

# TRANSNATIONAL FINANCIAL & INDUSTRIAL CORPORATION «ELITA»

# ТРАНСНАЦИОНАЛЬНАЯ ФИНАНСОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ КОРПОРАЦИЯ «ЭЛИТА»

48, Shkolnaya, Moscow, 109544, Russia Россия, 109544, Москва, Школьная, 48 Tel: (095) 953-53-94, Fax: (095) 953-53-82, E-mail: nanotech @ mail.magelan. ru

УДК 615.471: 616-073.753.3	681.32(075)				
№ Госрегистрации					
Инвентарный номер					
УТВЕРЖДАЮ					
Генеральный директор					
ОАО «ТФПК «Элита»					
д.т.н.					
М.А. Ананян					
« » февраля 2002 г.					

# ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ И ОПЫТНО-КОНСТРУКТОРСКОЙ РАБОТЕ

СОЗДАНИЕ ВИДЕОКОМПЬЮТЕРНЫХ СРЕДСТВ АНАЛИЗА ДАННЫХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (заключительный)

# Книга 1 СОЗДАНИЕ МОДИФИКАЦИЙ ВИДЕОКОМПЬЮТЕРНОГО КОМПЛЕКСА АНАЛИЗА МИКРОСКОПНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ В ОБЛАСТИ ГЕМАТОЛОГИИ И СМЕЖНЫХ ОБЛАСТЯХ

Руководитель НИОКР
Вав. отделением компьютерной бионики
К.Т.Н.
К.Б. Саниев

Москва 2002 г.

# Содержание

	Список исполнителей РЕФЕРАТ	3
	ВВЕДЕНИЕ	6
1. 1.1. 1.2.	ВИДЕОКОМПЬЮТЕРНЫЙ КОМПЛЕКС «ИМАДЖЕР» Состав и функционирование Унифицированное алгоритмическо-программное обеспечение анализа изображений «ИМАДЖЕРМЕДИА»	11 11
2.1. 2.2. 2.3. 2.3.1. 2.3.2. 2.4. 2.5.	ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА «ИМАДЖЕР» В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ Методика плоидометрических обследований Гематология Онкология Диагностика опухолей молочной железы Диагностика опухолей предстательной железы Трансплантация органов Оптимизация радиационно-химического лечения	26 28 32 44 44 56 63 82
2.6.	Заключение о применимости	87
3.	ПАТЕНТНЫЕ И МАРКЕТИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	88
4.	ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ПРОДОЛЖЕНИЮ РАБОТ	95
	выводы	107
	Литература	109

### Список исполнителей

1. Саниев К.Б. - научный руководитель темы, к.т.н., заведующий отделением компьютерной бионики ИНАТ МФК

2. Автандилов Г.Г. - медицинский научный руководитель темы, д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии РМАПО

3. Шереметьева Г.Ф. - медицинский научный руководитель темы, д.м.н., проф., руководитель патолого-анатомического отдела РНЦХ РАМН

4. Зайратьянц О.В. - медицинский научный руководитель темы, д.м.н., проф., зам.
 Гл.врача городской клинической больницы № 33

5. Баскаков В.Е. - научный сотрудник отделения компьютерной бионики ИНАТ МФК

6. Большова Т.Е. - научный сотрудник отделения компьютерной бионики ИНАТ МФК

7. Мотин Ю.А. - м.н.с. отделения компьютерной бионики ИНАТ МФК

# В работе принимали участие:

1. Гундорова Л.В. - к.м.н., врач-патологоанатом, доцент кафедры патанатомии УДН

2. Григорьева С.Г. - врач-патологоанатом

3. Лазаренко А.И. - к.б.н., с.н.с.

4. Морозова М.М. - к.м.н., ведущий научный сотрудник РНЦХ РАМН

5. Кочарян Е. З. - к.б.н., научный сотрудник РНЦХ РАМН6. Банов С.М. - врач радиологической клиники РМАПО

7. Султан-заде Т.С. - финансовый директор

8. Соколов В.Б. - зам. директора по научной работе, к.т.н.

## РЕФЕРАТ

Отчет 112 с., 33 рис., 10 табл., 46 источников.

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ, МОРФОЛОГИЯ, ОНКОЛОГИЯ, ГЕМАТОЛОГИЯ, ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПЕЧЕНИ

МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА, МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ, МОРФОДЕНСИТОМЕТРИЯ, ОНКОМОРФОЛОГИЯ, ПАТОГИСТОЛОГИЯ ОПУХОЛЕЙ ПЛОИДОМЕТРИЯ, СТАНДАРТ ДНК, ЛИМФОЦИТЫ, МАЗКИ, СРЕЗЫ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ СЛАБОФОРМАЛИЗУЕМЫХ ДАННЫХ, РАСПОЗНАВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ, АЛГОРИТМИЧЕСКО-ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОГРАММНО-АППАРАТНЫЙ ВИДЕОКОМПЬЮТЕРНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ

Основная цель настоящей НИОКР состояла во внедрении в медицинскую практику перспективного видеокомпьютерного инструментария анализа биопрепаратов и исследовании возможностей расширения медико-диагностических областей его применения и совершенствования морфологической диагностики на его основе.

АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ БИОПРЕПАРАТОВ

Базовым изделием являлся «Комплекс аппаратно-программный обработки и анализа цитологических и гистологических изображений «Имаджер-ЦГ», разработанный в инициативном порядке АНО ИНАТ МФК и рекомендованный к применению в медицинской практике МЗ РФ в декабре 2000 г.

Работа выполнялась в творческом содружестве с ведущими специалистами Российской медицинской академии последипломного образования (РМАПО), Российского научного центра хирургии Российской академии медицинских наук (РНЦХ РАМН) и ряда ведущих медицинских учреждений г. Москвы, осуществлявших научно-методическое руководство и авторское сопровождение медико-биологических исследований применимости и эффективности базового изделия «Имаджер-ЦГ».

Научно-медицинская методика применения базового изделия «Имаджер-ЦГ», разработанная и внедряемая в практику кафедрой патологической анатомии РМАПО, основывается на статистических оценках параметра плоидности клеток, характеризующего способность к синтезу ДНК и озлокачествлению тканей.

Медико-биологические исследования эффективности «Имадер-ЦГ» проведены в режиме опытной эксплуатации образцов прибора в клинических условиях больницы ЗИЛ, РНЦХ РАМН, госпиталя ветеранов ВОВ МЗ РФ.

Результаты выполненных медико-биологических исследований полностью согласуются с мировыми научно-медицинскими стандартами и обосновывают эффективность использования прибора «Имаджер-ЦГ» при онкологической диагностике новообразований различных органов; оптимизации качества диагностики и лечения злокачественных опухолей; диагностике болезней крови; контроле репаративной регенерации при родственной транспланции печени.

По результатам выполненных исследований прибор «Имаджер-ЦГ» также может быть рекомендован для широкого использования в практической медицине с целью определения темпов регенерации и эффективности лечебных мероприятий при различных состояниях — заболеваниях воспалительной природы, ожоговой болезни, последствий ишемических повреждений органов и др.

В процессе опытной эксплуатации прибора «Имаджер-ЦГ» разработана и апробирована унифицированная версия прикладного программного обеспечения «ИМАДЖЕРМЕДИА», учитывающая замечания медицинских пользователей и обеспечивающая более высокий уровень обработки и анализа различного рода изображений.

Результаты работы, выявленная маркетинговая конкурентноспособность продукции, а также достигнутый уровень проработки, определяют целесообразность продолжения инвестиций и работ по внедрению и унификации программно-аппаратных средств автоматизированного анализа слабоформализуемых визуальных данных на основе технологии «ИМАДЖЕРМЕДИА».

Наиболее актуальным развитием работы представляется продолжение исследований по расширению номенклатуры медико-диагностических областей применения, с включением их в перечень обязательных медицинских обследований, и сертификацией в МЗ РФ.

Предлагается, в качестве перспективной формы продолжения работ, создание межведомственных центров коллективного пользования, осуществляющих коммерческое внедрение и оказание услуг по компьютерной обработке и анализу изображений, в том числе, и пересылаемых по информационным сетям.

Актуальным является исследование применимости видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» в промышленной диагностике и контроле безопасности. В этом направлении представляются перспективными проекты, направленные на опережающую разработку и внедрение специализированных модификаций видеокомпьютерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» - охранная система контроля визуальной обстановки, компьютерный видеотелефон, компьютерный полиэкранный телевизор, видеокомпьютерная система контроля транспортных потоков.

## ВВЕДЕНИЕ

Исполнитель темы - Институт нанотехнологий Международного фонда конверсии (АНО ИНАТ МФК), являющийся разработчиком и правообладателем интеллектуальной собственности в области программно-аппаратных средств автоматизированного анализа изображений, интеллектуальных информационно-управляющих систем, инструментальных нанотехнологических комплексов.

Настоящая НИР «Создание модификаций видеокомпьютерного комплекса анализа микроскопных изображений биопрепаратов для медицинской диагностики в области гематологии и смежных областях» выполнялась в соответствии с Частным Техническим Заданием №\_1 от 5 января 2001 г. и Календарным планом работ по Договору № 01 от 10.02.2001 г. между ОАО «ТФПК «ЭЛИТА» (Заказчик) и Отделением компьютерной бионики Института нанотехнологий Международного фонда конверсии (Исполнитель).

Данная НИР по ЧТЗ №\_1 представляет собой часть НИОКР «Создание видеокомпьютерных средств анализа данных для медицинской диагностики и медико-биологических исследований», которая выполнялась в соответствии с Техническим Заданием от 17 января 2001г. и Календарным планом работ по Договору № 1242р/2837 от 17.01.2001г. между ОАО ТФПК «ЭЛИТА» (Исполнитель) и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Заказчик).

Основная цель настоящей НИОКР состояла во внедрении в медицинскую практику перспективного видеокомпьютерного инструментария анализа биопрепаратов и исследовании возможностей расширения медико-диагностических областей его применения и совершенствования морфологической диагностики на его основе.

Базовым изделием являлся «Комплекс аппаратно-программный обработки и анализа цитологических и гистологических изображений «Имаджер-ЦГ», разработанный в инициативном порядке АНО ИНАТ МФК, ТУ 9443-002-44471019-01, рекомендованный к применению в медицинской практике Комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ в декабре 2000 г., и внесенный в государственный Реестр, по согласованию технических условий, в июне 2001 г.

Комплекс «Имаджер-ЦГ» состоит из стандартной аппаратуры - микроскоп, видеокамеры, компьютер - и прикладного программного обеспечения, управляющего аппаратной частью и выполняющего анализ изображений и отображение результатов. Все изделие защищено патентом на полезную модель. Изделие предназначается для визуализации данных и распознавания изображений и предполагается использовать для оперативного получения количественной информации о свойствах биообъектов, в первую

очередь, для оценки их морфоденситометрических характеристик, с целью повышения качества диагностики в различных областях медицины.

На начало данной работы изделие «Имаджер-ЦГ» уже обеспечивает проведение двух медико-биологических обследований – «Кариотипирование» и «Гистоцитопатология».

Дальнейшая унификация и модернизация изделия «Имаджер-ЦГ» представляется особо перспективной в части расширения номенклатуры специализированных обследований типа «Гистоцитопатология», в которых врач-клиницист должен оперативно выявить статистически достоверную количественную оценку состояния клеток в анализируемом биопрепарате, и по этим данным диагностировать пациента.

Возможности повышения качества изделия «Имаджер-ЦГ» и расширения медикобиологических областей его применения, как инструмента медицинской диагностики, связываются со следующими основными моментами:

- математической процедурой (автоматического) выделения на произвольных биомедицинских изображениях исследуемых биообъектов;
- медико-биологической методикой интегральной оценки состояния биообъектов по плоидности;
- пользовательским интерфейсом прикладного программного обеспечения для редактирования результатов автоматическог анализа, их документирования и накопления.

Идея данной НИР по созданию модификаций унифицированного видеокомпьютерного комплекса для медицинской морфоденситометрической диагностики состоит в том, чтобы, основываясь на результатах опытной эксплуатации базового изделия «Имаджер-ЦГ» в различных медико-биологических исследованиях, произвести доработку только его прикладного программного обеспечения, соответствующую новым областям применения.

Содержание работ данной НИР предполагает комплексирование образцов изделия «Имаджер-ЦГ»; проведение их опытной эксплуатации совместно с медицинскими соисполнителями и в режиме плановых работ медучреждений; выработку медико-биологических обоснований для освоения перспективных медицинских обследований; разработку, по результатам опытной эксплуатации, технических требований к модификациям прикладного программного обеспечения; изготовление модификаций прикладного программного обеспечения и их практическую проверку.

В результате проведения работ выполнено следующее.

- 1. Скомплексированы образцы прибора «Имаджер-ЦГ» и введены в эксплуатацию в следующих медицинских учреждениях:
- кафедра патологической анатомии Российской медицинской академии последипломного образования на базе больницы ЗИЛ (профессор Автандилов Г.Г.);

- патологоанатомический отдел Российского научного центра хирургии РАМН (профессор Шереметьева Г.Ф.).

Также скомплексированы основные фрагменты образцов прибора «Имаджер-ЦГ» в отделении компьютерной бионики ИНАТ МФК.

2. По результатам экспериментальной эксплуатации комплексов «Имаджер-ЦГ» в медучреждениях разработан и изготовлен действующий макет унифицированного прикладного программного обеспечения «ИМАДЖЕРМЕДИА» для анализа изображений, в том числе, и для медицинской диагностики.

Прикладное программное обеспечение «ИМАДЖЕРМЕДИА» установлено в образцах прибора «Имаджер-ЦГ», введенных в эксплуатацию в медицинских учреждениях.

3. Для оценки эффективности применимости и исследования возможностей расширения номенклатуры медицинских обследований, организована и проведена в медицинских учреждениях опытная эксплуатация комплекса «Имаджер-ЦГ», в том числе, и с прикладным программным обеспечением «ИМАДЖЕРМЕДИА».

Данные медико-биологические исследования выполнены по следующим направлениям:

- дифференциальная диагностика новообразований молочной железы;
- дифференциальная диагностика новообразований предстатльной железы;
- мониторинг репаративной регенерации печени при родственной трансплантации;
- дифференциальная диагностика различных болезней крови;
- оптимизация радиационно-химического лечения боьных в клинической онкологии.

Данные медико-биологические исследования выполнены под научно-методическим руководством и при непосредстенном участии д.м.н. проф. Автандилова Г.Г., д.м.н. проф. Шереметьевой Г.Ф., д.м.н. проф. Зайратьянца О.В.

4. По результатам данных медико-биологических исследований прибор «Имаджер-ЦГ» с версией ППО «ИМАДЖЕРМЕДИА» рекомендуется для широкого использования в практической медицине с целью определения темпов регенерации и эффективности лечебных мероприятий при различных состояниях — заболеваниях воспалительной природы, ожоговой болезни, последствий ишемических повреждений органов и пр.

Также по результатам данных медико-биологических исследований медицинскими соисполнителями работы отмечается следующее:

- реализованная в ППО «ИМАДЖЕРМЕДИА» медико-диагностическая методика плоидометрии, как новое направление в патогистологических исследованиях, не связанная с использованием дорогостоящих расходных материалов, дает объективную дополнительную информацию о пролиферативной активности клеток эпителия, об его изменившихся генетических свойствах, что должно учитываться патогистологом при

принятии решений, связанных с дифференциальной диагностикой опухолей и опухолеподобных образований;

- морфоденситометрические данные автоматизированного анализа биопрепаратов, получаемые с помощью компьютерного анализатора изображений «Имаджер-ЦГ», с предлагаемой программой и пользовательским интерфейсом плоидометрического исследования клеток и тканей, качественно повышают уровень патогистологических исследований и открывают новые возможности для морфологической диагностики болезней и опухолей;
- впервые полученные возможности объективизации гистологической и цитологической диагностики новообразований различной локализации являются новым направлением в медицинской науке и практике;
- с помощью разработанной методики исследования можно следить за процессами регенерации и атрофии тканей, уточнять дифференциальную диагностику, следить за действием лечебных факторов на новообразования, развивать принципы «доказательной медицины».
- 5. Выполнены патентные и маркетинговые исследования, в том числе, презентация реализованной в ППО «ИМАДЖЕРМЕДИА» медико-диагностической методики плоидометрии, на Европейском конгрессе патологов (Берлин) в сентябре 2001г. По результатам маркетинговых мероприятий получены предварительные запросы на прибор 15-ти зарубежных и 7-ми российских пользователей.

Результаты данной работы по практическому применению изделия «Имаджер-ЦГ», выявленная маркетинговая оценка продукции класса видеокомпьютерных комплексов, а также достигнутый уровень проработки и унификации программно-аппаратных средств автоматизированного анализа визуальных данных, дает основания считать целесообразным и коммерчески перспективным продолжение работ по данному научнотехническому направлению в следующих областях:

- исследования по расширению номенклатуры медико-диагностических областей применения модернизированной модификации видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» и организация и проведение сертификации в МЗ РФ, с включением в перечень обязательных медицинских обследований, проводимых в онкодиспансерах и патологоанатомических отделениях больниц;
- исследования применимости видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» в промышленной диагностике и контроле безопасности. Представляются перспективными проекты, направленные на опережающую разработку и внедрение специализированных модификаций видеокомпьютерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА», например, таких как

компьютерный видеотелефон, компьютерный полиэкранный телевизор, видеокомпьютерная система контроля транспортных потоков.

Настоящий научно-технический отчет состоит из Введения, 4-х глав, Выводов и списка Литературы (46 наименований), и содержит 108 стр., 29 рис., 10 табл.

Глава 2 «ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА «ИМАДЖЕР» В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ» составлена по представленным медицинскими соисполнителями работы материалам выполненных ими медико-биологических исследований, в том числе:

- раздел 2.2. ГЕМАТОЛОГИЯ. Диагностика болезней системы крови

Исполнители: д.м.н., проф. Г.Г. Автандилов,

д.м.н., проф. О.В. Зайратьянц,

д.м.н., проф. Н.А. Пробатова

- раздел 2.3. ОНКОЛОГИЯ
  - 2.3.1. Диагностика опухолей молочной железы.

Исполнители: д.м.н., проф. Г.Г. Автандилов, патологоанатом С.Г. Григорьева

2.3.2. Диагностика опухолей предстательной железы.

Исполнители: д.м.н., проф. Г.Г. Автандилов, к.м.н. Л.В. Гундорова

2.5. Оптимизация радиационно-химического лечения

Исполнители: д.м.н., проф. Г.Г. Автандилов, врач-радиолог С.М. Банов

# 1. ВИДЕОКОМПЬЮТЕРНЫЙ КОМПЛЕКС «ИМАДЖЕР»

Одна из целей настоящей НИОКР состояла в исследованиях эффективности практического использования перспективного видеокомпьютерного инструментария анализа изображений биопрепаратов в медицинской диагностике и возможностей совершенствования морфологической диагностики на этой технической основе. В качестве базового для этих исследований изделия был принят «Комплекс аппаратно-программный обработки и анализа цитологических и гистологических изображений «Имаджер-ЦГ», разработанный в инициативном порядке АНО ИНАТ МФК и рекомендованный к применению в медицинской практике МЗ РФ в декабре 2000 г.

# 1.1. СОСТАВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ

Прибор «Имаджер-ЦГ» относится к классу унифицированых видео-компьютерных комплексов автоматизированного анализа изображений и состоит из стандартной покупной аппаратуры и прикладного программного обеспечения (рис. 1.-1).

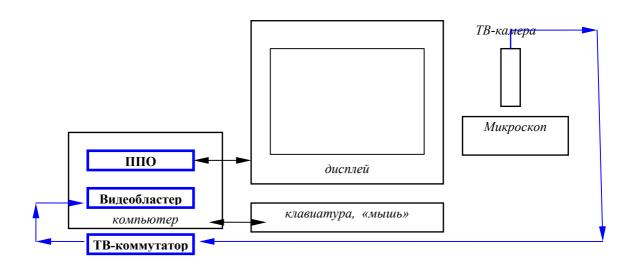


Рис. 1.-1. Блок-схема видеокомпьютерного комплекса «Имаджер-ЦГ».

Аппаратная унификация строится на использовании, в качестве универсального вычислителя, «IBM PC»-совместимого персонального компьютера (ПК), который даже в минимальной конфигурации уже имеет в своем составе системные устройства хранения, отображения и передачи данных, а процессор компьютера, вместе с программным обеспечением, фактически обеспечивает функции универсального вычислителя для широкого класса задач.

Для видеокомпьютерных комплесов обработки и анализа изображений в конфигурацию ПК включают унифицированные средства обработки изображений - видеобластер и ТВ-коммутатор, - которые штатно встраиваются в компьютер как дополнительные периферийные устройства и обеспечивают сопряжение компьютера с реальными изображениями стандартного телевизионного формата, т.е. их отображение на дисплее и запись (в цифровом виде) на жесткий диск ПК.

Вышеупомянутый специальный коммутатор телевизионных (видео-) сигналов обеспечивает дополнительные пользовательские возможности по одновременному подключению к компьютеру нескольких ТВ-камер и дополнительных видеоконтрольных устройств.

Аппаратура для обработки изображений включает также следующие классы техники:

- аппаратура отображения изображений (телевизоры, видеоконтрольные мониторы, дисплеи и пр.);
- аппаратура формирования первичных видеоданных, т.е. исходного изображения (ТВ-камеры и другие датчики сигналов).

Унифицированный видео-компьютерный комплекс может включать и дополнительное стандартное оборудование для формирования и отображения анализируемых видеоданных. Для медико-биологических иследований таковым оборудованием является микроскоп, который сопрягается с комплексом (ПК) посредством установленной на триокуляре микроскопа ТВ-камеры.

Общие технические требования к стандартному оборудованию для унифицированного видеокомпьютерного комплекса анализа изображений приведены в табл. 1.-1.

Основным функциональным блоком унифицированного видеокомпьютерного комплекса класса «Имаджер» является прикладное программное обеспечение (ППО), вычислительная часть которого базируется на универсальном алгоритме детектирования и классификации объектов (яркостных пятен), а пользовательский интерфейс ППО может видоизменяться в зависимости от специфики конкретной области применения.

В целях унификации, прикладное программное обеспечение должно функционировать в среде Windows'9x, управляя аппаратной частью (ТВ-коммутатором и видеобластером), выполняя обработку и анализ полноформатных цветных изображений и отображение как исходных видеоданных, так и результатов автоматического анализа.

# Таблица 1.-1.

Стандартное	Технические требования	Примеч.
оборудование		
КОМПЬЮТЕР	КОНСТРУКТИВ: наличие свободных слотов шины "РСІ"	
	(для установки видеобластера) и шины "ISA" (для	
	установки ТВ-коммутатора)	
	ПРОЦЕССОР: класса «Пентиум-1»	
	ОЗУ: от 16 Мбайт	
	НЖМД: от 1 Гбайта	
	СИСТЕМНОЕ ПО: операционная система Windows'9x;	
	сопутствующие сервисные программы (текстовый	
	редактор, драйвера принтера и факс-модема)	
	ДИСПЛЕЙ: разрешение не ниже 800*600 "High color";	
	размер экрана, желательно, не менее 15 дюймов (по	
	диагонали)	
	ПРИНТЕР: стандартный	
	ФАКС-МОДЕМ: стандартный	
МИКРОСКОП	КОНСТРУКТИВ: наличие посадочного места для ТВ-	
	камеры (триокуляр)	
	ОПТИКА: в соответствии с медико-технологическими	
	требованиями выполняемых обследований	
ТВ-КАМЕРЫ	КОНСТРУКТИВ: стандартный, без объектива, с блоком	
	питания от сети 220 В	
	ВЫХОД: стандартный видеосигнал с привязкой к «0»	
	МИШЕНЬ: размер по диагонали не менее 1/2 дюйма	
	РАЗРЕШЕНИЕ: не менее 600*400 пкс/кадр	

# 1.2. УНИФИЦИРОВАННОЕ АЛГОРИТМИЧЕСКО-ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ «ИМАДЖЕРМЕДИА»

Актуальность исследований в области распознавания образов — слабоформализуемых данных — и, в частности, изображений, и сегодня обуславливается теми же причинами, что и 20 и 50 лет тому назад, а именно:

- нарастающей потребностью в автоматизации так называемой интеллектуальной деятельности человека по выявлению и интерпретации различной информации;
- существенными затратами по подготовке технической реализации распознающих автоматов, связанными с необходимостью предварительного экспертного изучения и формализации каждой конкретной прикладной задачи;
- наличием «альтернативных» техническим биологических систем, механизмы переработки информации которых с очевидной легкостью обеспечивают функцию распознавания.

Во всех случаях анализа и распознавания изображений операции автоматической переработки видеоинформации решают две основные задачи:

- обнаружение, т.е. выделение из изображения (фона) участков, предположительно соответствующих искомым объектам либо их отличительным фрагментам;
- опознание, т.е. отнесение (классификация) анализируемого объекта к одному из распознаваемых классов объектов.

Анализ технических распознающих систем показывает, что они используют принципиально априорный эталон  $\{P(i)\}$ , который представляет собой предварительно формализованное описание решаемой задачи. Принятие решения R(t) при предъявлении внешних ситуаций  $\{F(t)\}$  строится на основе нахождения максимума подобия M[\*] между одним из эталонов P[i] и текущей ситуацией F(t). В качестве априорного эталона используют либо микроструктурный образ объекта («корреляционный» метод), либо набор его характерных свойств («структурно-лингвистический» метод). При этом появляется принципиальная необходимость заблаговременного формирования эталона на основе предварительного изучения решаемой задачи распознавания и ее формализации. Эта процедура «статистического обучения» тем менее эффективна, чем более вариабельны входные данные.

В общем случае исходные данные - изображение - воспринимаются автоматом как множество  $\pi\left(\bar{x},t,\bar{\varphi}\right)$  независимых точек — пикселов, - в котором в пространственновременных координатах  $(\bar{x},t)$  присутствуют и значимые для распознавания

информативные элементы  $\overline{\phi}(\bar{x},t)$ . При этом, во-первых, априори неизвестно, какого рода конфигурации могут информативными служить оказаться И элементами формализованного описания. Во-вторых, даже если типы такого рода фрагментов и определены, в каждом конкретном случае требуется своя специализированная процедура их выделения на полном множесте комбинаторных возможностей, которые предоставляет исходная яркостная микроструктура изображения после квантования и дискретизации. Втретьих, существенным помеховым фактором, создающим априорную неопределенность в задачах автоматического анализа изображений, является неограниченная изменчивость условий наблюдения одних и тех же даже объектов по масштабам, ракурсам, окружающему фону, условиям освещения и прочим визуальным параметрам.

