

Н.С. Меркульева и Н.И. Никитина

МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДВУХМЕРНЫХ ПАТТЕРНОВ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЧЕНЫХ НЕЙРОНОВ В КОРЕ БОЛЬШОГО МОЗГА

Лаборатория нейроморфологии (зав. — проф. Ф.Н. Макаров), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Цель настоящего исследования состояла в разработке алгоритма анализа двухмерных паттернов меченых нейронов и их построения. На примере изучения корково-корковых связей между полями 17 и 18 и заднемедиальной областью супрасильвиевой борозды у кошки показано, что предложенный алгоритм является адекватным для поставленных целей реконструкции и анализа паттернов инициальных нейронов и может быть использован при разработке узкоспециализированной компьютерной программы в качестве рабочего алгоритма.

Ключевые слова: зрительная кора, корково-корковые связи, двухмерные паттерны мечения.

Трудно переоценить роль синаптических межклеточных взаимодействий в функционировании нейронных сетей ЦНС. Среди морфологических способов изучения этих связей значительную роль играют методики антероградного и ретроградного мечения межклеточных, преимущественно, аксональных связей с использованием различных маркеров [1]. Маркированные нейроны выявляются на срезах нервной ткани в виде специфически окрашенных тел. Дальнейшее изучение пространственной организации этих нейронов связано с выявлением паттерна их распределения в ядрах мозга, слоях коры и последующим количественным анализом. Для исключения ручной обработки материала в данной работе представлен разработанный нами алгоритм выявления и анализа двухмерных паттернов меченых нейронов. В качестве одного из возможных вариантов реализации предлагаемого алгоритма использовали программу Adobe Photoshop 7.0. Данный алгоритм был применён при исследовании распределения меченых нейронов в зрительных корковых полях 17 и 18, меченных ретроградно пероксидазой хрена, введенной в зрительную часть заднемедиальной области супрасильвиевой борозды у кошки. Анализировали парасагиттальные срезы толщиной 50 мкм (разделённые промежутком в 50 мкм) коры мозга интактных животных в возрасте 12 нед. Введение маркера, перфузия животного и гистохимическое выявление пероксидазы хрена на срезах коры подробно описаны ранее [2].

Для оцифровки гистологических препаратов использовали установку, состоящую из бино-

кулярной лупы Wild (Швейцария, ув. 12×10), цифровой камеры Baumer Optronix (Германия) с матрицей на 12 точек, программы Video Test Master (Россия). Все последующие процедуры проводили в программе Adobe Photoshop 7.0. На все меченые нейроны, имеющиеся на оцифрованных изображениях срезов, наносили метки в виде круглых чёрных точек (диаметр таких точек примерно соответствует среднему размеру меченых нейронов в нашем эксперименте) (рис. 1, а, б). Для выявления двухмерного паттерна распределения нейронов проводили наложение соседних серийных срезов друг на друга, используя в качестве реперных точек сосуды, поскольку их очертания от среза к срезу меняются меньше, чем очертания общего контура среза. Однако полного сопоставления всех сосудов на соседних срезах достичь почти невозможно, поэтому добивались такого взаимного их расположения, при котором расстояние между контурами одного и того же сосуда во всех случаях было примерно одинаковым (см. рис. 1, в); в большинстве случаев это отклонение составило не более 80 мкм. Полученное суммарное изображение представляло собой сумму слоёв, для каждого из которых, в целях избавления от шумовой картины сосудов, контура и пр., проводили увеличение яркости и контраста до 100%. Итоговое изображение и представляет собой двухмерный паттерн распределения меченых нейронов (см. рис. 1, г). Очевидно, что при подобном построении двухмерных моделей количество ошибок будет значительно меньше, чем

