

Научная статья

УДК 616.831–005.4–091.8–092.9+004.9
doi:10.18499/2225-7357-2025-14-1-9-20
1.5.22 – клеточная биология

Иммуногистохимическая верификация синапсов и применение машинного обучения для анализа синаптоархитектоники СА3 гиппокампа белых крыс в постишемическом периоде

С. С. Степанов, А. С. Степанов, И. Г. Цускман, В. А. Акулинин✉

Омский государственный медицинский университет, Омск, Россия

Аннотация. Рассмотрены методические аспекты применения алгоритмов машинного обучения для поиска новых возможностей в интерпретации межнейронных связей. **Цель исследования** – показать, что комбинация Ilastik и StarDist эффективна для морфометрической характеристики гигантских синаптических терминалей в stratum lucidum СА3 гиппокампа белых крыс в норме и в постишемическом периоде. **Материал и методы.** Ишемию головного мозга у белых крыс Wistar моделировали двусторонней окклюзией общих сонных артерий (ООСА) на 20 мин. Исследовались животные без воздействия (n=6, контроль) и через 6 ч, 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ООСА (n=36). Использовали окраски гематоксилином и эозином, тионином по Нисслю, иммуногистохимическую реакцию на синаптофизин. Определяли численную плотность (ЧПТ), размеры, интенсивность окраски и площадь терминалей, применяли плагины Ilastik и StarDist на платформе ImageJ/Fiji. Статистический анализ проводили непараметрическими методами в программе Statistica 8.0. **Результаты.** Относительная площадь терминалей при ручном методе и машинном обучении не различалась. Машинное обучение предоставило дополнительную информацию о численной плотности, размерах и средней яркости терминалей. Через 6 ч после ООСА ЧПТ уменьшилась на 44,3%, но затем восстанавливалась в течение 7 сут. Средняя площадь терминалей была больше на 16,7% через 6 ч и 1 сут, а через 14 сут – меньше контрольного уровня. Яркость пикселей терминалей была обратно пропорциональна содержанию в них хромогена: увеличивалась через 6 ч и 1 сут после ООСА, затем восстанавливалась до уровня контроля. Корреляционные связи наблюдались между площадью и яркостью терминалей (R=0,78). **Заключение.** Использование комбинации Ilastik и StarDist позволило точно оценить численную плотность, размеры, форму, относительную площадь и интенсивность окраски синаптических терминалей в гиппокампе. В сравнении с ручным методом, применение машинного обучения обеспечило значительно больше информации о терминалях на цветных иммуногистохимических изображениях.

Ключевые слова: ишемия головного мозга; синапсы; гиппокамп; иммуногистохимия; морфометрия; машинное обучение

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Степанов С.С., Степанов А.С., Цускман И.Г., Акулинин В.А. Иммуногистохимическая верификация синапсов и применение машинного обучения для анализа синаптоархитектоники СА3 гиппокампа белых крыс в постишемическом периоде // Журнал анатомии и гистопатологии. 2025. Т.14, №1. С. 9–20. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2025-14-1-9-20>

LEADING ARTICLES

Original article

Immunohistochemical Verification of Synapses and the Use of Machine Learning for the Analysis of the Synptoarchitecture of the CA3 Hippocampus in White Rats During the Post-Ischemic Period

S. S. Stepanov, A. S. Stepanov, I. G. Tsuskman, V. A. Akulinin✉

Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Abstract. This study examines the methodological aspects of applying machine learning algorithms to explore new opportunities in interpreting inter-neuronal connections. **The aim** was to demonstrate that the combination of Ilastik and StarDist is effective for the morphometric characterization of giant synaptic terminals in the stratum lucidum of CA3 in the hippocampus of white rats under normal conditions and in the post-ischemic period. **Material and methods.** Cerebral ischemia in Wistar white rats was modeled by bilateral occlusion of the common carotid arteries (OCCA) for 20 minutes. Animals were studied without intervention (n=6, control)

and at 6 hours, 1, 3, 7, 14, and 30 days after OCCA (n=36). Staining with hematoxylin and eosin, Nissl staining with thionine, as well as immunohistochemical reaction for synaptophysin, were used. Numerical density (NDT), sizes, staining intensity, and area of the terminals were determined, and the Ilastik and StarDist plugins were applied on the ImageJ/Fiji platform. Statistical analysis was performed using non-parametric methods in Statistica 8.0. **Results.** The relative area of the terminals did not differ between the manual method and machine learning. Machine learning provided additional information on numerical density, sizes, and average brightness of the terminals. At 6 hours after OCCA, NDT decreased by 44.3%, but then recovered over 7 days. The average area of the terminals was 16.7% larger at 6 hours and 1 day, but smaller than the control level at 14 days. The brightness of the terminal pixels was inversely proportional to the content of chromogen: it increased at 6 hours and 1 day after OCCA, then returned to control levels. Correlations were observed between the area and brightness of the terminals ($R=0.78$). **Conclusion.** The use of the combination of Ilastik and StarDist allowed for accurate assessment of numerical density, sizes, shape, relative area, and staining intensity of synaptic terminals in the hippocampus. Compared to the manual method, the application of machine learning provided significantly more information about the terminals in color immunohistochemical images.