Таким образом, использование априрного признакового эталона создает принципиальные ограничения для технических систем принятия решений в условиях априорной неопределенности и распознавания слабоформализуемых сигналов.

Для преодоления данных методических ограничений делается попытка построения универсального алгоритма распознавания изображений, исходящего из обобщенного определения, или физического представления, визуального объекта как яркостного силуэта, для которого может иметь место универсальное полное пространство его первичных яркостно-геометрических характеристик, из которых могут быть вычислены все необходимые для распознавания, т.е. классификации с любой точностью, информативные признаки. На этой основе появляется возможность унификации алгоритма распознавания произвольных изображений, сводимого к обнаружению – детектированию – яркостных силуэтов, т.е. объектов, и последующей их классификации – распознавания – по яркостно-геометрическим параметрам.

В общем случае, анализируемое изображение f(t)=f(x,y) представляет собой множество  $\Phi$  точек

$$f(x,y) = \Phi = \{ \varphi_{i,j} \}, \quad i,j \in \overline{x}$$

Выделение искомых объектов заключается в нахождении в  $\Phi$  таких подмножеств, элементы которых связаны определенными соотношениями r. Теоретически имеется возможность рассмотрения искомых объектов, впервые объявленная в так называемом лингвистическом (или структурном) подходе к распознаванию, как простейших элементов изображения, отношения между которыми и определяют собственно семантику изображения, и на индивидуальных и взаимных свойствах которых строится его формализованное описание.

В соответствии с развиваемым подходом предлагается использовать в качестве таковых примитивов яркостные пятна, т.е. области приблизительно одинаковой яркости, на которые распадается (или которые составляют) любое изображение произвольной природы. В качестве элементов формализованного описания изображения данные области обладают следующими преимуществами:

1) множество F областей  $\theta_i$  полностью покрывает изображение  $\Phi$  так, что

$$\begin{split} F &= \big\{ \theta_i \big\}, & \qquad \bigcup \theta_i = F = \Phi, & \qquad \bigcap \theta_i = 0 \\ i &\in S & \qquad S << N^2 & \qquad i \in S \end{split}$$

- 2) общность понятия яркостного пятна разрешает любые конфигурации областей  $\theta_i$  от размера всего растра до одиночной точки изображения;
- 3) информативность областей  $\theta_i$  состоит в возможности построения полного пространства признаков P из признаков двух типов.

Микроструктурные признаки  $p_i$ , которые представляют индивидуальные характеристики областей и могут быть определены с помощью моментов  $m^{\alpha\beta}$  (вычисляемых на пространстве каждой области)

$${p_i} = {f_i(\theta_k, m^{\alpha\beta})} = \iint_{\theta_k} F(x, y)(x - m_{01})^{\alpha} (x - m_{10})^{\beta} dxdy$$
,  $i \in R$ 

R — номенклатура микроструктурных признаков.

Топологические признаки  $\widetilde{p}_j$ , которые представляют групповые характеристики областей и могут быть определены, в частности, с помощью моментов  $m^{\alpha\beta}$  (вычисляемых на пространства групп областей - кластеров)

$$\left\{ \widetilde{p}_{j} \right\} = \left\{ \psi_{j} \left( \left( \gamma_{e} \left[ \theta_{n} \right] \right), m^{\alpha \beta} \right) = \iint_{\gamma_{e}} F(x, y) (x - m_{01})^{\alpha} (x - m_{10})^{\beta} dx dy \right\}$$

T – номенклатура топологических признаков;

$$P = \{p_i\} \cup \{p_j\}$$
$$i \in R \quad j \in T$$

В качестве основных первичных яркостно-геометрических и топологических характеристик, вычисляемых для детектированных объектов-пятен, и необходимых для распознавания, предлагаются следующие параметры (табл. 1.-2):

Параметры	Описание
Яркость серого_ср	Средняя по силуэту объекта (всем точкам-пикселам, входящим
a u	в данный объект) <i>яркость «серого»</i> изображения
Яркость серого_Инт	Суммарная по силуэту объекта яркость «серого» изображения
Площадь	Количество точек-пикселов, входящих в данный объект
Форма1 =	Первый коэффициент формы, равный отношению Площади
Площ/габ_Площ, %	объекта к его габаритной Площади
Соседи близкие	Количество других объектов-пятен, непосредственно
	касающихся данного объекта-пятна
Внутренние Области	Количество объектов-пятен, полностью входящих
	(покрываемых) силуэтом данного объекта-пятна
Периметр	Количество контурных точек данного объекта-пятна, т.е.
	точек-пикселов, граничащих с другими объектами
Граница Левая	Минимальное значение координаты «Х» габаритного
	прямоугольника силуэта объекта
Граница Верхняя	Максимальное значение координаты «У» габаритного
	прямоугольника силуэта объекта
Граница Правая	Максимальное значение координаты «Х» габаритного
	прямоугольника силуэта объекта
Граница Нижняя	Минимальное значение координаты «У» габаритного
_	прямоугольника силуэта объекта
Концы Левые	Коэффициент формы силуэта объекта, характеризующий число
	его выступов (выпуклостей), направленных влево
Концы Правые	Коэффициент формы силуэта объекта, характеризующий число
•	его выступов (выпуклостей), направленных вправо
Концы Верхние	Коэффициент формы силуэта объекта, характеризующий число
•	его выступов (выпуклостей), направленных вверх
Концы Нижние	Коэффициент формы силуэта объекта, характеризующий число
•	его выступов (выпуклостей), направленных вниз
	J ( J // 1

На этой основе появляется возможность унификации алгоритма распознавания произвольных изображений, сводимого к обнаружению – детектированию – яркостных силуэтов, т.е. объектов, и последующей их классификации – распознавания – по яркостногеометрическим параметрам.

Во всех случаях анализа и распознавания изображений операции автоматической переработки видеоинформации решают две основные задачи:

- обнаружение, т.е. выделение из изображения (фона) участков, предположительно соответствующих искомым объектам либо их отличительным фрагментам;
- опознание, т.е. отнесение (классификация) анализируемого объекта к одному из распознаваемых классов объектов.

Основой соответствующих методов является эмпирическая последовательность операций переработки видеоинформации:

 предобработка и нормализация исходного изображения, т.е. формирование информативного сигнала и приведение его к виду, удобному для последующей обработки

#### и анализа;

- сегментация изображения на семантически однородные области и выделение информативных элементов, соответствующих распознаваемым объектам или их фрагментами, т.е. детектирование объектов;
- составление описаний найденных объектов и анализируемой картинки в целом и их интерпретация на основе сравнения с эталонами – собственно распознавание.

Возможности повышения качества исходного изображения рассматриваются, при конструировании унифицированного алгоритма распознавания изображений, в соответствии с теорией оптимального обнаружения сигналов в условиях априорной неопределенности, а также с учетом определения искомых объектов как яркостных пятен. В этой связи обсуждаются вопросы эффективности различного типа фильтраций для повышения отношения «сигнал/шум» с целью контрастирования такого рода искомых объектов.

В задачах распознавания цель первичной фильтрации должна состоять главным образом в выделении (подчеркивании, контрастировании) в качестве информативных фрагментов каких-либо локальных особенностей, "неоднородностей" изображения. Применительно к выделению яркостных пятен это означает, что целесообразно селектировать не просто области постоянной яркости, но такие, которые контрастируют с близлежащим фоном.

Как наиболее оптимальные для рассматриваемого случая выбираются пространственная фильтрация в амплитудном пространстве исходного изображения и логическая фильтрация в пространстве первично детектированных объектов-пятен. Соответствующие, выбранные в качестве основных, операции обработки изображений, необходимых для повышения достоверности распознавания, приведены в табл. 1.-3.

Таким образом, предлагается унифицированный алгоритм распознавания произвольных изображений, состоящий из следующих процедур:

- предварительная нормализация изображения, обеспечивающая повышение отношения «сигнал/шум», предназначающаяся для контрастирования искомых объектов;
  - детектирование объектов-пятен по критерию пространственно-яркостной связности;
- вычисление унифицированного набора первичных характеристик для множества детектированных объектов-пятен;
- кластеризация пятен по яркостно-топологическим параметрам, имеющая смысл логической фильтрации шумов в пространстве детектированных объектов;
- вычисление унифицированного набора первичных характеристик для множества объектов-кластеров;
  - оптимизация множества объектов-кластеров по априорной информации;

- классификация и идентификация изображения в целом и\или объектов-кластеров по признакам, вычисленным из первичных яркостно-пространственных характеристик.

Таблица 1.-3.

Обработки

Описание

Градиенты

Выделение фронтов — градиентов — на исходном изображении, т.е. каждое значение яркости "А" заменяется на "Подставка+\первая производная от А по окрестности\". \Первая производная от А по окрестности\ вычисляется для каждой точки-пиксела по ее окрестности. Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров, так что можно соответствующим подбором их значений изготовить обработку любого типа.

КОНТРАСТ

Контрастирование исходного изображения добавлением интегрального контраста каждой точки, т.е. каждое значение яркости "A" заменяется на "A+\A-AcpИHT\".

АсрИНТ вычисляется как среднее по всему исходному изображению. Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров, так что можно соответствующим подбором их значений изготовить обработку любого типа.

Негатив

Преобразование исходного изображения в негативное, т.е. каждое значение яркости "А" заменяется на "255-А".

Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров, так что можно соответствующим подбором их значений изготовить обработку любого типа.

Негатив

Преобразование исходного изображения в негативное, т.е. каждое значение яркости "A" заменяется на "255-A".

Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров, так что можно соответствующим подбором их значений изготовить обработку любого типа.

Нормализация

Контрастирование исходного изображения добавлением локального контраста каждой точки, т.е. каждое значение яркости "A" заменяется на "A+\A-AcpЛОК\".

АсрЛОК вычисляется для каждой точки-пиксела исходного изображения как среднее по окрестности.

Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров....

Силуэты

Выделение силуэтов на исходном изображении, т.е. каждое значение яркости "А" заменяется на "Подставка+\вторая производная от А по окрестности\". \Вторая производная от А по окрестности\ вычисляется для каждой точки-пиксела по двум ее окрестностям.

Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров, так что можно соответствующим подбором их значений изготовить обработку любого типа.

<u>Яркость</u>

Усиление (Ослабление) яркости исходного изображения добавлением константы, т.е. каждое значение яркости "А" заменяется на "А+Подставка". Для данной обработки открыт для редактирования весь набор параметров, так что можно соответствующим подбором их значений изготовить обработку любого типа.

Программная реализация предлагаемого унифицированного алгоритма распознавания изображений выполнена в виде макетной версии «ИМАДЖЕРМЕДИА», являющейся модернизацией ППО «Имаджер-ЦГ».

Программный комплекс «ИМАДЖЕРМЕДИА» был предоставлен медицинским соисполнителям работы и на нем выполнялись медико-биологические исследования 2-го и 3-го этапов опытной эксплуатации прибора «Имаджер-ЦГ».

# Пользовательский интерфейс программного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА»

«ИМАДЖЕРМЕДИА» штатно устанавливается, с помощью инсталляционного пакета, на любой компьютер класса IBM PC с операционной системой Windows, и запускается, как любая другая программа, двойным нажатием «мышкой» на ярлык программы.

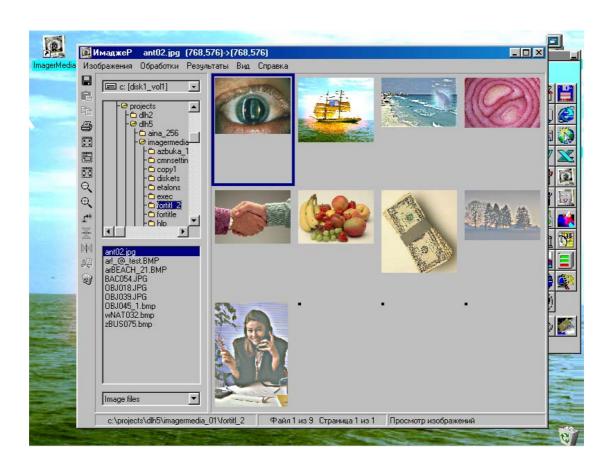


Рис. 1.-2. Основная форма-окно программы « ИМАДЖЕРМЕДИА».

«ИМАДЖЕРМЕДИА» это компьютерная программа, которая выполняет в интерактивном Пользователя, преобразования режиме, ПО командам цифровых изображений, также управляет совместимыми **IBM** PC устройствами приема, отображения и регистрации телевизионных видеосигналов.

Минимальная конфигурация изделия — это программа «ИМАДЖЕРМЕДИА», установленная (инсталлированная) на персональный компьютер - ПК класса IBM PC - под операционной системой Windows.

Максимальная конфигурация изделия «ИМАДЖЕРМЕДИА» дополняется стандартным для видеокомпьютерного мониторинга оборудованием: Видеобластер, ТВ-коммутатор, ТВ-камеры, монитор, видеомагнитофон, компьютерная периферия (факс-модем, сетевая плата) и специальными устройствами наблюдения (например, микроскоп с триокуляром).

«ИМАДЖЕРМЕДИА» обеспечивает:

- Сервисные форматные преобразования графических файлов цифровых изображений;
- Наблюдение и регистрацию «живого» видео телевизионных изображений;
- Редактирование и изготовление цифровых изображений;
- Обнаружение объектов на изображении;
- Измерения свойств объектов и их распознавание;
- Специальные прикладные исследования изображений для медицинской диагностики, в частности, плоидометрические обследования биомедицинских препаратов, иммуногистоцитометрические исследования, денситоморфометрические измерения.

«ИМАДЖЕРМЕДИА» - это комплекс программно-аппаратных средств на основе персонального компьютера, предназначенный для РАСПОЗНАВАНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ:

- обнаружения на любом отдельно взятом изображении множества фрагментовучастков, каждый из которых может считаться самостоятельным «объектом»,
  - измерения яркостных, геометрических и топологических свойств этих объектов,
  - накопления данных результатов распознавания в компьютере.

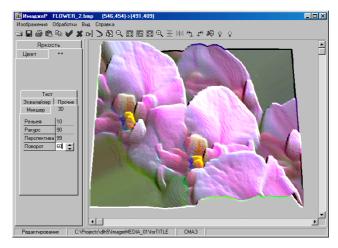
«ИМАДЖЕРМЕДИА» может использоваться во всех областях, где решения принимаются на основе анализа видеоданных

- детекция изменений,
- промышленный контроль качества,
- медицинская диагностика,
- научные исследования.

Комплекс может использоваться в медицинской практике и в научно-исследовательской работе в областях цитогенетики, цитологии, гистологии, патологии при амбулаторных и профилактических обследованиях, в клинических наблюдениях для диагностики заболеваний и в медико-биологических научных исследованиях.

ПОЛЬЗОВАТЕЛЬ работает с программой «ИМАДЖЕРМЕДИА» посредством нескольких форм-окон, оптимизированных под различные режимы наблюдения, обработки и анализа изображений.





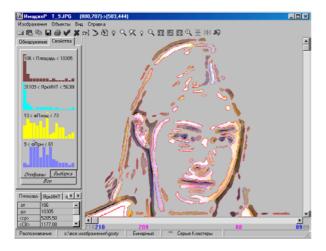




Рис. 1.-3. Формы-окна программы «ИМАДЖЕРМЕДИА».

Компьютерный анализ изображений предполагает наличие исходных данных в виде массива чисел, хранимых в компьютере.

Операция формирования числовых массивов, соответствующих изображениям, - <u>регистрация</u> изображений - выполняется посредством специальных устройств оцифровки (например, видеобластер), которые должны сопрягаться с компьютером.

Во всех случаях анализа и распознавания изображений операции автоматической переработки видеоинформации решают три основные задачи:

- <u>предобработка</u> исходного изображения для улучшения его качества, в первую очередь, в части «контрастирования» и «повышения четкости» искомых объектов;
- <u>обнаружение</u>, т.е. выделение на изображении, участков-фрагментов, соответствующих искомым объектам либо их отличительным фрагментам;

- <u>распознавание</u>, т.е. отнесение отдельного объекта или всего изображения с набором обнаруженных на нем объектов, к одному из заданных классов.

В программе «ИМАДЖЕРМЕДИА», соответственно этой методологии, возможны различные режимы работы, для каждого из которых открывается — включается собственная форма-окно.

При включении—запуске программы всегда открывается первая - просмотровая форма (окно), - которая предназначается для поиска в компьютере и просмотра изображений.

Режим - <u>Просмотр изображений</u> — выполняется в этой первой просмотровой форме открытием соответствующей директории жесткого диска компьютера. В этой же просмотровой форме-окне имеется возможность форматных, масштабных преобразований изображений, а также их стирания (удаления) с диска.

Переключение режимов работы с изображениями осуществляется с помощью МЕНЮ просмотровой формы (и Меню других форм-окон), а также с помощью кнопок управляющих панелей.

При закрытии форм-окон для анализа и обработок изображений программа возвращается в просмотровую – первую - форму.

Режим - <u>Наблюдение и регистрация «живого» видео</u> — включается выбором (нажатием «мышью») в основном МЕНЮ первой просмотровой формы

МЕНЮ: \«Изображения» \«Видео»

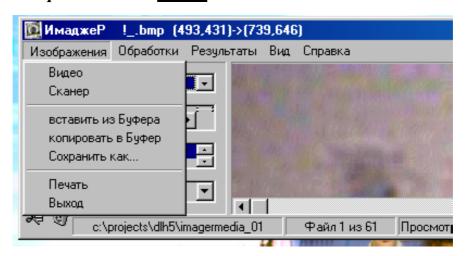


Рис. 1.-4. Выбор режимов «живого» видео.

При «фотографировании» видеоизображений в режиме «Видео» программа записывает изображения в поддиректорию /video/ рабочей директории с именами /ГГММДД/ /текущий номер/.bmp

Режим - <u>Редактирование и изготовление цифровых изображений</u> — включается выбором (нажатием «мышью») в основном МЕНЮ первой просмотровой формы

МЕНЮ: \«Обработки» \«Редактирование»

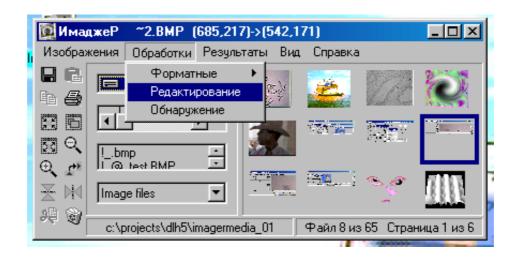


Рис. 1.-5. Выбор режимов редактирования изображений и обнаружения объектов.

Режим – <u>Обнаружение объектов</u> – включается выбором (нажатием «мышью») в основном МЕНЮ первой просмотровой формы

МЕНЮ : \«**О**бработки» \«<u>О</u>бнаружение»

Выбор форм-окон приложений, в которых были сохранены результаты обнаружения объектов, для измерения свойств объектов и их распознавания, а также для плоидометрических обследований биомедицинских изображений, производится с помощью диалогового окна «Приложения», которое вызывается при нажатии раздела «Результаты» МЕНЮ просмотровой формы.

Режим — <u>Измерения свойств объектов и распознавание</u> — включается (нажатием «мышью») выбором либо

в форме-окне обнаружения объектов с помощью основного Меню этой формы

Меню: \«Объекты» \«Сохранить» \«<u>Текущие</u>»

...\ «автоОбработка»

либо в основном МЕНЮ первой просмотровой формы

# МЕНЮ: \«**Результаты**»

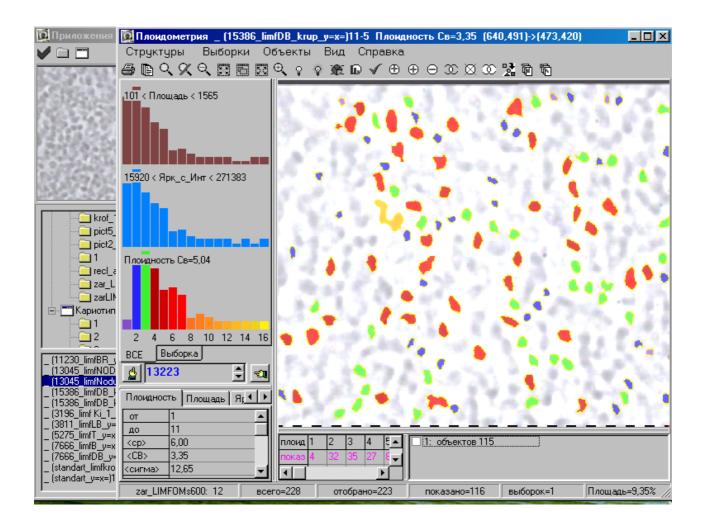


Рис. 1.-6. Режим измерения и анализа свойств объектов.

Режим — <u>Плоидометрические исследования - ПЛОИДОМЕТРИЯ</u> — является специализированным распознаванием свойств объектов по их интегральной яркости относительно задаваемого эталонного значения и включается выбором Пользовательских разделов приложения «Плоидометрия» в диалоговом окне «Результаты».

Режим — <u>Кариотипирование</u> — является специализированным распознаванием свойств объектов (первых 46-ти по площади) и включается выбором Пользовательских разделов приложения «Кариотипирование» в диалоговом окне «Результаты».

# 2. ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА «ИМАДЖЕР» В МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Описательная морфология патологических изменений в органах и системах в ряде случаев остается субъективной И диагнозы плохо воспроизводятся разными специалистами. Общеизвестны различные трактовки одних и тех же гистологических препаратов высококвалифицированными патологами [5]. Особенно трагичны для больных по последствиям случаи расхождений в морфологической диагностике начальных стадий формирования опухолевого процесса, определения вопросов гистогенеза опухолей и заболеваний кроветворных органов, a также решения многих клинических прогностических задач. Не решены проблемы подбора оптимальной дозировки лечебных воздействий на опухоль в разных периодах лечебных вмешательств.

В этом плане при микроскопическом анализе биопрепаратов открываются новые возможности в повышении качества диагностирования, поскольку более доступным становится строгий количественный анализ свойств биообъектов и биопроцессов. В биологии и медицине эта проблема всегда актуальна, поскольку естественное разнообразие, сложность и многофакторность изучаемых в них процессов, происходящих на разных уровнях морфологической организации живых объектов - генетический аппарат, ультраструктуры, ядро, клетка, ткань, межклеточные взаимоотношения, орган, система - требуют, для более точной и объективизированной классификации, и более точного количественного анализа различий в частоте появления и изменения морфологических И патологических признаков, статистической достоверности и диагностического значения, динамики изменений и тенденций дальнейшего развития изучаемого явления.

В частности, патологические процессы и их морфологические проявления имеют ряд неразрывно связанных признаков качественного и количественного характера. Поэтому результаты таких измерений позволяют объективизировать проведение дифференциальной морфологической диагностики, например, стадий дисплазий и рака, развивающихся в разных органах и системах, точнее оценивать типы и выраженность воспалительных реакций, однотипно устанавливать степень регенеративных и некротических процессов в тканях, выраженности дистрофических изменений, особенностей и интенсивности гистохимических и иммуногистохимических реакций. Важным разделом этих анализов является возможность объективно устанавливать стадию и степень выраженности опухолевых изменений, определять этапы канцерогенеза. Последнее весьма важно для организации адекватного лечения онкологических больных и решения вопросов прогноза.

Перспективы повышения качества медицинской диагностики в большой мере связываются с использованием современных информационных технологий, базирующихся на видео-компьютерной технике и математических методах анализа слабоформализуемых данных. Весьма полезным инструментарием для количественного морфологического анализа являются видеокомпьютерные анализаторы биомедицинских изображений, которые уже достаточно широко применяются в биологических и медицинских исследованиях.

В 2000 г. Минздравом РФ аттестован один из новейших приборов такого типа - «Имаджер-ЦГ», разработанный и внедряемый Отделением компьютерной бионики ИНАТ МФК, г. Москва.

Прибор успешно прошел медицинские испытания в Российской медицинской академии последипломного образования, Научном центре хирургии РАМН, Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова.

Изделие «Имаджер-ЦГ» обеспечивает автоматизацию медико-технологического процесса регистрации, наблюдения и анализа изображений биопрепаратов, а также документирование результатов в виде типовых карт обследования. Прикладная программа «Имаджер-ЦГ» оптимизирована для автоматического детектирования биомедицинских объектов на микроскопных изображениях биопрепаратов, автоматического вычисления их морфоденситометрических и структурных характеристик (яркость-оптическая плотность, размер, центромер, коэффициенты формы и т.д.), оперативного редактирования результатов автоматического анализа и представления (документирования) их в стандартном виде принятых форм (карт) обследования.

Программа «Имаджер-ЦГ» обеспечивает пользователю возможности проведения медицинских обследований «Кариотипирование» и «Гистоцитопатология».

Алгоритм анализа изображений, реализованный в программе «Имаджер-ЦГ», состоит из следующих основных этапов:

- Автоматическое, без обучения и без ручного указания, детектирование биообъектов и вычисление их морфоденситометрических характеристик;
- Интерактивные выборки подмножеств достоверно детектированных биообъектов с отображением их вычисленных свойств.

Комплекс «Имаджер-ЦГ» может использоваться в медицинской практике и в научноисследовательской работе в областях цитогенетики, цитологии, гистологии, патогистологии при амбулаторных и профилактических обследованиях, в клинических наблюдениях для диагностики заболеваний и в медико-биологических научных исследованиях. При этом исследуемые биопрепараты приготавливаются стандартно, по соответствующим медико-технологическим методикам, на специально предназначенном для этого оборудовании цитологических, генетических и гистологических лабораторий, в виде цитологических и гистологичесих объектов из кусочков тканей, получаемых при биопсиях и пункциях, проведенных у пациентов.

Вышеизложенные обстоятельства явились основанием для расширения исследований применимости и эффективности комплекса «Имаджер-ЦГ» в медико-биологических обследованиях различных направлений. На данном этапе работ перспективным, с медикобиологической точки зрения, представляется расширение номенклатуры обследований типа гистоцитопатологических, целью которых является получение статистически достоверной оценки ряда морфоденситометрических параметров большого числа биообъектов - клеток. Именно в таком режиме можно получить максимальный эффект от автоматизированной компьютерной обработки изображений, характеризующейся абсолютной воспроизводимостью результатов, высокой скоростью получения объективизированных количественных оценок и практически неограниченной памятью, необходимой и достаточной для накопления фактических данных.

