

N.I. Maystruk, T.A. Boyko, Ye.Yu. Shapovalova

Comparative Analysis of Apoptosis and Proliferation Processes in Cells of Pancreas and Mesonephros of Human Embryos

Summary. 56 human embryos were studied in the age from 21 days to 12 weeks of the intrauterus development at absence of the obviously expressed damaging factors of external environment, which includes stage X - XXIII and beginning of the fetal period by classification of Carnegie institute, index of proliferation (Ki-67-positive cells), index of apoptosis (p53- positive cells), index of readiness to the apoptosis (CD95- positive cells) and antiapoptosis index (Bcl-2-positive cells) of mesonephros cells have been revealed. In developed mesonephrons indexes of proliferation and apoptosis of their cells approximately are identically high. The index of readiness to the apoptosis

and antiapoptosis index is not high. In the epithelium of pancreas main duct as far as maturing of embryos the proliferation index and antiapoptosis index go down gradually, but remain notably higher, than index of apoptosis and readiness to the apoptosis. By the 12th week of gestation (embryos 70 mm of length) indexes of proliferation and apoptosis substantially higher in mesonephros as compared to pancreas. An index of readiness to the apoptosis and antiapoptosis index are at identical level.

Key words: *human embryos, proliferation, apoptosis, mesonephros, pancreas.*

Надійшла 01.03.2013 року.

УДК 611.813

Масловский С.Ю., Масловский А.С., Аврунин О.Г.¹, Глассмахер Б.²

Автоматизированный анализ криомикроскопических препаратов

Кафедра гистологии, цитологии, и эмбриологии (зав. каф. – проф. С.Ю.Масловский)

Харьковского национального медицинского университета

¹Харьковский национальный университет радиоелектроники

²Университет им. Лейбница, Ганновер, Германия

Резюме. В результате исследований разработаны методы и программное обеспечение для автоматизированной обработки криомикроскопических препаратов эндотелия и определения объема клеток при криоконсервировании. Реализованы методы, позволяющие устранять артефакты от кристаллов льда при замораживании криопрепаратов. Однако это приводит к уменьшению количества наблюдаемых объектов, поэтому необходимо разрабатывать методы замораживания с минимальным количеством артефактов от кристаллов льда.

Ключевые слова: *криопрепараты, сегментация изображений, анализ изображений.*

Постановка проблемы и анализ последних исследований.

Основной причиной сравнительно низкого уровня автоматизации программных продуктов для анализа биомедицинских изображений является высокая вариабельность большинства биологических структур. Поэтому совершенствование существующих и разработка новых методов и подходов для анализа (и в первую очередь - для сегментации) биомедицинских изображений должны быть основаны на изучении специфики визуализации исследуемых объектов. В настоящее время базовые подходы к сегментации изображений достаточно хорошо освещены в литературе [1-7]. При этом можно определить пять основных классов методов сегментации объектов: пороговые, наращивания областей, выделения границ, корреляционные и текстурные. Последние два находят лишь ограниченное применение при анализе изображений биологических объектов, ввиду высокой индивидуальной изменчивости их геометрических и оптических свойств, а так же характеристик окружающих структур. Основной задачей при этом является разработка методов, алгоритмов и программного обеспечения для автоматизированной обработки изображений микропрепаратов и мониторинга изменения объемов клеток в процессе замораживания.

Материал и методы исследований

Исследования проводились на препаратах эндотелия животных с помощью цифровой криомикроскопической установки, состоящей из стереоскопического микроскопа Zeiss PrimoStar с тринокулярной насадкой, позволяющей подключать цифровую окулярную видеокамеру, снимки с которой с частотой 2 кадра в секунду передавались через USB-интерфейс в ПЭВМ для дальнейшей обработки и анализа. Препарат размещался на предметном столике микроскопа в специальной криоприставке, к которой с помощью термоизолированных криошлангов подавался жидкий

азот. Протокол криозамораживания включал в себя понижение температуры от +4°С до -70°С. При этом для обработки подготавливался набор изображений (DataSet).