Keywords: brain ischemia; synapses; hippocampus; immunohistochemistry; morphometry; machine learning

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

For citation: Stepanov S.S., Stepanov A.S., Tsuskman I.G., Akulinin V.A. Immunohistochemical verification of synapses and the use of machine learning for the analysis of the synaptoarchitecture of the CA3 hippocampus in white rats during the post-ischemic period. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2025. V. 14, №1. P. *-*. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2025-14-1-9-20>

Введение

Изучение механизмов, ответственных за адаптацию и повреждение нейронных сетей, представляет собой один из наиболее актуальных и перспективных направлений современной нейробиологии. В частности, гиппокамп как ключевая структура, отвечающая за процессы обучения и памяти, привлекает особое внимание исследователей [11, 22]. В этой связи большое значение имеет морфометрическое изучение межнейронных синапсов, которое чаще осуществляется с помощью электронной микроскопии [3]. Однако, применение методов иммуногистохимии также позволяет визуализировать синапсы и исследовать изменения, происходящие в нейронных сетях, при различных патологических состояниях, включая ишемические повреждения гиппокампа [5, 6]. Особенно это касается крупных синапсов, локализующихся в stratum lucidum CA3 гиппокампа [11]. Наиболее полезным методом оценки числа синапсов в головном мозге является метод, основанный на стереологии р38-иммунореактивных везикул аксонных терминалей [8, 15].

Для сегментации изображения и классификации на нем объектов в настоящее время можно использовать разные подходы – от ручной установки порога разделения пикселей (например, в программе ImageJ/Fiji) до различных технологий машинного обучения, внедрение которого закономерно и целесообразно. Это способствует ускорению процесса исследования, а также повышает его точность [10, 12, 13, 16, 20, 25].

Цифровой анализ изображений может значительно упростить даже рутинный ручной подсчет, увеличивая его эффективность и стандартизацию. Так, программа ImageJ/Fiji предлагает множество инструментов, включая счетчик объектов и инструменты для обработки изображений, позволяя проводить ручной

или полуавтоматический подсчет. Например, поиск максимумов (Find Maxima) помогает настраивать уровень заметности для объектов, а Threshold и Analyze Particles – выделять и подсчитывать объекты по определенным критериям. Также процесс анализа можно автоматизировать, записывая шаги и создавая макросы. Однако встроенные инструменты ImageJ имеют ограничения в сегментации перекрывающихся объектов. Здесь на помощь приходят достижения в области машинного обучения, которые позволяют преобразовать задачу сегментации в задачу классификации пикселей. Например, обучаемая сегментация по методу водораздела и инструмент StarDist, использующий нейронные сети, облегчают процесс классификации и имеют ряд преимуществ в сравнении с традиционными методами [18, 19].

Выбор метода цифровой морфометрии зависит от конкретной задачи и материально-технического оснащения проекта. Пороговый классификатор легок в использовании, позволяет быстро получить результат, но требует высокого контраста и качества изображений, а также при высоком количестве классифицируемых структур его точность снижается [14]. До настоящего времени оценка результатов большей части иммуногистохимических исследований проведена именно с помощью порогового классификатора или даже более рутинными ручными методами [3, 6, 11].

Простые методы машинного обучения (например, деревья решения, метод случайного леса) позволяют добиться более высокой точности по сравнению с пороговым фильтром, но также требуют достаточно высокого контраста изображений [27]. Глубокие нейронные сети могут решать практически любую задачу классификации тканей на изображении, но требуют дополнительное время на подготовку выборки и обучение модели сети. Поэтому применение нейронных сетей

является наиболее выгодным, когда результат основывается на морфологии (геометрических особенностях) объектов в образцах [9].

В случаях явного различия объектов и небольшого количества их вариантов классификации предпочтение отдается простым методам машинного обучения в сочетании с ImageJ/Fiji. Поэтому часто выбор осуществляется в пользу последних в сочетании с плагином «Ilastik» (Европейская лаборатория молекулярной биологии, Евросоюз) [7, 23], StarDist [26] или TrackMate [12, 17, 24]. Это некоммерческие программы со свободным кодом Java и Python.

Ilastik представляет собой эффективный инструмент для анализа изображений с использованием машинного обучения. Чаще всего применяется в ситуациях, когда необходимо быстро и результативно сегментировать изображения и извлекать количественные данные [7, 23]. StarDist – это также плагин программы ImageJ/Fiji, который предназначен для сегментации и детекции объектов на изображениях, основанный на алгоритме глубокого обучения – на архитектуре U-Net, которая является мощным инструментом для обработки изображений и улучшения качества сегментации. Особенно полезен для решения задач, в которых необходимо сегментировать сложные архитектуры [26]. TrackMate способна автоматически обнаруживать, сохранять и использовать контуры объектов в 2D, отслеживать движущие объекты (клетки), интегрирует самые современные алгоритмы сегментации, такие как Ilastik, MorphoLibJ, StarDist, Weka [24]. Все они применяются в биологии и медицине, в частности для анализа микроскопических изображений, имеют свои уникальные особенности. Для цели настоящего исследования наиболее приемлем вариант сочетанного использования Ilastik и StarDist.