Перспективной для медицинской диагностики представляется методика плоидометрии.

Сущность методики плоидометрии состоит в том, что интегральное качество (или – состояние) каждого биообъекта оценивается по относительному количеству содержащегося в нем вещества ДНК. При этом исходят из того, что:

- количество вещества ДНК в биообъекте пропорционально его интегральной яркости (оптической плотности), т.е. суммарной яркости всех точек изображения, относящихся к данному объекту;
- за абсолютный стандарт количества вещества ДНК в биообъекте принимают полный двойной набор хромосом ( обозначаемый «2С» ), а такими эталонными объектами, содержащими именно 2С вещества, общепринято считать ядра малых лимфоцитов.

# 2.1. МЕТОДИКА ПЛОИДОМЕТРИЧЕСКИХ ОБСЛЕДОВАНИЙ

В последние десятилетия, исходя из интересов онкологической и гематологической клиники, обсуждаются вопросы, связанные с однотипным обозначениями разных форм заболеваний. Особое внимание привлекает диагностика начальных опухолевых изменений, таких как легкая и умеренная степень дисплазий, а также выделение тяжелых форм дисплазий и рака «in situ».

Для этих состояний предложено использовать специальный термин - интраэпителиальная неоплазия, - которая подразделяется или на три или на две степени. В литературе уже широко используют подобные термины (PIN, CIN, TIN, MIN),

соответствующие начальным и пограничным опухолевым пролиферативным процессам, соответственно, в предстательной железе, в шейке матки, в яичке и в молочной железе. Указанные обозначения облегчают выбор адекватной клинической тактики и берегут психику больных, которым ставится диагноз «рак in situ». Последнее состояние является переходным, пограничным, предшествующим в течение нескольких лет настоящему инфильтрирующему раку.

Известно также, что для диагностики лейкозов необходимо провести исследования мазков крови или мазков и отпечатков аспирированного костного мозга. Для распознавания характера локализованных опухолей решающее значение приобретает гистологическое исследование срезов опухоли.

Эти же подходы необходимы и для диагностики миело-лимфопролиферативных заболеваний.

Выполнение этих предложений потребует не только однотипного и подробного описания морфологических изменений в гистологических структурах органов, но и применения дополнительных метолов исследования, **УТОЧНЯЮЩИХ** характер пролиферативной активности клонов клеток. Укажем, что пролиферативная активность клонов клеток, скорость их размножения, оцениваются по разному темпу синтеза ДНК в интерфазных ядрах. качестве таких уточняющих средств используют иммунохимические и радиоизотопные методики, требующие дорогостоящих расходных материалов.

В то же время, для этих целей правомерно использование светооптических методов и, в частности, микроспектрофотометрии биопрепаратов. Для практической деятельности патологоанатома микроспектрофотометрические методы уточняющей диагностики особенно перспективны и эффективны, поскольку, в принципе, дают возможность определить пролиферативную активность клеток, например, крови, на основе данных о содержании ДНК в ядрах клеток с помощью исследования обычных цитологических или гистологических препаратов.

## Материал и метод

Для спектрофотометрического анализа использованы цитологические и гистологические препараты (толщиной 8 мкм), окрашенные по Фельгену (без окраски фона), изготовленные из биопсийного и операционного материала. Анализ препаратов проводили на компьтерном анализаторе изображений «Имаджер-ЦГ».

В процессе диагностики были отобраны наиболее информативные показатели – площадь оптического сечения ядра клетки, ее интегральная оптическая яркость,

свидетельствующая о количестве генетического материала, и плоидность ядер. При необходимости учитывали коэффициент формы ядра.

Измеряли площадь объекта ( $A=\sum x_i$ ), где x - хорды ядер, пределы распределения яркостей объекта I (Int =  $I_{max} - I_{min}$ ), среднюю яркость объекта ( $B=\sum I$  P[I]) и интегральную яркость - сумму яркостей всех пикселей объекта.

При окраске ядер по Фельгену содержание ДНК в ядрах точно коррелирует с количеством энергии монохроматического луча (570 нм), поглощенной красителем, связавшегося с хромосомами. Эти показатели соответствуют определенным значениям интегральной яркости или оптической плотности ядра.

Для получения *«истинного стандарта плоидности»*, т.е. количества генетического материала в ядре клетки, которое точно соответствует двойномк набору хромосом, использованы данные измерений интегральной яркости ядер малых лимфоцитов [7] центрифугата крови и ядер сперматозоидов мазков спермы человека.

В работе проведено измерение 1672 ядер малых лимфоцитов в мазках крови («истинный стандарт диплоидного значения ДНК») и в гистологических срезах («тканевой стандарт», равный 2С), и для сравнения - 189 ядер сперматозоидов (гаплоидный набор хромосом, равный 1С, который в плоидометрии принимается за единицу измерения. Отметим, что использование указанного стандарта (диплоидный «индекс ДНК» - ИД, равный 2с) при исследовании цитологических препаратов рекомендован для практического применения Комитетом по номенклатуре аналитической цитометрии (1984).

В отличие от методов исследования мазков, в цитологических препаратах, когда измеряются только целые клетки и структуры, изучение гистологических препаратов имеет свои особенности, связанные с разными уровнями срезов элементов ткани, клеток и ядер. Поэтому вариабельность толщины гистологического среза и окраски разных препаратов накладывают ряд ограничений на микроспектрофотометрические исследования срезов тканей.

При определении размеров и плоидности ядер изучаемых клеток новообразований в гистологических срезах, в связи с указанным, следует строго следовать требованиям *сравнительной микроспектрофотометриии*, внедренной в патологоанатомическую практику Г.Г. Автандиловым в 1973 году [1].

Для выполнения этих требований значения интегральной яркости ядер изучаемых клонов клеток относят к интегральной яркости ядер малых лимфоцитов, которая принимается за *«тканевой стандарт плоидности»* того же среза. Эти отношения являются показателями плоидности ядер изучаемых клеток разных тканей (1,2,3,4,6).

Для получения тканевого стандарта в данном разделе работы использованы средние значения результатов измерений количества Фельген-ДНК в 1036 ядрах малых лимфоцитов в гистологических срезах стандартной толщины. Эти данные принимали за *«тканевой стандарт плоидности» - 2с.* Указанный стандарт оказался ниже значений истинного стандарта содержания ДНК в ядре нормальной лимфоидной клетки, определенного по 536 ядрам целых малых лимфоцитов в мазках центрифугата периферической крови человека.

Для получения количественной характеристики измеренных ядер получали средние арифметические значения плоидности ядер клеток и «индекс накопления ДНК» - средний взвешенный показатель, которые обобщенно характеризовали, в целом, изучаемую совокупность клеток, формирующих определенные структуры.

Для получения гистограммы распределения значений плоидности ядер клеток («профиль плоидности ядер») в каждой выборке клеток получаемые данные измерений группировали по нарастающим показателям с интервалами: 1,5c - 2,4c (парадиплоидные ядра), 2,5c - 3,4c (паратриплоидные ядра), 3,5c - 4,4c (паратетраплоидные ядра) и так далее.

Каждая выборка ядер, имеющих определенную плоидность визуализируется на экране дисплея в псевдоцветах и четко выявляет разнообразие содержания генетического материала в ядрах исследуемых клонов клеток в мазке или в гистологическом срезе. Эти показатели характеризуют качественные особенности всего распределения выборки ядер изучаемых клеток [5]. Учитывая, что интерфазное ядро в фазе «покоя» имеет двойной набор хромосом, а при синтезе ДНК увеличивается общее содержание генетического материала, используют понятие пролиферативной активности ткани. Этот индекс может характеризовать домитотическое превышение показателей диплоидного содержания ДНК на ядро клеток.

Под *пролиферативной активностью* (ПА) клеток понимали увеличение содержания ДНК в их ядрах свыше 2с, а превышение значений плоидности ядер клеток новообразований, показателей характеризующих процесс регенерации нормальной ткани, обозначали термином *«индекс клональной пролиферации»* (ИКП) [1,2,3,4].

Все данные измерений подвергали статистической обработке. Использовали средние арифметические — M, взвешенные средние арифметические («индекс накопления ДНК») -  $\overline{x}$ , среднее квадратическое отклонение -  $\sigma$  и ошибки выборки - m.) . Различия между показателями принимались достоверными при 0,95 уровне вероятности безошибочного суждения.

### 2.2. ГЕМАТОЛОГИЯ

# Диагностика болезней системы крови

Актуальной проблемой современной гематологии продолжает оставаться достоверная классификация лимфопролиферативных процессов и их диагностика.

Соответствующие изменения В ядрах клеток выявляются c помошью иммуногистохимических методик, требующих использования дорогостоящих реактивов. приемы. Отметим. что все диагностические включая новейшие ланные иммуногистохимии, основаны на использовании описательной морфологии.

Целью настоящей работы является исследование возможностей использования для диагностики болезней системы крови более точных и более доступных в клинической практике плоидометрических дифференциально-диагностических методик.

### 2.1.1. Обоснования метода.

Наука, занимающаяся изучением болезней системы крови, называется гематологией. Для диагностики нарушений в процессе кроветворения используют данные о составе периферической крови. Увеличение или уменьшение количества определенных клеток крови и их зрелость дает возможность гематологу диагностировать заболевание кроветворной системы и проводить адекватное лечение.

Однако наиболее полное представление о состоянии кроветворных органов дает изучение пунктатов костного мозга, трепанобиопсий и биоптатов лимфатических узлов, которые проводят при диагностике анемии и опухолевых заболеваний гемопоэтической системы.

Приведем краткий перечень наиболее распространенных заболеваний кроветворной системы.

Лейкозы — заболевания, характеризующиеся системным прогрессирующим разрастанием кроветворных клеток опухолевой природы. На первых фазах заболеваний лейкозные клетки разрастаются только в кроветворных органах (костный мозг, селезенка, лимфатические узлы), затем образуют лейкозные очаговые и диффузные инфильтраты в других органах. Лейкозные клетки обычно разрастаются по ходу сосудов, из-за чего повреждаются прилежащие к опухолевым разрастаниям паренхиматозные клетки этих органов.

В зависимости от степени снижения дифференцировки лейкозных клеток крови и характера течения заболевания возникают *острые или хронические лейкозы*. Среди *острых лейкозов* выделяют следующие гистогенетические формы - недифференцированный, миэлобластный, лимфобластный, монобластный, эритромиэлобластный и

мегакариобластный. Отметим, что недифференцированный острый лейкоз развивается из клеток - предшественников гемопоэтической системы.

*Хронические лейкозы*, в зависимости от источника развития, также подразделяются на лейкозы миэлоцитарного, лимфоцитарного и моноцитарного происхождения. Из большой группы лейкозов выделяют лейкозы лимфобластного генеза.

Регионарные опухолевые заболевания кроветворной ткани *представлены* злокачественными лимфомами (лимфосаркома, ретикулосаркома, грибовидный микоз, лифогранулематоз – болезнь Ходжкина).

В условиях современной цитостатической терапии весьма важно разграничивать злокачественные лимфомы от лимфолейкозов с позиций их нозологической принадлежности.

*Лимфосаркома* - злокачественная опухоль, возникающая из клеток лимфоцитарного ряда. Она может быть нодулярной и диффузной. При распространении процесса в различных органах обнаруживаются опухолевые клетки типа лимфоцитов, пролимфоцитов и лимфобластов.

Дифференциальная диагностика этих клеток по степени озлокачествления лимфоидной ткани весьма субъективна и воспроизводится разными исследователями со значительными противоречиями. В то же время, от точности этого диагноза зависит лечебная тактика и дозировка назначаемых лекарств.

Согласно данным медицинской литературы, изменение свойств лейкозных клеток связано с нарушениями в их генетическом аппарате, а также с последующим изменением качества и количества ДНК в их ядрах.

В повседневной практике у гистолога нет возможности проводить оценку пролиферативной активности лимфоидных новообразований, т.к. все ядра окрашиваются в один цвет. Интерфазное ядро клетки в «покое» содержит двойной набор хромосом, в синтетической фазе количество ДНК удваивается и наступает митоз. Определение увеличения содержания ДНК на ядро в определенной выборке ядер свидетельствует об интенсивности пролиферативного процесса. Другими словами — превышение средних показателей плоидности выборки клеток значений 2с, может отражать пролиферативную активность всей изучаемой ткани и учитываться в качестве индекса пролиферативной активности нормальной и опухолевой ткани.

## 2.2.2. Программа и результаты исследований.

В работе использованы мазки крови и гистологические срезы лимфатических узлов, толщиной 8 мкм, окрашенные по Фельгену. Материал в виде мазков и биоптатов лимфатических узлов получен у 20 больных с лимфопролиферативной патологией. Для контроля также исследовались мазки центрифугатов крови 12 здоровых людей, а также срезы нормальных лимфатических узлов (15 наблюдений).

Во всех случаях проводили гистологическую верификацию патологических процессов в соответствии с международной классификацией опухолевых болезней кроветворной и лимфоидной тканей. Отметим, что указанная классификация в последние годы постоянно расширяется и уточняется в связи с новыми иммуногистохимическими данными.

Содержание Фельген–ДНК в ядрах клеток определялось с помощью диагностического комплекса «Имаджер-ЦГ» с модернизированным программным обеспечением «ИМАДЖЕРМЕДИА».

Микроспектрофотометрические условия (микроскоп, ТВ-камера, уровень освещения биопрепарата и т.п.) сохраняли одинаковыми для всех анализов.

Для определения истинного значения содержания ДНК в ядрах малых лимфоцитов использовали мазки, изготовленные из центрифугата крови здорового человека. Мазки лимфоцитов для микроспектрофотометрии получали из гепаринизированной крови человека, разведенной в фосфатно-солевом буфере 1:1, который наслаивался на феколл-верографин с градиентом плотности в 1,077. Условия центрофугирования 400g (1500 оборотов в минуту) в течение 30 минут. Производили забор интерфазного слоя, дважды отмывали его тем же буферным раствором и из осадка пипеткой наносили одну каплю (5мкл) на предметное стекло толщиной 0,8 мм. Мазок высушивали при комнатной температуре. Окрашивали по Фельгену. Толщина покровного стекла 0,17 мм.

Согласно проведенным исследованиям 724 ядер малых лимфоцитов в мазках получены средние значения их интегральной яркости. При анализе всех клеток мазка центрифугата были выделены средние и крупные лимфоциты, ядра которых синтезировали ДНК до паратриплодного уровня и имели синий и зеленый псевдоцвета (рис.2.2.-1).

Содержание ДНК по значениям интегральной яркости в ядрах малых лимфоцитов, выделенных в мазке несколькими квалифицированными экспертами-патогистологами, автоматически показывались в синем псевдоцвете на всем мазке и на гистограмме.. Это значение интегральной яркости принимались за «истинный стандарт плоидности», который признан эквивалентом двойного набора хромосом – 2 с (рис.2.2.-2).

#### Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ 10.01.02 131 (из 165) С ср взв=2,39 020110 2-15 Площадь 118.381 Ярк\_с\_Инт 13543..44982 Плоидность С ср взв=2,39 16 15 12 4 5 6 Плоидность 3 0 0 0 0 0 51 0 0 0 0 0 0 0 80 Показано 0 0 4 94 62 5 0 0 0 0 0 0 0 0 Bcero Плоидность\_10320 Площадь Ярк с Инт 18404 161 минимум 2 36100 295 3 максимум 228,00 27252,00 среднее 2,50 25136,96 216,76 2,39 ср. взв. 3574,90 28,43 0,49 дисперсия 312,34 2,48 0.04 ошибка возраст пол Заключение Лимфоидные элементы центрифугата крови человека Дата: Медучреждение ..... Рис ... I... истем институтый

Рис. 2.2.-1.

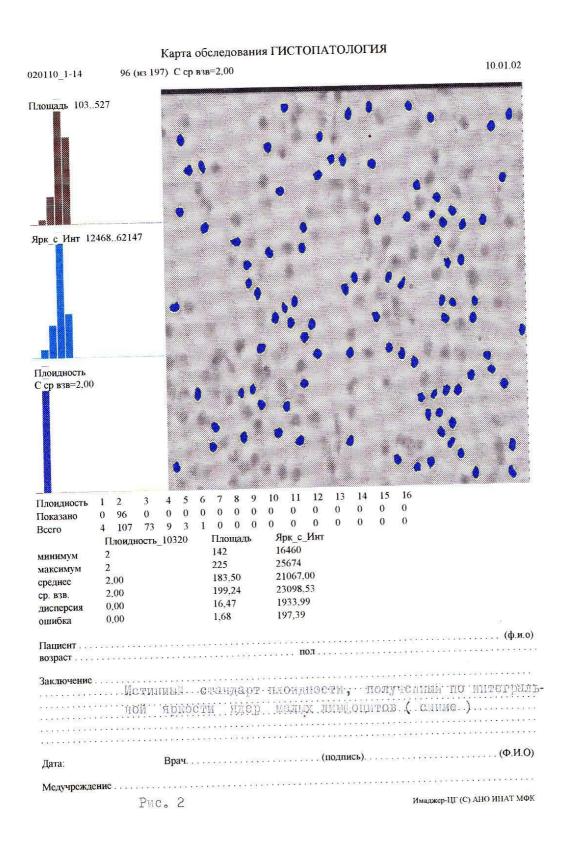


Рис. 2.2.-2.

Дополнительно для проверки методики определения плоидности ядер изучены и мазки спермы - 189 сперматозоидов, - имеющих гаплоидный, т.е. половинный набор хромосом в своих ядрах. Значения интегральной яркости ядер сперматозоидов оказались в два раза ниже, чем для ядер малых лимфоцитов. Таким образом, соотношение плоидности ядер малых лимфоцитов и ядер сперматозоидов человека точно соответствует 2:1, что подтверждает корректность проводимых на анализаторе «ИМАДЖЕРМЕДИА» измерений мазков крови здоровых людей и больных людей.

Для получения значений «тканевого стандарта плоидности» провели измерения интегральной оптической яркости 483 малых лимфоцитов в зоне Т-клеток лимфатических узлов. Определив интегральную яркость типичных малых лимфоцитов в зоне коркового вещества, приняли ее соответствующей диплоидному набору хромосом. Средние значения полученной яркости ядра малого лимфоцита в гистологическом срезе приняли за «гистологический стандарт плоидности» (рис.2.2.-3).

При анализе всех ядер среза коркового вещества лимфатического узла выделены два их вида. Преобладали ядра синего псевдоцвета и в четыре раза меньше - зеленого (рис.2.1.-5). При изучении зон реактивного центра лимфатического узла выявлены другие соотношения между клонами клеток: паратриплоидные ядра составляли немного более половины количества парадиплоидных, кроме того уже обнаруживались паратетраплоидные ядра (красного псевдоцвета). Это соотношение демонстрировало размножение клеток в рективном центре (рис.2.2.-6).

В гистологическом срезе толщиной 8 мкм сохраняются целые ядра клеток и их фрагменты, поэтому средние значения интегральной яркости ядер лимфоцитов в гистологических срезах оказались в среднем почти на 10% ниже истинных, характеризующих выборку лимфоцитов с целыми ядрами (табл. 2.2.-1).

Значения интегральной яркости ядер любых изучаемых клеток относили к стандартному значению плоидности лимфоцитов и получали показатели содержания Фельген-ДНК в ядрах в единицах плоидности (c).

Под пролиферативной активностью (ПА) клонов клеток понимали увеличение содержания ДНК в их ядрах свыше 2c. [2].

Впервые получены объективные характеристики клеточного состава нормального лимфатического узла и лимфопролиферативных процессов (таблица 2.2.-2., рис. 2.2.-6).

Таблица 2.2.-1. Сравнительная характеристика показателей средней площади и интегральной яркости ядер малых лимфоцитов мазка крови и гистологического среза.

77.4	DA METERI I	ЯДРА ЛИМ	ФОЦИТОВ
HA	РАМЕТРЫ	МАЗОК	CPE3
		Всего = 724	Всего = 483
ПЛОЩАДЬ	Среднее арифметическое	182	163
	Среднее взвешенное	192	162
	Сигма	18	7
	Ошибка	1,9	1,3
ИНТЕГРАЛЬНАЯ	Среднее арифметическое	20665	19568
ЯРКОСТЬ	Среднее взвешенное	22133	19614
	Сигма	2279	908
	Ошибка	237	171
ПЛОИДНОСТЬ	Среднее арифметическое	2,0	2,0
	Среднее взвешенное	2,0	2,0
	Сигма	0	0
	Ошибка	0	0
O	тношение		
«Интегральна	я Яркость / Площадь»	56	58

Таблица 2.1.-2. Сравнительная характеристика плоидности ядер лимфоидных клеток и коэффициентов пролиферативной активности при некоторых регионарных опухолевых заболеваниях кроветворной системы

Гистологический диагноз	Кол-во ядер	Средняя плоидность ядер (Р), с	Индекс Пролиферативной активности (Р-2с)	Кратность превышения Площади ядра Малого лимфоцита в лимфоузле (равной 150 пикселей)
Паракортикальное вещество	610	2,5	0,5	1,0
нормального лимфоузла	422	2.5	1.7	1.0
Центр размножения	432	3,5	1,5	1,2
фолликула лимфоузла				
Диффузная	620	3,5	1,5	2,0
В-клеточная лимфома				
Лимфома Беркитта	586	3,5	1,5	2,1
Хронический лимфолейкоз	530	3,9	1,9	1,6
Лимфогранулематоз	630	4,0	2,0	2,2
Т-клеточная лимфома	711	4,0	2,0	2,0
Крупноклеточная В-лимфома	481	4,0	2,0	2,2
(Ki-I положительная)		Ź		, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,
Лимфома из центрофолли- кулярных клеток	410	4,5	3,9	2,1

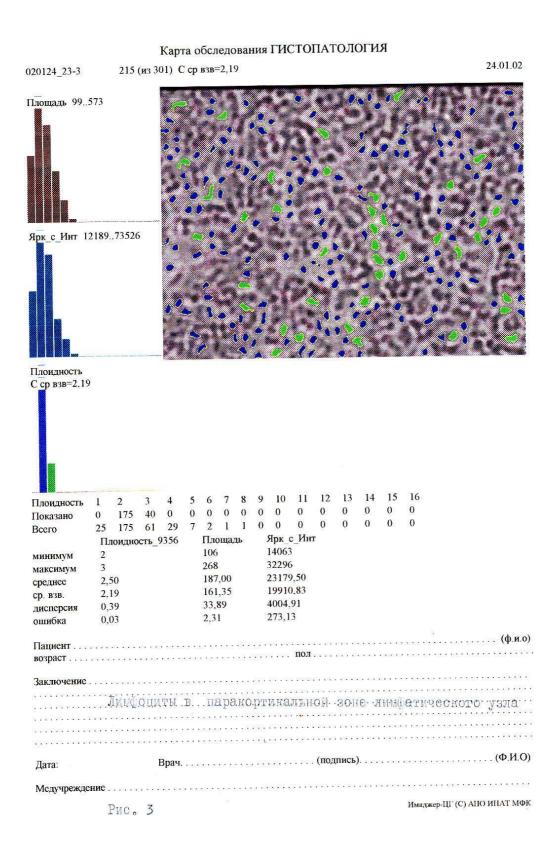


Рис. 2.2.-3.

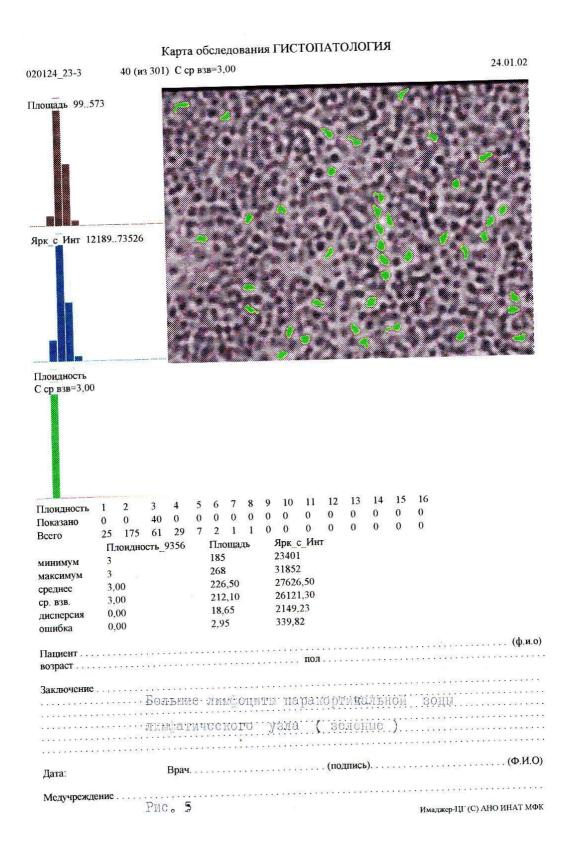


Рис. 2.2.-4.

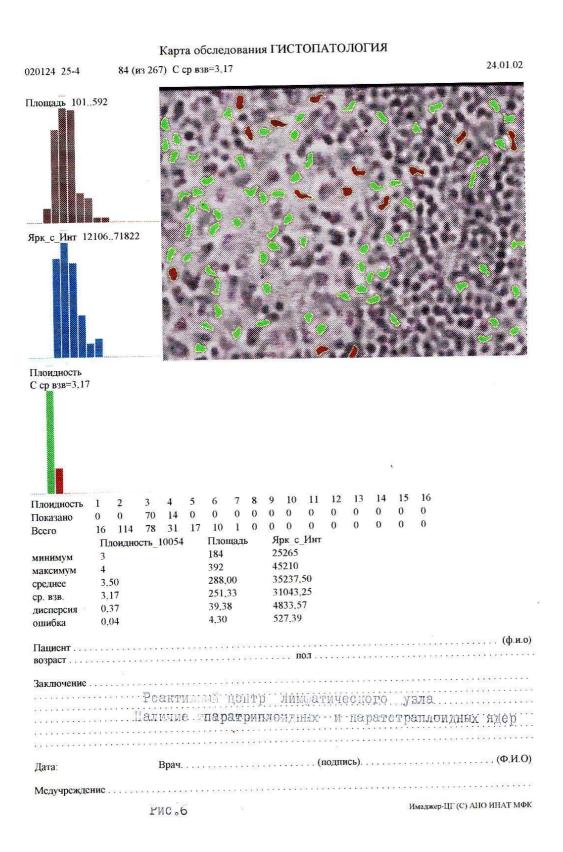


Рис. 2.2.-5.

