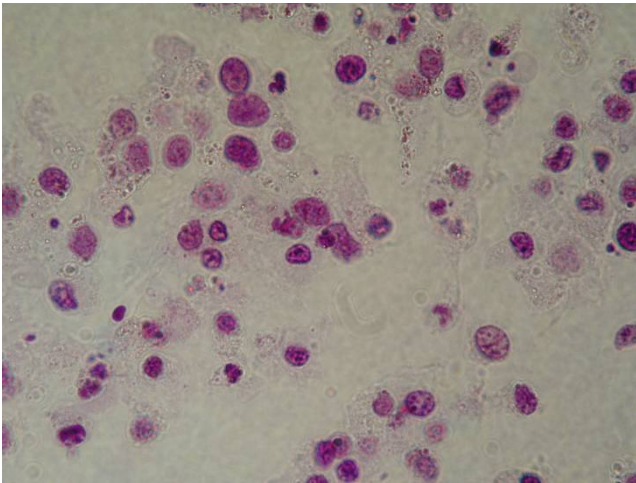


Рис. 1. Цифрове зображення соскобу епітеліцитів буккального епітелію, взяті з середньої глибини шипуватого прошарку, зафіксовані в суміші Нікіфорова і пофарбовані по Фельгену. (Архів відділу онкогематології ІЕПОР ім. Р.С.Кавецького НАН України).

На кожному етапі мітозу розподіл щільності хроматину істотно змінюється. Якщо під час інтерфази хроматин рівномірно розподілений в ядрі клітини, то під час профазу від збирається в «брили», які під час менафази і анафази розбиваються на частини і притискаються до протилежних сторін клітини.

У задачах вивчення стану хроматину нас цікавить тільки період інтерфази життєвого циклу клітини. Таким чином метод дослідження розподілу щільності хроматину ядер клітин повинен враховувати цю особливість. Вихідні дані представлені в вигляді повнокольорових зображень, отриманих в результаті цитологічного дослідження (рис.1).

II. ОГЛЯД ІСНУЮЧИХ МЕТОДІВ

Ефективним методом дослідження такого роду є фрактальний аналіз напівтонових зображенні. Перш за все це такі методи.

Метод BOX COUNTING. Цей метод застосовується до зображення будь-якої структури на площині і може бути пристосований до 3D-об'єктів [9,10], він пов'язаний з розмірністю подібності, і дозволяє визначити фрактальну розмірність не строго самоподібних об'єктів [11]. Для оцінки box-розмірності, евклідовий простір, що містить зображення об'єкта, поділяють сіткою з кроком розміру g і підраховуються непусти, зайняті досліджуваним об'єктом, квадрати $N(g)$. Потім розмір g зменшують, і знову підраховують число непустих полів $N(g)$. Нахил графіка в логарифмічному масштабі $N(g)$ від $1/g$ відповідає величині розмірності. Як видно з визначення, для цього методу попередньо потрібно провести сегментацію зображення, що істотно погіршує отриману фрактальну характеристику.

Метод 2D Variation [12] призначений для обробки бінарних (binary) і напівтонових (grayscale) зображень. В цьому випадку знаходяться мінімальний і максимальний рівні сірого в межах кожної квадратної комірки зі стороною g . Таким чином, визначаються двовірна мінімальна і максимальна функції для кожного кроку сітки.

Потім для всього зображення в цілому визначається різниця об'єму між мінімальним та максимальним значеннями. Тоді $V(r) = r^S \cdot const$, де V - об'єм різниці, g - крок сітки, S - фрактальна розмірність.

Подібна процедура повторюється для всіх пікселів зображення, досить віддалених від границі, потім g збільшується, і процедура повторюється. Нахил s графіка $V(g)$ в логарифмічному масштабі використовується для визначення фрактальної розмірності: $D_{2D} = 3 - \frac{S}{2}$. Даний метод дозволяє оцінювати як розмірність кожного колірного каналу RGB окремо, так і розмірність "яскравості" зображення.

