



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106364** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 21/00
G06K 9/00
G06K 9/80 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 10068	(72) Винахідник(и): Нікіфоров Артем Геннадійович (UA), Старченко Іван Іванович (UA), Черняк Валентина Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 15.10.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2016	(73) Власник(и): ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНЬСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2016, Бюл.№ 8	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ МЕТРИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК НЕЙРОНІВ НА ГІСТОЛОГІЧНИХ ЗРІЗАХ СПИННОМОЗКОВИХ ВУЗЛІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення основних метричних характеристик нейронів на гістологічних зрізах спинномозкових вузлів включає зафарбовування ділянок проєкцій нейронів на фотографіях гістологічного зрізу та проведення морфометрії. Контур нейронів на цифровій фотографії гістологічного зрізу обмальовують в графічному редакторі чорним кольором з наступною комп'ютерною обробкою.

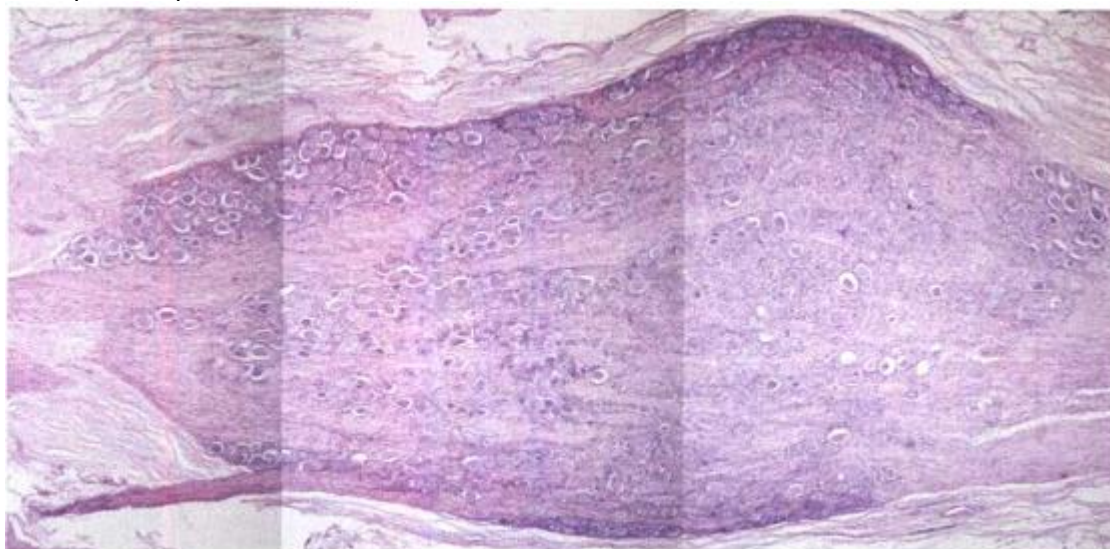


Fig. 1

UA 106364 U

Запропонований спосіб належить до медицини, а саме до морфології, гістології, ембріології та судової медицини, і може бути використаний для більш досконалого використання морфометричних досліджень гістологічних зрізів.

При виконанні морфометричних досліджень науковці досить часто зустрічаються з труднощами визначення кількості, розмірів, площі, як загальної, так і окремо кожного елемента на площині (Салтыков С.А. Стереометрическая металлография (стереология металлических материалов) Учебное пособие. - М.: Металлургия, 1976. - 270 с.), в тому числі і клітин, на гістологічних зрізах (Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 384 с.). Найбільш розповсюдженими методами отримання стереометричних характеристик організації тканин, клітин, міжклітинних просторів та їхніх структур є планіметричний. В основі його є те, що площу, яку займає елемент на зрізі, визначають накладанням на зріз квадратної сітки, систему паралельних ліній на відомій відстані між собою, крапкового рахунку. Визначивши частку елементів зрізу, що перетинають або співпадають з елементами тест-системи (квадрати, лінії, крапки), можна визначити площу досліджуваних структур на зрізі. Також для таких досліджень, разом з мікроскопом, необхідне деяке обладнання: окуляр-мікрометр, об'єкт-мікрометр, мікрошкала, спеціальні вставки в окуляр та ін., що не завжди доступні.

Найбільш близьким аналогом є спосіб крапково-розрахункової планіметрії, за яким проводять рутинний підрахунок середньої кількості клітин та розрахунок середньої кількості крапок тестової решітки, які займають об'єкти на вибіркових полях зору мікроскопа (Глаголев А.А. Геометрические методы количественного анализа агрегатов под микроскопом. М.-Л. Госгеоліздат. 1941 г. - С. 15-23).

Недоліками найближчого аналога є:

- спосіб наближено визначає середню кількість об'єктів, оскільки розрахунок цього показника здійснюється не на всіх, а лише на вибіркових полях зору;
- за способом точково-розрахункової планіметрії можна лише наближено визначити відносну площу елементів на полях зору мікроскопа, оскільки він не враховує геометричних характеристик елементів, які обмежуються кратністю чарунок в тестовій решітці;
- спосіб трудомісткий;
- спосіб не дає можливості визначення розмірів кожного елемента: найбільшого (довжина) та найменшого (ширина).

В основу корисної моделі поставлена задача, що полягає у скороченні часу на проведення досліджень, підвищення точності та повноти отриманих результатів дослідження.

Задача вирішується шляхом створення способу визначення основних метричних характеристик нейронів на гістологічних зрізах спинномозкових вузлів, що виконують шляхом зафарбовування ділянок проекцій нейронів на фотографіях гістологічного зрізу та проведення морфометрії, згідно з корисною моделлю, контур нейронів на цифровій фотографії гістологічного зрізу обмальовують в графічному редакторі чорним кольором з наступною комп'ютерною обробкою.

Суть способу пояснюють ілюстративні матеріали.

На фіг. 1 зображено гістологічний зріз поперекового спинномозкового вузла, гематоксилін-еозин, Об. 4^х, ок. 7^х. Фото отримане шляхом фотографування гістологічного зрізу з предметного скла через насадку для фотоапарата на мікроскопі. На фіг. 2 зображено гістологічний зріз поперекового спинномозкового вузла, гематоксилін-еозин, Об. 4^х, ок. 7^х... Фото після обведення контурів нейронів в графічному редакторі Paint Microsoft Windows 7. На фіг. 3 зображено гістологічний зріз поперекового спинномозкового вузла, гематоксилін-еозин, Об. 4^х, ок. 7^х. Зображення після обробки фото з обведеними контурами нейронів в спеціалізованій безкоштовній програмі ImageJ.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Спочатку проводять фотографування гістологічних зрізів поперекового спинномозкового вузла людини, з подальшим виготовленням (в графічному редакторі Adobe Photoshop) двомірної - просторової реконструкції поздовжнього зрізу останнього (див. фіг. 1). Отримане цифрове зображення обробляють шляхом обведення контурів псевдоуніполярних нейронів в стандартному графічному редакторі Paint, операційної системи Microsoft Windows 7, чорним кольором, широким пензлем (див. фіг. 2). Після обведення контурів псевдоуніполярних нейронів в Paint, відкривають зображення в редакторі ImageJ. Перед відкриттям зображення, слід відкалібрувати програму за допомогою команди Analyze> SetScale для завдання просторового масштабу зображення (певна кількість пікселів зображення на одиницю вимірювання, наприклад міліметр). Для цього можна використати фотографію готового об'єкта-мікрометра, або відстані між сусідніми рисками шкільної лінійки, що є менш точним. На наступному етапі, за

допомогою команди Image> Type конвертують активне зображення в 8-бітове (в результаті чого отримуємо зображення у відтінках сірого кольору). Використовують інструмент Image> Adjust> Threshold автоматично або інтерактивно налаштовують верхні і нижні значення порога для сегментування області інтересу і заднього фону зображення. При цьому видаляють всі непотрібні елементи, крім обведених контурів нейронів, в результаті чого отримуємо білий фон, на якому зображені чорні контури нейронів (фіг. 3).

Після цього потрібно заповнити білі простори в межах контурів командою Process> Binary> FillHoles (фіг. 4). На наступному етапі конвертують зображення в маску командою Process> Binary> Convert to Mask і відокремлюють кожен елемент один від одного на відстань одного пікселя командою Process> Binary> Watershed, задаючи відповідні параметри. Потім проводять налаштування: у пункті меню Analyze> SetMeasurements обираємо Area (розрахунок загальної площі нейронів, виділених чорним кольором) і Feret's Diameter (дає два розміри: максимальний і мінімальний кожного окремого елемента чорного кольору, в нашому випадку максимальний і мінімальний діаметр нейроцитів). Далі проводять розрахунок кількості, розмірів і загальної площі ділянок чорного кольору, які відповідають площі псевдоуніполярних нейронів за допомогою команди Analyze> AnalyzeParticles.

У вікні необхідно в рядку Size ввести 100-infinity, і виділяють пункти: Pixel units, Display results, Clear results, Summarize. У рядку Circularity залишити незмінним значення (0.00-1.00), а в рядку Show виставити Outlines.

В результаті проведених дій, відкриється три вікна: одне вікно із загальними результатами, в якому містяться дані про кількість нейронів і їх загальної площі; інше з розміром кожного з елементів (мінімальний-MinFeret і максимальний-Feret) (фіг. 5); третє вікно з позначенням кожного з окремих елементів, з нумерацією і його контуром (фіг. 6).