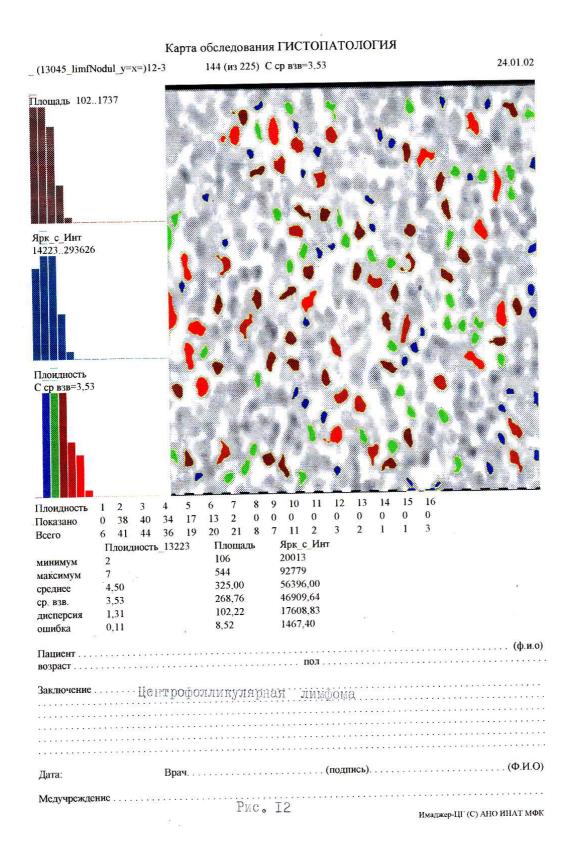


Рис. 2.2.-6.

#### 2.2.3. Выводы.

1. Полученные результаты гематологических медико-биологических исследований впервые демонстрируют возможности проведения дифференциальной диагностики различных лимфопролиферативных заболеваний с учетом плоидности и размеров ядер клеток региональных лимфопоэтических новообразований.

Плоидометрия является дополнительной объективной базой для принятия диагностических решений патогистологом. Впервые у морфолога-гематолога во время исследования препарата появляется возможность оценить и функциональное разнообразие клеток, формирующих опухолевый процесс.

- 2. Полученные плоидометрическе и морфометрические данные о лимфоидных элементах в различных лимфомах впервые демонстрируют различия в средних показателях плоидности ядер, их площади оптического сечения и пролиферативной активности ткани. Показатели пролиферативной активности клеток свидетельствуют о характере роста опухоли, отличающиеся у лимфом разного генеза.
- 3. Появление у патологоанатома возможности визуализировать количество генетического материала в ядрах лимфоидных клеток по показателям плоидности, которая наглядно демонстрируется в псевдоцветах, открывает новое направление в онкогематологической диагностике.

#### 2.3. ОНКОЛОГИЯ

#### 2.3.1. Диагностика опухолей молочной железы.

Злокачественные новообразования молочных желез в структуре онкологической заболеваемости женщин в России занимали в 1999 году почти 20%. В связи с этим, ранняя и правильная диагностика рака молочной железы продолжает оставаться весьма актуальной.

В дополнение к обычной гистологической диагностике новообразований молочной железы, проводили микроспектрофотометрическое исследование срезов тех же опухолей. Для этого весь материал подразделили на 4 группы в соответствии с собственной рабочей классификацией, включающей в себя понятие о «маммарной интраэпителиальной неоплазии» (МИН). Для дополнительного компьютерного анализа, в отличие от применяемых классификаций опухолей молочной железы [11], выделяли следующие участки препарата:

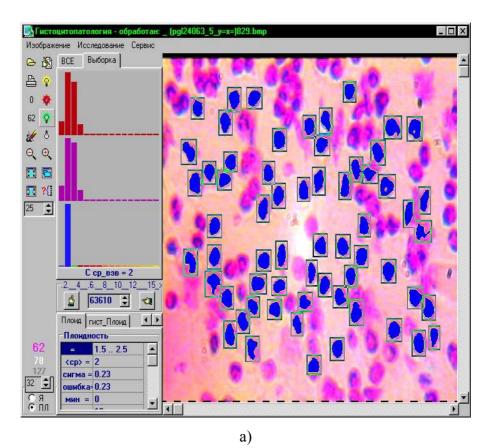
- 1) нормальное гистологическое строение железы и с признаками гиперплазии эпителия (H),
  - 2) с признаками легкой и умеренной дисплазии (МИН-1),
  - 3) с морфологической картиной тяжелой дисплазии и рака «in situ» (МИН-2),
  - 4) типичные участки инфильтрирующих дольковых (ДК) и протоковых (ПК) карцином.

На этих участках срезов биоптатов молочной железы проведен микроспектрофотометрический анализ 15142 ядер клеток долькового и протокового эпителия с определением их плоидности.

При изучении опухолей и опухолеподобных изменений молочной железы определена плоидность 9061 ядер клеток долькового эпителия и 6081 ядер клеток протокового эпителия молочной железы.

#### Результаты и обсуждение.

Анализ изменения средних показателей плоидности типичных клонов эпителиальных клеток по стадиям канцерогенеза выявил четкую закономерность нарастания показателей плоидности (и содержания ДНК в ядрах), по мере нарастания степени озлокачествления ткани железы (таблица 2.3.-1, рис.2.3.-1,-2).



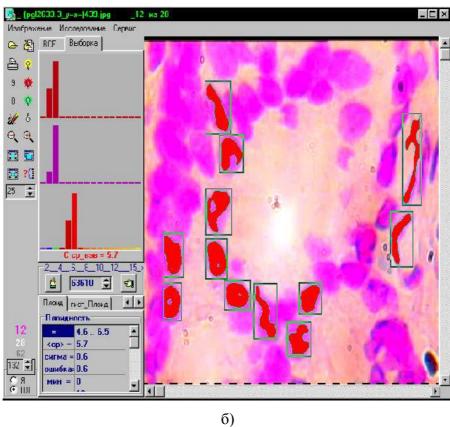


Рис. 2.3.-1. Результаты анализа гистологических срезов молочной железы.

Таблица 2.3.-1.

# Изменение количества клеток и показателей плоидности их ядер в эпителиальных структурах молочной железы по стадиям канцерогенеза

(в % ко всему материалу и по выделенным диагностическим группам).

## Дольковый эпителий ( 9061 ядро)

Плоидность	1,5-1,9	2-2,4	2,5-2,9	3-3,4	3,5-3,9	4-4,4	4,5-4,9	5-5,4
Стадия								
канцерогенеза								
Норма	260	950						
Гиперплазия			1228					
Профиль,%%	6/11	16,5/3	50/					
		9	165					
МИН-1				1379	2979			
Профиль,%%				31/	69/			
				13,7	29,5			
МИН-2						770		
Профиль,%%						100/		
						5,8		
Карцинома							725	180
Профиль,%%				8 /7,2	12/1,2		•	
ИНДНК, с		1,	9 2	,5	3,4	4,	4	
ИНДНК, с			2,2		3,9	)		
по стадиям								
Плоидность	5,5-5,9	6-6,4	6,5-6,9	7-7,4	7,5-7,9	8>	Всего	
Стадия								
канцерогенеза								
Норма								
Гиперплазия								
Профиль,%%								
МИН-1								
МИН-2								
Профиль,%%								
Карцинома	187	0	403				9061	
Профиль,%%								
Профиль,%%		•	1	3/1,1	27	•		•
ИНДНК, с			4,5		3,	13		
ИНДНК, с				4.				
по стадиям				,	,			

Таблица 2.3.-1.

# Изменение количества клеток и показателей плоидности их ядер в эпителиальных структурах молочной железы по стадиям канцерогенеза (в % ко всему материалу и по выделенным диагностическим группам).

## Протоковый эпителий (6081 ядро)

Плоидность	1,5-1,9	2-2,4	2,5-2,9	3-3,4	3,5-3,9	4-4,4	4,5-4,9	5-5,4
	1,5 1,5	2 2, 1	2,5 2,5	5 5,1	3,5 3,5	' ', '	1,5 1,5	] 3 3,1
Стадия								
канцерогенеза								
Норма	332	292						
Гиперплазия			218					
Профиль,%%	40	34	26					
МИН-1				621				
Профиль,%%				100				
МИН-2					1162	896	1251	
Профиль,%%					35	28	37	
Карцинома								140
Профиль,%%				1	1			
ИНДНК, с		1,	8	2,5	2,6	3	3,8	
ИНДНК, с			2,2			3,2		
по стадиям			·					
Плоидность	5,5-5,9	6-6,4	6,5-6,9	7-7,4	7,5-7,9	8>	Всего	
Стадия								
канцерогенеза								
Норма								
Гиперплазия								
Профиль,%%								
МИН-1								
МИН-2								
Профиль,%%								
Карцинома		93	0	461	105	210	300	6081
Профиль,%%								
Профиль,%%		7		35	8	16	23	
ИНДНК, с		6,9 3,11						
ИНДНК, с		6,9						
по стадиям								

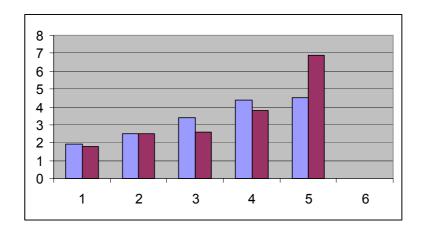


Рис.2.3.-2. Изменение индекса накопления ДНК (ИНДНК) в процессе канцерогенеза в молочной железе.

Ось ординат – единицы плоидности. Ось абсцисс: 1 – норма, 2 - гиперплазия, 3 - МИН-1, 4 – МИН-2, 5 – инфильтрирующие карциномы (первые столбцы – дольковый эпителий, вторые - протоковый).

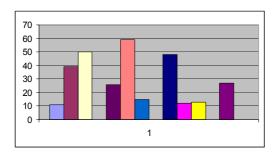
Индекс накопления ДНК в ядрах характеризует интенсивность пролиферации определенных клонов клеток. Этот показатель оказался выше у долькового эпителия до стадии МИН-2. При карциномах прогрессия опухолевого роста была более выражена у проткового эпителия. Пролиферативную активность опухолевой ткани отражало увеличение значений ИНДНК по стадиям канцерогенеза, по сравнению с уровнем, характерным для нормального эпителия. Для долькового эпителия эти показатели увеличивались по указанным выше стадиям соответственно в 1,3; 1,8; 2,3; 2,4 раза, а для протокового эпителия - в 1,4; 1,4; 2,9; 3,8 раза.

Рисунки 13 и 14 демонстрируют особенности распределения ядер отдельных клонов клеток, формирующих норму и гиперплазию, маммарную интраэпителиальную неоплазию легкой и тяжелой степеней (МИН-1 и МИН-2), а также инфильтрирующие карциномы.

Имеются существенные различия в количественном составе клеток с разной плоидностью ядер. Дольковый эпителий и его гиперплазия, характеризуются постепенным увеличением числа парадиплоидных ядер, а протоковый эпителий имеет обратные соотношения - ядра с плоидностью 1,5с — 2с преобладают в клональной характеристике. При интраэпителиальной неоплазии у долькового эпителия модальный класс ядер тетраплоидный, а у протокового преобладают парапентаплоидные ядра. Клеточный состав дольковых карцином характеризуется наличием ядер с плоидностью 4,5с — 7с. Протоковый рак имеет более выраженную полиплоидию (5с — 8с и более).

Рассмотрим более подробно диагностическое значение полученных данных плоидометрии для патогистологической практики.

Изучение распределения ядер по значениям плоидности выявило различия между характером канцерогенеза в дольковом и протоковом эпителиях молочной железы (рис.13 и 14). Исходя из полученных результатов, можно оценить диагностические значения средних данных о плоидности клеток клонов разных стадий канцерогенеза (рис. 2.2.-2.).



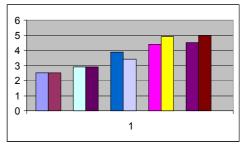


Рис. 2.3.-3. Распределение 9061 ядра клеток долькового эпителия молочной железы по нарастающим значениям плоидности.

По оси абсцисс: первые три столбца — норма и гиперплазия (1,5c-2,9c), вторые — МИН-1 (3c-3,9c) и МИН-2 (4c-4,4c), третья группа столбцов - инфильтрирующая дольковая карцинома (4,5c-6,9c). По оси ординат — количество ядер в группе, %.

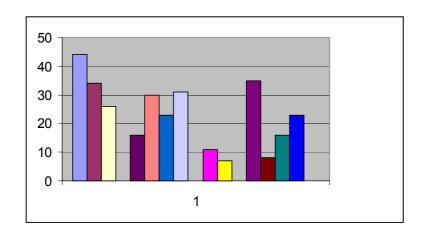


Рис. 2.3.-4. Распределение 6081 ядер клеток протокового эпителия молочной железы по нарастающим значениям плоидности.

По оси абсцисс: первые три столбца — норма и гиперплазия (1,5c-2,9c), вторые — МИН-1 (3c-3,4c) и МИН-2 (3,5c-4,9c), третья группа столбцов - инфильтрирующая протоковая карцинома (5c-8c>). По оси ординат — количество ядер в группе, %.

Значения средней плоидности типичных клонов клеток, не достигающих тетраплоидных значений плоидности, всегда характеризуют доброкачественные стадии онкогенеза. Более высокие показатели могут свидетельствовать или о тяжелой неинвазивной интраэпителиальной неоплазии, включающей в себя и рак «in situ» ( до 4,4c) или уже о инвазивной карциноме при 4,5c и более для дольковой и более 5c для протоковых инвазивных карцином.

Получены количественные данные о динамике изменения средних арифметических показателей плоидности ядер эпителиальных клеток, формирующих различные клоны в дольках и протоках молочной железы, в ходе развития стадий канцерогенеза (табл. 4, рис.18). При проведении дифференциальной диагностики важно учитывать не только средние значения показателей, с возможной ошибкой выборки из генеральной совокупности, но и вероятности безошибочного суждения разной точности. Поэтому в таблице, кроме средних арифметических показателей плоидности ядер для каждой стадии канцерогенеза, приведены дополнительно показатели средней плоидности ядер для клеток клонов, проходящих через «бифуркационную ситуацию», т.е. когда вероятность нахождения показателей в двух пограничных диагностических группах равна между собой (p = 0.5) при  $\sigma = 0.67$ ).

Далее приводятся показатели плоидности ядер с 0,7 уровнем вероятности безошибочного суждения (p = 0,7 при  $\sigma$  = 1,0) и с 0,95 уровнем вероятности (p = 0,95 при  $\sigma$  = 2,0) .

Таблица 2.3.-2. Дфференциально-диагностические параметры плоидности ядер клеток долькового и протокового эпителия молочной железы.

π υ		MM / 1	`	
Дольковый			$\sigma \pi n \alpha$	۸.
/IO.IIBKOBBIN	энителии с	71711	34/11100	
ACCIDITORDIN	J1111 1 CU11111 1	( / 0 0 -	22400	,

Диагноз	Μ-2σ	Μ-1σ	Μ-0,67σ	M±m	Μ+0,67σ	M+1σ	M+2σ
Н	2,0	2,2	2,3	2,4±0,07	2,5	2,6	2,8
МИН-1	2,5	2,8	2,7	3,1±0,09	3,5	3,4	3,7
МИН-2	3,1	3,4	3,4	3,6±0,2	3,7	3,8	4,0
ДК	2,8	3,7	4,5	4,6±0,4	5,2	5,5	6,3

#### Протоковый эпителий (6081 ядро)

Диагноз	Μ-2σ	Μ-1σ	Μ-0,67σ	M±m	M+0,67σ	M+1σ	M+2σ
Н	2,2	2,3	1,9	2,4±0,06	2,5	2,5	2,6
МИН-1	2,5	2,6	2,6	2,7±0,09	2,8	2,8	2,9
МИН-2	3,6	4,0	4,1	4,4±0,08	4,7	4,8	5,2
ПК	3,1	4,1	4,4	5,1±0,3	5,8	6,1	7,1

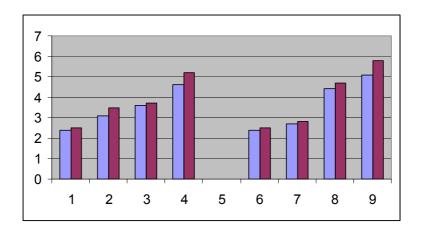


Рис.2.3.-5. Диагностические значения средней плоидности ядер клеток клонов эпителиальных структур молочной железы (первые столбцы) и с вероятностью 0,5 при отклонениях от средних значений на  $+0,67\sigma$  (вторые столбцы).

На оси ординат - единицы плоидности (с).

На оси абсцисс (первая группа столбцов - дольковый, вторая группа - протоковый эпителий): 1,6 - нормальный эпителий и его гиперплазия, 2 и 7 - МИН –1, 3 и 8 - МИН-2, 4 - дольковая и 9 - протоковые инфильтрирующие карциномы.

Для начальных изменений эпителия, проявляющихся в пролиферации клеток с нормальным генотипом, которая гистологически описывается как эпителиальная гиперплазия, следует учитывать увеличение значений показателей плоидности ядер нормальных клеток в пределах до  $3\sigma$  (вероятность безошибочного суждения выше 0,95).

С учетом величин ошибок выборки, можно считать, что между средними показателями плоидности ядер доброкачественных (гиперплазия эпителия и МИН-1) и злокачественных стадий (МИН-2 и карциномы) канцерогенеза имеются статистически достоверные различия. Это особенно выражено при канцерогенезе в протоковом эпителии. Вероятность безошибочного суждения при использовании этих показателей для решения дифференциально-диагностических задач достигает 0,95 - 0,99 и, конечно, значительно превышает по точности другие методы исследования. Особенно эти данные ценны для диагностики преинвазивных фаз неоплазии, которые также достоверно статистически отличаются от инвазивной формы.

Микроспекторфотометрические данные позволили получить дополнительную объективную информацию о клонах эпителиальных клеток долек и протоков молочной железы. Выявлены различия в увеличении средних показателей содержания Фельген-ДНК в ядрах долькового и протокового эпителия. Так, по сравнению с нормальными

структурами долькового эпителия, МИН-I характеризуется нарастанием содержания ДНК в ядрах клеток в 1,3 раза. Дальнейшее увеличение показателя плоидности связано с появлением клеток с новыми биологическими свойствами, что проявляется в картине легкой неинвазивной неоплазии (легкой и умереннй дисплазиии). Более выраженные изменения клонального профиля клеток наблюдаются при тяжелых формах дисплазии и при интраэпителиальном раке. МИН – 2 отличается от нормы увеличением показателя средней плоидности ядер клеток в 1,6 раза. Наибольшее отклонение от нормы - в 1,9 раз, отмечается при инвазивной дольковой карциноме. Более интенсивное изменение показателей плоидности ядер клеток наблюдается при внутрипротоковой пролиферации эпителия: при МИН-1 - в 1,1 раза; при МИН - 2 - в 1,8 раза и при протоковой карциноме - в 2,1 раза (рис.6). Эти показатели свидетельствуют о разных темпах малигнизации долькового и протокового эпителия молочной железы.

Пролиферативная активность клонов клеток возрастала по изучаемым группам наблюдений в такой же последовательности: у клеток долькового эпителия - 0,4-1,1-1,6-2,6 и у протокового эпителия - 0,4-0,7-2,4-3,1. Полученные показатели демонстрируют нарастающий характер темпа размножения клеток, приобретающих новые свойства, в каждой последующей фазе канцерогенеза.

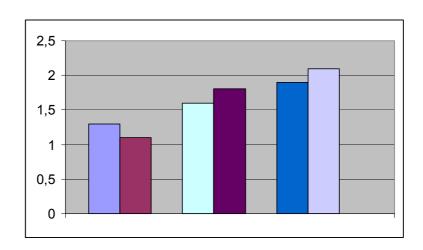
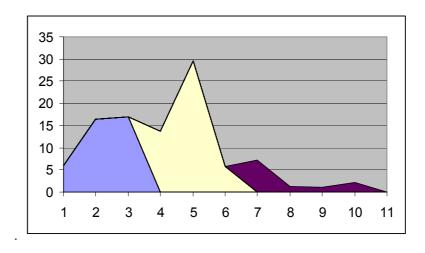


Рис.2.3.-6. Изменение индекса клональной пролиферации в разных стадиях канцерогенеза в молочной железе.

Ось ординат - значения ИКП.

Ось абсцисс: 1 – МИН - I, 2 – МИН – II, 3 - инфильтрирующие карциномы (первые столбцы - дольковый эпителий, вторые - протоковый).



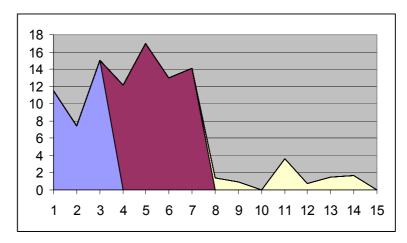


Рис.2.3.-7. Три области распределения клонов клеток долькового (верхний график) и протокового эпителия (нижний график) по значениям средней плоидности их ядер. Ось ординат - количество исследованных ядер (в % ко всем измеренным ядрам). Ось абсцисс (единицы плоидности, с): первая область (норма и гиперплазия, МИН-1), вторая - МИН-2, третья - инфильтрирующие карциномы.

Выявленная динамика изменения пролиферативной активности эпителиальных клеток желез и протоков, свидетельствует о более интенсивной скорости процесса озлокачествления протокового эпителия, по сравнению с дольковым.

Нарастающие значения плоидности ядер клеток долькового и протокового эпителия, в норме и при гиперплазии, почти одинаковы. При легкой и тяжелой маммарной неоплазии показатели количества ядер двух видов эпителия отличаются (почти половина ядер с повышенной плоидностью преобладает у долькового эпителия при легкой неоплазии, а у протокового - при тяжелой форме). Число ядер с высокой плоидностью у протоковых карцином значительно выше, чем у дольковых.

Выявлены также различия в «профиле плоидности ядер» у клонов клеток долькового и протокового эпителия молочной железы, имеющие разные типы гистограмм. Ядра

эпителиоцитов желез долек в норме и при гиперплазии - в основном парадиплоидны. При МИН-1, ядра по содержанию генетического материала, не выходят за пределы паратетраплоидных значений.

Таким образом, доброкачественные новообразования характеризуются клонами клеток, имеющих количество ДНК, не превышающее тетраплоидного значения.

Этот рубеж преодолевают пограничные новообразования, которые не имеют инфильтративного роста. В этих случаях четко диагностируются клоны клеток, характеризующие тяжелую неоплазию (МИН-2). Этот вид неоплазии долькового эпителия превышает паратетраплоидные значения и приближается к параоктаплоидным (до 7с и 8с).

Превышение указанных показателей на гистограммах, правее значений для МИН-2, обеспечивают клоны клеток с полиплоидными ядрами, которые уже формируют дольковую карциному. Другими словами, ядра клеток инфильтрирующих раков по своим показателям превышают параоктаплоидный рубеж.

В протоковом эпителии эта закономерность повторяется. При легкой форме неоплазии (МИН-1) плоидность ядер достигает в среднем значений 3,4с, а при тяжелой дисплазии и раке «in situ» (МИН-2) встречаются ядра с плоидностью до 5с. При инвазивной протоковой карциноме выявляются клетки с плоидностью ядер свыше 5с и разброс их значений выше параоктаплоидных, встерчаются и полиплоидные ядра (до 14c).

Отметим, что верхние пределы значений плоидности ядер эпителиальных клеток при МИН–2 и инфильтрирующих карциномах очень близки, что, по-видимому, свидетельствует о достаточной близости геномов ядер в этих стадиях канцерогенеза.

Следовательно, для полной характеристики стадий канцерогенеза, кроме обычной оценки патогистологических изменений в предопухолевых и опухолевых образованиях молочной железы, желательно дополнительно использовать, как количественные показатели плоидности ядер исследованного клона (среднее арифметическое или среднее взвешенное значение - «индекс накопления ДНК), так и качественную характеристику клона клеток, проявляющуюся в виде статистического распределения показателей плоидности их ядер - «профиля плоидности ядер».

Установлено, что распределение клеток по плоидности ядер в гистограммах по оси абсцисс до паратетраплоидных показателей свидетельствует о доброкачественном пролиферативном процессе. Преобладание в гистограмме ядер со значением плоидности свыше 4с уже указывает на возможность возникновения следующей, более тяжелой, интраэпителиальной неоплазии, а дальнейшее увеличение показателей плоидности ядер клеток, в районе параоктаплоидных и выше, свидетельствует о наличии инфильтрирующих карцином молочной железы.

Приведенные данные подтверждают справедливость открытой нами закономерности экспоненциального накопления ДНК в ядрах клеток ростковых зон в процессе канцерогенеза [5]. Следует также отметить, что показатели плоидности ядер для стадии МИН-2 и карцином очень близки и должны, по-видимому, рассматриваться уже в качестве атипической пролиферации, отражающей, в общих чертах, злокачественный тип процесса, в котором гистологически диагностированный рак «in situ», имеет только отсроченный риск перехода его В инфильтративную карциному. Заметим также, патогистологические критерии тяжелой дисплазии и рака «in situ», в ряде наблюдений, не дают полной уверенности в том, что исследуемый срез является вполне представительным для этой стадии канцерогенеза, т.к. гистологическая картина зависит от места иссечения кусочка, от уровня прохождения и плоскости среза, а также от их количества. Информация о плоидности ядер клонов клеток точнее характеризует стадию канцерогенеза.

При наличии данных о плоидности ядер клеток опухолей молочной железы, указанные ограничения почти снимаются, т.к. появляется возможность оценки пролиферативных свойств определенного клона клеток. Таким образом, при наличии результатов плоидометрии ядер эпителиальных клеток, предлагаются следующие диагностические критерии, которые должны, в соответствующих случаях, отражаться в заключениях патологоанатома при исследовании биоптатов молочной железы - нормальный эпителий и гиперплазия эпителия.

На основе проведенных нами исследований предлагается рабочая классификация стадий канцерогенеза, отличающиеся от известной рубрификации опухолей молочной железы Тавассоли [11], а именно:

- Доброкачественная стадия канцерогенеза,
- легкая и умеренная маммарная интраэпителиальная неоплазия (МИН-1),
- Пограничная стадия канцерогенеза,
- тяжелая маммарная интраэпителиальная неоплазия, включающая в себя рак «in situ» (МИН-II),
  - Злокачественная стадия канцерегенеза,
- инфильтрирующие дольковые и протоковые карциномы молочной железы (без метастазов и с метастазами).