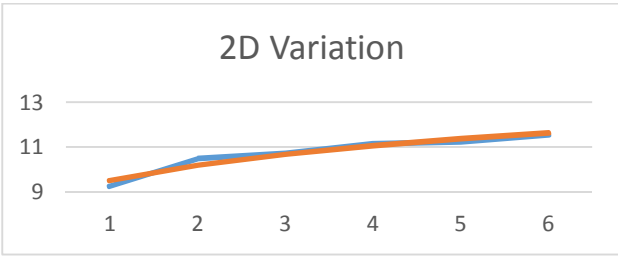


Рис. 2. Розрахунок фрактальної розмірності методом 2D Variation

Ще одним методом оцінювання фрактальної розмірності напівтонових зображень є броунівський розмірність [9], яка пропорційна експоненті Херста (Hurst's exponent) $D = 3 - H$. Параметр H можна обчислити статистично із закону дисперсії, використовуючи властивості броунівського руху: $H = -\frac{\log(\sigma_{\Delta R}(\Delta I))}{\log(\Delta R)}$, $\sigma_{\Delta R}(\Delta I)$ - середньо-квадратичне відхилення різниць, тобто різницка освітлення в точках $R + \Delta R$ та R , $\Delta I = I(R + \Delta R) - I(R)$, R - координати точки.

Алгоритм обчислень виглядає наступним чином: для всіх точок зображення (досить віддалених від краю) обчислюються збільшення освітлення ΔI в ΔR - околиці, для отриманого масиву збільшень обчислюється середньоквадратичне відхилення $\sigma_{\Delta R}(\Delta I)$, потім змінюємо ΔR та повторюємо попередні кроки. Нахил графіку залежності $\sigma_{\Delta R}(\Delta I)$ від ΔR в логарифмічних координатах дає нам величину H .

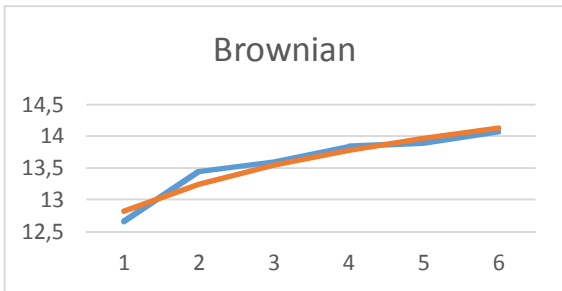


Рис. 3. Розрахунок фрактальної розмірності методом Brownian

III. ПОБУДОВА ХАРАКТЕРИСТИК ЩІЛЬНОСТІ РОЗПОДІЛУ ХРОМАТИНУ В ДАНОМУ НАПРЯМКУ

Складність використання даних характеристик для розв'язуваної задачі в тому, що отримані значення характеризують фрактальність зображення в цілому, а для вирішення поставленого завдання важливо визначити локальну нерівномірність розподілу кольору (щільності хроматину), або хоча б нерівномірність в якомусь напрямку, що характерно для стану мітозу клітини.

Нехай дано монохроматичне зображення ядер клітин $K_k = \{(x_i^k, y_i^k) | i = 0, 1, \dots, n_k - 1\} (k = 1, 2, \dots, N)$.

Використовуючи значення кольору пікселя в якості маси відповідної матеріальної точки, знайдемо центр мас

$$X_k = \frac{1}{n_k} \sum_{i=0}^{n_k-1} x_i^k, Y_k = \frac{1}{n_k} \sum_{i=0}^{n_k-1} y_i^k.$$

і через цю точку проведемо пучок прямих $y = tg\varphi(x - X_k)$, де $\varphi \in \left(-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}\right)$.

Для кожного фіксованого φ , маси точок множини K_k , які попали на пряму $y = tg\varphi(x - X_k)$ представляють собою одновимірний масив $P(\varphi) = \{P_0, P_1, \dots, P_{N(\varphi)}\}$.

$$\text{Нехай } \Delta P(\varphi) = \frac{1}{N(\varphi)} \sqrt{\sum_{i=0}^{N(\varphi)-1} |P_i - P_{i+1}|^2}.$$

Якщо хроматин в ядрі клітини розташований рівномірно, то $\Delta P(\varphi)$ змінюється в будь-якому напрямку φ приблизно однаково, тобто, якщо $\Pi(\Delta P(\varphi))$ перестановка Харді $\Delta P(\varphi)$, то вона містить велику горизонтальну (або майже горизонтальну) ділянку. Наблизимо $\Pi(\Delta P(\varphi))$ ламаною $\ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3, t)$ з трьома ланками і граничними умовами (щоб прибрати викиди, як великі, так і маленькі)

$$\ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3, \tau_0) = 0, \ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3, \tau_3) = 1,$$

де $\tau_0 = 0, \tau_3 = N$. Так, щоб для

$$\|\Pi(\Delta P(\varphi)) - \ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3)\|_2 \rightarrow \min \quad || \tau_1, \tau_2.$$

Для знаходження вирішення цього завдання нам знадобляться додаткові означення.