Таким образом, плагины Ilastik и StarDist являются совместимыми инструментами для сегментации и обработки изображений с применением методов машинного обучения. Они могут быть полезны для исследований в области морфологии при иммуногистохимическом изучении синапсов [17]. Благодаря модульности данных платформ большинство задач решаются в пакетном режиме через ImageJ/Fiji. Однако до сих пор эти плагины не были использованы для сочетанного изучения синапсов при их иммуногистохимической верификации, что, по нашему мнению, не полностью раскрывает их суммарный потенциал.

Цель исследования – изучить возможности автоматического морфометрического анализа гигантских синаптических терминалей мшистых волокон в stratum lucidum САЗ гиппокампа белых крыс с использованием сочетания методов машинного обучения из плагинов Ilastik и StarDist для более точной

классификации этих структур в норме и постшемическом периоде.

Материал и методы исследования

Работа, представленная на базе ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», выполнена с соблюдением всех необходимых этических норм, что подтверждается этическим комитетом университета (протокол № 123 от 09 октября 2020 года). В качестве экспериментальных животных использованы белые крысы линии Wistar, что является распространенной практикой в биомедицинских исследованиях, так как этот вид обладает хорошей предсказуемостью и сопоставимостью результатов. Данные исследования проводились в строгом соответствии с рекомендациями Международного комитета по работе с лабораторными животными и директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU. Приняты все необходимые меры для минимизации страданий животных в процессе исследования.

Эксперимент проведен на половозрелых самцах. На фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) животным внутримышечно вводили Zoletil 100 (10 мг/кг). Неполную 20-мин ишемию головного мозга моделировали с помощью двусторонней окклюзии общих сонных артерий (ООСА) [5]. Из эксперимента животных выводили через 6 ч, 1, 3, 7, 14 и 30 сут после ООСА (n=36). Под наркозом проводили перфузию головного мозга 4% раствором параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) через аорту [5]. Контролем служили интактные крысы (n=6). Мозг извлекали и хранили в холодильнике при температуре +4°C. С помощью автомата «STP 120» полученные образцы заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили на уровне гиппокампа (микромом HM 450, Thermo) [21].

Для общеморфологической оценки нервной ткани в САЗ гиппокампа были использованы методы окраски гематоксилином и эозином, а также тионином по Нисслю. Синаптические терминалы верифицировали посредством иммуногистохимической реакции на синаптофизин (p38), локализующийся в мембранах синаптических пузырьков. Для этого использовали первичные мышинные антитела клона 27G12 (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd/PA0299, Великобритания). Затем – вторичные антитела и хромоген DAB (3,3'-диаминобензидин). Применяли мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Срезы дополнительно окрашивали гематоксилином и заключали в полистирол. Цифровые изображения получали на микроскопе Leica DM 1000 (камера