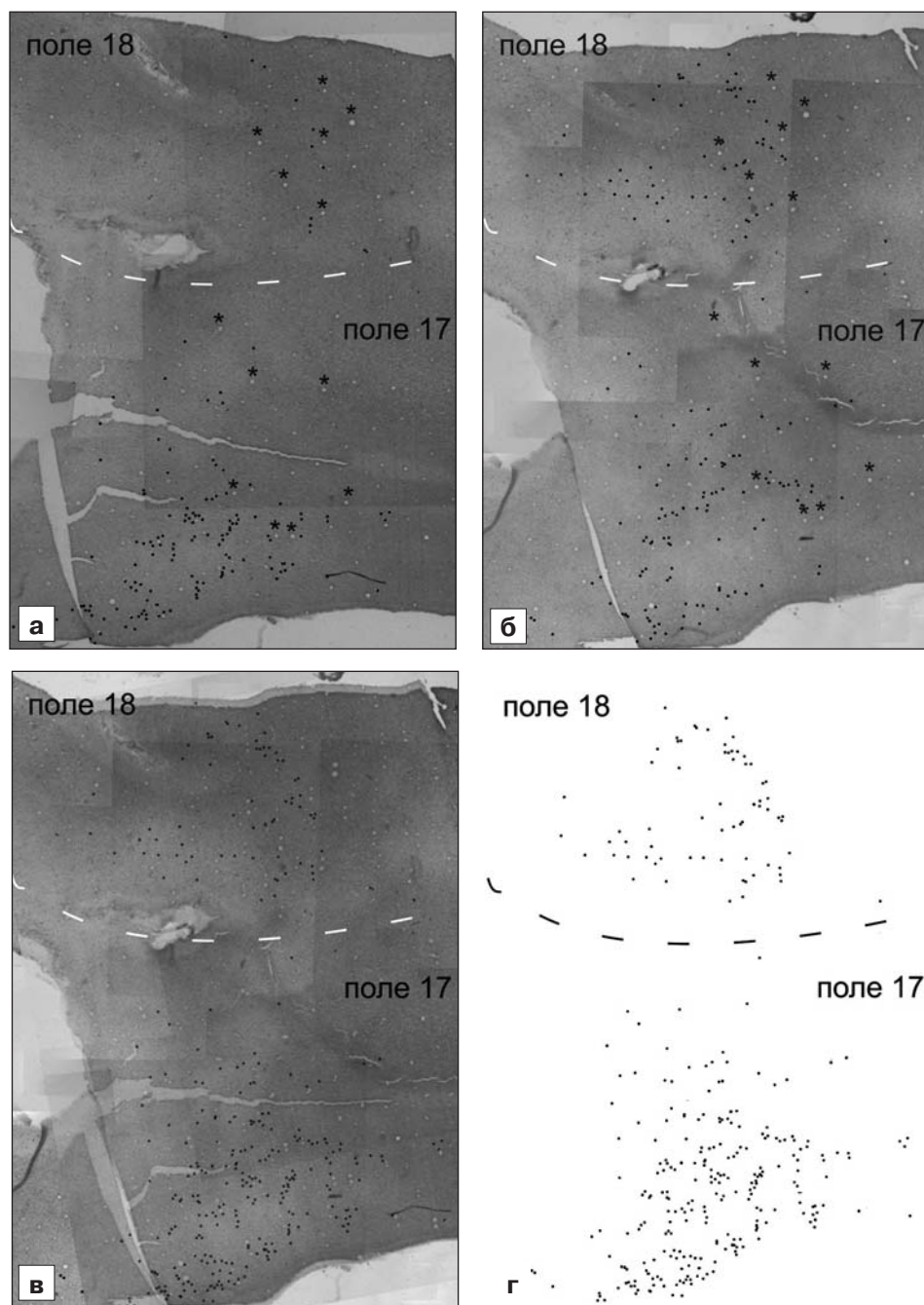


Рис. 1. Последовательность построения двухмерного паттерна распределения меченых нейронов в полях 17 и 18 мозга кошки.

а, б — два изображения последовательных парасагиттальных срезов коры с выделенными на них нейронами. Маленькие чёрные точки — меченые нейроны; звёздочками обозначены сосуды, использованные в качестве реперных точек; в — изображение, полученное в результате наложения изображений «а» и «б»; г — двухмерный паттерн распределения нейронов, полученный после увеличения яркости и контраста изображения до 100%. Штриховая линия — граница между полями 17 и 18.

при ручной обработке с использованием *camera lucida*.

Следующий шаг — анализ двухмерных паттернов. Одними из самых распространённых этапов этого анализа являются: определение площади области, содержащей меченые клетки, а также плотности и количества этих клеток (последний пункт является актуальным при многочисленной выборке). Для единообразного определения пло-

щади области, содержащей меченые нейроны, необходимо сначала выбрать определённый алгоритм выделения границ этой области. Существуют несколько таких алгоритмов: вписывание области мечения в определённую геометрическую фигуру (например, овал или круг), построение сложного многоугольника путём соединения соседних меченых клеток на изображении. Однако даже второй алгоритм не избавляет от погрешностей, поскольку