Следовательно, данные плоидометрии ядер клеток визуализирующие их генетические различия, могут быть использованы в качестве дополнительных дифференциально-диагностических критериев при патогистологической диагностике новообразований молочной железы.

#### 2.3.2. Диагностика опухолей предстательной железы.

Опухоли и опухолеподобные образования предстательной железы в настоящее время стали одной из важных проблем современной онкоурологии. В связи с состоянием проблемы повышаются требования к ранней диагностике начальных опухолевых изменений в простате, с обращением особого внимания на пограничные («предраковые») Олнако обычные морфологической состояния. методы диагностики биоптатов предстательной железы, основывающиеся только на описательной характеристике структурных и микроскопических изменений желез простаты, что во многом снижает точность патогистологической диагностики и препятствует единообразной трактовке наблюдаемых картин разными патологоанатомами. В литературе приводится излишняя морфологическая детализация стадий канцерогенеза, которая зависит от места забора материала, изготовления срезов и других причин. Это прежде всего касается диагностики тяжелых форм дисплазий и рака «in situ», а также оценки самых начальных признаков инвазии. Появилась новая терминология для обозначения начальных фаз тканевой неоплазии в предстательной железе («простатическая интраэпителиальная неоплазия» -ПИН - с разной степенью выраженности - I, II, III) [3]. Однако, пока нет полной согласованности в практическом применении этих степеней. Некоторые авторы используют для диагностики только две градации (низкая и высокая). Имеются дисдифференцировки существенные расхождения при оценках степеней инфильтрирующих опухолей (высоко -, умеренно- низкодифференцированные и недифференцированные).

Возрастающие требования к точности диагностики стадий канцерогенеза в различных органах связаны с новыми возможностями лечения онкологических заболеваний. В связи с чем, проблема унификации диагностики различных опухолей и опухолеподобных образований предстательной железы в современной онкологии приобретает весьма важное значение. Возросли требования к достоверности гистопатологических заключений при дифференциальной диагностике доброкачественных, пограничных и злокачественных новообразований простаты [1,2,3]. Иногда затруднен дифференциальный диагноз между аденоматозной гиперплазией и карциномой простаты, т.к. клеточный и ядерный полиморфизм не характерны для дифференцированных форм рака и более важным диагностическим признаком в этих случаях является атипизм структуры железы или ее отделов. Например, криброзный вариант аденокарциномы отличается от гиперплазии эпителия простаты только более крупными размером клеток, который по разному оценивается патогистологом. Много субъективизма проявляется и при оценке степени дисдифференцировки стадий аденокарцином простаты.

В настоящее время с целью совершенствования диагностики широко используют систему определения гистологической степени дифференцировки опухолей предстательной железы по Глисону, которая учитывает гетерогенность строения опухоли [4]. Для предсказания поведения опухолей простаты дополнительно проводят иммуногистохимические исследования пролиферативной активности клеток опухолей.

В последнее время для обозначения прединвазивных процессов в железе используется термин «интраэпителиальная неоплазия», а применительно для предстательной железы - «простатическая интраэпителиальная неоплазия» - ПИН, которым обозначают две или три стадии дисплазии разной тяжести и рак «in situ».

Таким образом, повышение надежности и достоверности морфологической диагностики опухолевого процесса связано с максимальной объективизацией определения стадий канцерогенеза. Для указанной цели может быть применена плоидометрия, основанная на микроспектрофотометрическом анализе содержания Фельген-ДНК в ядрах клеток, которые формируют определенные клоны клеток с разными биологическими свойствами.

Цель настоящего исследования — применение плоидометрии для совершенствования диагностики опухолеподобных и опухолевых изменений предстательной железы.

#### Материал и метод.

После обычного патологогистологического исследования биоптатов, операционного и секционного материала предстательных желез, полученных от 80 пациентов, проводили микроспектрофотометрическое исследование гистологических срезов толщиной 8 мкм тех же биоптатов, окрашенных по Фельгену. Главным требованием при использовании способа сравнительной микроспектрофотометрии являлись стандартная толщина и одновременная окраска срезов.

Содержание Фельген–ДНК в ядрах клеток определяли на компьютерном анализаторе изображений «Имаджер-ЦГ» (с версией программы для плоидометрии «Автан-Сан»).

Для изучения особенностей канцерогенеза определяли плоидность интерфазных ядер эпителиальных клеток в следующих зонах препарата:

- в участках нормального строения простаты и с признаками гиперплазии эпителия желез (первая группа наблюдений),
  - с явлениями легкой и умеренной дисплазии ПИН-І (вторая группа),
  - с признаками тяжелой дисплазии и рака «in situ» ПИН-П (третья группа),
- и в участках инфильтрирующих аденокарцином простаты с разной степенью дисдифференцировки (четвертая группа).

Все полученные данные подвергали статистической обработке.

#### Результаты и обсуждение.

Все данные микроспектрофотометрического исследования ядер эпителиальных клеток предстательной железы представлены в таблице 2.3.-3, и иллюстрируются рис.2.3.-9.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что средние показатели плоидности ядер типичных клонов клеток доброкачественных процессов достоверно отличаются от злокачественных новообразований. По сравнению со средними показателями плоидности ядер клеток нормального эпителия, при гиперплазии он увеличивается в 1,07 раз, при ПИН-I - в 1,32 раза, при ПИН-II - в 1,53 раза, при аденокарциномах трех нарастающих степеней дисдифференцировки, соответственно: в 1,92, 1,96 и 2,4 раза.

При сравнении средних взвешенных показателей плоидности интерфазных ядер клеток – «индексов накопления ДНК» - эти различия более выражены и в тех же группах имели значения: 1,35; 1,57; 1,71; 2,21; 2,32; 2,46.

Таблица 2.3.-3. Средние показатели плоидности ядер клеток основного клона эпителиальных клеток предстательной железы на различных стадиях канцерогенеза

Диагноз	Коли-	Средняя	«Индекс	Пролиферативная	
	чество	плоидность	накопления	активность:	
	ядер	ядер, с	ДНК», с		
		$M \pm \sigma \pm m$	$\bar{x}$ $\pm \sigma \pm m$	по М по $\bar{x}$	
Нормальная ткань	124	2,8 0,6 0,05	2,8 0,6 0,05	0,8 0,8	
железы					
Гиперплазия	480	3,0 0,9 0,04	3,8 1,0 0,05	1,0 1,8	
ПИН -І	122	3,7 1,0 0,09	4,4 1,1 0,1	1,7 2,4	
ПИН-ІІ	153	4,3 1,4 0,12	4,8 1,5 0,1	2,3 2,8	
Аденокарциномы:					
Высокодифферен-	123	5,4 1,2 0,01	6,2 1,3 0,12	3,4 4,2	
цированная					
Умереннодифферен-	307	5,5 1,3 0,08	6,5 1,6 0,09	3,5 4,5	
цированная					
Низкодифференци	147	6,7 1,2 0,1	6,9 1,2 0,1	4,7 4,9	
-рованная					
Всего	1332				

Пролиферативная активность (ПА) клеток поддерживается на постоянном уровне при физиологической регенерации любой ткани, резко увеличивается при повышенных функциональных нагрузках, что морфологически выражается в гипертрофии, и при развитии опухолевого процесса, при котором размножаются клоны клеток с новыми биологическими свойствами. Снижение ПА в тканях наблюдается при атрофических процессах и в результате различных патологических воздействий. В обычной

патологоанатомической практике основным критерием оценки пролиферативного процесса, как известно, остаются показатели митотической активности клеток, которая не всегда достаточна для диагностики стадии процесса.

При изучении особенностей изменений отдельных прогрессирующих фаз канцерогенеза в предстательной железе выявлены существенные различия, характерные для изученных четырех стадий канцерогенеза.

По мере озлокачествления ткани пролиферативная активность эпителия желез предстательной железы выражалась следующими увеличивающимися показателями: 0,8; 1,8; 2,4; 2,8, а для аденокарцином с прогрессирующей степенью дисдифференцировки – 4,2; 4,5; и 4,9.

Получены также четкие диагностические границы между средними значениями плоидности (около 4,5 с) и пролиферативной активности (2,8c) для доброкачественных изменений железы и для и аденокарцином простаты (рис.2.2.-7).

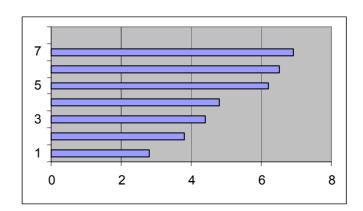


Рис.2.3.-7. Дифференциально-диагностическое значение плоидности ядер эпителиальных клеток предстательной железы.

Ось абсцисс - единицы плоидности (с): средние арифметические показатели (первые столбцы в парах столбиков) и их средневзвешенные значения.

Ось ординат: стадии канцерогенеза: 1 - норма, 2 – гиперплазия эпителия, 3 - ПИН – I, 4 - ПИН – II; аденокарциномы простаты: 5 – хорошодифференцированная, 6 – умереннодифференцированная, 7 - плоходифференцированная

Представляло интерес проследить за плоидометрическими значениями ядер клеток изучаемых стадий канцерогенеза с учетом «бифуркационной ситуации», т.е. когда вероятность нахождения признака в диагностируемой группе равна 0,5 (при колебаниях показателя в пределах  $\pm 0,67\sigma$ ). Возможные границы перехода показателей в соседние диагностические группы приведены в таблице 2.2.-4 и рис.2.2.-8.

Таблица 2.3.-4. Переходные значения средних показателей плоидности ядер клеток на разных стадиях канцерогенеза в предстательной железе

Стадия канцерогенеза	Μ- 0,67σ	$M \pm \sigma$	M+0,67σ
Норма	2,4	2,8±0,6	3,2
ПИН -І	3,1	3,7±1,0	4,3
ПИН-ІІ	3,6	4,3±1,4	4,9
Аденокарциномы:			
Высокодифференцированная	4,6	5,4±1,2	6,2
Умереннодифференцированная	4,6	5,5±1,3	6,4
низкодиффернцированная	5,9	6,7±1,2	7,5

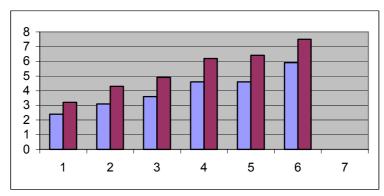


Рис.2.3.-8. Возможные пределы уровней перехода показателей средней плоидности ядер клеток простаты (первые столбики -  $M-0,67\sigma$ , вторые  $M+0,67\sigma$ ) в соседние диагностические группы стадий канцерогенеза в предстательной железе.

По оси ординат: средние показатели плоидности ядер клеток - с. По оси абсцисс: 1 – норма, 2- ПИН-I, 3 – ПИН – II аденокарциномы: 4 – высоко дифференцированная, 5 – умерено дифференцированная, 6 – низко дифференцированная.

Результаты статистического анализа полученных показателей, характеризующих каждую группу, с учетом асимметрии распределения, выявили высокую степень достоверности различий между изучаемыми диагностическими группами (p< 0,001).

Таким образом, данные плоидометриии позволяют точнее отличать доброкачественный характер неоплазий (гиперплазия эпителия и ПИН -I), от пограничных состояний (ПИН-II) и злокачественных стадий канцерогенеза (инфильтрирующих аденокарцином).

С учетом требований онкологической практики целесообразно при гистологической диагностике, учитывающей в качестве базового состояния картину нормальной ткани и ее гиперплазии, выделение, по нашему мнению, только трех основных стадий канцерогенеза.

Эти стадии существенно различаются по характеристикам средней плоидности ядер и типам их гистограмм клонов клеток, а именно:

- Доброкачественные стадии опухолевого процесса
- Легкая внутриэпителиальная (внутритканевая) неоплазия I степени;
- Пограничная стадия
- Тяжелая неинвазивная внутриэпителиальная (внутритканевая) неоплазия II степени;
- Злокачественные стадии опухолевого процесса
- Инфильтрирующие карциномы (без метастазов и с метастазами).

В связи с полученными данными, следует рассмотреть возможность внесения дополнений в Международные классификации опухолей простаты, дающие возможность однотипно шифровать характер эпителиальных новообразований в предстательной железе.

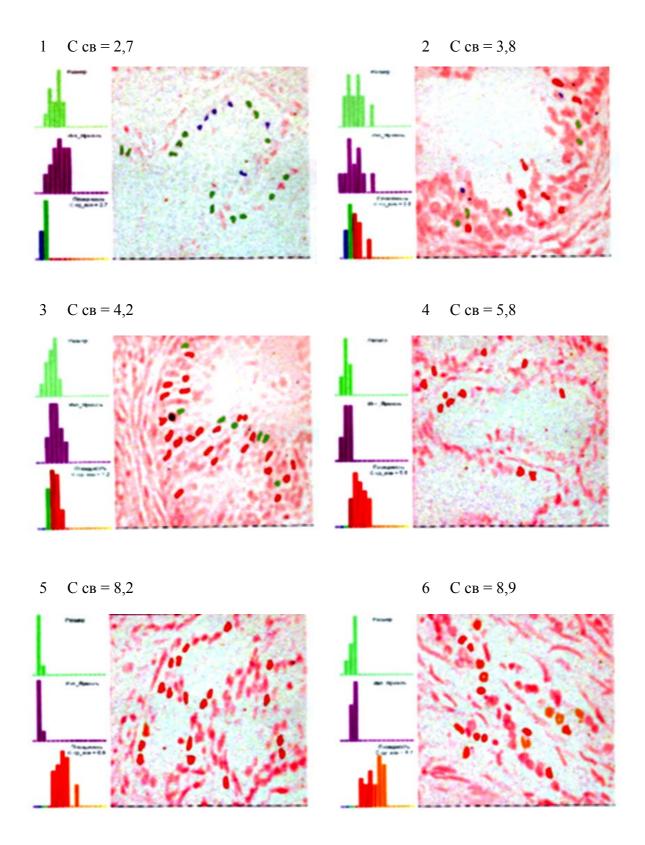


Рис. 2.3.-9.

#### 2.4. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

Исследование процессов регенерации органов и тканей является одной из фундаментальных проблем биологии и медицины, а изучение репаративной регенерации играет главенствующую роль в реконструктивной хирургии..

Вместе с тем, достижения современной морфологии в значительной мере связываютчя с внедрением математических методов количественного анализа биомедицинских изображений. Компьютеризация этого процесса, в принципе, значительно расширяет возможности исследователей и ускоряет процессы познания. Если ранее распознавание состояния биопрепарата было исключительно прерогативой опытного исследователя, то в настоящее время созданы программы, позволяющие компьютеру распознавать и анализировать некоторые морфологические структуры.

Наиболее развиты такие программы для анализа гематологических препаратов, что связано, прежде всего, с идентичным набором клеток в мазках. Хуже обстоит дело с распознаванием клеток в гистологических срезах. Это обусловлено сложностью и разнообразием строения органов, различиями клеток даже одной популяции, плотностью их расположения, а также отсутствием стандарта уровня среза.

Поэтому программ по анализу гистологических препаратов до настоящего времени все еще крайне мало и в мире постоянно ведутся работы по их созданию. Комплекс «Имаджер-ЦГ» является одной из таких разработок. В ней поставлены и решены задачи автоматического определения и анализа размеров ядер и плоидности клеток. Поэтому использование видеокомпьютерного комплекса анализа микроскопических изображений биопрепаратов «Имаджер-ЦГ» для медицинской диагностики является целесообразным, поскольку использование этой программы исключает рутинную работу исследователя по подсчету клеток с определенным размером и плотностью ядра, позволяет быстро получать количественные характеристики клеток.

#### 2.4.1. Обоснования метода.

Регенерация утраченной процесс восстановления ИЛИ поврежденной дифференцированной бывает физиологическая структуры И репаративная. Физиологической регенерацией называется естественное обновление структуры, которое имеет место в процессе жизнедеятельности органов и тканей. На смену закончившим жизненный цикл клеткам приходят новые. Репаративная регенерация заключается в образовании новых структур на месте поврежденных. Признаком репаративной регенерации является образование массы малодифференцированных клеток со свойствами эмбриональных клеток зачатка регенерирующего органа или ткани.

При репаративной регенерации какой-либо структуры реконструируются нормальные процессы развития этой структуры в раннем онтогенезе. Характер клеточной популяции поврежденной структуры определяет возможность ее регенерации. Так, репаративная регенерация возможна, если структура состоит из клеток обновляющейся популяции (эпителиальные клетки, клетки мезенхимального происхождения). Репаративная регенерация также возможна, если в тканях имеются стволовые клетки и существуют условия для их дифференцировки. Например, при повреждении скелетной мышцы ткань восстанавливается за счет дифференцировки стволовых клеток-сателлитов в миобласты, которые затем формируют мышечные волокна. Ткани, утратившие стволовые клетки, такие как кардиомиоциты или нейроны не имеют шансы к восстановлению. Однако в случае повреждения части нейрона его восстановление возможно за счет интенсификации внутриклеточных процессов: синтеза белка, внутриклеточного транспорта, увеличения внутриклеточных органелл -т.е. осуществления регенерации на внутриклеточном уровне.

Важным фактором восстановления структуры органа является существование морфогенетических полей, не имеющих четких анатомических границ, но клетки, их составляющие, формируют строго определенную структуру. Морфогенетическое поле организовано таким образом, что при изменении в нем количества клеток оставшиеся клетки вновь устанавливают исходные взаимоотношения и восстанавливается нормальная структура ткани. Регенерация в пределах морфогенетического поля контролируется регуляторными механизмами на основе позиционной информации клеток этого поля.

Одним из клеточных механизмов регенерации является деление клеток - митоз. Но прежде чем он совершится, в клетке, находящейся в интерфазе, происходит удвоение ДНК. Поэтому изучая вопросы регенерации необходимо иметь представление о клеточном цикле, т.е. многократном повторении некоторой последовательности событий в определенном отрезке времени. Так период интерфазы, в котором синтезируется ДНК, был назван S-периодом клеточного цикла. Было установлено, что этот период начинается спустя примерно 8 часов после окончания митоза и завершается через 7-8 часов. Промежуток между окончанием митоза и началом S-периода получил название G1-периода, а промежуток между концом S-периода и началом следующего митоза назвали G2-периодом.

Установление факта удвоения ДНК в течение части периода интерфазы изменило широко распространенное представление о том, что на протяжении всей интерфазы клетка занята выполнением своей специализированной функции. Создавалось впечатление, что клетка должна выполнять свою специализированную функцию во время либо G1-, либо G2-периода цикла. Экспериментальные исследования показали, что клеткам, непрерывно

совершающим один цикл за другим, ни в один из этих двух периодов не остается времени ни на специализацию, ни на выполнение специализированных функций. Поэтому интерфазные клетки, для того, чтобы превратиться в высокоспециализированные функционирующие клетки, должны на время или навсегда выйти из цикла. Обычно это происходит в G1-периоде. Таким образом, выполнение специализированных функций обеспечивается клетками, находящимися в продленном G1-периоде. Однако для нормальной жизнедеятельности организм должен располагать клетками разных типов, которые бы делились хотя бы время от времени. В самом деле в некоторых органах и тканях клетки регулярно делятся. Тем не менее, не все клетки в организме способны совершать митотический цикл.

Поддержание клеточных популяций различными клетками осуществляется по-разному. При рассмотрении этого вопроса полезно помнить об одном законе, носящем самый общий характер: между степенью специализации клетки и ее способностью к делению существует в какой-то мере обратная зависимость.

#### Различают 3 категории клеток:

1-ая категория - к моменту рождения или самое большее - после нескольких первых лет жизни организма - клетки достигают высокой специализации при полной потере способности к размножению. Более того, в организме нет совершенно никаких резервов для замещения этих специализированных структур в случае их отмирания. Классический пример — это нервные клетки.

2-ая категория - высоко специализированные клетки хотя и утратившие способность к размножению, но сохранившие возможность их замещения той же линией не столь специализированных и не утративших способность к размножению клеток. Данный фонд служит постоянным источником новых клеток, которые могут далее специализироваться, замещая соответствующие специализированные клетки, утраченные организмом. Это означает, что во многих частях тела происходит непрерывное и подчас быстрое обновление клеточной популяции за счет относительно неспециализированных клеток, которые достаточно часто проделывают цикл, чтобы поставлять дочерние клетки, способные специализироваться и занимать место утрачиваемых функционирующих клеток.

Таким образом, во многих частях организма существует равновесие между образованием клеток и их утратой, так что общее число клеток остается постоянным, хотя отдельные части клеточной популяции заменяются. Такие клеточные популяции называются обновляющимися, а состояние в котором они находятся - стационарным состоянием. Например, клетки, выстилающие большую часть кишечного тракта,

непрерывно слущиваются с его внутренней поверхности в просвет кишки, но клеточная выстилка кишечника сохраняет целостность, так как другие клетки, принадлежащие к той же линии, но менее специализированные, продолжают совершать клеточный цикл и образуют дочерние клетки, которые выходят из цикла в G1 -периоде, специализируются и перемещаются в направлении просвета кишечника, сохраняя целостность эпителия. В результате этого процесса эпителий кишечника каждые несколько дней обновляется.

Для обозначения неспециализированных клеток, сохраняющих способность к делению, которую члены данного семейства утрачивают, становясь высокоспециализированными, было предложено несколько разных терминов:

- 1) герменативные клетки,
- 2) материнские клетки,
- 3) камбиальные клетки,
- 4) стволовые клетки.

Чаще употребляется термин стволовые клетки. Следовательно, стволовой называется такая камбиальная клетка, которая на всем протяжении постнатальной жизни остается клеткой одного и того же типа и тем самым сохраняет способность, совершая циклы в течение всей жизни организма, поставлять клетки, специализирующиеся в определенном направлении, замещая отмирающие или утрачиваемые клетки. Многие стволовые клетки пребывают в продленном G1- периоде, не подвергаясь специализации, и готовы в любой момент вступить в цикл, чтобы обеспечить численность стволовых клеток на обычном уровне. Если же стволовые клетки выходят из своей популяции, то это происходит в G1-периоде, после чего они начинают специализироваться.

Сохранение в организме фондов стволовых клеток разных типов имеет огромное значение для роста и поддержания клеточных популяций тех тканей, в которых специализированные функционирующие клетки утратили свою способность к размножению.

Существует также 3-я категория клеток, составляющих исключение из общего правила, согласно которому выполнение специализированных функций обычно нарушает способность к размножению. Имеются примеры высокоспециализированных клеток, которые в известных условиях, по-видимому, способны вступать в цикл, с тем, чтобы восстановить свою численность. Однако таким высокоспециализированным клеткам обычно не приходится использовать свою способность к размножению после завершения роста органа, к которому они относятся. Клетки этой категории имеются главным образом в тех органах, у которых функционирующие клетки отличаются большой

продолжительностью жизни и где после полного завершения роста деление клеток происходит редко. Примером таких клеток служат клетки печени - гепатоциты.

В эксперименте показано, что удаление 2/3 печени у животного ведет к тому, что клетки оставшейся части начинают делиться, причем с такой скоростью, что печень меньше, чем за две недели восстанавливается до прежних размеров.

Способность к регенерации у гепатоцитов обусловлена возможностью репликации ДНК с последующим цитокинезом или без него. Если клетка не разделяется, образуется двуядерный гепатоцит.

Показано, что у человека при ряде воспалительных заболеваний печени увеличивается количество двуядерных клеток, что рассматривается как один из цитологических регенераторных механизмов, обеспечивающих повышение функциональных возможностей органа в ответ на повреждение. Считается, что одним из механизмов компенсации функции при повреждении печени является полиплоидия, т.е. увеличение количества геномов клетки. Если в норме в соматической клетке содержится 46 хромосом, образующих 23 пары, то в полиплоидной количество хромосом увеличивается в несколько раз. В интерфазе у полиплоидной клетки печени ядро крупнее, чем у диплоидной. Существует мнение, что полиплоидия является результатом незавершившегося митоза и сопровождается усилением синтеза ДНК. Обычная причина полиплоидии состоит, возможно, в том, что в метафазе митоза двум s-хромосомам каждой d-хромосомы не удается разойтись, в результате чего два набора s-хромосом, вместо того, чтобы направиться к противоположным концам клетки, остаются вблизи экваториальной пластинки до тех пор, пока не образуется новая мембрана и все они не оказываются в одном ядре.

Исследование плоидности имеет большое значение в медицине, поскольку позволяет выявить поломки на уровне соматических клеток. В эксперименте показано, что длительное размножение клеток ведет к анэуплоидии, характерной для злокачественного роста. Поэтому изучение плоидности при регенерации, длительно происходящей при хронических заболеваниях приобретает особое значение [6,7,8,9,10,11].

В связи с тем, что одним из цитологических механизмов регенерации печени человека является изменение плоидности гепатоцитов, определение этого показателя при исследовании гистологических препаратов имеет большое значение, так как интенсивность его может свидетельствовать о различных путях компенсаторноприспособительных и регенераторных процессов в зависимости от характера патологии.

В РНЦХ РАМН постоянно производятся операции резекции печени при опухолевых поражениях и более 10 лет - трансплантация печени как от трупа, так и от живых родственных доноров. В настоящее время проводится активная работа по проблеме "Ортотопическая пересадка печени от трупа и живого родственного донора" (номер госрегистрации № 01990002398). Уникальные компенсаторные возможности печени позволяют производить обширные резекции печеночной паренхимы до 70-80% ее условной массы, а также пересаживать фрагменты (правую или левую долю) от живого родственного донора, что, в связи с резким дефицитом трупных трансплантатов, имеет огромное значение для спасения жизни больных. Условия компенсации функции и восстановления необходимой массы гепатоцитов при трансплантации печени, особенно при пересадке доли печени, существенно отличаются от таковых при резекции, так как они связаны не только с изначальным дефицитом массы органа, но и со степенью ишемического повреждения в процессе забора трансплантата у донора, последующей консервации и имплантации его реципиенту, а также с осложнениями реперфузии и реакции отторжения. Несмотря на малый изначальный объем пересаженных фрагментов печени в послеоперационном периоде обеспечивается адекватная функция трансплантата и последующее увеличение его до нормальных размеров.

#### 2.4.2. Программа и результаты исследований.

В настоящей работе ставится задача оценки эффективности использования в реальной клинической практике видеокомпьютерного комплекса «Имаджер-ЦГ» для анализа микроскопических изображений гистологических препаратов, с обращением особого внимания на определение плоидности клеток в условиях регенерации.

Плоидность клеток представляет особый интерес, так как позволяет на гистологическом срезе оценить этот показатель клеточной популяции как при опухолевом процессе, так и при регенерации.