Нехай $\Delta_n : 0 = t_0 < t_1 < \dots < t_{n-1} < t_n = T$ - довільне розбиття відрізка $[0, T]$ і $S_r(\Delta_n)$ - множина всіх сплайнів порядку r мінімального дефекту за розбиттям Δ_n , тобто множина функцій з неперервною $r - 1$ -ю похідною на $[0, T]$, які співпадають на кожному проміжку $(t_{i,n}, t_{i+1,n}) (i = 0, 1, \dots, n - 1)$ з алгебраїчним поліномом ступеню не вище r .

Через $P(\Delta_n)$ позначимо оператор, який відображає C^p в $S_r(\Delta_n)$, $\rho \geq r - k$. При фіксованому r послідовність $\{P^*(\Delta_n^*)\}_{n=1}^\infty$ будемо називати асимптотично оптимальною сплайн-регресією для функції $x(t)$, якщо при $n \rightarrow \infty$

$$\int_a^b (x(t) - P^*(\Delta_n^*, t))^2 dt = \inf_{\Delta_n} \inf \left\{ \int_a^b (x(t) - P(\Delta_n, t))^2 dt \mid P(\Delta_n) \in S_r(\Delta_n) \right\} (1 + o(1)) \quad (1)$$

Нехай на проміжку $[0, T]$ у вузлах розбиття Δ_n дані значення функції $x_i, i = 0, 1, \dots, n$. Кубічний сплайн $s_3(x, \Delta_n) = s_3(\{x_i\}_{i=0}^n, \Delta_n)$ будемо називати інтерполяційним з граничними умовами

$$s_3^{(i)}(x, \Delta_n, 0) = x(0), i = 0, 1, \geq, \quad s_3^{(i)}(x, \Delta_n, T) = x(T), i = 0, 1,$$

якщо $s_3(x, \Delta_n, t_i) = x_i, i = 0, 1, \dots, n$.

В роботі [13] доведено наступне твердження.

Теорема 1. Нехай $x \in L_2^3$ така, що x'' дорівнює нулю на обмеженому числі відрізків або точок з $[0, T]$ і $X(t)$ друга первісна функції $x(t)$ така, що $X'(0) = 0$ і $X(0) = 0$. Виберемо M_i з умов

$$\lambda_i M_{i-1} + 2M_i + \mu_i M_{i+1} = \frac{\delta}{h_{i-1} + h_i} \left(\frac{X_{i+1} - X_i}{h_i} - \frac{X_i - X_{i-1}}{h_{i-1}} \right), \quad i = 1, 2, \dots, n-1,$$

де $\mu_i = \frac{h_{i-1}}{h_{i-1} + h_i}, \lambda_i = 1 - \mu_i$.

$$\inf \left\{ \|x - s_I(\Delta_n)\|_2 \mid s_I(\Delta_n) \in S_I(\Delta_n) \right\} = \inf \left\| x - s_3^n(\{M_i\}_{i=0}^n, \Delta_n) \right\|_2$$

Виберемо вузли t_i^* розбиття Δ_n^* з умови

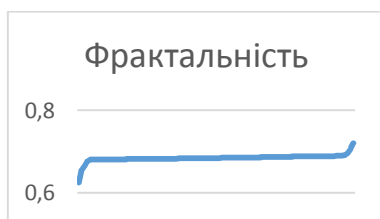


Рис. 4. Характеристики клітини в стані інтерфази

$$\int_0^{t_i^*} \left(\left\| s_3^n(\{M_i\}_{i=0}^n, t) + \frac{I}{n^\gamma} \right\|^\alpha dt = \frac{i}{n} A_n, \right. \\ \left. A_n = \int_0^T \left(\left\| s_3^n(\{M_i\}_{i=0}^n, t) + \frac{I}{n^\gamma} \right\|^\alpha dt \right), \right.$$

