

УДК 57.081.23

І. К. Смоляренко, О. А. Шугуров, О. О. Шугуров

Дніпропетровський національний університет

ПРОГРАМНЕ ОПРАЦЮВАННЯ ГІСТОЛОГІЧНИХ ДАНИХ ЗРІЗІВ НЕРВОВОЇ ТКАНИНИ

Для морфометричного аналізу зразків мозку розроблено програму, яка дозволяє обраховувати основні геометричні параметри тіл нейронів. Автоматичне розпізнавання нейронів базується на градації контрасту та кольору клітинних тіл. Описано методи створення цифрових матриць, що відповідають реальним фотозображенням, і методи апроксимації форм нейронів до більш простих фігур.

In article the program designed for analysis of a brain sections is described. It allows to calculate the basic geometrical parameters of neuron's bodies. The self-acting recognition of neurons is based on gradation of contrast and colour of cells bodies. The methods of building of digital templates conforming the actual photographic images and methods of approximation of the forms of neurons to more prime figures are described.

Вступ

Для опрацювання морфометричних або електрофізіологічних зображень використовують складну техніку, що включає як оптичний, так і цифровий (у тому числі програмне забезпечення) компоненти. Для оцифровки лінійних сигналів використовують різного типу дигітайзери, але аналіз двомірних зображень ще складніший. Наприклад, система морфометричного аналізу «Морфоквант» захоплює зображення ділянки гістологічного зрізу та здійснює його подальшу обробку (фільтрація, вимір). При роботі на зазначеній системі дослідник, застосовуючи ручний маніпулятор, окреслює ділянку зображення і за допомогою програмних методів оцифровує її. Прикладом можуть бути роботи, у яких застосовували зазначений аналізатор для визначення лінійних параметрів нейронів до і після опромінення мозку рентгенівськими хвилями [4] або низькоінтенсивним лазером оптичного діапазону [3], а також у нормальних умовах [2].

З одного боку, подібні системи дуже дорогі, з іншого – підсумкова інформація про досліджуваний нейрон дуже мала, оскільки оцифрується не весь зразок, а тільки зазначені експериментатором його частини. Таким чином, наша мета – одержати більш повну інформацію про морфометричні параметри нейронів шляхом додаткової оцифровки зразків із можливістю використання інформації для подальшої всебічної статистичної обробки даних.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення морфометричних досліджень використовували котів вагою близько 4 кг, у яких спинний мозок вилучали хірургічним методом на рівні $L_5 - S_1$ сегментів. Ділянки спинного мозку тварин фіксували у рідині Карнуа, заливали у парафін, після чого були зроблені гістологічні зрізи за допомогою заморожувального мікротому МЗ-2 з шагом 5 мкм. Фарбування зрізів проводилося за допомогою поширеного методу фарбування гематоксилін-еозином (метод Ніссля) [1].

Для фарбування відповідно використовували гематоксилін (природний барвник, що дозволяє виявити структурні компоненти ядер клітин) та еозин (штучний барвник, що фарбує цитоплазму клітини). У ході роботи використовували прогресивний метод фарбування, тобто зрізи перебували у барвнику доти, поки не зафарбо-

© І. К. Смоляренко, О. А. Шугуров, О. О. Шугуров, 2006

увалися до потрібного рівня, потім ретельно промивалися під проточною водою. У результаті отримали препарати з чітко вираженими ядром, ядерцем і хроматином. Цитоплазма клітини світла, мембрана відносно темна. У подальшій роботі отримані препарати вивчалися під світловим мікроскопом із використанням спеціально розробленої програми для обробки морфологічних даних.

Результати та їх обговорення

Обравши зону дослідження та зафіксувавши положення деяких нейронів, починали збільшувати зображення. Загалом максимальне значення візуального підсилення складало $\times 3000$. На мікроскопі «Jena-Med» підсилення дорівнювало $\times 1000$ (100 на об'єктиві, 10 на окулярі), ще у три рази було підсилення за рахунок оптичного збільшення цифрового апарата Canon A75. Зображення за допомогою USB-кабеля переводили на магнітний носій персональної обчислювальної машини (ПЕОМ). Далі для обробки параметрів нейронів використовували розроблений програмний засіб (MFE), описаний нижче.

Для вирішення поставленого завдання розроблений програмний засіб із використанням мови програмування Delphi, який складається з двох функціонально різних блоків. Перший здійснює перетворення зображення, розміром до 200 x 200 пікселів із кольорового зображення в сіре, а потім з сірого – в бітове чорно-біле (програмно можна змінювати градацію чорного від 0 до 255 для зміни контрасту зображення) (рис. 1). З одного боку, така обробка фільтрує зображення, а з іншого – виділяє найважливіші компоненти (такі як границя соми клітини та зовнішній простір, ядро, ядерце, аксон тощо).