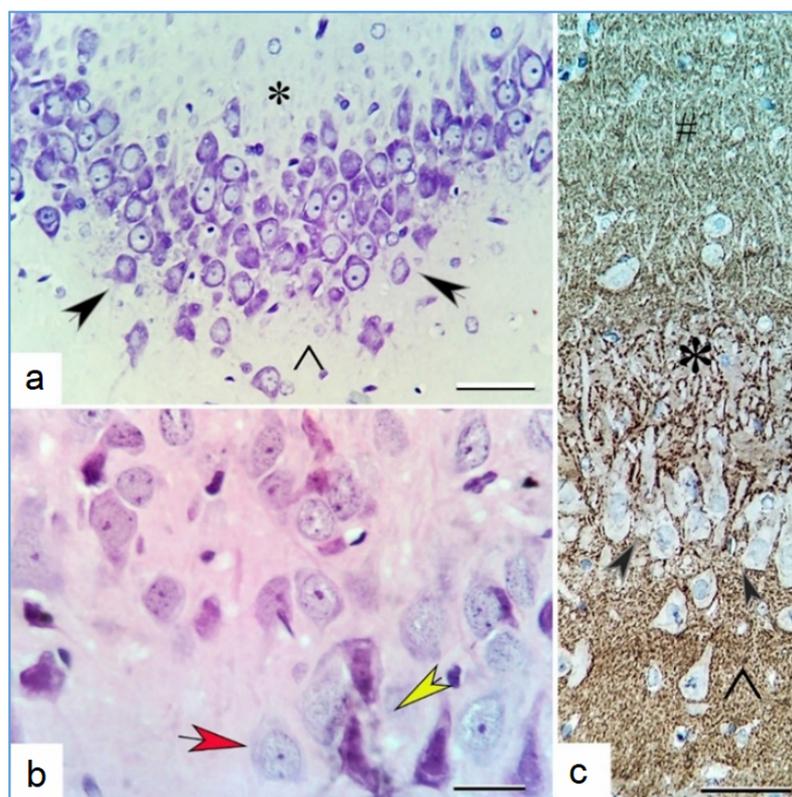


Рис. 1. Пирамидные нейроны поля CA₃ гиппокампа контрольного животного (а, с) и после ишемии (б, через 14 сут). Черные стрелки – слой пирамидных нейронов, * – stratum lucidum молекулярного слоя, ^ – расположение полиморфных нейронов, # – stratum lacunosum и radiatum, красная стрелка – нормохромный, желтая стрелка – гиперхромные нейроны. Окраска по методу Ниссля (а) и гематоксилином и эозином (б), иммуногистохимическая реакция на синаптофизин (с). Об. 40×, шкала – 40 мкм (а, в); об. 100×, шкала – 20 мкм (б).

Fig. 1. Pyramidal neurons of the CA₃ field of the hippocampus in a control animal (a, c) and after ischemia (b, 14 days post-ischemia). Black arrows – indicate the layer of pyramidal neurons, * – indicates the stratum lucidum of the molecular layer, ^ – indicates the location of polymorphic neurons, # – indicates the stratum lacunosum and radiatum, red arrow – indicates normochromatic neurons, yellow arrow – indicates hyperchromatic neurons. Staining: by the Nissl method (a) and hematoxylin/eosin (b), and immunohistochemical reaction for synaptophysin (c). Lense 40×, scale bar 40 μm (a, c); lense 100×, scale bar 20 μm (b).

GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1.4×1.4 μm) и сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей) [6].

Морфометрическое исследование изображений терминалей проводили при помощи плагинов Plastik и StarDist в программе ImageJ 1.53. На первом этапе селекцию и сегментацию части (ROI) цветного изображения осуществляли путем ручного выделения объектов (обучение) в плагине Plastik 1.3.3post3. Далее на базе идентифицированных объектов с помощью этого же плагина создавали обученную вероятностную модель их распознавания и переносили ее (файл HDF5) в ImageJ, где уже с ее помощью сегментировали другие ROI (которые программа не «видела»). Окончательные результаты выделения терминалей в виде таблиц с цифровыми значениями получали в плагине ImageJ/Fiji StarDist с помощью уже обученной модели Versatile (H&E nuclei; <https://bioimage.io/#/>). На срок с помощью генератора случайных чисел отбирали по 25 ROI.

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями: парное сравнение (Mann–Whitney U-test), множественное сравнение (ANOVA Kruskal–Wallis test) с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, USA). Количественные данные в исследовании представлены как медиана (Me – 50% квартиль, Q2), интерквартильный разброс (Q1–Q3 – 25–75% квартили), (Min–Max). Проблема множественного сравнения решалась путем использования ANOVA Kruskal–Wallis [2].

Результаты и их обсуждение

Гисто-, цито- и синаптоархитектоника СА₃ гиппокампа белой крысы представляет собой сложную организацию нейрональных, глиальных и синаптических элементов (рис. 1).

Stratum lucidum располагается между слоями stratum radiatum и pyramidale. В этой зоне можно выделить волокна, образующие гигантские синапсы с дендритами пирамид-

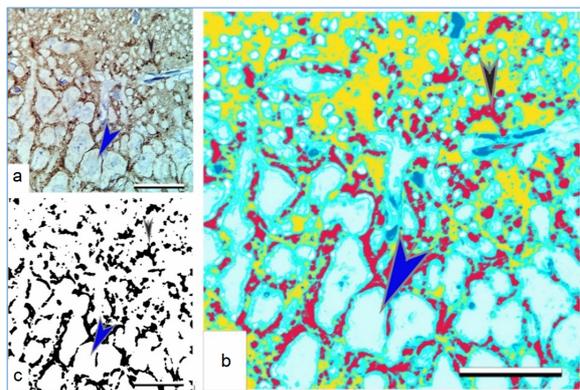


Рис. 2. Исходное цифровое изображение зоны интереса (а), включающей *stratum lucidum* и слой пирамидных нейронов CA₃ гиппокампа; ключевые этапы (а, б) его трансформации в «Plastik»: б – этап проверки обучения сегментации изображения по пяти структурам (желтый – нейропил без терминалей, красный – терминали, синий – ядра эндотелиоцитов и глиальных клеток, салатовый – периферические менее плотные, белый – центральные более плотные слои цитоплазмы перикарионов и дендритов); с – этап проверки слоя выделенных моделью терминалей в многослойном (стек) импортном из «Plastik» файле HDF5 в ImageJ/Fiji; черная стрелка на всех изображениях – конгломераты p38-позитивных терминалей, синяя стрелка – p38-негативные перикарионы. Об. 100×, шкала – 30 мкм.

