

DOI: 10.17586/1023-5086-2022-89-08-104-109

УДК 612.087

# Количественная оценка функциональной активности в многослойных структурах головного мозга по гистологическим срезам

СВЕТЛАНА ВАЛЕНТИНОВНА АЛЕКСЕЕНКО<sup>1</sup>, СЕРГЕЙ ДМИТРИЕВИЧ СОЛНУШКИН<sup>2</sup>,  
ВАЛЕРИЙ НИКОЛАЕВИЧ ЧИХМАН<sup>3</sup>✉

<sup>1, 2, 3</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>1</sup>alekseenkosv@infran.ru    ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4811-7078>

<sup>2</sup>solnushkin@list.ru    ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4009-6716>

<sup>3</sup>chikhmanvn@infran.ru    ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4955-4608>

## Аннотация

**Предмет исследования.** Создать алгоритм и программное обеспечение для измерения оптической плотности, как коррелята нейронной активности в многослойных структурах мозга. **Цель работы** — разработка метода и алгоритма программы для количественной оценки оптической плотности в слоях нейронных структур, которая коррелирует с функциональной активностью клеток, на изображениях гистологических препаратов мозга. **Метод.** Оптическая плотность измеряется локально в последовательных участках слоя или слоёв нейронной структуры, которые на срезах мозга имеют криволинейную форму. Выбор траектории измерения оптической плотности осуществляется в оцифрованном изображении среза в интерактивном режиме исследователем-экспертом. Результаты измерения плотности представлены в прямоугольной системе координат. Разработана возможность автоматического сглаживания кривых, поиска экстремумов, вычисления расстояний между ними. **Результаты.** Приведён алгоритм реализации созданной программы с иллюстрацией последовательных этапов работы на примере измерений оптической плотности в слое зрительной коры на изображении среза мозга. Представлены результаты оценки оптической плотности в слоях наружного колленчатого тела. **Практическая значимость.** Разработанный метод и алгоритм программы необходимы для реконструкции функциональной активности искривлённых слоёв различных структур головного мозга с целью изучения архитектуры организации нейронных сетей головного мозга человека и их моделирования.

**Ключевые слова:** обработка изображений, гистологические срезы мозга, криволинейная траектория измерений

**Благодарность:** работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 0134-2019-0005.

**Ссылка для цитирования:** Алексеенко С.В., Солнушкин С.Д., Чихман В.Н. Количественная оценка функциональной активности в многослойных структурах головного мозга по гистологическим срезам // Оптический журнал. 2022. Т. 89. № 8. С. 104–109. DOI: 10.17586/1023-5086-2022-89-08-104-109

**Коды OCIS:** 110.2960, 330.7326, 330.4060, 330.5510.

## ВВЕДЕНИЕ

Морфологические исследования головного мозга являются составной частью комплексного подхода к изучению механизмов распозна-

вания изображений. К настоящему времени разработаны маркеры разных типов нервных клеток, позволяющие оценить их распределение и связи в структурах мозга животных.

Кроме того, имеются иммуногистохимические маркеры, при помощи которых возможна оценка активности клеток по интенсивности их окраски. Одним из таких маркеров, активность которого коррелирует с функциональной активностью клеток, является цитохромоксидаза — эндогенный фермент дыхательной цепи нервных клеток [1]. Измерение оптической плотности на препаратах срезов мозга после гистохимической обработки по выявлению цитохромоксидазы позволяет обнаружить функционально активные участки в зрительных структурах и оценить изменения, происходящие при нарушениях зрительного восприятия [2].

Автоматизация обработки изображений срезов мозга с использованием цифровых технологий сокращает время, затрачиваемое на анализ биологического материала. Однако имеющиеся системы автоматизированной обработки изображений [3–5] обладают избыточностью и требуют тщательной подготовки исходных изображений. Биомедицинские изображения препаратов мозга имеют много артефактов — кровеносные сосуды, разрывы ткани и неравномерность её окраски, обусловленные сложностью морфологических методов получения срезов, процесса фиксации. Эти артефакты ограничивают возможность применения процедур автоматической сегментации изображений для решения поставленных задач. Поэтому выделить «область интереса» для последующего анализа наиболее точно может исследователь, обладающий экспертными знаниями. Кроме того, важным моментом при реализации компьютерной системы анализа изображений в биологических исследованиях является возможность визуализации результатов обработки, их представления в удобном для зрительного восприятия графическом виде, что облегчает эксперту выделять области интереса и проводить необходимые количественные измерения. Следует заметить, что зрительные структуры: подкорковое дорсальное ядро наружного коленчатого тела (НКТ) и зрительная кора имеют слоистую организацию, границы между слоями на препаратах фронтальных срезов мозга непрямолинейны.

Цель данной работы — разработать метод и программное обеспечение процедур для количественной оценки оптической плотности

в слоях зрительных структур, используя их изображения на фронтальных срезах мозга после гистохимической обработки для выявления активности цитохромоксидазы.

## МЕТОД

Оптическая плотность измеряется локально на изображениях препаратов срезов мозга, в последовательных участках слоя или слоёв зрительной структуры, которые на гистологических срезах имеют криволинейную форму. Выбор траектории измерения оптической плотности в оцифрованном изображении среза осуществляется в интерактивном режиме исследователем-экспертом.

Область интереса для измерения оптической плотности на срезах зрительной коры — входной слой IV, который состоит из чередующихся групп клеток, иннервируемых из разных глаз, — монокулярных доменов [6]. Область интереса на срезах НКТ — два поверхностных слоя, которые иннервируются из разных глаз. При нарушении бинокулярного зрения активность клеток в доменах коры и слое НКТ, получающих входы из косящего или депривированного глаз, уменьшается. Соответственно, в этих участках на изображениях гистологических срезов мозга наблюдается снижение уровня оптической плотности [7–9].

Пример изображения зрительной коры кошки на срезе мозга после его гистохимической обработки для выявления цитохромоксидазы представлен на рис. 1. Слои коры на препарате фронтального среза мозга имеют криволинейную форму, повторяющую кривизну поверхности мозговой извилины. В средней части коры видна тёмноокрашенная область, соответствующая входному слою IV. Оптическая плотность в ней измеряется в последовательных участках одинакового размера, т.е. в криволинейной полосе, ширину которой исследователь может менять в зависимости от задачи. Результаты измерений необходимо представить в прямоугольной системе координат (ось абсцисс — расстояние от начала полосы, ось ординат — значение оптической плотности).

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработана программа MorphoSliceII, предназначенная для измерения параметров оптической

ской плотности вдоль определяемых исследователем-экспертом траекторий на изображениях гистологических срезов. Программа реализована в среде Delphi с использованием графической библиотеки DirectX и библиотек функций Windows API. Программа MorphoSliceII работает с входными изображениями, представленными в форматах bmp или jpeg с размером, кратным 512×512 пикселей. Изображения могут быть цветными или с 256 оттенками серого. В случае исходного цветного изображения оно преобразуется в полутоновое, используя известную формулу:  $R*28 + G*151 + B*77$ , где R, G и B — значения яркости красной, зелёной и синей составляющей на цветном изображении.

После запуска программы исследователь-эксперт выбирает обрабатываемое изображение среза из bmp- или jpeg-файла, отмечает мышью на изображении точки-локусы внутри выбранной им «области интереса». Количество точек и расстояние между ними определяются экспертом для более качественной интерполяции при выделении «области интереса». Первая отмеченная точка является начальной точкой отсчёта для последующего построения графика изменения оптической плотности криволинейного участка в прямоугольной системе координат (рис. 1).

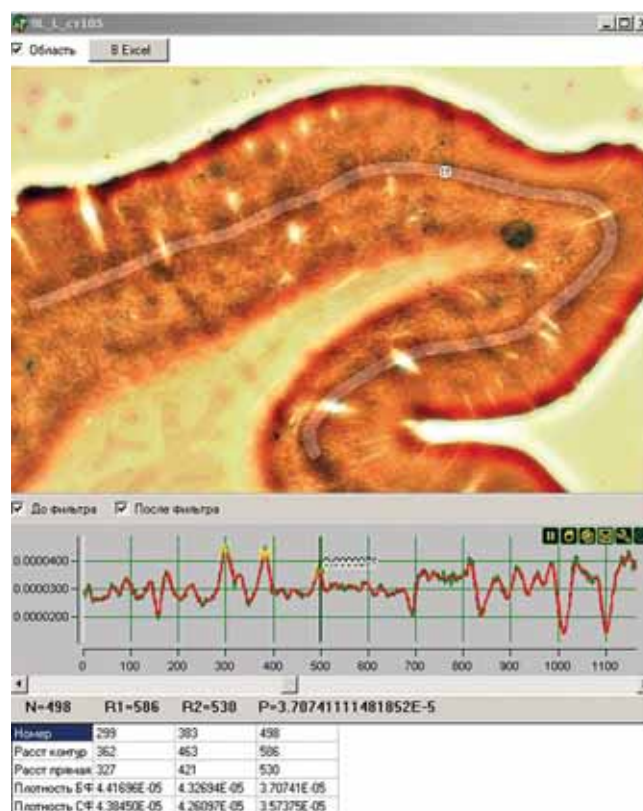
Далее программа конструирует траекторию, проходящую через точки-локусы, используя метод приближения кубическим сплай-