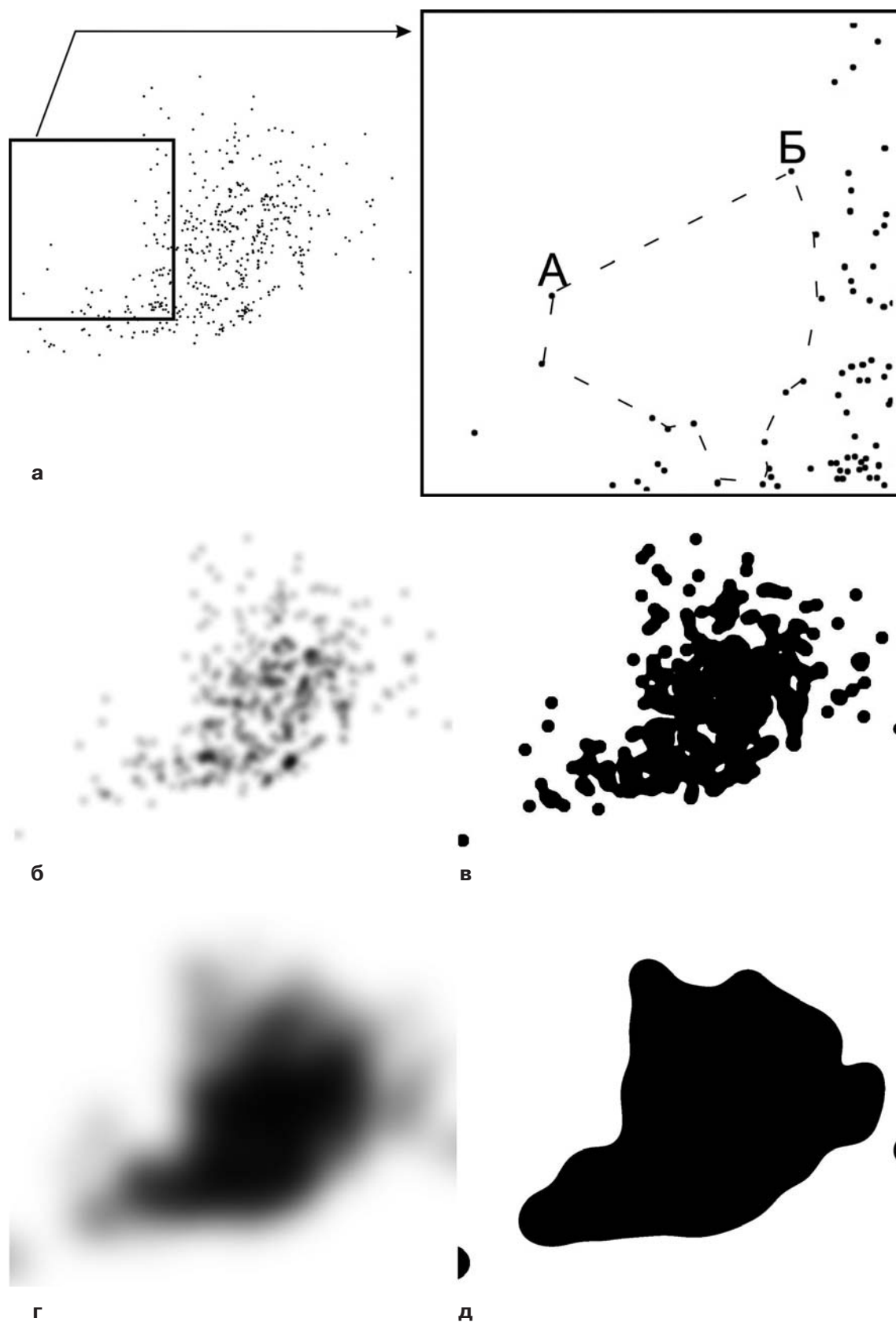


Рис. 2. Способ определения площади участка поля 17, содержащего меченые нейроны.

а — исходное изображение двумерного паттерна. Квадрат справа — увеличенный фрагмент паттерна, показывающий два из множества возможных вариантов соединения точек А и Б при обведении области с мечеными нейронами; б — изображение паттерна после фильтрации в режиме «Размытие Гаусса» (режим усреднения 10 пикселей); в — изображение «б» после увеличения контраста до 100%; г — изображение паттерна «в» после фильтрации в режиме «Размытие Гаусса» (режим усреднения 20 пикселей); д — изображение «г» после увеличения контраста до 100%.