Fig. 2. The original digital image of the region of interest (a), which includes *stratum lucidum* and the layer of pyramidal neurons of CA₃ in the hippocampus; key stages (a, b) of its transformation in «Plastik»: b – the stage of verifying the segmentation learning of the image into five structures (yellow – neuropil without terminals, red – terminals, blue – nuclei of endothelial and glial cells, light green – peripheral less dense layers, white – central denser layers of cytoplasm of perikaryons and dendrites); c – the stage of verifying the layer of terminals identified by the model in a multilayer (stack) HDF5 file imported from «Plastik» into ImageJ/Fiji; the black arrow in all images (a, b, c) indicates conglomerates of p38-positive terminals, the blue arrow indicates p38-negative perikaryons. Scale bar 30 μm.

ных нейронов, которые составляют основную массу гиппокампа (рис. 1, а, с). При иммуногистохимической реакции p38-негативный материал располагался так, что на его фоне кроме терминалей были видны: нейроны, нейропил без терминалей, ядра нейронов, эндотелиоцитов и глиальных клеток, разные зоны цитоплазмы перикарионов и дендритов. То есть, для анализа нами выбраны неоднородные цветные изображения – результат двойной окраски терминалей (p38) и ядер клеток (гематоксилином) (рис. 1, с).

В постишемическом периоде изменялись все компоненты нейронных сетей и глиальных клеток. Подробно это описано нами ранее [5]. За весь период наблюдения (30 сут) общая численная плотность пирамидных нейронов в поле CA₃ уменьшалась на 17,4%. Элиминация нейронов происходила на фоне

увеличения реактивно, дистрофически (набухание, вакуолизация, гипохромия, гиперхромия без сморщивания и гомогенизации) и некробиотически (гиперхромия и сморщивание с гомогенизацией ядра и цитоплазмы, клетки-тени) измененных клеток, а также появления большого количества терминалей, измененных по светлостому типу деструкции (гидропическая дистрофия). Максимальное уменьшение количества нормохромных нейронов отмечали через 1, 3 и 7 сут [5].

В настоящем исследовании для морфометрического анализа синапсов классификацию пикселей (Pixel Classification) и обучение модели распознавания структур нейропиля и пирамидного слоя CA₃ гиппокампа проводили с помощью Plastik 1.3.3post3 – сначала для обучения – в ручном режиме. При этом выделяли зоны терминалей, нейропил без терминалей, ядра эндотелиоцитов и глиальных клеток, периферические центральные зоны цитоплазмы перикарионов и дендритов; создавали и проверяли модель (рис. 2, б). Проверка обученной в «Plastik» модели показала, что она хорошо справляется с задачей сегментации по пяти выбранным структурам и хорошо выделяет конгломераты p38-позитивного материала (зоны терминалей) (рис. 2, б, с).

При иммуногистохимическом выявлении p38 в участках расположения маркера яркость пикселей, по нашим данным, варьировала в широких пределах, а также было много «шума». Наиболее темные (яркость 33–90 у.е.) объекты круглой или овальной формы (непосредственно терминали) были окружены диффузным, немного более ярким материалом, (яркость >90–140 у.е.). Это создавало иллюзию слияния и наложения терминалей, что затрудняло их визуальную сегментацию (рис. 3, а). Еще нагляднее неоднородность яркости можно видеть в таблице поиска (Lookup tables/Spectrum), на изображении которой терминали представлены синим, а диффузный окружающий материал – зеленым, желтым и красным цветами (рис. 3, б).

Более тонкая классификация отдельных терминалей в их конгломератах требует технологий типа Watershed или использования модели (нейронной сети), натренированной для разделения близлежащих малококонтрастных круглых и овальных объектов [26]. Для этой цели была выбрана программа «StarDist», в которой используется метод глубокого машинного обучения с помощью TensorFlow (открытая программная библиотека, решающая задачи построения и тренировки нейронной сети с целью автоматического нахождения и классификации образов). Она позволяет точно выделять объекты на сложных малококонтрастных изображениях со взаимным наложением (рис. 4). Кроме того, имеется проверенная модель (Versatile H&E nuclei) «StarDist» для ImageJ/Fiji, которую можно использовать для анализа предвари-