#### <u>1-й этап</u>

Предполагается на материале 174 пункционных биопий трансплантированной от живых родственных доноров доли печени 12 больным ( 5мужчин и 7 женщин) в возрасте от 3 до 42 лет изучить динамику плоидности гепатоцитов в различные сроки послеоперационного периода. Пункционные биопсии выполняли под ультразвуковым контролем режущей иглой 14G типа Tru-Cut для морфологического мониторинга реакции отторжения трансплантата на 3-4, 10-12 сутки и далее еженедельно в течение первых двух месяцев после ортотопической трансплантации печени, а затем каждые 3 месяца в отдаленном послеоперационном периоде (до 5 лет).

Для гистологического исследования биоптаты фиксировали в 10% нейтральном формалине, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону, проводили гистохимические реакции: для определения РНК- реакция Браше, ДНК – реакция Фельгена, гликогена- ШИК- реакция.

Идентификация клеток, находящихся на различных стадиях митоза в световом микроскопе, при окраске гематоксилином и эозином возможна, если имеются достаточно крупные окрашивающиеся структуры, и в препаратах срезы через делящиеся клетки совпали с экваториальной плоскостью клетки. Обнаружение фигур митоза также в значительной степени зависит от того, удастся ли найти клетки, в которых вместо распределения хроматина, характерного для G1-периода, видны хромосомы. Кроме того, необходимо иметь в виду, что на обычных срезах хромосомы часто сбиваются в комки, и они трудно отличимы от ядра умирающей клетки. Шансов найти срез, который прошел бы именно в нужной плоскости через фигуры митоза, гораздо меньше, чем найти срезы, прошедшие через другие плоскости.

Наблюдение за процессами митоза облегчилось благодаря возможности выявления ДНК хромосом с помощью гистохимической реакции Фельгена - одного из методов селективной окраски срезов, применяемых в количественном анализе гистологических структур. Для осуществления этой реакции срезы фиксированного материала подвергаются действию концентрированной кислоты, разрушающей связь между пуриновым основанием и дезоксирибозой, которые затем выявляются с помощью реактива Шиффа. При этом участки, содержащие ДНК, окрашиваются в фиолетовый цвет. Благодаря этому гистохимическому методу было установлено, что ДНК локализуется в хроматине ядер неделящихся клеток и в хромосомах делящихся клеток.

При анализе гистологического материала, обработанного по этому методу, для получения объективных данных можно и необходимо подключать количественные методы исследования.

Результаты 1-го этапа исследований иллюстрируются рис. 2.4.-1\_2.4.-4.

Результаты 1-го этапа исследований показали, что, наряду с положительными факторами, при создании программы должны быть уточнены и следующие моменты.

При изучении регенераторных процессов на гистологических препаратах необходимо учитывать неоднородность клеточного состава органов. Так, печень сложный орган - одновременно она является экзокринной и эндокринной железой, что обусловлено особенностями ее строения. В паренхиме печени каждый гепатоцит контактирует с протоком, относящимся к системе выведения экзокринного секрета (желчи), а также с кровеносным сосудом, в который выделяется эндокринный секрет.

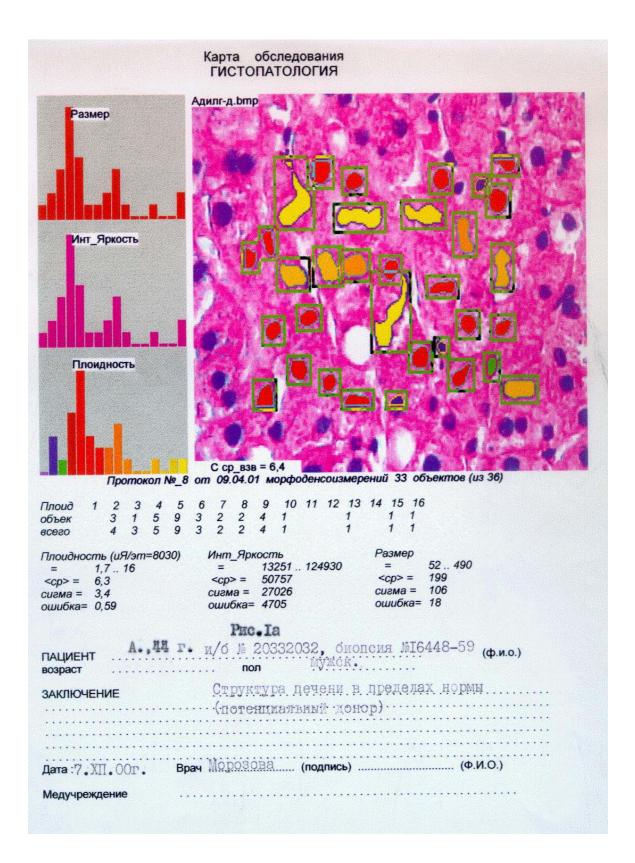


Рис. 2.4.-1. Из 80-ти объектов, пригодных для анализа, автоматически захвачено 33. Ядра клеток, расположенных по периферии, не вошли в анализ Захвачены одновременно ядра 2-х гепатоцитов и одной эндотелиальной клетки; 3 ядра соседних гепатоцитов;

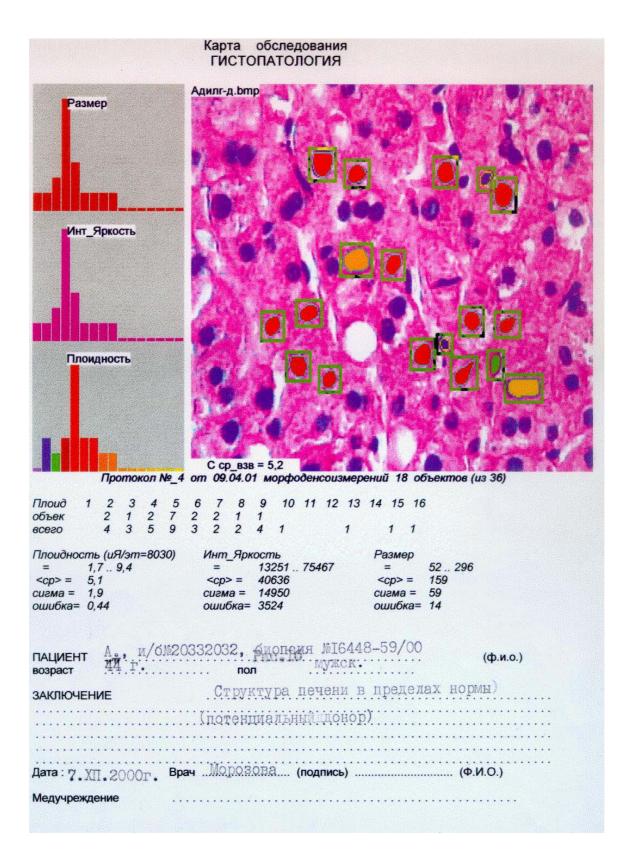


Рис. 2.4.-2. После мануальной коррекции в анализе участвуют лишь 18 объектов; Микропрепарат печени родственного донора, и.б. № 20332032. Пункционная биопсия № 16448-59/00. Окраска гематоксилином и эозином, x220.

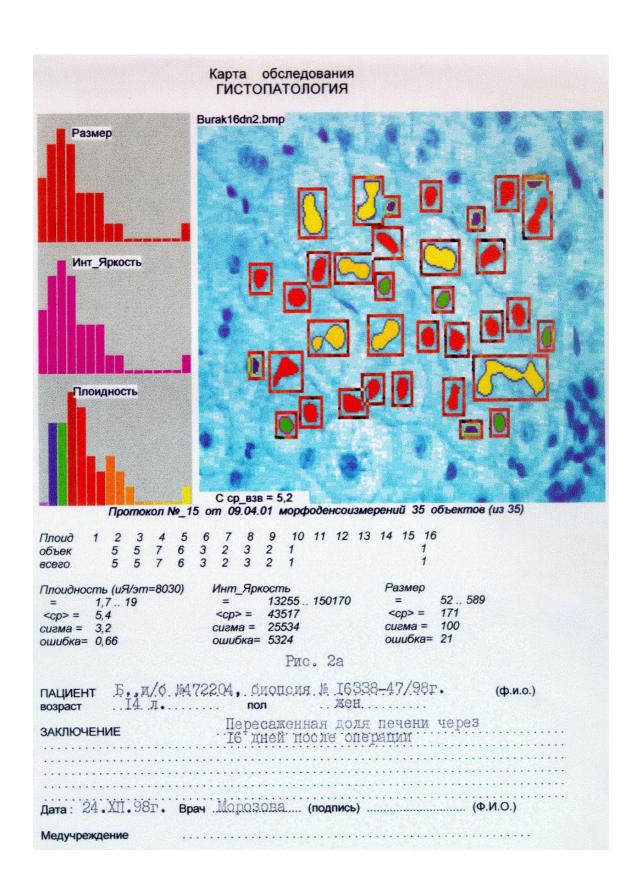


Рис. 2.4.-3. На экране монитора 51 объект, пригодный для анализа. Автоматически захвачено 35 в центре поля, из них ядра 3-х гепатоцитов захвачены лишь частично.

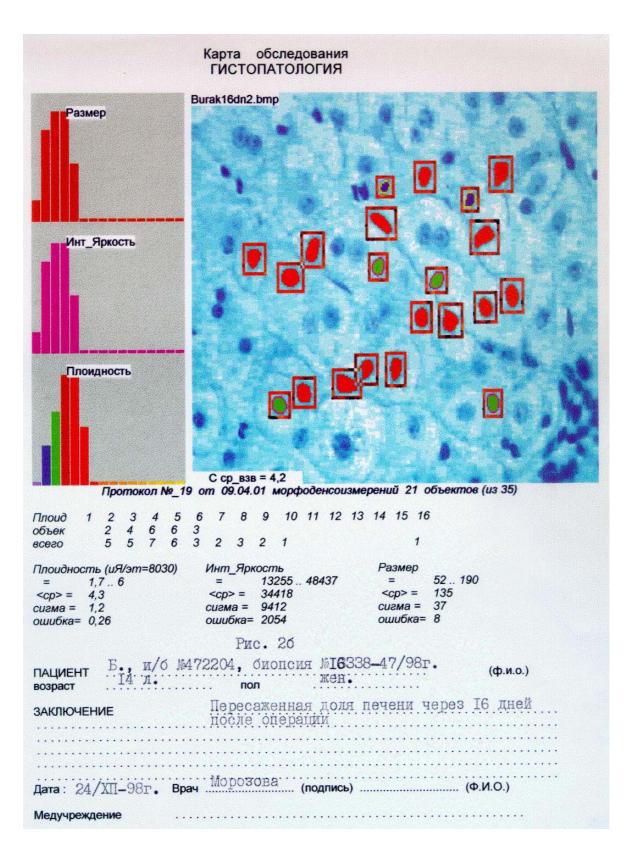


Рис. 2.4.-4. После мануальной коррекции проанализированы данные только 21 клетки. Микропрепарат пересаженной правой доли печени через 16 дней после трансплантации, и.б.№ 472204. Пункционная биопсия № 16338-47/98. Гистохимическая реакция Фельгена, х 220.

И желчные протоки, и сосуды, в том числе синусоиды, контактирующие вплотную с гепатоцитами, выстланы клетками (эпителий в желчных протоках и эндотелий в сосудах и синусоидах). Выстилка синусоидов печени отличается от обычных капилляров тем, что ее образуют 2 вида клеток: тонких и плоских, напоминающих эндотелий обычных капилляров, и крупных звездчатого вида клеток Купфера, которые являются производными моноцитов и относятся к макрофагам.

Таким образом, из сказанного следует, что поскольку компьютер не распознает тип клеток - эндотелий, гепатоцит, клетка Купфера и т.д., только автоматический режим работы при изучении как печени , так и любого другого органа, использовать нельзя. Каждое поле зрения исследователю необходимо коррегировать, убирая ядра клеточных популяций, не подлежащих анализу. Однако при этой процедуре число анализируемых клеток в поле зрения резко сокращается.

Кроме того, в предлагаемой программе в анализ не включаются клетки, расположенные по периферии исследуемого поля, что также резко уменьшает количество изучаемых объектов. В некоторых клетках захватывается лишь часть ядра, а в других - сразу 2-3 ядра близ лежащих клеток различных клеточных популяций.

Поэтому обработка одного поля зрения не дает статистически достоверных результатов. Необходимо, чтобы данные измерений с каждого поля зрения суммировались и обрабатывались только при накоплении исследуемых параметров не менее 100 клеток.

### **2-й этап**

В РНЦХ РАМН более 10 лет производится трансплантация печеи от живых родственных доноров. При пересадке печени от родственного донора имеется дефицит массы органа, т.к. пересаживается только часть печени. Масса родственного трансплантата рассчитывается с учетом соответствия ее антропометрическим параметрам и определением коэффициента К — соотношения массы трансплантата к идеальной расчетной массе печени реципиента. Однако, уже к первому году после операции пересаженный фрагмент печени увеличивается и соответствует массе тела реципиента, что убедительно доказывают проводимые в клинике функциональные и ультразвуковые исследования. Расширение технических возможностей исследования тонких механизмов данного процесса приобретает важнейшее значение.

На данном этапе работы была поставлена задача изучения динамики репаративных процессов при родственной пересадке печени человека, определение площади и плоидности ядер гепатоцитов, с применением компьютерной программы

"ИМАДЖЕРМЕДИА", которая является модифицированной версией программного обеспечения комплекса "Имаджер-ЦГ".

В программе «ИМАДЖЕРМЕДИА» учтены замечания, выявленные на 1-м этапе работ. Программа «ИМАДЖЕРМЕДИА» позволяет определять площадь и плоидность ядер, причем захватывает для анализа большое количество объектов не только с центра, но и с периферии монитора; обрабатывает выбранную исследователем группу изображений в автоматическом режиме и создает архив данных. Накопление и суммирование количественных показателей дает возможность объективизировать результаты, экстраполировать их на орган в целом и оценивать такие важнейшие факторы регенерации, как синтез ДНК и пролиферативная активность клеток.

Материалом исследования на 2-м этапе служили 250 пункционных биоптатов трансплантированной печени, полученных при морфологическом мониторинге реакции отторжения у 18 реципиентов в возрасте от 3-х до 55-ти лет (8 - мужского и 10 – женского пола), в сроки от 2-х суток до 10-ти лет после пересадки. Контролем служили 18 биоптатов печени донора.

В первый месяц после пересадки морфологические изменения в трансплантате отличались разноообразием: наблюдались эпизоды отторжения, просходило становление и развитие регенераторных процессов.

Сильное интерстициальное, а также гуморальное отторжение, не наблюдались. Интерстициальное отторжение было слабо выражено, гепатоциты существенно не повреждались.

Регенераторные процессы при родственной пересадке печени наиболее интенсивно развивались в течение первых 3-х месяцев. При гистологическом исследовании они характеризовались появлением многочисленных крупных клеток с большими ядрами и пиронинофильной цитоплазмой, неравномерным распределением гликогена.

В процессе регенерации выявлялись фигуры митоза. В первые две недели после операции количество митозов колебалось от 0,1% до 0,6%. Наблюдались также удвоение и дискомплексация балок, гетерогенность размеров ядер и клеток и очаги пролиферации в виде скопления мелких гепатоцитов, которые выстраивались вокруг синусоидов и каналикул, образуя подобие альвеол, выявлялись ретикулиновые волокна, поддерживающие структуру синусоидов.

Очаги пролиферации были характерны для первых 3-х месяцев, но иногда наблюдались и в более отдаленные сроки — через 8 месяцев после операции пр родственной пересадке взрослым реципиентам с индексом К, близким к 0,5. У детей с малой массой тела, где индекс К приближался к 1, очаги пролиферации отсутствовали.

Для объективизации полученных данных применялись количественные методы исследования (программа "ИМАДЖЕРМЕДИА"): определялись площадь и плоидность ядер гепатоцитов. Оказалось, что площадь ядер гепатоцитов достигала максимума лишь к концу второго месяца и постепенно возвращалась к исходному уровню в течение года.

Параллельно с возрастанием площади ядер увеличивалась средняя плоидность гепатоцитов (рис. 2.4.-5).

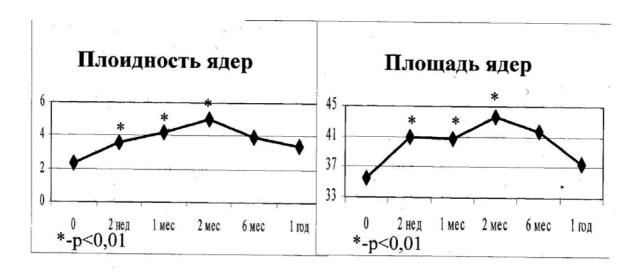


Рис. 2.4.-5.

Анализ плоидности показал преобладание тетраплоидных гепатоцитов в исходе. Число клеток с высокой плоидностью (преимущественно шестиплоидных) увеличивалось ко второй неделе после операции, что коррелировало с возрастанием площади ядер. Показатели плоидности достигали максимума через 1,5 – 2 месяца (среднее значение 8) и сохранялись повышенными до 8-ми месяцев после трансплантации у реципиентов с индексом К, близким к 0,5, а затем возвращались к исходному уровню. При этом в очагах пролиферации преобладали мелкие гепатоциты с диплоидным ядром и пиронинофильной цитоплазмой.

Репаративные процессы заканчивались полным восстановлением структуры органа: дискомплексация балок исчезала, размеры ядер и клеток приближались к донорским, фиброзные изменения отсутствовали.

Интенсивность и характер репаративной регенерации определяляись соответствием массы пересаженного органа. При трансплантации от родителей к детям нередко индекс К

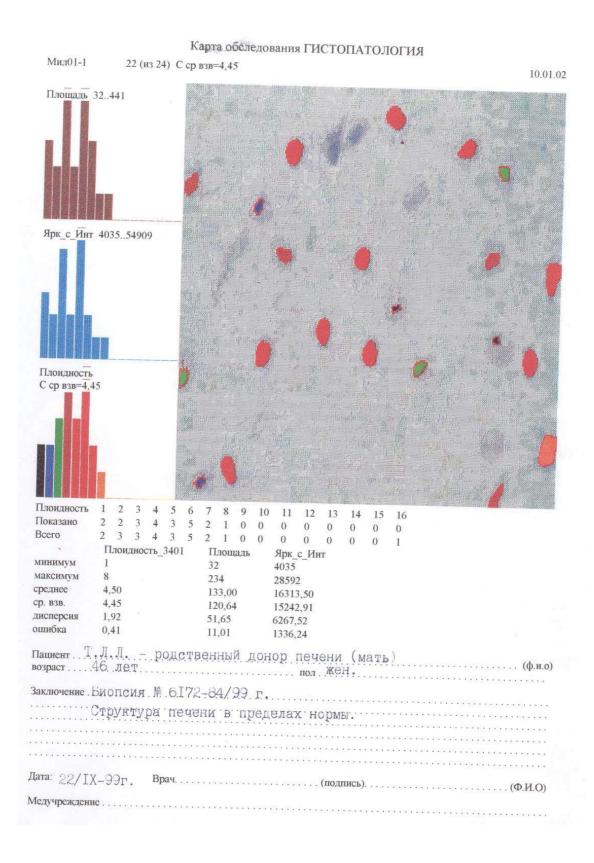


Рис. 2.4.-6.

# Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ

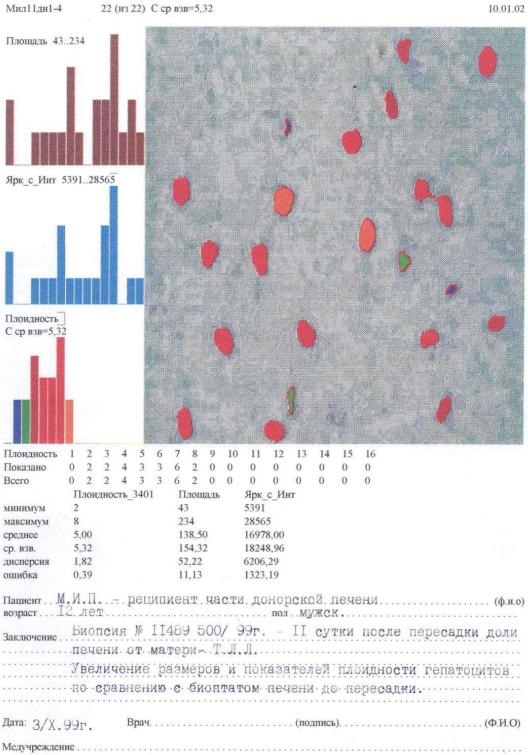


Рис. 2.4.-7.

09.01.02

# Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ 29 (из 29) С ср взв=4,59

Мил2с1-8

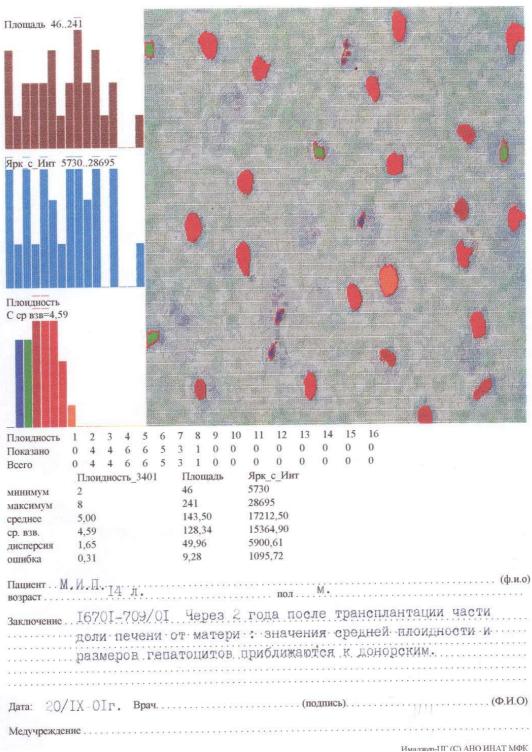


Рис. 2.4.-8.

# Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ 22.01.02 23 (из 23) С ср взв=6,09 Мил40дн4-32 Площадь 32..373 Har 4337, 49742 Плондность С ср взв=6,09 Плоидность 1 2 3 4 5 6 7 8 1 1 1 0 0 1 1 1 1 1 5 4 2 Показано 1 3 1 5 4 2 1 1 1 0 0 1 1 Всего Плоидность 3401 Площадь Ярк\_с\_Инг 4337 минимум 32 373 49742 15 максимум 202,50 27039,50 8,00 среднее 155,74 20736,09 6,09 ср. взв. 98,79 13231,84 3,90 дисперсия 20,60 2759,03 ошибка 0.81 пол М. (ф.и.с заключение. Биопсия № 12940 49/99г. 40 дней после трансплантации... доли печени от матери. Увеличение плоидности и средних вмеров гелатоцитов по сравнению с показателями донорской печени..... Дата: I.XI.99г.

Рис. 2.4.-9.

И ТАНИ ОНА (С) АНО ИНАТ МФК

приближался или составлял 1. В этих случаях существенной структурных изменений в дольке не происходило. При индексе К, близком к 0,5, очаги пролиферации и увеличение плоидности гепатоцитов определялись в течение 8 месяцев (рис. 2.4.-5 ... 2.4.-9).

Изучение динамики репаративной регенерации трансплантированной печени с использованием программы «ИМАДЖЕРМЕДИА» показало, что определение оптимальной массы пересаживаемой части печени от родственного донора и эффективная иммуносупрессионная терапия обеспечивают необходимые темпы репарации и полное восстановление структуры трансплантата.

При сопоставлении морфологических и клинических показателей найдено соответствие динамики пролиферативных процессов с нарастанием массы трансплантата по данным ультразвукового исследования.

### 2.4.3. Выводы.

1. Весьма полезным и эффективным инструментом для медицинской диагностики и научных исследований является видеокомпьютерный комплекс «Имаджер-ЦГ» анализа микроскопических изображений гистологических и цитологических препаратов, с модернизированным программным обеспечение «ИМАДЖЕРМЕДИА».

Использование программы «ИМАДЖЕРМЕДИА» позволяет объективизировать морфологическую информацию, экстраполировать характеристики отдельных клеток на орган в целом и, следовательно, сопоставлять морфологические и клиникофункциональные данные, что, в конечном итоге, повышает диагностические возможности и создает перспективы целенаправленного лечения больных.

2. Метод количественной оценки площади и плоидности ядер с помощью унифицированной компьютерной программы «ИМАДЖЕРМЕДИА», апробированный при исследовании регенерации пересаженного родственного фрагмента печени, позволяет объективно оценить синтетическую и пролиферативную функцию популяции клеток и может быть рекомендован для широкого использования в практической медицине с целью определения темпов регенерации и эффективности лечебных мероприятий при различных состояниях — заболеваниях воспалительной природы, ожоговой болезни, последствий ишемических повреждений органов и пр.

Описание и применение метода представлены на XIX научно-практической конференции «Морфометрия в диагностике болезней», Москва, 2001 г., (Шереметьева Г.Ф., Кочарян Е.З., Морозова М.М. Динамика регенерации печеночной ткани при родственных пересадках) и приняты к печати в журнале "Вестник академии медицинских наук" (Шереметьева Г.Ф., Морозова М.М., Готье С.В., Цирульникова О.М., Кочарян Е.З.).

# 2.5. ОПТИМИЗАЦИЯ РАЦИАЦИОННО-ХИМИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

# Возможности компьютерной микрофотоспектрометрии в клинической онкологии

В современной онкологии существуют три основных метода лечения:

- хирургический,
- химиотерапевтический и
- лучевое лечение.

Эмпирически выработаны определенные схемы лечения применительно к каждой конкретной опухоли.

Однако выбор оптимальной формы лечения применительно к каждой конкретной опухоли остается серьезной проблемой. Соотношение между минимальным воздействием и радикальностью (полноценностью) лечения является серьезной задачей современной мировой онкологии.

Очень часто в онкологии в погоне за радикализмом (излечением) проводят достаточно агрессивное лечение. Результатом подобного лечения может быть потеря органа, различные осложнения и приобретение стойкой инвалидности.

Реализация принципа минимальной достаточности лечения с одновременным максимальным радикализмом возможен только в условиях постоянной оценки эффективности лечения.

В настоящий момент критерием эффективности лечения являются клинические методы, т.е. оценка изменения размеров опухоли, уменьшение размера метастазов, положительные изменения инструментальных и лабораторных методов исследования анализы крови, компьютерная томография и пр.

Однако эти методы субъективны, не всегда информативны, не достаточно оперативны в плане проведения.