Результаты исследований и их обсуждение

Обработку изображений микропрепаратов можно разбить на несколько этапов, основными из которых являются этап предварительной обработки, сегментации микрообъектов и их описания. Рассмотрим подробно данные этапы.

Предварительная обработка изображений включает в себя гистограммную коррекцию и медианную фильтрацию изображений, направленные на расширение тонового диапазона, коррекцию неравномерности освещения и устранение локальных помех.

Этап сегментации изображений, который делится на две стадии: грубой сегментации и разметки обнаруженных объектов. Результатом грубой сегментации является построение бинарной характеристической функции изображения, разграничивающей области объектов и фона. Априорными данными для сегментации при этом являются: допущения, что изображение является суммой представлений всех областей объектов, на изображении (включая фон как объект), и области объектов, находящиеся на изображении, не перекрываются. Учитывая, что при криомикроскопии большинство клеточных структур, являющиеся объектами сегментации, существенно не отличаются по интенсивности и цветовым характеристикам от фона, но имеют ярко выраженные контуры, целесообразным является проведение сегментации путем выделения границ. Данный метод позволяет с помощью операций пространственного дифференцирования выделять контурные характеристики объектов и основан на вычислении градиентных характеристик изображения. На заключительном этапе выполняется однородная заливка обнаруженных объектов на изображениях.

На стадии разметки изображения на отдельные объекты выполняется построчное сканирование бинарной характеристической функции скользящим окном и проверкой смежности элементов обнаруженных объектов. Процедура выполняется рекурсивно до полной разметки изображения.

Далее выполняется устранение ложных объектов и артефактов с помощью логической фильтрации. Параметры логической фильтрации определяются эмпирически, исходя из характеристик искомым объектов. Первым этапом является устранение малых по площади объектов, являющихся

частями клеток и кристаллов, а так же слившихся клеток и их ансамблей, неподдающихся анализу вследствие нарушения допущений при сегментации и занимающих большие площади. Учитывая, что рассматриваемые клетки являются объектами с почти идеальной круглой формой, поэтому для вытянутых объектов, близких к ним по площади, применяется фильтрация по значению коэффициента площади. При этом выполняется нахождение диаметра каждого объекта и соответствующее нахождение площади аналитически, а так же путем численного подсчета принадлежащих ему элементов. Затем, по величине коэффициента отношения площадей определяется степень вытянутости формы каждого обрабатываемого объекта. Таким образом, устраняются артефакты от кристаллов льда и «слипшиеся» клетки. Объемность вычислений при выполнении описания обнаруженных объектов связана с необходимостью обрабатывать большое количество изображений и проследивать расположение каждого объекта в наборе данных. На практике, не более 20% обнаруженных объектов могут быть пригодны для обработки на всех изображениях набора данных.

Выводы

В результате работы разработаны методы и программное обеспечение для автоматизированной обработки криомикроскопических препаратов и определения объема клеток при криоконсервировании. Реализованы методы, позволяющие устранять артефакты от кристаллов льда при замораживании криопрепаратов. Однако это приводит к уменьшению количества наблюдаемых объектов, поэтому необходимо разрабатывать методы замораживания с минимальным количеством артефактов от кристаллов льда.

Перспективой дальнейших исследований есть разработка программного обеспечения для мониторинга изменения объема клеток при криоконсервировании в автоматическом режиме с возможностью экспресс-анализа и контроля статуса процесса замораживания.

Литература

1. Павлидис Т. Алгоритмы машинной графики и обработки изображений / Павлидис Т. - М.: Радио и связь, 1986. - 400 с.
2. Путьгин Е.П. Обработка изображений в робототехнике / Путьгин Е.П., Аверин С.И. - М.: Машиностроение, 1990. - 330 с.
3. Acharya T., Ray A.K. Image processing: principles and applications / Acharya T., Ray A.K. J. - Wiley & Sons, 2005. - 428. p.
4. Bovik A. Handbook of image and video processing / Bovik A. - Academic Press., 2000. - 890.
5. Gonzales R. Digital image processing / Gonzales R., Woods R. - Prentice Hall, 2002. - 1070 p.
6. Nixon M. Feature extraction and image processing / Nixon M., Aguado A. - Newnes, 2002. - 350 p.
7. Pratt W. Digital image processing / Pratt W. - J. Wiley & Sons, 2001. - 735 p.