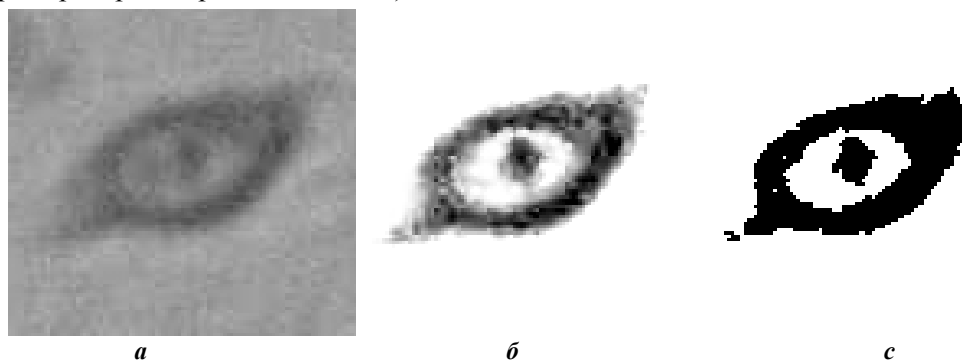


Рис. 1. Цифрове опрацювання фотографічного морфометричного зображення проміжного нейрона спинного мозку при оптичному підсиленні зображення у тисячу разів:
а – сіре зображення нейрона (256 тонів); б – сіре (з високим контрастом); в – бітове чорно-біле;
розмір нейрона – 15 мкм (у довжину).

Далі проводиться запис зображення в текстовий файл у вигляді набору з нулів та одиниць у масив даних розміром 200 x 200 (рис. 2). Після цього кожна точка $A(X, Y)$ зображення (незалежно від того, сигнал це чи зображення) стає носієм координатних значень X та Y , що відповідають ширині та висоті графічного об'єкта.

Друга частина програмного засобу здійснює математичну обробку оцифрованого зображення або сигналу. У випадку, якщо це будь-яка крива (наприклад, гранична лінія, волокно), він усереднюється по всіх точках із координатами $A_1(X_0, Y_1); A_2(X_0, Y_2); \dots A_{200}(X_0, Y_{200})$. Далі відбувається перехід на точку X_1 і т. д. по осі абсцис до кінцевої точки, що відповідає значенню X_{200} .

Оцифрований рисунок, який вже є математичною матрицею (рис. 2, б) вносять до бази даних для подальшого аналізу або, змінюючи візуальну «ширину» сигналу, зберігають для використання у вигляді графічного зображення.

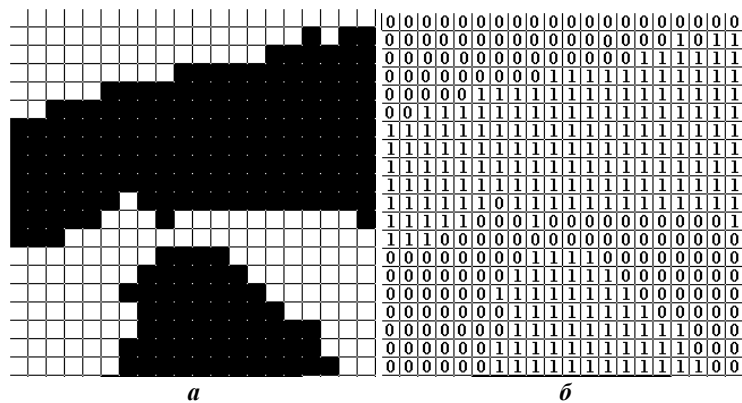


Рис. 2. Переведення графічного подання даних у цифрове: частина (20 на 20 елементів) клітини, наведеної на рис. 1, в, у вигляді бітового зображення (а) та математичної матриці (б).

Обробка двовимірного морфометричного зображення йде таким шляхом. З одного боку, площу об'єкта можна вирахувати як кількість одиниць, що присутні у матриці. Але такий підхід дійсний лише за умови, що весь досліджуваний об'єкт (наприклад волокно) має близьку за значеннями щільність фотографічного зображення. Оскільки всередині клітини завжди є ядро, ядерце, цитоплазма, то деякі внутрішні об'єкти (наприклад цитоплазма) мають таку ж щільність, як і зовнішнє міжклітинне середовище.

Тому, використовуючи початкову інформативну точку зображення (чорна на білому фоні) із значенням $A_0 (X_0, Y_0)$, програма послідовно збирає значення всіх інших чорних точок $A_n (X_n, Y_n)$ за допомогою правила визначення абсолютних значень для векторів, які утворені всіма такими точками. У такий спосіб знаходяться максимальне та мінімальне значення, що відповідають поздовжньому та поперечному зовнішньому розміру нейрона. Останні – базові при подальшому формуванні зображення та обробці.

При автоматичній обробці зображення присутній суттєвий недолік, що проявляється при відносно малому контрасті морфометричного зображення. Фактично у бітовому чорно-білому форматі «з'їдаються» дрібні деталі, особливо ті, що мають малу різницю градації кольору відносно близько розташованого зображення. Тому автоматична обробка доцільна тоді, коли проводиться оцінка невеликих частин клітин, або є великий контраст між деталями, що аналізуються.

При «ручному» керуванні програмою оцінку параметрів нервових клітин проводили, апроксимуючи ядра та клітини еліпсоїдом (рис. 3). Це пов'язано з тим, що у більшості вимірів при випадкових напрямках проведення зрізання шарів тканин мозку, кількість випадків, коли на зрізі нейрона присутні дендрити або аксон, які можуть суттєво змінити форму самої соми клітини, досить мала [4].

У нашому випадку морфометричне зображення формується в лівому верхньому куті поля; воно може масштабуватися відповідно розміру поля відображення (рис. 3). У верхній правій частині вікна програми містяться пристрої зміни його графічних значень. У нижній лівій частині – кнопки для позиціонування базових точок зображення, у правій – деякі цифрові значення морфометричних параметрів нейронів.

Встановивши у центрі зображення клітини курсор і просуваючи маніпулятор «мишу», експериментатор формує еліпсоїд, що відповідає розміру клітини. Відповідні значення параметрів клітини (розмір, площа поверхні, площа перетину,

велика та мала осі) по черзі викликаються на панель статусу вікна. Аналогічним чином, використовуючи отримані значення й окресливши площу перетину, програма переходить до ядра, розглядаючи його як певний масив білих точок у просторі чорних, що також являють собою еліпсоїд. Далі за знайденими значеннями вже можна визначити параметри відношень, що вивчаються (об'єм клітини та ядра, ядерно-цитоплазматичне відношення, сплюсненість соми та ядра, інші параметри).

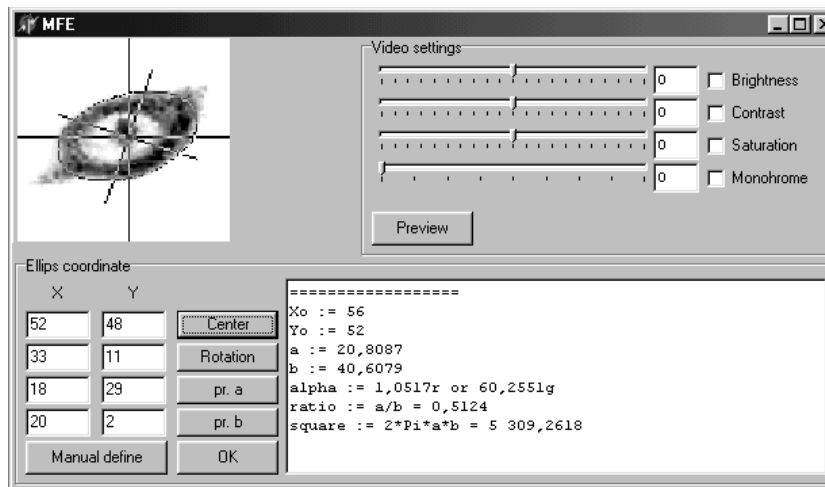


Рис. 3. Апроксимація нервової клітини та її ядра еліпсоїдом

Даний метод цифрового опрацювання гістологічних зрізів мозку успішно використовувався при дослідженні впливу хвиль НВЧ (10 ГГц) нетеплової інтенсивності на нервову систему. Зразки зрізів мозку фотографувалися на цифровий носій і опрацьовувалися на ЕОМ (рис. 1) за допомогою вказаної програми.