**Рис. 1.** Изображение фронтального среза зрительной коры кошки с отмеченными точками-локусами в «области интереса». Серое пятно на срезе — артефакт окраски

ном в кусочно-полиномиальной форме (процедура CSCVN пакета Matlab, Spline ToolBox). Вдоль полученной траектории строится гладкая область из последовательности окружностей с попиксельным сдвигом и с диаметром, величина которого подбирается исследователем в интерактивном режиме, чтобы обеспечить наилучшее перекрытие «области интереса». Окружность выбрана для получения «области интереса» с более гладкими краями. Для визуализации искомой кривой на исходном изображении без разрушения последнего («прозрачное наложение») применяется метод AlphaBlend из WinAPI. Это позволяет эффективно задавать «область интереса» усреднённой ширины, изменяя в интерактивном режиме диаметр окружности с помощью визуальной компоненты spinedit (рис. 2).

После окончательного конструирования в интерактивном режиме «области интереса» программа автоматически рассчитывает оптическую плотность вдоль полученной траектории полосы. Определяется средняя оптическая плотность внутри каждой сформированной окружности. Оптическая плот-



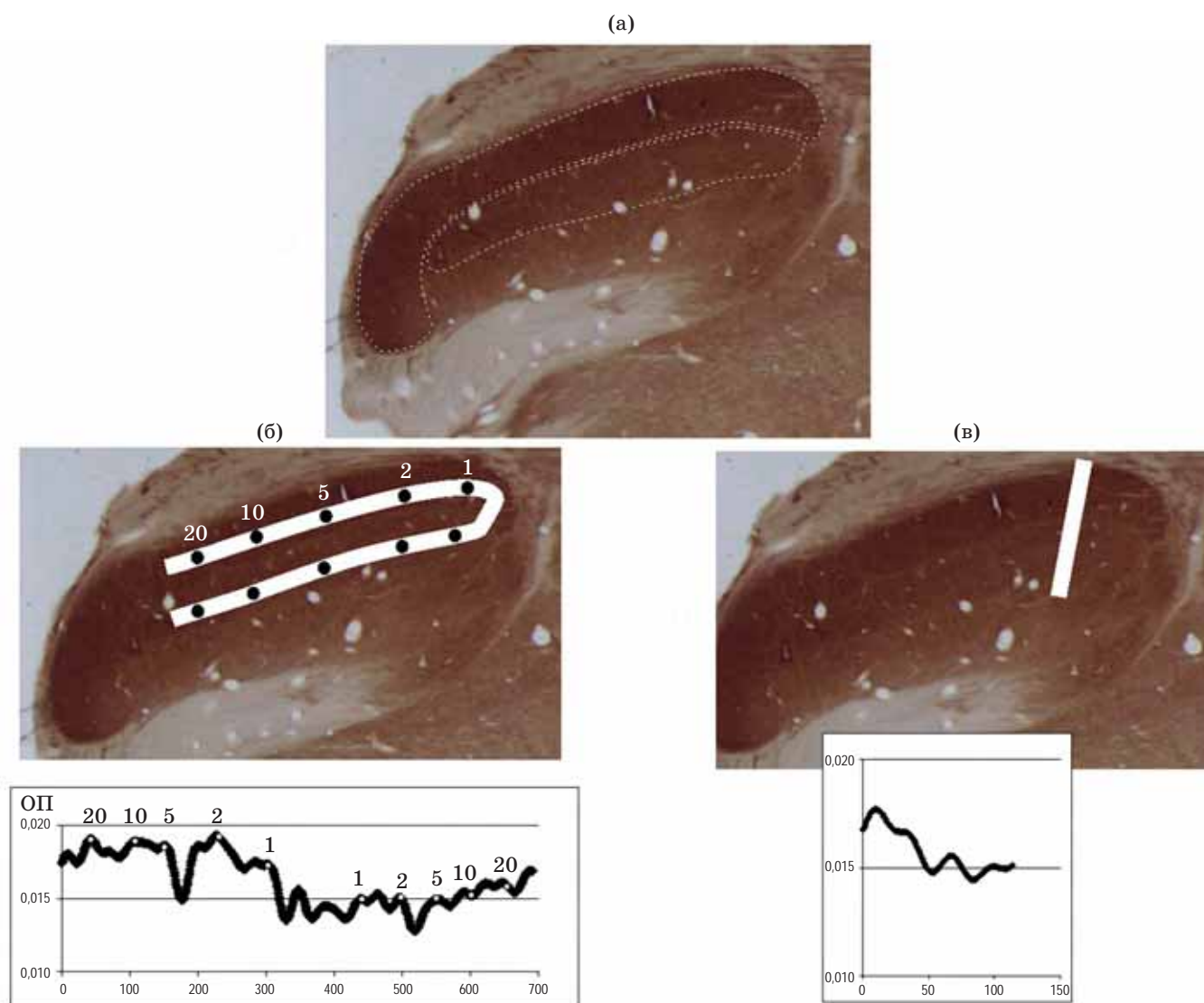
**Рис. 2.** Результат работы программы



ность пиксела определяется как  $P = 1/(R*28 + G*151 + B*77)$ , где R, G и B — красная, зелёная и синяя составляющие на цветном изображении. Полученные значения средней оптической плотности отображаются в виде графика в прямоугольной системе координат, а в таблице (рис. 2) приведены числовые характеристики плотности в отмеченных маркерами точках графика. Для построения графиков используется свободно распространяемая библиотека фирмы Mitov Software [10].

На графике с помощью полосы прокрутки правой кнопкой мыши отмечаются точки на

полученной кривой оптической плотности. Параметры точки запоминаются в таблице. В качестве параметров фиксируются номер отсчёта, расстояние в пикселах от начала координат на графике оптической плотности до точки по траектории «области интереса», значение оптической плотности в данной точке. Причём, отображаются два графика — без фильтрации и после обработки высокочастотным цифровым фильтром с целью сглаживания (FilteringBase — библиотека компонентов для Delphi, BaseGroupe Labs [11]). Результаты измерений протоколируются в базе данных