тоді при $n \rightarrow \infty$

$$\inf_{\Delta_n} \inf \left\{ \|x - s_I(\Delta_n)\|_2 \mid s_I(\Delta_n) \in S_I(\Delta_n) \right\} = \\ \|x - s_3^n(\{M_i\}_{i=0}^n, \Delta_n^*)\|_2 (1 + o(1)) = \frac{\theta}{n^2} \|x''\|_\alpha + o\left(\frac{1}{n^2}\right),$$

$$\text{де } \theta = \frac{I}{2!} \left(\int_0^1 t^2 (1-t)^2 dt \right)^{1/2} \quad \text{і } \alpha = 2/5.$$

Використовуючи результати теореми 1, знайдемо розв'язок задачі (1). Рішенням будуть значення τ_1 та τ_2 , які реалізують екстремум. Тоді величина

$$\delta = \frac{\ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3, \tau_2) - \ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3, \tau_1)}{\tau_2 - \tau_1}$$

буде характеризувати рівномірність розподілу хроматину, чим ближче δ до нуля, тем рівномірніше (незалежно від напрямку) він розподілений, а величина $\theta = \ell(\varphi, \{\tau_i\}_{i=0}^3, \tau_1)$ характеризує величину щільності, тобто, чим більше θ , тим більше перепади кольору хроматину, а величина $\vartheta = \tau_2 - \tau_1$ характеризує наявність або відсутність викидів, чим ближче ϑ до $N(\varphi)$ тим менше викидів даних.

Зауважимо, що велике значення δ характерно для стану менафази і анафази, мале значення θ характерно для клітин в стані профазы, а маленьке значення ϑ може говорити про те, що ми спостерігаємо телофази ядра.

Таким чином, використання отриманих характеристик дозволяє, з одного боку, відкинути ті клітини, які знаходяться в стані мітозу, а, з іншого, отримати характеристику щільності хроматину.

Крім того, для оцінки щільності, можна використовувати фрактальну розмірність в даному напрямку. Для цього використовуємо таку конструкцію.

Нехай $r \ll N(\varphi)$ и $P_i = 0$ при $i > N(\varphi)$, тоді для $i = 0, 1, \dots, [N(\varphi)/r]$

$$m_i = \min \{P_{ir}, P_{ir+1}, \dots, P_{(i+1)r}\}, \quad M_i = \max \{P_{ir}, P_{ir+1}, \dots, P_{(i+1)r}\} \\ \text{і } V_i(r) = (M_i - m_i)r.$$

Далі, нехай $V(r) = \sum_{i=0}^{[N(\varphi)/r]} V_i(r)$. Подібна процедура повторюється для всіх пікселів зображення, досить

віддалених від кордону, потім r збільшується, і процедура повторюється. Нахил s графіка $V(r)$ в логарифмічному масштабі використовується для визначення фрактальної розмірності.

Якщо хроматин розташований в ядрі рівномірно, то і фрактальна розмірність в будь-якому напрямку однакова.

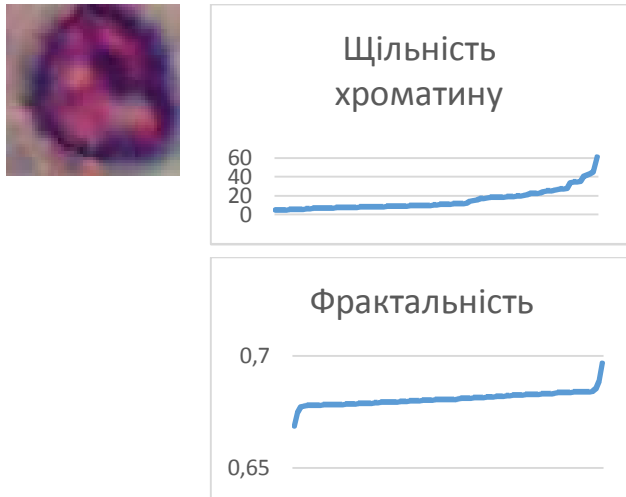


Рис. 5. Характеристики клітини в стані мітозу

Побудова характеристик визначення клітин в стані інтерфази.