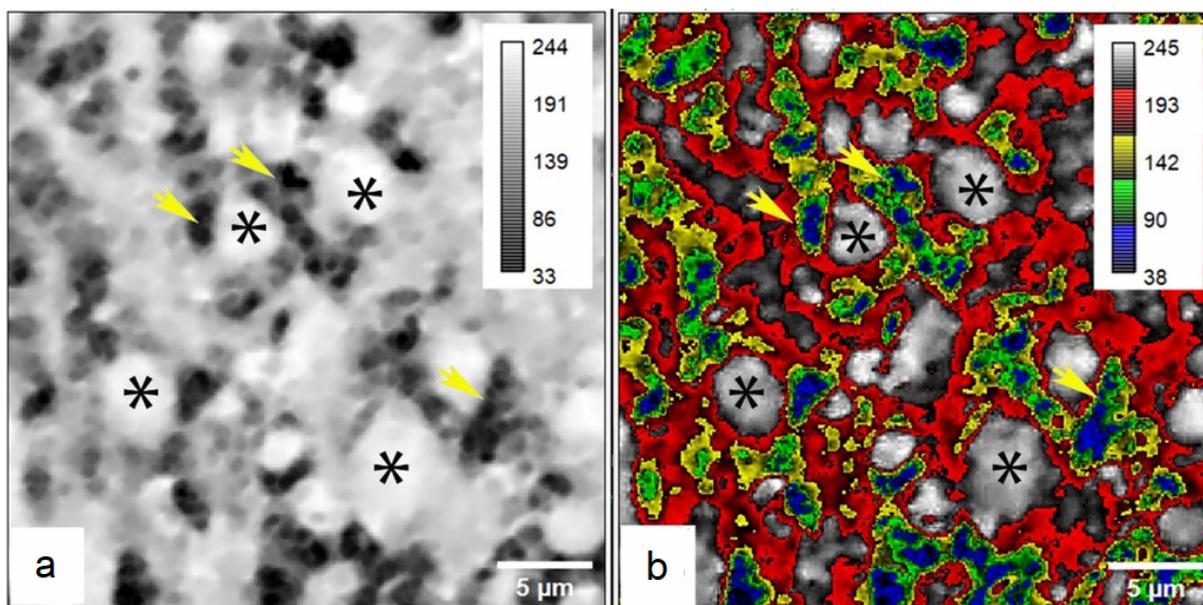


Рис. 3. Две таблицы поиска (Lookup tables/Gray и Spectrum) одного и того же ROI, на которых показана неоднородность яркости участков stratum lucidum с большим количеством терминалей (стрелки). А – оттенки серого, b – условный спектр цветов, * – самые яркие объекты (p38-негативные перикарионы и дендриты). Шкала калибровки яркости изображения в у.е.; шкала размеров в мкм.

Примечание. Таблицы поиска (или таблицы сопоставления, Lookup tables, LUT) используются для изменения цветового отображения изображений. Они позволяют визуализировать данные, улучшая восприятие определенных участков данных или контрастности.

Fig. 3. Two lookup tables (Lookup tables/Gray and Spectrum) of the same ROI, showing the inhomogeneity of brightness in areas of the stratum lucidum with a high number of terminals (arrows). A – shades of gray, b – conditional color spectrum, * – the brightest objects (p38-negative perikarya and dendrites). The brightness calibration scale in arbitrary units; size scale in micrometers.

Note. Lookup tables (or mapping tables, Lookup tables, LUT) are used to modify the color representation of images. They allow for the visualization of data, enhancing the perception of specific areas of data or contrast.

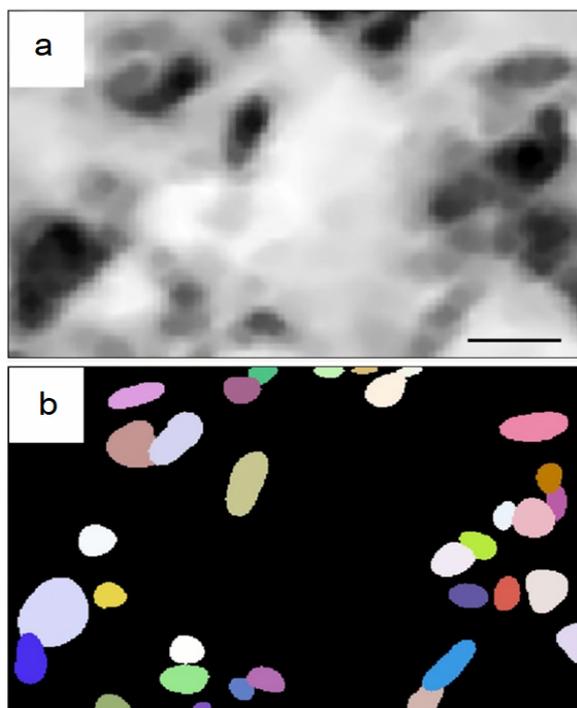


Рис. 4. Фрагмент (a) рисунка за и демонстрация возможностей программы «StarDist» по сепарации на нем различных терминалей (b). Шкала – 2,5 мкм.

Fig. 4. Fragment (a) of Figure 3a and demonstration of the capabilities of the “StarDist” program for the separation of various terminals on it (b). Scale – 2.5 μm.

тельно подготовленных в других программах сегментации (например, «Plastik») данных на незнакомых изображениях 2D. Готовые к использованию модели выложены на сайте <https://bioimage.io>. Поэтому мы выбрали вариант сочетанного использования программы «Plastik» и плагина «StarDist» ImageJ/Fiji.

После пакетного анализа изображений, получения результатов распознавания p38-позитивного материала в «Plastik» и переноса файла (формат HDF5) с иерархическим форматом данных (карта вероятности по терминалям, нейропиллю без терминалей, ядер эндотелиоцитов и глиальных клеток, периферическим и центральным зонам цитоплазмы перикарионов и дендритов) в ImageJ/Fiji завершали алгоритм классификации только для терминалей с помощью модели Versatile (H&E nuclei плагина) «StarDist», скачанной на сайте <https://bioimage.io> (рис. 5).