**Рис. 3.** Положение на изображении среза НКТ мозга полос, вдоль которых измерялась оптическая плотность у животного с монокулярной депривацией. Ниже приведены графики изменения значений плотности в полосах; начальные точки отсчёта значений плотности расположены в верхнем слое НКТ. Цифрами 20, 10, 5, 2, 1 на (б) указаны примерные координаты (угл. град) положения точек-локусов в проекции горизонтального меридиана поля зрения

и могут экспортироваться для дальнейшей обработки в Excel, используя OLE Windows. Загруженные файлы изображений и результаты их обработки сохраняются в базе данных. При необходимости перерасчёта изображения вызываются из базы данных, что позволяет проводить повторные измерения, например, при корректировке траектории. Реализована возможность автоматического сглаживания графика, поиска экстремумов, вычисления расстояний между ними.

Пример использования программы MorphoSliceII для измерения оптической плотности в слоях НКТ левого полушария у кошки с депривацией левого глаза (модель врождённой катаракты) приведён на рис. 3. Клетки верхнего слоя НКТ получают иннервацию из сетчатки противоположного (интактного правого) глаза, клетки нижележащего слоя — из депривированного глаза (контуры этих слоёв отмечены на рис. 3а пунктирной кривой). Причём, карты проекций полуполей зрения разных глаз расположены в этих слоях друг под другом [6]. Данные, приведённые на рис. 3б, указывают, что в нижнем слое НКТ оптическая плотность снижена по сравнению

с верхним слоем во всех участках проекции полуполя зрения. Начальная точка отсчёта значений плотности в верхнем слое НКТ была расположена в области проекции периферии поля зрения, её удалённость от центра — более 20 угл. град. Снижение плотности и, соответственно, функциональной активности в слое депривированного глаза подтверждается и данными измерения в полосе, расположенной в области проекции 2 угл. град в обоих слоях НКТ (рис. 3в).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод и алгоритм программы необходимы для реконструкции функциональной активности искривлённых слоёв различных структур головного мозга с целью изучения архитектуры организации нейронных сетей головного мозга человека и их моделирования. Данный метод и программный алгоритм успешно использовались при исследовании динамики изменений активности в слоях структур головного мозга у животных в процессе развития, а также при нарушении бинокулярного зрения [12–14].