Кроме того, они не отражают объективных процессов происходящих в клетках опухоли. Именно подобные изменения, происходящие в опухоли определяют причину рецидивирования последней при кажущихся хорошими результатами стандартных методов контроля лечения.

Компьютерная микрофотоспектрометрия позволяет определить в ядрах опухолевых клеток количество ДНК, что является **чрезвычайно** важным показателем, определяющим злокачественность процесса.

Серийное определение этого показателя в процессе лечения может своевременно изменить тактику лечения.

В одном случае, изучая изменение этого показателя, «агрессивность» лечения можно значительно снизить и добиться излечения с минимальными затратами (экономический эффект) и сохранением трудоспособности пациента (качество жизни + экономический эффект).

В другом случае с помощью этого же метода можно своевременно установить факт неэффективности стандартных методов лечения и увеличить интенсивность лечения, добиваясь стойкого излечения или длительной ремиссии процесса.

На рисунках 2.5.-1, 2.5.-2 и 2.5.-3 приведены примеры результатов компьютерного анализа, с помощью программы «ИМАДЖЕРМЕДИА», биопрепаратов онкологических пациентов, подверженных разным дозам облучения.

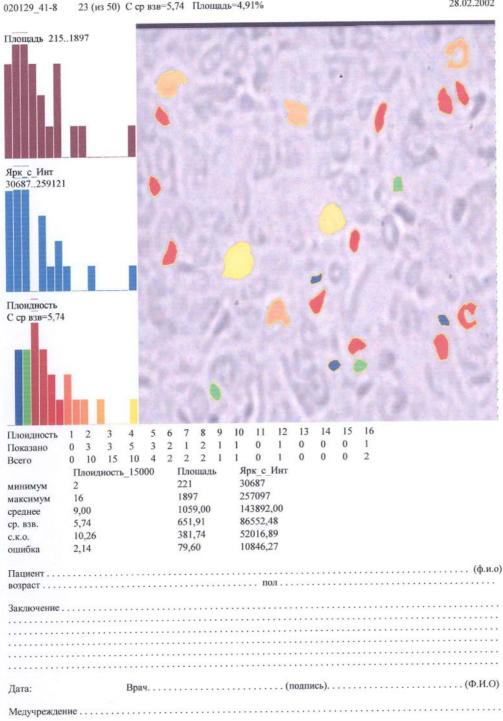
#### Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ 28.02.2002 56 (из 65) С ср взв=3,52 Площадь=7,33% 020130 25-1 Площадь 203..670 Ярк\_с\_Инт 27708..92463 Плоидность С ср взв=3,52 15 16 Плоидность 0 0 0 0 0 0 0 0 0 9 22 16 5 4 0 0 Показано 0 11 27 17 5 5 0 0 0 0 0 0 0 0 Bcero Ярк\_с\_Инт Плоидность\_15000 Площадь 27708 203 минимум 2 92463 670 максимум 436,50 60085,50 среднее 4,00 53529,79 399,50 ср. взв. 3,52 115,83 15652,28 12,48 с.к.о. 1,67 15,48 2091,62 ошибка возраст.....пол.... Имаджер-ЦГ (С) АНО ИНАТ МФК

Рис. 2.5.-1.

#### Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ 28.02.2002 33 (из 50) С ср взв=4,12 Площадь=5,04% 020130 18-6 Площадь 220..1398 Ярк\_с\_Инт 29574..190946 Плоидность С ср взв=4,12 13 14 15 16 10 11 12 5 Плоидность 0 0 0 4 4 2 0 0 0 6 13 Показано 0 0 0 0 0 0 1 0 7 12 15 6 4 2 1 2 Bcero Ярк\_с\_Инт Плоидность\_15000 Площадь 29574 2 229 минимум 817 110142 максимум 523,00 69858,00 4,50 среднее 61325,18 468,85 ср. взв. 4,12 19438,33 11,88 149,61 с.к.о. 3383,78 26,04 ошибка 2,07 Пациент . . . возраст.....пол.... Дата: Имаджер-ЦГ (С) АНО ИНАТ МФК

Рис. 2.5.-2.

# Карта обследования ГИСТОПАТОЛОГИЯ 23 (из 50) С ср взв=5,74 Площадь=4,91%



Имаджер-ЦГ (С) АНО ИНАТ МФК

28.02.2002

### 2.6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ О ПРИМЕНИМОСТИ

Таким образом, морфометрия и плоидометрия, направление как новое патогистологических исследованиях, не связанное с использованием дорогостоящих расходных материалов, лает дополнительную объективную информацию пролиферативной активности клеток эпителия, об его изменившихся генетических свойствах, что должно учитываться патогистологом при принятии решений, связанных с дифференциальной диагностикой опухолей и опухолеподобных образований различных органов.

Морфоденситометрические данные автоматизированного анализа биопрепаратов, получаемые с помощью компьютерного анализатора изображений «Имаджер-ЦГ», с предлагаемой программой и пользовательским интерфейсом плоидометрического исследования клеток и тканей, качественно повышают уровень патогистологических исследований и открывают новые возможности для морфологической диагностики стадий развития опухолей.

С помощью разработанной методики исследования можно следить за процессами регенерации и атрофии тканей, уточнять дифференциальную диагностику, следить за действием лечебных факторов на новообразования, развивать принципы «доказательной медицины».

Впервые полученные возможности объективизации гистологической и цитологической диагностики новообразований различной локализации являются новым направлением в медицине, особенно в онокологии и патологии.

Необходимость развития компьютерной диагностики патологических процессов и различных заболеваний диктуется перспективами медицины XXI века и требует широкого внедрения в медицинскую практику.

# 3. ПАТЕНТНЫЕ И МАРКЕТИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Маркетинговые исследования включали в себя следующее:

- предварительную оценку номенклатуры потенциальных пользователей видеокомпьютерного комплекса анализа цитологических и гистологических изображений «Имаджер-ЦГ», рекомендованного к применению МЗ РФ в декабре 2000 г.;
- разработку, изготовление и распространение рекламно-информационных материалов на видеокомпьютерный анализатор биопрепаратов «Имаджер-ЦГ» и его перспективные модификации;
- подготовку материалов для публикаций по результатам медико-биологических исследований эффективности применения анализатора «Имаджер-ЦГ», с целью научно-медицинской рекламы прибора и реализованной в нем медико-диагностической методики плоидометрических исследований;
- ознакомление с прибором «Имаджер-ЦГ» и возможностями его применения слушателей курсов повышения квалификации кафедры патанатомии Российской академии последипломного образования (в течение 2001 г.);
- научно-медицинскую презентацию прибора «Имаджер-ЦГ» на 18-м Европейском конгрессе патологов в Берлине (сентябрь 2001 г.).

Изделие - в комплекте с микроскопом —п редназначено для надежной и быстрой диагностики предопухолевых изменений в организме, злокачественных новообразований, патологических изменений состава крови. По оценкам экспертов, спрос на видеокомпьютерные комплексы различной направленности растет, и эта тенденция сохранится в связи с прогнозируемым расширением использования систем с искусственным интеллектом, частью которого является зрение.

К известным аналогам создаваемого комплекса можно отнести автоматизированную компьютерную микротелефотометрическую систему "Гистоцитоскоп", систему "Видеотест" (Россия) и анализатор изображения LECO IA 3001 (США).

Продукция ИНАТ МФК образует самостоятельный класс средств компьютерного видеомониторинга, характеризующийся высоким уровнем автоматизации, удобным и "доброжелательным" пользовательским интерфейсом применительно к решению медицинских и медико-биологических задач.

Унификация решений по обработке видеоизображений позволяет использовать изделие в диагностической медицинской сети с пространственно-разнесенными диагностическими пунктами.

Важно также, что системы для различных приложений проектируются на основе единой методологии обработки видеоизображений, что позволяет легко адаптировать возможности систем к требованиям пользователей.

Объем продаж комплекса медико-биологической направленности на ближайшие 2 года прогнозируется, по предварительным оценкам номенклатуры потенциальных пользователей цитологических и гистологических обследований в объеме сотен единиц, при следующем контингенте покупателей:

- Исследователи и исследовательские центры,
- Научно-консультационные и консультационно-диагностические учреждения,
- Диспансеры, поликлиники,
- Разработчики наукоемкой аппаратуры

(см. письмо РМА ПО МЗ РФ, рис. 3.-1).

<u>Ориентировочная цена изделия</u> определяется заказанным потребителем комплектом поставки и может составлять от 1000 долларов США (программное обеспечение) до 12000-15000 тысяч долларов США при полной конфигурации оборудования.

Стоимость модернизированной версии программного обеспечения «ИМАДЖЕРМЕДИА» может составлять порядка 3000 долларов США.

<u>Себестоимость</u> соответственно составляет от 50 долларов США (тиражирование программного обеспечения) до 10000-12000 долларов США (комплексирование оборудования).

Планируемая прибыль на единицу продукции составляет 35%.

Объем продаж и цены конкурентов являются, как правило, конфиденциальной информацией. В этой связи, для продвижения продукции представляются необходимыми специальные оргмероприятия, например, организация предоставления услуг по пользованию разрабатываемым оборудованием

Оказание таких услуг должно включать в себя:

- предоставление пользователям возможности работы на оборудовании для решения их собственных задач. Оборудование будет располагаться в центрах коллективного пользования в России и за рубежом;
- предоставление пользователям возможности работы на специально оборудованном рабочем месте, адаптированном к их задачам. Такое место укомплектуется специальными приспособлениями и оснасткой, препаратами, аппаратурой и приборами для съема, обработки, хранения и передачи информации;

 проведение исследований с использованием оборудования по заданию и за счет заказчика.

С учетом новизны предлагаемого оборудования представляется целесообразным и коммерчески оправданным создать систему платного обучения пользователей с их последующей сертификацией. Такая система обучения, выполняя одновременно функции консультационного центра, была бы полезна также для покупателей оборудования, персонала дилерских и сервисных компаний. Особенно важно функционирование системы обучения на начальных этапах продвижения продукции, когда неумелые действия персонала с новой техникой, могут ее просто дискредитировать. Одновременно в таких центрах велся бы анализ рекламаций от пользователей и учет их пожеланий, чтобы позволило бы построить программу по выпуску оборудования и его модернизации.

Еще одной важной функцией центра должны быть информация и реклама указанной продукции, включающая в себя издательскую деятельность, ИНТЕРНЕТ-технологии, организацию постоянно действующих семинаров и выставок для специалистов и пользователей.

Информация о зарубежных медицинских пользователях, проявивших интерес к приобретению прибора «Имаджер-ЦГ», представлена в табл. 3.-1.

Последняя редакция рекламно-информационного листка, подготовленная к принятой публикации в ведущем профессиональном журнале «Архив патологии» с учетом полученных в работе результатов, приведена на рис. 3.-2.

Проведена также апробация программного обеспечения «Имаджер» в Пущинском научном центре РАН, в биологических исследованиях по экологическому мониторингу (рис. 3.-3).

Министерство здравоохранения Российской Федерации

# РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

123836, Москва, Баррикадная улица, дом 2/1

тел. (095) 252-09-01, (095) 252-21-04. Факс (095) 254-98-05

В институт Нанотехнологий Международного Фонда Конверсии

113184 Москва, ул. Б. Татарская, 38. ИНАТ МФК Повсеместное постарение населения во всех

цивилизованных станах привело к резкому увеличению показателей онкологической заболеваемости. Существующие методы диагностики опухолей иногда связаны с ошибочными диагностическими заключениями, которые имеют трагические исходы. Усилия медиков всего мира направлены на совершенствование диагностики ранних стадий злокачественного роста. В этом направлении существенные успехи достигнуты на базе иммунохимии, требующей дорогостоящих расходных материалов. Гистофизические методики микроскопической диагностики опухолей по кусочкам ткани недостаточно точны изза субъективизма исследователя и отсутствии надежных объективных критериев, свидетельствующих об измении генома клонов размножающихся клеток. Эти критерии может дать только компьтерная микроспектрофотометрия цитологических и В нашей стране в каждом гистологических препаратов. субъекте Федерации функционируют Онкологические диспансеры, патологоанатомические отделения Республиканских и областных больниц, в которых происходит уточнение сложных цитологических и гистологических диагнозов новообразований. В связи с этим можно ожидать, после соответствующей рекламы, 100-200 заказов на компьютерный анализатор изображений (Имаджер-БИОМЕД.2). Далее число заказчиков может нарастать за счет цитологических лабораторий и кафедр патологической анатомии медицинских институтов и академий.

Профессор кафедры патологической анатомии РМАПО, Заслуженный деятель науки РСФСР, академик РАЕН, дин,

Профемор — СГ. Автандилов 25.07/2000 Росси

noc, te and concept

Рис. 3.-1.



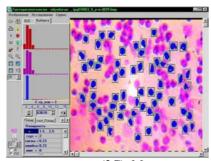
# АНАЛИЗАТОР МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗОБРАЖЕНИЙ БИОПРЕПАРАТОВ «ИМАДЖЕР-ЦГ»

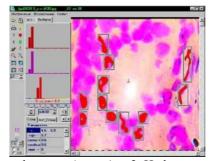
#### Рекомендован МЗ РФ к применению в медицинской диагностической практике

Предназначен для цитогистопатологии и кариотипирования, оценивающих патологию клеток и тканей на основе измерений кариоцито-гистометрических и денситоморфометрических свойств микроскопических изображений биопрепаратов, с использованием перспективной методики плоидометрии, основанной на сравнении содержания ДНК в интерфазных ядрах клеток со стандартом плоидности 2С.

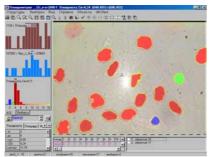
Позволяет объективизировать контроль за развитием атрофических, гипертрофических, дистро-фических, некробиотических, воспалительных, иммунологических, регенерационных и неоплас-тических процессов и морфологической основы болезней.

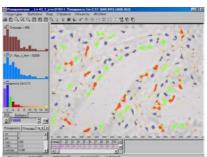
# Способствует повышению точности и достоверности клинических диагнозов



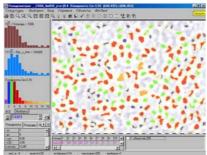


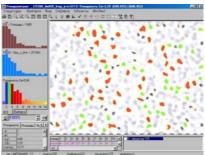
1. Стандарт плоидности (2С). Мазок крови. Ядра малых лимфоцитов (синие). 2. Инфильтрирующий рак молочной железы. Срез. Пентаплоидные ядра (красные).





3. Рак молочной железы. Мазок. Пентаплоидные ядра (красные). 4. Проток предстательной железы. Срез. Диплоидные и триплоидные ядра (синие и зеленые). Единичные тетраплоидные ядра (красные).





- 5. Крупноклеточная В-лимфома. Срез. Преобладание тетра- и пентаплоидных ядер (красные и темнокрасные).
- 6. Лимфогрануломатоз. Срез. Преобладание три- и тетраплоидных ядер (зеленые и красные).

Работа выполнялась при поддержке Фонда содействия развитию малого предпринимательства в научно-технической сфере по проекту № 2837

Таблица 3.-1.

$N_0N_0$	Ф.И.О.	Реквизиты			
1.	Guski, Hans	Institut fur Pathologie der Charite Campus Charite Mitte,			
		Humboldt-Universitat zu Berlin			
		Schumannstrabe 20 / 21 10117 Berlin <b>Germany</b>			
2.	Haroske, Gunter	Institut fur Pathologie Klinikum Dresden-Friedrichstadt			
		Friedrichstr. 41 01067 Dresden Germany			
3.	Kallioniemi, Oli-P	Cancer Genetic Branch,			
		National Human Genome Reseach Institute,			
		NIH Building 49, Room 4A24 49 Convent Drive, MSC 4470			
		Bethesda 20892-4470 USA			
4.	Tavassoli, Fattanch	Armed Forces Institute of Pathology			
		GYN / Breast Pathology Bldg. 54 14th Street and Alaska			
		Avenue			
_	D ( ) D ( ) C	Washington DC, 20306-6000 USA			
5.	<b>Bostwick</b> , David G.	Bostwick Laboratories 935 / W Broad Street Richmond VA, 23294 USA			
6.	Holland, Roland	National Expert and Training Centre			
		For Breast Cancer Screnning Academisch Ziekenhuis			
		Nijmgen			
		Geert Grooteplein 18 6500 Nijmgen Netherlands			
7.	Leica Microsystems	Wetzlar Gmbh Ernst-leitz-Strasse 17 – 37 D-35578 Wetzlar			
	•	Germany			
		E-mail: Katja.Peter@leica-microsystems.com			
8.	Ian Salisbury	10 Lonsdate Gardens Tunbridge Wells Kent TN1 1NU			
		United Kingdom			
		Tel: +44 (0) 1892 539588 Mobile: 0771 8036959			
		E-mail: <u>i.salisbury@fairfield-imaging.co.uk</u>			
9.	Uwe Olff P.A.L.M.	Microlaser Technologies AG Am Neuland 9 + 12			
		D-82347 Bernried Germany			
		Tel: +49())81 58-9971-0 Mobil: +49(0)172-754-7732			
10	D I I D A	E-mail: <u>Uwe.Olf@palm-microlaser.com</u>			
10.	Baak, Jan P. A.	MD; PhD; FRCPath; FIAC(Hon); Dr HC(Antwerp)			
		Institute of Pathology Free University Hospital Charlotte de Boelelaan 26 2082 BJ Santpoort-Zuid			
		Netherlands			
11.	Deutschland: OLYMPUS	Wendenstrabe 14-18 D-20097 Hamburg Germany			
11.	OPTICAL CO.	Tel: +49-40-23773-115 Fax: +49-4—230817			
	(EUROPA) GMBH	E-mail: microscopy@olympus-europa.com			
	Mr. Michael Czempiel				
12.	Dalquen, Peter	Institut fur Pathologie der Universitat			
		Schonbeinstrasse 40 4003 Basel Switzerland			
13.	Andreas Hinz	medite Gesellscaft fur Medizintechnik mbH			
		Wollenweberstrabe 12 31301 Burgdorf Germany			
		Tel. 0 51 36 / 88 84 – 0 Mobil: 0171 / 8 22 89 33			
		E-mail: <u>hinz@medite.de</u>			
14.	ELIA ROSETTA	MICROWAVE LABORATORY SYSTEMS			
		MILESTONE s.r.l. – Via Fatebenefratelli, 1/5 –			
		24010 SORISOLE (BG) Italy			



#### РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

#### ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ

142290 Пущино Московской области, ул. Институтская, 3 Тел. (095) 923-96-68 Факс (27) 79-0553

12.10. 2000 No 12308 21/4-02 Ha No OT

В Институт нанотехнологий Международного фонда конверсии 113184, г. Москва, ул. Б. Татарская 38

В Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН в течение 20 лет ведутся разработки биотехнологий для мониторинга широкого применения: от экологии (контроль качества пресной воды) до фармацевтики (быстрый скрининг фармакологических препаратов). Естественно, использование в этих биотехнологиях компьютерных средств обработки и анализа информации и, в частности, методов автоматического анализа изображений, позволило бы стандартизировать методику биомониторинга и, соответственно, повысить качество и достоверность диагностирования.

В связи представляется интересной разработка Вашего института - программноаппаратный комплекс для анализа биомедицинских изображений "ИмаджерБИОМЕД2". Проведенная в инициативном порядке его предварительная апробация показала, что изделие может стать базовым модулем перспективных мониторинговых биотехнологий с компьютерной морфометрией широкого профиля для решения максимально возможного круга задач планиметрического анализа биологических объектов.

Например, напим институтом готовится к внедрению перспективная тестмониторинговая методика, основанная на прижизненном контроле количественных характеристик процесса регенерации нервных клеток и их волокон у плоских червей планарий. Эта методика, основанная на универсальной биологической тест-системе, демонстрирует высокую чувствительность, в частности, при анализе пресной воды на присутствие широкого спектра поллютантов - от биологически активных веществ (нейрогормонов и нейропептидов) до нитратов и диоксинов.

При реализации методов биоконтроля с использованием комплекса "ИмаджерБИОМЕД2" получается готовая для практического внедрения система контроля, включающая стандартный биолотический тест-препарат (линейные животные, планарии), стандартное оборудование съема первичной информации (микроскоп — телевизионная камера — видеобграббер — компьютер) и унифицированные программно-алгоритмические средства анализа слабоформализованных данных (изображений).

В настоящее время такая совместная разработка может найти широкое применение в системе Госсанэпидназдора как автономная и универсальная система контроля качества пресной воды.

Система представляет в конкурентноспособной для зарубежного патентования.

Дирек при института в отетической и экспериментальной биофизики РАН

член-корр 2 А ката обессот

# 4. ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО ПРОДОЛЖЕНИЮ РАБОТ

Результаты данной работы по практическому применению изделия «Имаджер-ЦГ», выявленная маркетинговая оценка продукции класса видеокомпьютерных комплексов, а также достигнутый уровень проработки и унификации программно-аппаратных средств автоматизированного анализа визуальных данных, дает основания считать целесообразным и коммерчески перспективным продолжение инвестиций по данному научно-техническому направлению.

Наиболее актуальным развитием настоящей работы является продолжение исследований расширению номенклатуры медико-диагностических областей ПО применения модернизированной модификации видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» и организация и проведение его сертификации в МЗ РФ, с включением в перечень обязательных медицинских обследований.

Весьма актуальным представляется такая форма работ, как организация и ввод в эксплуатацию межведомственных центров коллективного пользования, коммерческого внедрения, модернизации видеокомпьютерных приборов анализа изображений, а также оказания услуг по компьютерной обработке и анализу изображений, в том числе, и пересылаемых по информационным сетям.

Идея такого рода проекта, например, **совместного предприятия**, заключается в создании научно-промышленно-торговой структуры для совместной с инвестрорм коммерческой реализации перспективных разработок и «ноу-хау» в сфере информационных технологий по тематике интеллектуальных робототехнических систем для медицинской и промышленной диагностики.

Научно-техническая направленность проекта отражает мировые тенденции исследований в этой области и базируется на разработках эффективных унифицированных алгоритмов автоматизированного анализа слабоформализованных данных (в частности, изображений и звука) и новых методах построения интеллектуальных (со способностью к формированию адекватных условно-рефлекторных стереотипов поведения) нейросетей.

Пользовательская направленность проекта состоит -

<u>1-й этап</u>: внедрение (маркетинг, освоение серийного выпуска, продажа, обслуживание, авторское сопровождение) существующих видеокомпьютерных приборов (охранная сигнализация, анализатор микроскопных изображений).

Последующие этапы проекта предполагают развитие видеокомпьютерного комплекса анализа биомедицинских изображений расширением номенклатуры медико-биологических исследований (гематология, макроморфология); освоение опытного производства

модификаций унифицированного видеокомпьютерного комплекса анализа изображений для задач оперативного контроля визуальной обстановки (охранная сигнализация, мониторинг транспортных потоков); апробацию экспериментальных образцов принципиально новых компьютерных игрушек типа «тамагочи» - со способностью к естественному диалогу в аудио- и видео- модальностях.

Реализуемость проекта обеспечивается тем, что предлагаемое для реализации «ноу-хау» опосредуется в виде прикладных программных продуктов, функционирующих на общеупотребительной вычислительной технике класса ПЭВМ IBM PC и сопряженных со стандартным видео-, связным и орг- оборудованием.

Коммерческая сторона проекта может включать непосредственные поставки продукции; сервисное обслуживание; услуги по обучению пользователей и аренде (центры коллективного пользования).

Развитие коммерческого аспекта предполагается в направлении зарубежного патентования «ноу-хау» и продукции на его основе; продаже патентов и лицензий на тиражирование и распространение; привлечении различных грантов на исследования по данной тематике.

Следующим по актуальности представляется исследование применимости видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» в промышленной диагностике и контроле безопасности.

В частности, на базе развиваемой видеокомпьютерной технологии «Имаджер» созданы и используются на практике автоматическая система охранной сигнализации «Аргус+» и система контроля движущихся объектов (транспортных средств).

Основная пользовательская функция, обеспечиваемая прибором «Аргус+», - «детекция активности», т.е. автоматическая регистрация только значащих, событийных картинок, являющихся источником новой для Пользователя информации.

Другими преимуществами системы «Аргус+» являются возможность подключения к одному компьютеру до 16-ти видеокамер; передача Протокола «тревожных» видеокадров на другие удаленные компьютеры, в том числе и по обычному телефонному каналу.

Функциональная схема изделия «Аргус+» приведена на рис. 4.-1.

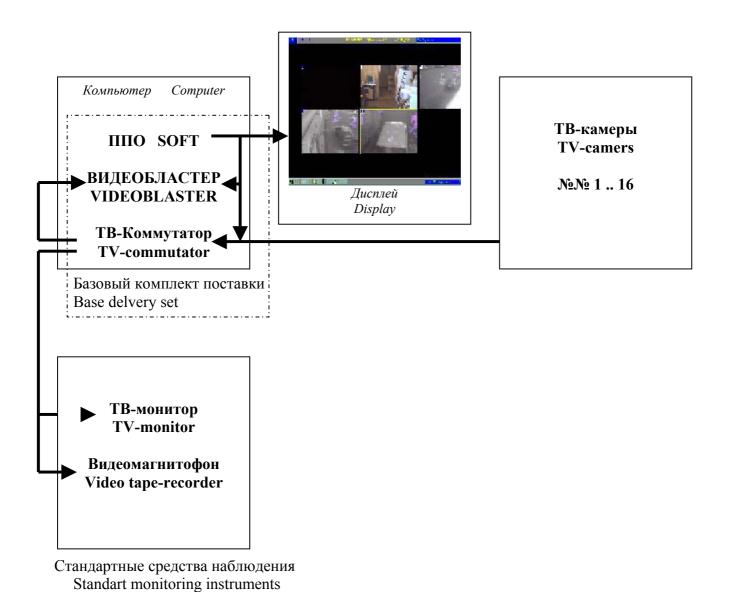


Рис. 4.-1.

Весьма полезным представляется использование видеокомпьютерной системы «Аргус+» для контроля периметров охраняемых объектов, в том числе, и для скрытного автоматизированного контроля пограничных территорий. Здесь система «Аргус+» обеспечивает абсолютно достоверный, объективный, без пропусков событий, контроль визуальной обстановки. При этом для наблюдения по многим направлениям достаточно одного оператора, а параллельно вся оперативная, визуальная и событийная, информация может автоматически пересылаться компьютером «по инстанциям».