ку не всегда ясно, какие именно точки считать соседними (на рис. 2, а приведён пример двух возможных вариантов соединения точек А и Б). Эта проблема — предмет многолетних исследований в области психофизики зрительного восприятия и машинного зрения, и на данный момент установлено, что наиболее оптимальные способы выполнения указанной задачи — применение принципа «минимизации энергии» [4] или использование процедуры удаления высоких пространственных частот в изображении. В настоящей работе для унификации процесса выделения пространства, содержащего меченые клетки, мы использовали второй способ. Для этого проведена двухступенчатая пространственно-частотная фильтрация полученных двумерных паттернов (с использованием функции «Размытие Гаусса», в режимах усреднения 10 и 20 пикселей). Между первым (см. рис. 2, б) и вторым этапами фильтрации (см. рис. 2, г), и после них проводили увеличения контраста до 100% (см. рис. 2, в, д). Применение этого способа к анализу всех паттернов в исследуемой выборке позволяет избавляться от флуктуаций в количественных данных, связанных с «индивидуальным» подходом к определению площади каждого конкретного паттерна. Площадь полученной фигуры определяли с использованием режима «Гистограмма», показывающего количество пикселей в указанной фигуре (для перевода пикселей в микрометры полученное значение умножали на калибровочный коэффициент, определяемый в начале калибровки объективов). В тех случаях, когда двумерный паттерн состоит из большого числа нейронов, их подсчёт вручную может представлять определённые трудности. Эту процедуру можно также выполнить в автоматическом режиме; для этого на исходном изображении двумерного паттерна (см. рис. 2, а) одну из точек отмечают инструментом «Волшебная палочка», после чего в режиме «Гистограмма» можно определить площадь как отдельной точки, так и их суммы. Разделив суммарную площадь на площадь отдельной точки, получим количество точек на изображении — число меченых нейронов в двумерном паттерне. Наконец, частное от деления числа меченых клеток на площадь области мечения даст значение плотности распределения меченых нейронов.

Таким образом, предложенный способ обработки материала позволяет исключать из числа неизбежных погрешностей те, которые связаны с невозможностью применения единого алгоритма анализа данных при их ручной обработке.

Очевидно, что для оптимизации описанного алгоритма требуется более простая и узкоспециализированная программа, позволяющая выполнять перечисленные выше процедуры полностью в автоматическом режиме. Апробированный в пошаговом режиме алгоритм, представленный в данной работе, может быть использован в качестве рабочего алгоритма этой программы. В литературе описаны примеры компьютерного анализа паттернов корково-корковых связей [3], однако они, в большинстве случаев, созданы авторами для конкретных целей, с невозможностью их приобретения. Предлагаемая методика анализа паттернов нейронов позволяет осуществлять более быструю и эффективную работу при анализе данных (особенно при больших массивах данных), полученных не только при исследовании организации корково-корковых связей, но и при количественном анализе особенностей cito- и хемоархитектоники мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макаров Ф.Н. Исследование связей нервной системы с помощью аксонального транспорта пероксидазы хрена. *Арх. анат.*, 1979, т. 77, вып. 9, с. 108–116.
2. Меркульева Н.С. и Макаров Ф.Н. Онтогенетические особенности организации корково-корковых связей первичной зрительной коры и латеральной супрасильвиевой области мозга кошки. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, 2010, т. 96, № 3, с. 271–279.
3. Boyd J.D. and Matsubara J.A. Projections from V1 to lateral suprasylvian cortex: an efferent pathway in the cat's visual cortex that originates preferentially from CO blob columns. *Vis. Neurosci.*, 1999, v. 16, p. 849–860.
4. Williams L.R. and Jacobs D.W. Stochastic completion fields: a neural model of illusory contour shape and salience. *Neural Comput.*, 1997, v. 9, p. 837–858.

Поступила в редакцию 16.04.10

A METHOD FOR DETECTION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF TWO-DIMENSIONAL PATTERNS OF LABELED NEURON DISTRIBUTION IN THE CEREBRAL CORTEX

N.S. Merkulieva and N.I. Nikitina

The aim of the present investigation was to elaborate an algorithm for labeled neuron 2-D pattern reconstruction and its analysis. Using the study of cat cortico-cortical connections between the areas 17, 18 and posteromedial lateral suprasylvian area as an example, it was shown that proposed algorithm is adequate for present aims of initial neuron pattern reconstruction and analysis, and that it can be applied as a working algorithm for highly specialized computer program elaboration.

Key words: *visual cortex, corticocortical connections, 2-D patterns of labeling*

Laboratory of Neuromorphology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg