

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-193-9-73-77>

УДК: 579.61:616–094:004.93



Морфологическая, ультраструктурная и яркостная количественная характеристика электронномикроскопических изображений *Helicobacter pylori**

Жуховицкий В.Г.^{1,2}, Навольнев С.О.¹, Шевлягина Н.В.¹

¹ ФГБУ «Национальный исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ; Москва, ул. Гамалеи, д. 18, 123098 Российская Федерация

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО) Минздрава РФ; Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1, 125993 Российская Федерация

Для цитирования: Жуховицкий В.Г., Навольнев С.О., Шевлягина Н.В. Морфологическая, ультраструктурная и яркостная количественная характеристика электронномикроскопических изображений *Helicobacter pylori*. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;193(9): 73–77. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-193-9-73-77

Жуховицкий Владимир Григорьевич, к.м.н., с.н.с., заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов; доцент кафедры биохимии и иммунопатологии

Навольнев С.О., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов

Шевлягина Н.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов

✉ Для переписки:

**Жуховицкий
Владимир Григорьевич**
zhukhovitsky@rambler.ru

Резюме

С помощью оригинальной компьютерной программы выполнена количественная характеристика структурных особенностей культур двух эталонных штаммов *Helicobacter pylori*, выявленных посредством трансмиссионной электронной микроскопии. Полученные результаты позволили установить морфологические, ультраструктурные и яркостные различия между отдельными бактериальными клетками исследованных штаммов. Предложенная программа, составленная в соответствии с требованиями технологии компьютерного зрения, позволяет обнаруживать различия в структуре бактериальных клеток, не выявляемые при визуальной оценке, а также открывает возможность изучения фенотипической гетерогенности изогенных популяций *Helicobacter pylori* и её патогенетического значения.

* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, электронная микроскопия, компьютерное зрение

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-193-9-73-77>

Morphological, ultrastructural and brightness quantitative characteristics of *Helicobacter pylori* electronic microscopic images*

V.G. Zhukhovitsky^{1,2}, S.O. Navolnev¹, N.V. Shevlyagina¹¹ Gamaleya National Research Centre for Epidemiology & Microbiology of the Ministry of Public Health, Moscow, Gamaleya str., h. 18, 123098, Russia² Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMANPO), Ministry of Public Health, Moscow, Barrikadnaya str., h. 2/1, build. 1, 125993, Russia

For citation: Zhukhovitsky V.G., Navolnev S.O., Shevlyagina N.V. Morphological, ultrastructural and brightness quantitative characteristics of *Helicobacter pylori* electronic microscopic images. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;193(9): 73–77. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-193-9-73-77

✉ Corresponding author:

Vladimir G. Zhukhovitsky
zhukhovitsky@rambler.ru**Vladimir G. Zhukhovitsky**, MD, PhD, Head of the Laboratory of indication and ultrastructural analysis of microorganisms;
ORCID: 0000–0002–4653–2446, Scopus Author ID: 57194386794, WoS ID: AAH-9536–2020**S.O. Navolnev**, MD, PhD, Senior Scientist of the Laboratory of indication and ultrastructural analysis of microorganisms;
ORCID: 0000–0002–8470–582X**N.V. Shevlyagina**, MD, PhD, Senior Scientist of the Laboratory of indication and ultrastructural analysis of microorganisms;
ORCID: 0000–0001–9651–1654

Summary

* Illustrations to the article
are on the colored inset
of the Journal.

Using an original computer program, a quantitative characteristic of the structural features of the cultures of two reference strains of *Helicobacter pylori*, identified by transmission electron microscopy, was performed. The results obtained made it possible to establish morphological, ultrastructural and brightness differences between individual bacterial cells of the studied strains. The proposed program, compiled in accordance with the requirements of computer vision technology, makes it possible to detect differences in the structure of bacterial cells that are not detected by visual assessment, and also opens up the possibility of studying the phenotypic heterogeneity of isogenic populations of *Helicobacter pylori* and its pathogenic significance.