Наиболее эффективным, и сегодня как никогда актуальным, является также применение видеокомпьютерной системы «Аргус+» в комплексах охраны локальных объектов повышенной опасности:

- склады горючих материалов и боеприпасов;
- аэробусы, контрольно-пропускные пункты;
- специальные промышленные объекты гидротехнические сооружения, АЭС, распределительные узлы трубопроводов, метрополитен и другие труднодоступные коммуникации;
- предприятия социального назначения больницы, школы, спорткомплексы, высотные офисы, правительственные учреждения.

Во всех вышеперечисленных случаях видеокомпьютерная система «Аргус+» позволяет организовать дистанционный контроль ситуации на объекте, без участия охранного личного состава, посредством компьютерной передачи «тревожной» видеоинформации на Центральный Контрольный Пункт, где может находиться дежурная бригада по чрезвычайным ситуациям.

Видеокомпьютерная система автоматизированного контроля визуальной обстановки класса «Аргус+» легко интегрируется (посредством стандартных системных компьютерных функций) с любыми другими комплексами контроля безопасности.

Также видеокомпьютерная система «Аргус+» представляет собой самостоятельное техническое средство контроля безопасности и может быть использовано для создания «полевых» – без персонала, как открытх («маяки»), так и замаскированных. полностью автономных пунктов наблюдения (АПН, рис. 4.-2.).

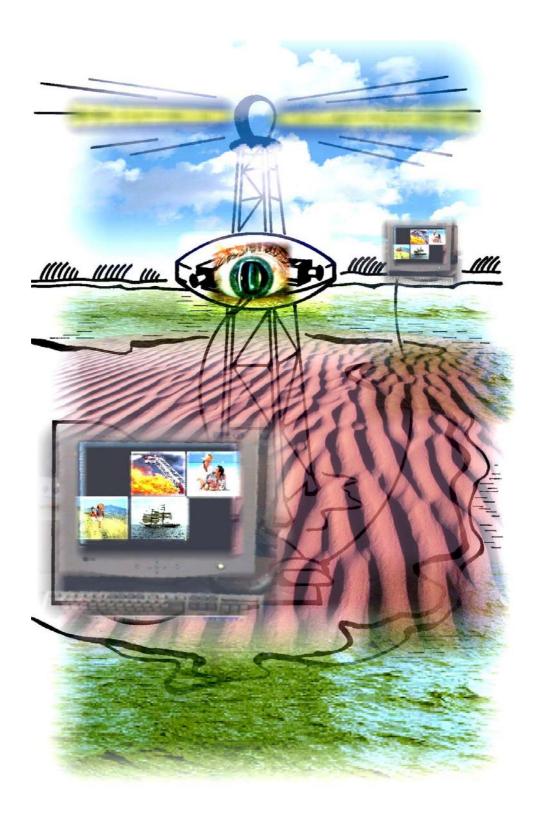


Рис. 4.-2.

Представляются перспективными следующие проекты, направленные на опережающую разработку и внедрение специализированных модификаций видеокомпьютерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА», например, таких как компьютерный видеотелефон, компьютерный полиэкранный телевизор, видеокомпьютерная система контроля транспортных потоков.

# Компьютерный видеотелефон

# 1. Стадия разработки -

Имеются в наличии отдельные программные модули,

- для передачи изображений по телефонной линии связи через факс-модем
- для записи, воспроизведения, генерации аудио-данных
- для редактирования и распознавания изображений,

которые используются в промышленных прикладных программно-аппаратных изделиях «Аргус+» (видеокомпьютерная охранная сигнализация), «Имаджер-ЦГ» (компьютерный анализатор биомедицинских изображений), «ИМАДЖЕРМЕДИА» (графический редактор распознавания изображений).

# 2. Краткая аннотация -

Идея проекта заключается в создании прикладной программы для стандартного компьютера, обеспечивающей пользовательскую функцию двусторонней видеофонной связи.

Суть проекта заключается в создании действующего экспериментального образца компьютерного видеотелефона, состоящего из стандартных аппаратных средств, стандартного системного программного обеспечения и унифицированного прикладного программного обеспечения для обработки и анализа изображений.

В состав стандартных аппаратных средств входят:

- персональный компьютер в комплекте с необходимой периферией (факс-модем, видеобластер, звуковая карта);
  - телевизионные камеры.

Научно-техническая новизна и собственно проблематика разработки заключается в разработке программы, обеспечивающей дуплексную линию телефонной связи для 2-х компьютеров-корреспондентов, на основе использования уже существующих программных драйверов для связной компьютерной периферии.

Второй аспект научно-технической новизны состоит в эргономической оптимизации пользовательского интерфейса компьютерной видеофонной связи на основе использования алгоритмическо-программного и инженерно-конструкторского «ноу-хау» в области

автоматизированного анализа слабоформализованных сигналов и данных и создания видеокомпьютерных приборов реального времени.

# 3. Назначение конечного продукта -

Прикладная программа, обеспечивающая видеотелефонную связь

# 4. Предполагаемая длительность проекта -

Разработка и изготовление действующего экспериментального образца (на стандартном оборудовании - без БИС) - 9..12 месяцев.

# 5. Предлагаемый общий бюджет -

- закупаемое оборудование \$40,000

- сырье, материалы, компоненты \$20,000

- общий размер зарплаты исполнителей \$180,000

# 6. Обобщенный календарный план -

NoNo	Содержание этапов работ	Продолжи- тельность этапов работ	Исполнител и работ	Стоимость этапа
1.	Разработка и утверждение Технического Задания и сопутствующих планово-экономических документов. Подготовка и оборудование производственных помещений.	2 мес.		15%
2.	Разработка, отладка, испытания, доработка прикладной программы видеотелефонной связи	6 мес.		70%
3.	Испытания изделия. Первичная реклама и презентации изделия. Маркетинговые исследования.	1 мес.		15%
	Итого:		\$ 250,000	

# Компьютерный полиэкранный телевизор

# 1. Стадия разработки -

Имеется в наличии программно-аппаратный модуль для полиэкранного наблюдения «живого» ТВ-изображения на дисплее компьютера. Модуль штатно используется в изделии «Аргус+» (видеокомпьютерная охранная сигнализация).

# 2. Краткая аннотация -

Идея проекта заключается в создании прикладной программы для стандартного компьютера (с видеобластером и ТВ-коммутатором), обеспечивающей пользовательскую функцию полиэкранного просмотра вещательных ТВ-программ.

Суть проекта заключается в создании действующего экспериментального образца компьютерного полиэкранного телевизора, состоящего из стандартных аппаратных средств(компьютер, видеобластер, ТВ-коммутатор, ТВ-тюнеры) и унифицированного прикладного программного обеспечения для полиэкранного наблюдения (просмотра) и регистрации (компьютерное видеофото) ТВ-изображений.

Длительность проекта - 12..16 мес. Данный проект включает разработку (линейное схемотехническое конструирование, предварительно согласованное с партнерами по апппаратной части) и изготовление опытных партий дополнительных устройств:

### - унифицированный видеобластер

ориентировочная стоимость \$ 50,000, с изготовлением 5 опытных образцов, имеет самостоятельное значение и может продаваться как отдельное изделие с розничной стоимостью ~ \$ 500, спрос постоянный есть на внутреннем и внешнем рынках;

### - телевизионная приставка

параллельно работающие 5-8 ТВ-тюнеров, программируемые от компьютера, ориентировочная стоимость \$ 75,000, с изготовлением 5 опытных образцов,

#### - аудио-коммутатор

на 16 входов и 2-3 выхода, управляется программно от компьютера, может быть совмещен конструктивно с **телевизионной приставкой,** ориентировочная стоимость \$ 50,000, с изготовлением 5 опытных образцов, может использоваться также для создания видео-аудио-компьютерных охранных систем.

Научно-техническая новизна и собственно проблематика разработки заключается

- а) в модернизации и оптимизации уже существующего программно-аппаратного модуля для полиэкранного просмотра «живых» ТВ-изображений;
- б) в разработке и изготовлении опытной партии устройства телевизионной приставки состоящего из нескольких параллельно работающих ТВ-тюнеров, управляемых

программно от компьютера, и включающего также аудио-коммутатор на 16 входов и 1 выход.

Другими словами, научно-техническая новизна состоит в повышении уровня унификации аппаратно-программных компьютерных средств наблюдения и регистрации «живых» ТВ-изображений.

# 3. Назначение конечного продукта -

Унифицированный программно-аппаратный модуль, штатно сопрягаемый с компьютером, для полиэкранного просмотра «живых» ТВ-изображений, включая вещательные ТВ-программы, и «компьютерного фотографирования» отдельных видеокадров.

- 4. Предполагаемая длительность проекта 12..16 месяцев.
- 5. Предлагаемый общий бюджет -
- контрагенты (по разработке и изготовлению опытной партии аудио-ТВ-приставки к компьютеру и унифицированного видеобластера) \$ 175,000
  - закупаемое оборудование \$ 90,000
  - сырье, материалы, компоненты \$ 10,000
  - общий размер зарплаты исполнителей \$55,000

# 6. Обобщенный календарный план -

NºNº	Содержание этапов работ	Продолжи- тельность Этапов работ	Исполнители работ	Стоимость этапа
1.	Разработка и утверждение Технического Задания и сопутствующих планово-экономических документов. Подготовка и оборудование производственных помещений.	2 мес.		15%
2.	Разработка, отладка, испытания, доработка прикладной программы полиэкранного телевизора	35 мес.		20%
3.	Разработка и изготовление опытной партии аудио-ТВ-приставки к компьютеру	35 мес.		25%
4.	Разработка и изготовление опытной партии унифициро-ванного видеобластера	35 мес.		25%
5.	Испытания изделия. Первичная реклама и презентации изделия. Маркетинговые исследования.	1 мес.		15%
	Итого:		\$ 350,000	

# Видеокомпьютерная система контроля транспортных потоков

# 1. Стадия разработки -

Имеется в наличии экспериментальный образец изделия «Имаджер\_КОП» - видеокомпьютерный пеленгатор:

Пассивная телевизионная система контроля границ, подъездных путей, безопасности движения





Рис. 4.-3.

# Реализованные пользовательские функции:

- Автоматическая детекция движущихся транспортных средств, автоматическое отслеживание их положения и измерение скорости;
- Автоматическая регистрация запись в компьютер превышений установленного ограничения скорости;
- Быстрый автоматический анализ зарегистрированного изображения "нарушителя" и выделение регистрационного номера транспортного средства

### Состав:

- компьютер типа «Пентиум» под Windows
- две телевизионные камеры (на одно направление)
- видеобластер цветной + ТВ-коммутатор
- прикладная <u>программа «Имаджер КОП»</u> (зарегистрирована Роспатентом).

По сравнению с известными аналогами имеет следующие преимущества:

- безрадарная скрытная пассивная экологически чистая система;
- ◆ реализована на стандартных компьютерных апаратных средствах и прикладной программе и потому проще в установке и эксплуатации;

- ◆ программный модуль анализа изображения использует весь набор авторских унифицированных алгоритмическо-программных средств автоматической обработки и анализа изображений, включая функцию автоматического слежения за положением объекта по ТВ-изображению;
  - в программе все функции -от измерения скорости до распознавания номера;
  - ◆ программа «открыта» для сопряжения с БД.

# 3.2. Краткая аннотация -

Идея проекта состоит в создании перспективного изделия - унифицированного видеокомпьютерного прибора для контроля движущихся объектов - на базе стандартного компьютера (с видеобластером и ТВ-коммутатором) и прикладной программы, обеспечивающей пользовательскую функцию автоматизированного контроля транспортных потоков (авто-транспорт, жд-транспорт).

Суть проекта заключается в создании и сертификации опытного образца изделия в процессе натурных испытаний и доработки только программного обеспечения уже существующего экспериментального образца.

Длительность проекта - 12 мес.

Данный проект должен включать контрагентов по:

- монтажу и техническому обслуживанию образцов изделия для их испытаний на объектах пользователя;
  - соисполнители испытаний службы ГИБДД;
- аттестация и регистрация изделия как измерительного устройства в Госстандарте (предварительное согласование возможности такой работы также проведено).

Представляется перспективной также модификация (или расширение) данного проекта - создание мобильной видеокомпьютерной системы контроля безопасности движения: на 2 автомобилях (на одном - ТВ-камеры с проводной линией ТВ-связи, на другом - компьютер и мобильный пост ГАИ).

Научно-техническая новизна разработки заключается в использовании авторского «ноухау» в области автоматического слежения за объектами по ТВ-изображению, а также - в использовании авторского «ноу-хау» в области автоматического распознавания изображений.

# 3.3. Назначение конечного продукта -

Компьютерный инструмент для автоматизированного контроля:

- автотранспортных потоков и безопасности движения;
- вагонного состава формируемых жд-поездов (товарных);

- трафика транспортных средств на различного рода КПП;
- различного рода «пограничных» зон.

# 3.4. Предполагаемая длительность проекта -

Комплексирование и монтаж экспериментальных образцов на объектах натурных испытаний, натурные испытания, доработка прикладного программного обеспечения по результатам натурных испытаний, подготовка сертификации изделия как измерительного устройства

- 12 месяцев.
- 3.5. Предлагаемый общий бюджет -
- комлексирование 3-х экспериментальных образцов \$ 65,000
- монтаж изделий на объектах испытаний \$30,000
- сырье, материалы, компоненты \$10,000
- общий размер зарплаты исполнителей \$50,000
- прочие прямые расходы
- 3.6. Обобщенный календарный план -

<u>№№</u>	Содержание этапов работ	Продолжи- тельность этапов работ	Исполнители работ	Стоимость этапа
1.	Разработка и утверждение	2 мес.		
	Технического Задания и			
	сопутствующих планово-			
	экономических документов.			
	Подготовка и оборудование			
	производственных помещений.			
	Комплексирование образцов.			
2.	Монтаж изделий на объектах испытаний	2 мес.		
3.	Натурные испытания	6 мес.	_	
4.	Доработка ППО по результатам			
	испытаний.	2 мес.		
	Подготовка к сертификации			
	Итого:		\$ 200,000	

# ВЫВОДЫ

- 1. Результаты опытной эксплуатации образцов видеокомпьютерного анализатора биопрепаратов «Имаджер-ЦГ», полученные в данной работе, подтверждают его высокую эффективность в медицинской диагностике стадий онкогенеза и мониторинге репаративной регенерации различных органов.
- 2. Разработаный и изготовленный действующий макет прикладного программного обеспечения «ИМАДЖЕРМЕДИА» для анализа изображений, существенно расширяет области применения унифицированного видеокомпьютерного комплекса «Имаджер», в том числе, и для медицинской диагностики.
- 3. Результаты медико-биологических исследований, полученные в процессе опытной эксплуатации прибора «Имаджер-ЦГ», с версией ППО «ИМАДЖЕРМЕДИА», дают основания рекомендовать прибор «ИМАДЖЕРМЕДИА» для широкого использования в практической медицине с целью определения темпов регенерации и эффективности лечебных мероприятий при различных состояниях заболеваниях воспалительной природы, ожоговой болезни, последствий ишемических повреждений органов и пр.

Также по результатам данных медико-биологических исследований медицинскими соисполнителями работы отмечается следующее:

- реализованная в ППО «ИМАДЖЕРМЕДИА» медико-диагностическая методика плоидометрии, как новое направление в патогистологических исследованиях, не связанная с использованием дорогостоящих расходных материалов, дает объективную дополнительную информацию о пролиферативной активности клеток эпителия, об его изменившихся генетических свойствах, что должно учитываться патогистологом при принятии решений, связанных с дифференциальной диагностикой опухолей и опухолеподобных образований;
- морфоденситометрические данные автоматизированного анализа биопрепаратов, получаемые с помощью компьютерного анализатора изображений «Имаджер-ЦГ», с предлагаемой программой и пользовательским интерфейсом плоидометрического исследования клеток и тканей, качественно повышают уровень патогистологических исследований и открывают новые возможности для морфологической диагностики болезней и опухолей;
- впервые полученные возможности объективизации гистологической и цитологической диагностики новообразований различной локализации являются новым направлением в медицинской науке и практике;

- с помощью разработанной методики исследования можно следить за процессами регенерации и атрофии тканей, уточнять дифференциальную диагностику, следить за действием лечебных факторов на новообразования, развивать принципы «доказательной медицины».
- 4. Выполненные патентные и маркетинговые исследования подтверждают конкурентноспособность прибора на отечественном и мировом рынках.

Продвижение и коммерческое внедрение прибора в медицинскую практику требуют специальных организационно-финансовых мероприятий.

- 5. Результаты данной работы по практическому применению изделия «Имаджер-ЦГ», выявленная маркетинговая оценка продукции класса видеокомпьютерных комплексов, а также достигнутый уровень проработки и унификации программно-аппаратных средств автоматизированного анализа визуальных данных, дает основания считать целесообразным и коммерчески перспективным продолжение работ по данному научнотехническому направлению в следующих областях:
- исследования по расширению номенклатуры медико-диагностических областей применения модернизированной модификации видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» и организация и проведение сертификации в МЗ РФ, с включением в перечень обязательных медицинских обследований;
- исследования применимости видеокомпьтерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА» в промышленной диагностике и контроле безопасности. Представляются перспективными проекты, направленные на опережающую разработку и внедрение специализированных модификаций видеокомпьютерного комплекса «ИМАДЖЕРМЕДИА», например, таких как компьютерный видеотелефон, компьютерный полиэкранный телевизор, видеокомпьютерная система контроля транспортных потоков.

# Литература

- 1. Абрамов М.Г. Клиническая цитология. Второе издание. М:.Медицина. 1976.
- 2. Автандилов Г.Г., Григорьева С.Г. Оценка плоидности ядер клеток железистого и протокового эпителия молочной железы при диагностике стадий канцерогенеза. Клиническая лабораторная диагностика, № 8, 2001.
- 3. Автандилов Г.Г. К вопросу о гистологической номенклатуре и классификации стадий канцерогенеза в молочной железе. Вопросы онкологии, том 47, № 5, 2001.
- 4. Автандилов Г.Г. Компьютерная микрофототелеметрия в диагностической гистоцитопатологиию М., РМАПО, 1994, ISBNS 5-7249-0377-6; Avtandilov G.G. The Computerized Microtelephotometry in Diagnostic Histocytopathology Moscow, 1996.
- 5. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. М., 1973.
- 6. Автандилов Г.Г., Перов Ю.Л., Григорьева С.Г., Зайратьянц О.В. Патогистологическая диагностика предопухолевых процессов и опухолей молочной железы. Архив патологии, том 63, 2001.
- 7. Автандилов Г.Г. Плоидометрия новое диагностическое направление в патогистологических исследованиях. Материалы научной конференции с международным участием, посвященной 10-летию ПГУ им. Т.Г. Шевченко, выпуск 3, Тирасполь, РИО ПГУ, 2001.
- 8. Автандилов Г.Г Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики в аспектах морфометрии. М. –1984.
- 9. Баскаков В.Е., Мотин Ю.А., Саниев К.Б. Программный комплекс для регистрации, редактирования и распознавания изображений и звуков «ИмаджерМЕДИА» (ПК «ИмаджерМЕДИА»). Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2001610675 от 5 июня 2001 г., РОСПАТЕНТ, уведомление № 2001610619 от 8.06.2001 г.
- 10. Белянин В.Л., Цыплаков Д.Э. Диагностика реактивных гиперплазий лимфатических узлов. СПб Казань. 1999. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Руководство. Изд.3. М.: Медицина. 1982.
- Гистологическая и цитологическая классификация опухолевых болезней кроветворной и лимфоидной тканей. МГКО № 14. ВОЗ Женева.1981.
- 12. Головин Д.И. Ошибки и трудности гистологической диагностики опухолей.Л., 1982.

- 13. Готье С.В., Камалов Ю.Р., Морозова М.М., Овчинников В.И., Скипенко О.Г., Филин Ф.В., Цирульникова О.М., Шереметьева Г.Ф., Шишло Л.А. Клиникоморфологическая оценка регенераторных процессов в печени после ее ортотопической трансплантации или обширной резекции. Итоги, РНЦХ РАМН, 1998.
- 14. Готье С.В., Цирульникова О.М., Филин А.В. и др. Трансплантация правой доли печени от живого родственного донора. // Анналы РНЦХ РАМН. –вып. 5. с. 6-11, 2000.
- 15. Григорьева С.Г. Патогистологическая дифференциальная диагностика интраэпитальных неоплазий и карцином молочной железы. Российские медицинские вести, № 2, 2001.
- 16. Завадская Е.А. Цитологический механизм репаративного роста печени в условиях ее хронического повреждения и частичной гепатэктомии //Дисс.канд.биол.наук, 1989.
- 17. Закономерность накопления ДНК в ядрах клеток ростковой популяции при дисплазиях и злокачественном росте тканей человека (Диплом № 68) / Автандилов Г.Г., Казанцева И.А., Червонная Л.В. // Научные открытия. М. Спб. 2000.
- 18. Залцмане В.К., Макарова Н.И., Бояре И.В. Электронномикроскопический анализ приспособительных и компенсаторных процессов при патологии печени. в сб. "Компенсаторно-приспособительные процессы в патологии", Рига, "Знание", 1987.
- 19. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Пер. с англ. / Под ред. С. Херингтона, Дж. Макги. М.- Мир.- 1999.
- 20. Решение о выдаче свидетельства на полезную модель «Программно-аппаратный комплекс для анализа биологических препаратов», № 2000125191/20(027058), от 09.10.2000, РОСПАТЕНТ, Федеральный институт промышленной собственности.
- 21. Саниев К.Б. и др. Создание модификаций видеокомпьютерного комплекса анализа микроскопных изображений биопрепаратов для медицинской диагностики в области гематологии и смежных областях. − Научно-технический отчет по 1-му этапу НИОКР «Создание видеокомпьютерных средств анализа данных для медицинской диагностики и медико-биологических исследований», ГР № 01200110060, по проекту 1242р/2837 Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.
- 22. Саркисов Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. Руководство. Под ред. Д.С.Саркисова., М.: Медицина, 1987.

- 23. Саркисов Д.С., Аруин Л.И., Туманов В.П. Морфология компенсаторно-приспособительных процессов. Итоги науки и техники, Патологическая анатомия, ВИНИТИ, 1983, п.4, стр.131-136.
- 24. Avtandilov GG (1975) Die Anwendung der Mikrospektrophotometrie in der Diagnostik Bosartiger Tumoren. Zbl Allg Pathol 119:33 –37.
- 25. Avtandilov G.G., Grigorieva S.G., Gundorova L.V., Ananyan M.A., Saniev K.B., Sultan-Zade T.S. Application of "IMAGER-CH" Analyzer for Better Tumor Diagnostics.

   8<sup>th</sup> International Conference on Neural Information Processing, November 14-18, 2001, Shanghai, China, ICONIP2001 Proceedings, Volume 3, p.1401-1402.
- 26. Avtandilov G.G. Perspectives on the use of microspectrophotometry in the diagnosis of pretumours process and malignant tumours // Cancer, 1976. Vol. 38. P. 256—260. Cancer 1976.- Vol. 38. P. 256 260.
- 27. Bartl R., Hansmann M.L., Frisch B et all. Comparative histology of malignant lymphomas in lymph node and bone marrow // Br. J. Haetmatol. (1988) 69: 229 237.
- 28. Bennett J.M, Catovsky D., Daniel MT. et all. Proposals for the classification jf the chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias // J. Clin. Pathol..(1989) 42: 567 –584.
- 29. Bostwick DG, Brawer MK (1987) Prostatic intraepithelial neoplasia and early invasion in prostate. Cancer 59: 788 –794.
- 30. Chaib E., Bertevello P., Saad W.A., et al. Predicting the donor liver lobe weight from body weight for split-liver transplantation. // HPB. 1997. Vol. 1 (suppl. 1). p. 85-90.
- 31. Columbano A, Shinozuka H. Liver regenaration versus direct hyperplasia. FASEB Jn 6, Aug; 10(10): 1118-28.
- 32. European Commission Working group on Breast Screening pathology Consistency achieved by 23 European pathologists from 12 countries in diagnosing breast disease and reporting prognostic features of carcinomas // Virchows arch. –1999.- Bd. 434.- S. 3-10.
- 33. Gane E, Portmann B, Saxena R, Wong P, Ramage J, Williams R. Nodular regenerative hiperplasia of the liver graft after liver transplantaition. Hepatology, 1994, Jul; 20(1 Pt 1): 88-94.
- 34. Gleason D.F., Mellingeer G.T. .(1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histilogical grading and clinical staging. J. of Urology III.  $N_2 1:58-64$ .
- 35. Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H. et all. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood (1994). 84: 13-1392.

- 36. Henrique R., Achten R., Maes B et all. Guidelines for subtyping small B-cell lymphomas in bone marrow biopsies // Virchows Archiw (1999) 453:549 –558.
- 37. International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Prostate Tumours. (1990) World Health Organization, Geneva.
- 38. Lee S.G., Hwang S., Lee Y.J., et al. Regeneration of graft liver in adult-to-adult living donor liver transplantation using a left lobe graft. // J. Korean Med. Science. 1998. Vol. 13. N 4. p. 350-354.
- 39. Kay VF, Fausto N. Liver regenaraition: prospects for therapy based on new technologies. Mol. Med. Today 1997, Mar; 3(3): 108-15.
- 40. Kiuchi T., Kasahara M., Uryuhara K., et al. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. // Transplantation. − 1999. − Vol. 67. − N 2. − p. 321-327.
- 41. Kudriavtsev B.N., Kudriavtseva M.V., Sakuta G.A., Skorina A.D., Shtein G.I. Hepatocyte poyploidization in chronic liver diseas in man, Tsiologiia 1993; 35(5): 70-83.
- 42. Leevy C.B. Abnormalities of liver regenaration: a review. Dig Dis Mar-Apr; 16(2): 88-98.
- 43. Sigal S.H., Rajvanshi P., Gorla G.R., Sokhi R.P., Saxena R., Gebhard D.R. Jr., Reid L.M., Gupta S. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. American journal of Physiology, May; 276(5 Pt): G1260-72.
- 44. Steinbeck R.G. Mitotic failure and genome stability in benign, premalignant and malignant human tissues. Karolinska Inst. Hospit. Stockholm.- 1998.
- 45. Tavassoli F.A. Mammary intraepithelial neoplasia: a translational classification system for the intraductal epithelial proliferation // Breast J.- 1997. Vol. 3. P. 48 58.
- 46. Zettenberg A., Eposti P.(1980) Prognostic significance of nuclear DNA levels in prostatic carcinoma. Scand. J. Urol. Nephrol. 55: 53 58.