Масловський С.Ю., Масловський О.С., Аврунін О.Г., Глассмакер Б.
Автоматизований аналіз кріомікроскопічних препаратів

Резюме. У результаті досліджень розроблені методи та програмне забезпечення для автоматизованої обробки кріомікроскопічних препаратів ендотелію та визначення об'єму клітин при кріоконсервуванні. Розроблені методи дозволяють усувати артефакти від кристалів льоду при заморожуванні препаратів. Однак це призводить до зменшення кількості спостережуваних об'єктів, тому необхідно розробляти методи заморожування з мінімальною кількістю артефактів від кристалів льоду.

Ключові слова: кріопрепарати, сегментація зображень, аналіз зображень.

S.Y. Maslovskiy, O.S. Maslovskiy, O.G. Avrunin, B. Glassmaher
Automated Analysis of Cryo Microscopic Preparations

Summary. As a result of researching the methods and software for automated processing of cryo microscopic preparations and endothelial cells in determining the volume of cryopreservation were developed. The developed methods allow to eliminate the artifacts from ice crystals during freezing preparations. However, this leads to a reduction in the number of observed objects, so it is necessary to develop methods of freezing the minimum number of artifacts from ice crystals.

Key words: cryo preparations, image segmentation, image analysis.

Поступила 01.03.2013 года.

УДК: 616.681-007.23: 616-092+611.165

Півторак В.І., Сміюха О.А., Булько М.П.

Ультроструктурні зміни компонентів яєчка після лікування варикоцеле за допомогою операції за Іваніссевичем

Кафедра оперативної хірургії та топографічної анатомії (зав. каф. - проф. Г.Я.Костюк)
Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова

Резюме. Встановлені субмікроскопічні зміни структурних компонентів яєчка після операції за Іваніссевичем, проведеної через 30 діб після моделювання варикоцеле. Створювали модель варикоцеле на безпородних собаках-самцях, масою від 9 до 12 кг. Через 60 діб після створення моделі варикоцеле та 30 діб після операції за Іваніссевичем досліджували обидва яєчка. В гонадах тварин після операції залишаються негативні зміни всіх структурних компонентів яєчка. Спостерігається зменшення діаметру звивистих сім'яних каналців, потовщення їх власної оболонки. Виявлені ділянки сім'яних каналців, де встановлені ознаки деструкції сперматогенних клітин сперматоцитах першого і другого порядків. Наявні ділянки, де збільшені міжклітинні проміжки. В інтерстиції знаходяться гемокапіляри з нерівномірними, переважно розширеними і звуженими просвітами, які заповнені еритроцитами, тромбоцитами, відмічаються лімфоцити. Спостерігається набряк інтерстицію та невеликі осередки периваскулярного фіброзу. Спостерігаються пошкоджені сперматозоїди, подібні на встановлені при варикоцеле без корекції. Виявлені пошкоджені клітини Лейдига.

Ключові слова: варикоцеле, моделювання, яєчко, лікування, електронна мікроскопія.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень.

Вивчення патогенетичних механізмів формування безпліддя у чоловіків при порушеннях кровообігу яєчок є істотним і необхідним для розробки методів більш точної діагностики і проведення більш ефективного лікування чоловічої інфертильності [7]. Пошкодження сперматогенного епітелію є основною причиною порушення сперматогенезу й обумовлено при варикоцеле порушенням тестикулярного кровотоку та гіпертермією [8].

При вторинному варикоцеле спостерігається підвищення гідродинамічного тиску в системі лівої ниркової вени, розширення яєчкової вени з нормальною будовою венозної стінки, формування недостатності клапанів і вираженого ретроградного потоку в лозоподібному сплетінні [6]. Немає