Следовательно, сначала в «Plastik» проводили: 1) ввод данных (изображение для обучения модели), 2) выбор признаков структур (цвет, яркость, текстура, форма), 3) обучение, 4) экспорт прогнозов (создание файла HDF5), 5) пакетную обработку изучаемых изображений на основании этого (обученная модель) файла. Это позволило хорошо классифицировать объекты по их характеристикам – цвету, яркости, текстуре и форме. Затем в ImageJ/Fiji с помощью команды «Stack to

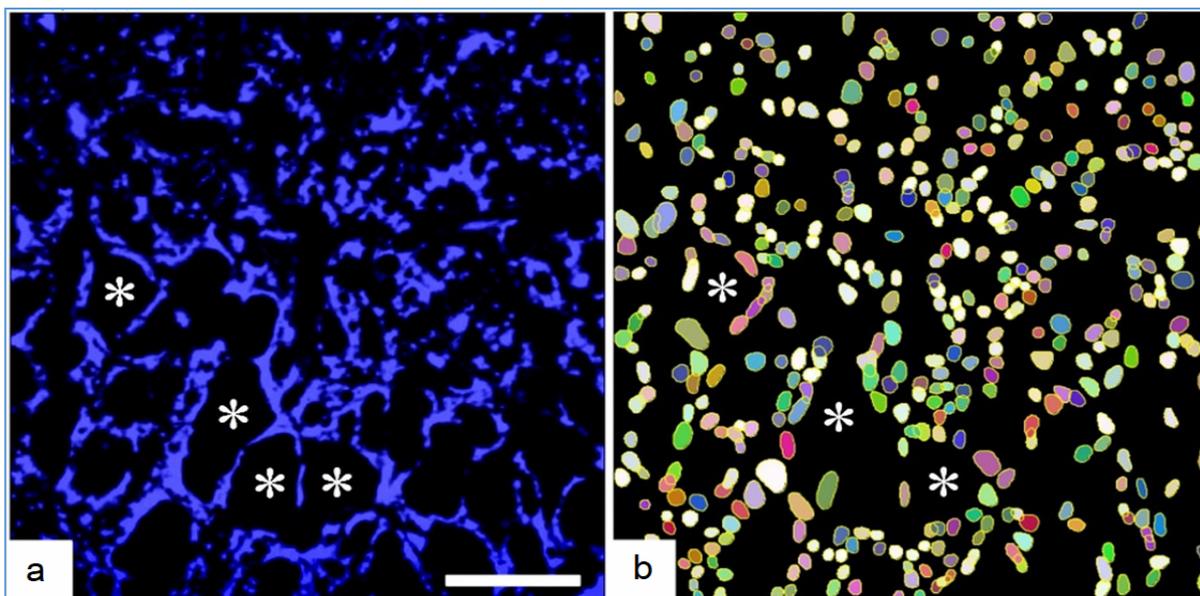


Рис. 5. Завершающий этап анализа изображения терминалей в «Ilastik» (a) и «StarDist» (b). * – места локализации перикарионов, цветные структуры – места локализации гигантских терминалей *stratum lucidum*. Шкала – 30 мкм.

Fig. 5. Final stage of image analysis of terminals in “Ilastik” (a) and “StarDist” (b). * – locations of perikarya, colored structures – locations of giant terminals in the *stratum lucidum*. Scale bar 30 μm .

image» открывали нужный слой (канал) изображения только с терминалями (рис. 5, a), которое анализировали с использованием плагина «StarDist». На выходе результаты визуализировались графически (рис. 5, b) и в виде таблицы (количество, площадь терминалей).

Видно, что после использования плагина «StarDist» терминали представлены не сплошным конгломератом р38-позитивного материала (как при использовании «Ilastik»), а отдельными круглыми или овальными дискретными частицами с индивидуальными характеристиками (это отмечено разным цветом). Выделялись даже терминали с наложением друг на друга. То есть, происходило полное программное выделение круглых частиц в конгломератах, что визуально и, по данным электронной микроскопии, соответствует реальному расположению терминалей в пространстве нейропиля [6, 11].

Следовательно, необходимость применения двух плагинов обусловлена тем, что на цветных изображениях сложных архитектурных, типа СА3 гиппокампа, присутствуют разные по входным данным структуры (рис. 6). Их нужно разделить по цвету, форме, размерам, яркости. С помощью Ilastik можно вручную легко выделить необходимые объекты (терминали, дендриты, перикарионы, ядра клеток) и обучить деревья классификации узнавать их на ранее им неизвестных изображениях. При этом объекты в процессе классификации разделяются на разные каналы и хранятся в стеках в специальном многослойном файле-контейнере. Непосредственно сегментация полученных на предыдущем этапе изображений выделенных объектов производит-

ся с помощью StarDist на соответствующих слоях последовательно по отдельности, не мешает друг другу. Мы исследовали только слой представления терминалей. Использование StarDist для подобных задач отмечено в литературных источниках [24].