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kageyama G.H., Wong-Riley M. Laminar and cellular localization of cytochrome oxidase in the cat striate cortex // *J. Comp. Neurol.* 1986. V. 245. № 2. P. 137–159.
2. Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry // *Brain Research.* 1979. V. 171. № 1. P. 11–28.
3. Гонсалес Р., Вудс Р. Цифровая обработка изображений. М.: Техносфера, 2005. 1104 с.
4. Абламейко С.В., Недзьведь А.М. Обработка оптических изображений клеточных структур в медицине. Мн.: ОИПИ НАН Беларуси, 2005. 156 с.
5. Астахов А.С., Бумагин В.В. Анализ эффективности алгоритмов обработки изображений для выделения микрообъектов на гистологических срезах // *Инженерный вестник Дона.* 2017. № 4. [ivdon.ru/magazine/archive/n4y2017/4515](http://ivdon.ru/magazine/archive/n4y2017/4515)
6. Hubel D.H., Wiesel T.N. *Brain and visual perception.* N.Y., Oxford: Oxford University Press, 2005. 744 p.
7. Shkorbatova P.Y., Alekseenko S.V. Eye-rotation-induced spatial reorganization of horizontal connections in field 17 of the cat cortex // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2006. V. 36. № 5. P. 495–497.
8. Шкорбатова П.Ю., Топорова С.Н., Макаров Ф.Н., Алексеенко С.В. Внутрикоровые связи доминантных колонок полей 17 и 18 при экспериментальном косоглазии у кошки // *Сенсорные системы.* 2006. Т. 20. № 4. С. 309–318.
9. Alekseenko S.V., Toporova S.N., Shkorbatova P.Y. Neuronal connections of eye-dominance columns in the cat cerebral cortex after monocular deprivation // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2008. V. 38. № 7. P. 669–675. DOI:10.1007/s11055-008-9031-4. PMID: 18709465
10. <http://mitov.com>
11. <https://basegroup.ru>
12. Алексеенко С.В., Шкорбатова П.Ю. Депривационная и дисбинокулярная амблиопия: нарушения в геникуло-корковых зрительных путях // *Альманах клинической медицины.* 2015. Т. 36. С. 97–100.

13. Алексеенко С.В., Шкорбатова П.Ю. Динамика развития аномалий в подкорковом зрительном центре головного мозга при раннем нарушении бинокулярного опыта // Альманах клинической медицины. 2016. Т. 44. № 3. С. 351–357.
14. Alekseenko S.V. The neural networks that provide stereoscopic vision // Journal of Optical Technology. 2018. V. 85. № 8. P. 482–487.

**АВТОРЫ**

**Светлана Валентиновна Алексеенко** — доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-4811-7078>, [binocularity@yandex.ru](mailto:binocularity@yandex.ru)

**Сергей Дмитриевич Солнушкин** — старший научный сотрудник, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, Россия, <http://orcid.org/0000-0003-4009-6716>, [Solnushkin@list.ru](mailto:Solnushkin@list.ru)

**Валерий Николаевич Чихман** — канд. техн. наук, старший научный сотрудник, зав. лаб., Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-4955-4608>, [chikhmanvn@infran.ru](mailto:chikhmanvn@infran.ru)

**AUTHORS**

**Svetlana V. Alekseenko** — Doctor of Biological Sciences, leading researcher, Pavlov Institute of Physiology RAS, 199034, Saint-Petersburg, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-4811-7078>, [binocularity@yandex.ru](mailto:binocularity@yandex.ru)

**Sergey D. Solnushkin** — researcher, Pavlov Institute of Physiology RAS, 199034, Saint-Petersburg, Russia, 199034, <http://orcid.org/0000-0003-4009-6716>, [Solnushkin@list.ru](mailto:Solnushkin@list.ru)

**Valeriy N. Chikhman** — PhD, Head of laboratory, Pavlov Institute of Physiology RAS, 199034, Saint-Petersburg, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-4955-4608>, [chikhmanvn@infran.ru](mailto:chikhmanvn@infran.ru)

*Статья поступила в редакцию 27.04.2022, одобрена после рецензирования 26.05.2022, принята к печати 04.07.2022*