Keywords: *Helicobacter pylori*, electron microscopy, computer vision

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Грамотрицательная микроаэробная изогнутая бактерия *Helicobacter pylori*, инфицирующая не менее половины человеческой популяции [1], является этиопатогенетическим фактором гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [2], а также расценивается как фактор риска в возникновении некоторых форм рака желудка [3].

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) является широко распространённым методом изучения ультраструктуры микроорганизмов. Визуальная оценка предоставляемых ТЭМ изображений носит очевидно субъективный характер, что затрудняет сравнительный анализ двух и более изображений [4].

Современные компьютерные технологии, в частности компьютерное зрение, позволяют создавать программы количественной оценки структурных и яркостных параметров изображений [5]. Применение такого рода программ позволяет снизить субъективность оценки изображения бактериальных клеток [6].

Поскольку в доступной литературе отсутствуют сведения о количественном автоматизированном анализе изображения как целых клеток *Helicobacter pylori*, так и их внутриклеточных структур, нами была поставлена цель создания компьютерной программы, позволяющей производить общий анализ цифрового изображения клеток *Helicobacter pylori*, а также выявлять и анализировать их структурные особенности.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований были использованы эталонные штаммы *Helicobacter pylori* NCTC 11637 и NCTC 11639, культивировавшиеся

в стандартных условиях [7]. Отмытая и осаждённая центрифугированием суспензия бактериальных клеток фиксировалась глутаровым альдегидом,

после чего обезжизнялась серией спиртов возрастающей концентрации и заливалась смолой. Ультратонкие срезы окрашивались уранилацетатом и цитратом свинца и исследовались при помощи трансмиссионного микроскопа “JEM 2100Plus” (“JEOL Ltd.”, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ [8].

Полученные цифровые изображения в формате bmp анализировались с помощью разработанной нами ранее [9] и модифицированной программы на основе Visual Basic 6.0, для IBM-совместимых

компьютеров с операционными системами Windows XP и более поздних версий. Программа позволяет анализировать как параметры бактериальной клетки в целом (размеры, площадь, сечение и др.), так и параметры внутриклеточных структур различной электронной плотности, дискриминируя их по яркости. Результаты обработки изображений поступают в базу данных, имеющую формат текстового файла; имеется также подпрограмма для анализа базы данных, статистической обработки, построения графиков и проч.

Результаты

Электронномикроскопическое изображение 72-часовой культуры штамма *Helicobacter pylori* NCTC 11637 представлено на рис. 1 (на цветной вклейке в журнал). Как видно, бактериальные клетки варьируют как по форме, так и по яркости в так называемом сером цвете. Поскольку аддитивная цветовая модель кодирования цвета RGB позволяет различать 256 градаций цвета, становится возможным получение разнообразных яркостных характеристик изображения бактериальных клеток.

Изображение отобранной для анализа бактериальной клетки (рис. 2а) обводилось вручную красной линией по внешнему контуру (рис. 2б), после чего программа распознавала выделенную область, находила её центр масс и выполняла 128 радиальных сечений (рис. 2в). Далее программа исчисляла площадь бактериальной клетки и степень её вытянутости как отношение наиболее длинного сечения к перпендикулярному к нему. Кроме того, определялась длина контура бактериальной клетки и средняя яркость её содержимого.

При визуальном анализе внутриклеточных структур *Helicobacter pylori* видно, что форма большинства пятен приближается к округлой с максимальной электронной плотностью (интенсивностью окраски) в центре пятна. При постановке в соответствие интенсивности окраски некоего значения “высоты” ограниченная контуром площадь приобретает характер “холмистой поверхности”. Форма каждого отдельного “холма” в той или иной степени приближается к форме конуса – фигуры, у которой точка вершины располагается выше любой точки, лежащей на окружности его основания. При этом, программа отождествляет интенсивность окраски (электронную плотность) пятна с высотой соответствующего ему “холма”, и, как следствие, соответствующего условного конуса.