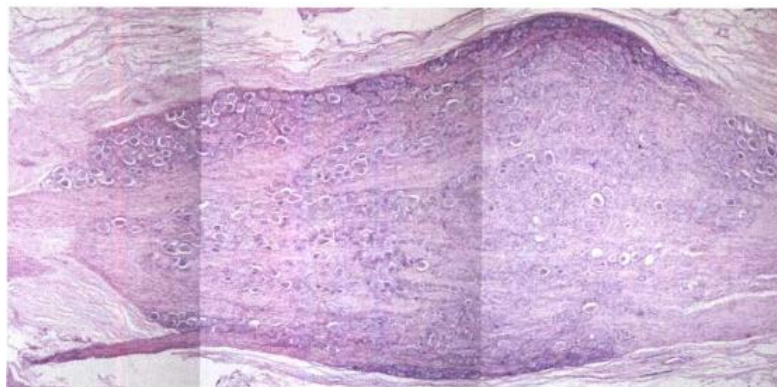
Таким чином, спосіб забезпечує скорочення часу проведення досліджень, точніше відображає мікроскопічну картину всього гістологічного зрізу, а не окремих полів зору, дає можливість визначити кількість нейронів, площу нейронів, яку вони займають на зрізі, та їхні розміри (ширину та довжину) на гістологічному зрізі.

Запропонований спосіб було застосовано при аналізі 50 зрізів спинномозкових вузлів людини віком від 18 тижнів внутрішньоутробного розвитку до людей старше 60 років. В усіх випадках вдалося розрахувати кількість псевдоуніполярних нейронів на гістологічному зрізі, площу, що вони займають на зрізі, та максимальний і мінімальний розмір кожного з нейронів на зрізі.

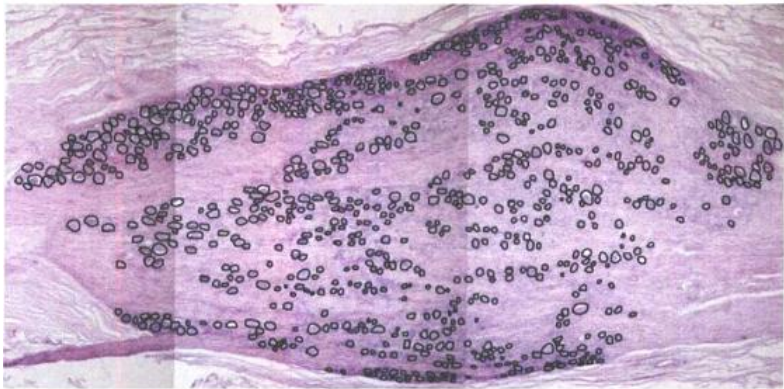
Спосіб, що запропоновано, був апробований на базі кафедри патологічної анатомії ВДНЗУ "Українська медична стоматологічна академія". Отримані позитивні результати дають підстави рекомендувати цей спосіб в широку медичну практику.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення основних метричних характеристик нейронів на гістологічних зрізах спинномозкових вузлів, що включає зафарбовування ділянок проєкцій нейронів на фотографіях гістологічного зрізу та проведення морфометрії, який **відрізняється** тим, що контур нейронів на цифровій фотографії гістологічного зрізу обмальовують в графічному редакторі чорним кольором з наступною комп'ютерною обробкою.



Фіг. 1



Φir. 2



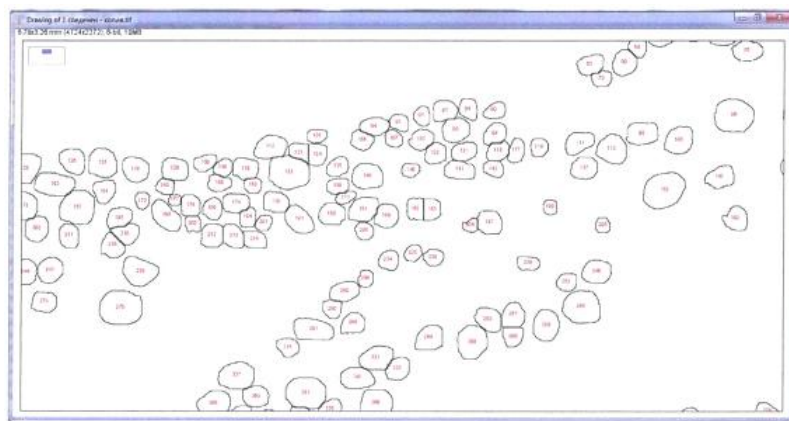
Φir. 3



Φir. 4

Results							
File	Edit	Font	Results				
	Area	Perim.	Feret	FeretX	FeretY	FeretAngle	MinFeret
738	0.004	0.234	0.081	4.244	2.725	35.655	0.066
739	0.002	0.163	0.058	3.774	2.671	140.013	0.045
740	0.004	0.231	0.082	4.172	2.730	40.711	0.058
741	0.006	0.302	0.105	4.967	2.759	40.006	0.083
742	0.002	0.166	0.058	4.692	2.710	15.751	0.044
743	0.002	0.166	0.059	3.070	2.714	21.541	0.042
744	0.004	0.243	0.081	4.010	2.691	154.799	0.060
745	0.002	0.163	0.057	4.102	2.728	31.701	0.042
746	0.003	0.211	0.076	5.233	2.731	15.350	0.050
747	0.003	0.214	0.075	5.075	2.743	36.431	0.055
748	0.006	0.290	0.101	3.195	2.728	164.389	0.076
749	0.001	0.144	0.050	2.941	2.738	27.300	0.040

Φir. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601