Дані свідчать, що точність оцінки параметрів клітини описаним методом і при використанні системи «Морфоквант» була приблизно однаковою (у межах 3–5% похибки). Однак запропонована програма окрім «ручного окреслення» досліджуваного зображення дозволяє проводити автоматичну оцінку розмірів профарбованих площин тканин і в цьому сенсі є більш об'єктивною. Програмний засіб не потребує складної апаратури, простий у роботі й тому може рекомендуватися для вимірювання як морфометричних, так і інших типів зображень і електрофізіологічних сигналів.

Висновки

Автоматизований морфометричний аналіз здатний адекватно відобразити зміни у клітинах нервової системи незалежно від їх розміру та способу фарбування, але за умови високого контрасту між деталями фотографії. При малих контрастах у морфометричних зображеннях доцільно використовувати мануальне втручання в окреслення досліджуваної зони. Головні параметри, що відбивають зміни при дії на мозок різноманітних факторів, можливо досить достовірно визначити при апроксимації форми нейронів еліпсоїдом.

Бібліографічні посилання

1. **Волкова А. В.** Основы гистологии с гистологической техникой / А. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – М.: Наука, 1971. – 260 с.
2. **Никоненко А. Г.** Анализ пространственного распределения везикул в пресинаптических терминалах гиппокампа in vivo и in vitro / А. Г. Никоненко, А. В. Шейченко, Г. Г. Скибо // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2000. – Т. 32, № 5. – С. 342–347.

3. **Русаков Д. А.** Структурно-функциональные изменения нейронов спинного мозга после низкоинтенсивного лазерного облучения / Д. А. Русаков, П. Г. Клеринг // Радиобиология. – 1988. – Т. 28, № 1. – С. 133–137.
4. **Щербатых Ю. В.** Объективные критерии для определения степени радиационного поражения нервных клеток при церебральном синдроме / Ю. В. Щербатых, П. Г. Клеринг, А. И. Дворецкий // Радиобиология. – 1986. – Т. 24, № 3. – С. 397–399.
5. **Elliptic Fourier analysis** of cell and nuclear shapes / G. Diaz, A. Zuccaretti, I. Pelligra, A. Ghiani // Comput. and Biomed. Res. – 1989. – Vol. 22, N 5. – P. 405–414.

Надійшла до редколегії 15.01.06.

УДК 577.182:579.253

М. П. Теплицкая, И. Е. Соколова

Днепропетровский национальный университет

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ БИОСИНТЕЗА АНТИБИОТИКОВ У *STREPTOMYCES*

Проаналізовано основні гіпотези та експериментальні дані, подані у літературі стосовно регуляції синтезу антибіотичних речовин представниками роду *Streptomyces*. Узагальнено дані про кластерну організацію генів біосинтезу деяких антибіотиків у цих мікроорганізмів. Наведено приклади позитивної та негативної регуляції експресії генів біосинтезу антибіотиків. Крім цього, знайдено докази, що підтверджують участь у процесі ініціації та експресії генів біосинтезу антибіотиків ще кількох генів більш високого рівня. У цьому зв'язку детально розібрано роль А-фактора у механізмі каскадно організованого процесу регуляції біосинтезу стрептоміцину, деяких інших антибіотиків, а також спороутворення.

These work contain a review of basic hypotheses and experimental information in relation to the problem of antibiotic synthesis regulation by the bacteria of the *Streptomyces* family. Data on cluster organization of antibiotics biosynthesis genes in these microorganisms were generalized. The examples of the positive and negative specific control of antibiotic production genes were resulted. Except for it, proofs that confirm participation of a few genes of more high level in the process of initiation and expression of antibiotics biosynthesis genes also were found. In this connection A-factor role in the mechanism of cascade-organized process of streptomycin biosynthesis control, some other antibiotics and spore determinations is discussed in detail.

Введение

Биосинтез антибиотиков – сложный многоэтапный ферментативный процесс, который обеспечивается координированной работой целого комплекса специфических генов [8]. В результате детального исследования генетической детерминации биосинтеза антибиотиков у ряда микроорганизмов-продуцентов установлено, что комплексы структурных генов и оперонов, участвующих в этом процессе, представляют собой кластеры. Очевидно, как и в случае описанных у бактерий систем оперонного типа, кластерная организация способствует координированной экспрессии, регуляции и эволюции этих генов в составе генома организма-продуцента [13].

Кластерная организация генов антибиотикообразования

В составе изученных кластеров генов биосинтеза антибиотиков обнаружены:

- а) структурные гены, кодирующие ферменты, участвующие в биосинтезе соответствующих антибиотиков;
- б) ген(ы) устойчивости, обеспечивающий защиту микроорганизма-продуцента от образуемого им антибиотика;

© М. П. Теплицкая, И. Е. Соколова, 2006