Задав параметры некоего виртуального эталонного конуса, программа путём наложения сравнивает с ним каждый отдельный “холм”, отражая степень этого сходства величиной P , представляющей собой двумерный массив $mP(x, y) = P$.

После многократного наложения эталонного конуса на изображение и оценки величины совпадения эталона с каждым “холмом”-конусом,

программа по умолчанию дискриминирует пятна на чёткие округлые с выраженной интенсивностью окраски (“яркие”) и нечёткие неокруглые с низкой интенсивностью окраски (“неяркие”) – (рис. 3). Все нечёткие неокруглые пятна размером менее 3 пикселей расценивались по умолчанию в качестве “шума” и далее не анализировались.

Компьютерный анализ электронномикроскопических изображений с помощью разработанной нами программы занимает несколько секунд. Совпадение результатов компьютерного выявления чётких пятен с результатами выявления их посредством визуальной оценки составляет 80–90%, тогда как визуальное выявление нечётких пятен остаётся практически неосуществимым и доступным лишь компьютерному анализу.

Результаты анализа электронномикроскопических изображений материала культур штаммов *Helicobacter pylori* NCTC 11637 и NCTC 11639 представлены в таблице.

Как видно, бактериальные клетки штамма *Helicobacter pylori* NCTC 11637 значительно крупнее клеток штамма *Helicobacter pylori* NCTC 11639: достоверно превосходят их по площади, длине, ширине и протяжённости контура; в то же время, испытываемые штаммы не различаются достоверно между собой по параметру отношению длины к ширине составляющих их клеток. Содержимое клеток штамма *Helicobacter pylori* NCTC 11639, оцененное по средней интенсивности окраски, выглядит более электронноплотным; при этом, суммарная площадь как области, занятой пятнами, так и области, свободной от пятен, у клеток штамма *Helicobacter pylori* NCTC 11637 значительно превосходит таковые для штамма *Helicobacter pylori* NCTC 11639. С другой стороны, по критериям средней интенсивности окраски как области пятен, так и области, лишённой пятен, штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11639 превосходил штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11637. Средняя площадь чётких ярких пятен обоих штаммов, как и их оптический объём, не менее, чем на порядок превосходили среднюю площадь и оптический объём нечётких неярких. Наконец, штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11637 демонстрировал достоверно большее количество (в пересчёте на отдельную клетку) как ярких чётких, так и неярких нечётких пятен, нежели штамм *Helicobacter pylori* NCTC 11639.

Таблица.
Характеристики параметров электронномикроскопических изображений бактериальных клеток *Helicobacter pylori*

Примечание:
1. “пкс” – пиксель.
2. Оптический объём определяется как суммарная интенсивность окраски всех рассматриваемых пикселей за вычетом окружающего фона.