У разі, якщо потрібно виділити клітини в стані інтерфази (що є найбільш часто розглядаються випадком), то завдання дещо спрощується.

Як видно з поведінки графіка щільності хроматину, якщо ці дані описати квадратичної регресією

$$\sum_{i=0}^{100} (\Pi(\Delta P(\varphi_i)) - ai^2 - bi - c)^2 \rightarrow \min_{a,b,c}$$

тоді коефіцієнти a, b, c будуть характеризувати зміну щільності хроматину.

Рис.4	0.0015835	0.2163586	1.5100646
Рис.5	0.0037519	0.1356285	4.4715336

Кращою характеристикою є старший коефіцієнт. Для тестової вибірки це значення лежить в межах від 0.000804 до 0.0061442.

Перестановка коефіцієнтів, що характеризують фрактальність, добре описується кубічною моделлю. Для прикладів на зображенні 5 і 6 коефіцієнти кубічної регресії будуть наступні

Рис.4	0.000000284	0.0000076194	0.0109206	-0.2296844
Рис.5	0.0000003088	0.0000083126	0.0117783	-0.2497191

Як і в попередньому випадку, найкращою характеристикою є старший коефіцієнт, для тестової вибірки його значення лежать в межах від 0.0000002736 до 0.0000003524.

Таким чином, визначення стану інтерфази клітин може спиратися на значення старших коефіцієнтів квадратичної регресії для перестановки Харді зміни щільності хроматину і кубічної регресії коефіцієнтів фрактальності.

IV. ВИСНОВКИ

Використання характеристик зміни щільності розподілу хроматину в ядрі клітини, дозволяє отримати ефективні алгоритми виділення на цифрових зображеннях клітин в стані інтерфази.

Автори статті висловлюють подяку науковим співробітникам відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України за наданий для аналізу і обробки фото- та інформаційний матеріал.

ЛІТЕРАТУРА REFERENCES

- [1] Диагностическая онкогематология. / Д. Ф. Глузман [и др.] ; ред. Д. Ф. Глузман. - Киев: ДИА, 2011. - 256 с.
- [2] Acharya, Rajendra, et al. "Analysis of cardiac health using fractal dimension and wavelet transformation." ITBM-RBM 26.2 (2005): 133-139.
- [3] Smith, T. G., et al. "A fractal analysis of cell images." Journal of neuroscience methods 27.2 (1989): 173-180.
- [4] Einstein, Andrew J., et al. "Fractal characterization of chromatin appearance for diagnosis in breast cytology." The Journal of pathology 185.4 (1998): 366-381.
- [5] Klyushin, D. A., et al. "Screening of breast cancer using Peano curve." Журнал обчислювальної та прикладної математики 4 (2012): 117-121.
- [6] Ключин, Д. А., et al. "Новий метод скринінгу раку молочної залози на підставі фрактального аналізу інтерфазних ядер букального епітелію." Журнал обчислювальної та прикладної математики 1 (2011): 104.
- [7] Ключин Д.А. и др. Фрактальный анализ опухоле-ассоциированных изменений интерфазных ядер букального эпителия. Журнал обчислювальної та прикладної математики 4 (2013): 114.
- [8] https://uk.wikipedia.org/wiki/Поділ_клітини
- [9] Лигун А.А., Шумейко А.А. Асимптотические методы восстановления кривых.-Киев, Институт математики НАН Украины, 1997.-358 с.
- [10] Кроновер Р.М. Фракталы и хаос в динамических системах. - М. ПОСТМАРКТ, 2000. - 350 с.
- [11] Falconer K. Fractal Geometry. Mathematical foundations and applications. - New York: John Wiley & Sons, 1990.
- [12] Kraft R. Estimating the Fractals and Dimensions // Journal of agricultural, nutritional and environmental sciences - 1996. - №10 //
- [13] Шумейко А.А., Шумейко Е.А. О построении асимптотически оптимальной кусочно-линейной регрессии.// Информатика та математичні методи в моделюванні. Том 1, №2,2011, с.99-106.