ПАРАМЕТР	<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637	<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11639	Достоверность различий между штаммами (p)
Число изученных клеток	16	17	–
ДЛЯ ОТДЕЛЬНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ			
Площадь (пкс)	192381 ± 72746	71966 ± 22917	<0.05
Длина (пкс)	557 ± 100	364 ± 76	<0.05
Ширина (пкс)	429 ± 104	257 ± 49	<0.05
Отношение (длина/ширина) x100 (пкс)	139 ± 27	144 ± 34	>0.05
Протяжённость контура (пкс)	1415 ± 274	903 ± 171	<0.05
Средняя интенсивность окраски	141 ± 19	178 ± 12	<0.05
ДЛЯ ОБЛАСТИ С ПЯТНАМИ (СУММАРНО)			
Площадь (пкс)	65684 ± 23330	24360 ± 7745	<0.05
Отношение площади области к площади клетки (%)	34 ± 12	34 ± 4	>0.05
Средняя интенсивность окраски	158 ± 18	186 ± 12	<0.05
ДЛЯ ОБЛАСТИ БЕЗ ПЯТЕН (СУММАРНО)			
Площадь (пкс)	126696 ± 49474	47605 ± 15285	<0.05
Отношение площади области к площади клетки (%)	66 ± 25	66 ± 25	>0.05
Средняя интенсивность окраски	132 ± 19	174 ± 12	<0.05
ДЛЯ ЧЁТКИХ ЯРКИХ ПЯТЕН			
Среднее число пятен в клетке	496 ± 166	207 ± 70	<0.05
Средняя площадь пятна (пкс)	140 ± 8	124 ± 6	<0.05
Прирост интенсивности окраски пятна (относительно фона)	50 ± 2	32 ± 2	<0.05
Оптический объём пятна	3790 ± 353	2154 ± 247	<0.05
ДЛЯ НЕЧЁТКИХ НЕЯРКИХ ПЯТЕН			
Среднее число пятен в клетке	1127 ± 550	537 ± 152	<0.05
Средняя площадь пятна (пкс)	16 ± 2	4 ± 1	<0.05
Прирост интенсивности окраски пятна (относительно фона)	21 ± 1	15 ± 1	<0.05
Оптический объём пятна	251 ± 37	172 ± 24	<0.05

Заключение

Разработанная нами компьютерная программа позволяет оценивать морфологические, ультраструктурные и яркостные характеристики цифровых электронномикроскопических изображений бактериальных клеток, выдавая результаты оценки 13-ти анализируемых параметров в количественном виде. Выявленные количественные структурные различия между бактериальными клетками двух

эталонных штаммов *Helicobacter pylori*, возможно, отражают различия в их физиологической активности. Предложенная программа, позволяющая оценивать фенотипическую гетерогенность в изогенных популяциях бактерий *in vitro* и *in vivo*, возможно, окажется полезной при оценке роли штаммовых различий *Helicobacter pylori* в возникновении и развитии заболеваний гастродуоденальной области [10].

Литература | References

1. Leja M., Grinberga-Derica I., Bilgilier C., Steininger C. Review: epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019, No. 24, Suppl. 1: e12635. DOI: 10.1111/hel.12635.

2. Chmiela M., Kupcinskas J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2019, No. 24, Suppl. 1: e12638. DOI: 10.1111/hel.12638.

3. Amieva M., Peek R. M. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Gastroenterology*. 2016;150(1):64–78. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.09.004.

4. Harris J. R. Transmission electron microscopy in molecular structural biology: a historical survey. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015, Vol. 581, pp. 3–18. DOI: 10.1016/j.abb.2014.11.011.

5. Shapiro L., Stockman J. Computer vision (translated from English). Moscow. “BINOM – Knowledge Laboratory”. 2006, 752 p. (In Russ)
Шапиро Л., Стокман Дж. Компьютерное зрение (пер. с англ.). – М: “БИНОМ – Лаборатория знаний”. – 2006. – 752 с.

6. Didenko L.V., Navolnev S. O. A program for the analysis of biological micro-objects in images obtained from an electron microscope. Scientific session of NRNU MEPhI-2012, volume 1. Innovative nuclear technologies.

High technologies in medicine. Moscow. NRNU MEPhI Publ. 2012, 286 P.

Диденко Л. В., Навольнев С. О. Программа для анализа биологических микрообъектов на изображениях, полученных от электронного микроскопа // Научная сессия НИЯУ МИФИ-2012, том 1. Инновационные ядерные технологии. Высокие технологии в медицине. – М: НИЯУ МИФИ. – 2012. – С. 286.

7. Zhukhovitsky V.G., Smirnova T. A., Shevlyagina N. V., Korzheva I. Yu., Didenko L. V., Gintsburg A. L. *Helicobacter pylori* BIOFILM IN VITRO AND IN VIVO. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2017;(5):14–19. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682–8658-ecg-141–5–14–19. Жуховицкий В. Г., Смирнова Т. А., Шевлягина Н. В., Коржева И. Ю., Диденко Л. В., Гинцбург А. Л. Биоплёнка *Helicobacter pylori* in vitro и in vivo // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – № 5 – С. 14–19. DOI: 10.31146/1682–8658-ecg-141–5–14–19.

8. Tizro P., Choi C., Khanlou N. Sample preparation for transmission electron microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2019, Vol. 1897, pp. 417–424. DOI: 10.1007/978–1–4939–8935–5_33.

9. Navolnev S. O. Development of a computer program for quantitative assessment of the digital image of bacteria obtained from a transmission electron microscope. *Bacteriology*. 2017;2(2):20–23. DOI: 10.20953/2500–1027–2017–2–20–23.

Навольнев С. О. Разработка компьютерной программы для количественной оценки цифрового изображения бактерий, полученного от трансмиссионного электронного микроскопа // Бактериология. – 2017. – № 2. – С. 20–23. DOI: 10.20953/2500–1027–2017–2–20–23.

10. Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015;13(8):497–508. Doi: 10.1038/nrmicro3491.

К статье

Морфологическая, ультраструктурная и яркостная количественная характеристика электронномикроскопических изображений *Helicobacter pylori* (стр. 73–77)

To article

Morphological, ultrastructural and brightness quantitative characteristics of *Helicobacter pylori* electronic microscopic images (p. 73–77)

Рисунок 1.

Агаровая культура *Helicobacter pylori* NCTC 11637;
ТЭМ, $\times 50000$

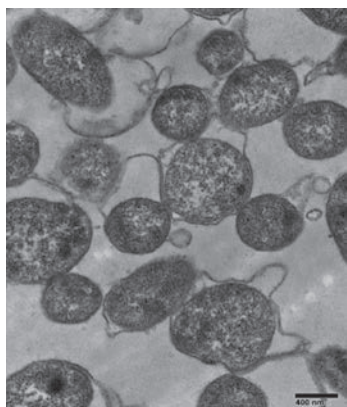


Рисунок 2.

Компьютерный анализ
отдельной клетки культуры
Helicobacter pylori NCTC
11637:
2а – отобранная для анализа
бактериальная клетка;
2б – бактериальная клетка,
обведённая по контуру;
2в – радиальное рассечение
выделенной области;
ТЭМ, $\times 50000$

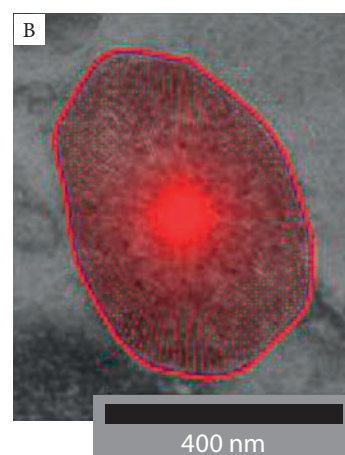
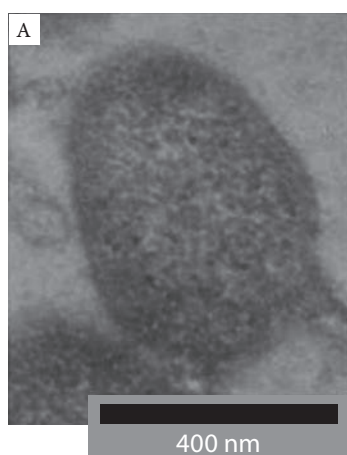


Рисунок 3.

Визуализация различных
стадий обработки изобра-
жения отдельной клетки
культуры *Helicobacter pylori*
NCTC 11637:
3а – чёткие “яркие” и окру-
глые пятна (обведены тон-
кой красной линией);
3б – нечёткие “неяркие” и не-
округлые пятна (обведены
тонкой жёлтой линией);
ТЭМ, $\times 50000$