Необходимо, однако отметить, что, если зона исследования однородная и контрастными являются только синапсы, можно сразу использовать StarDist или метод водораздела, минуя этап Ilastik (рис. 6, a, b). При этом требуется ручная фильтрация (с помощью порога отсечения) минимального и максимального размеров частиц изображения, включенных в анализ.

Таким образом, Ilastik позволил нам разделить пиксели исходного изображения (Pixel Classification), в зависимости от выделенных структур, на несколько каналов, а затем с помощью плагина StarDist анализировать канал изображения р38-позитивного материала – терминали. Необходимо отметить, что в Ilastik также позволяет решать аналогичные и более сложные задачи классификации с помощью «Pixel Classification+Object Classification».

Для сравнения разных методов сегментации мы применили описанный выше подход с использованием программы ImageJ/Fiji, плагинов Ilastik и StarDist для анализа морфометрических изменений синапсов СА3 гиппокампа в постишемическом периоде. Ранее нами с помощью иммуногистохимических реакций и рутинных морфометрических методов (пороговый классификатор, find maxima) было установлено, что относительная площадь р38-позитивного материала в норме была на уровне 24,6 (18,8–31,2)%. В остром

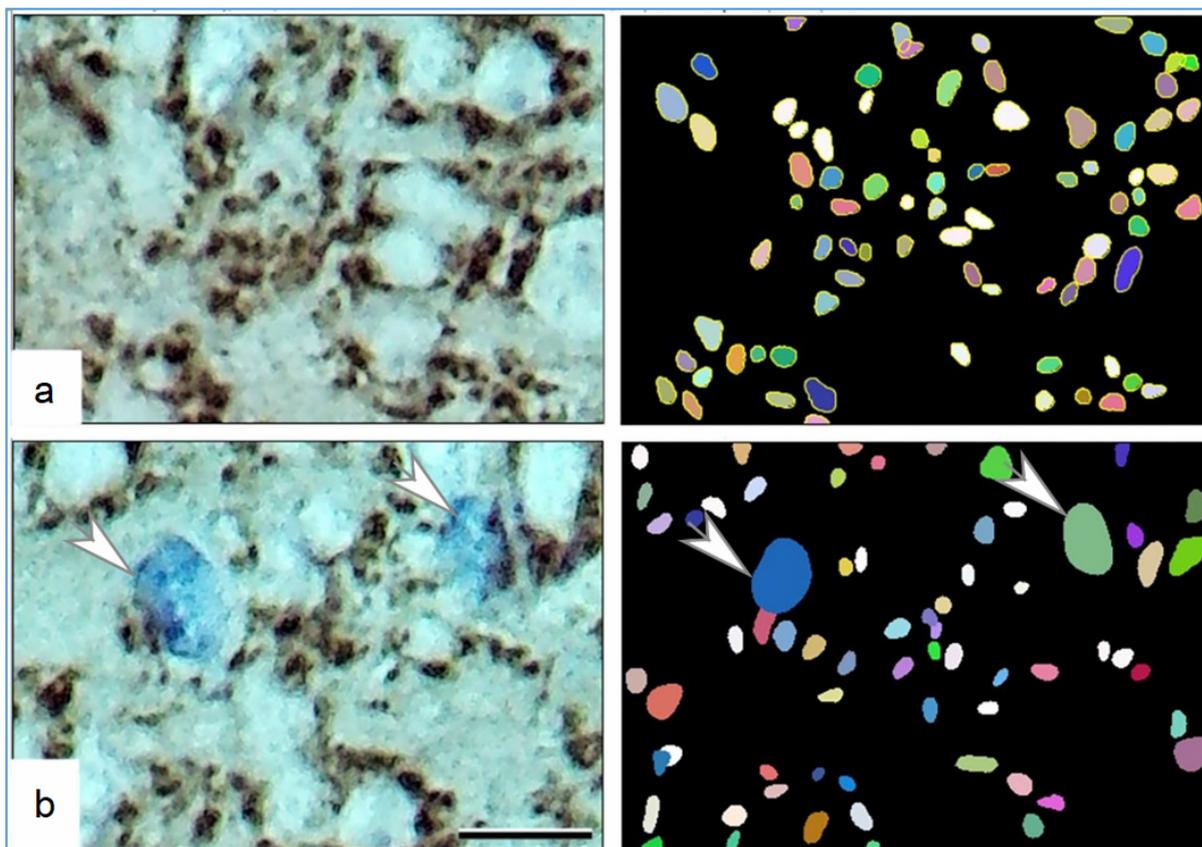


Рис. 6. Исходное однородное цифровое цветное изображение зоны (а) интереса, содержащей только высококонтрастные терминалы, и зоны (b) с контрастными ядрами нейронов (белые стрелки). Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин. Об. 100×, шкала – 30 мкм.

Fig. 6. Original homogeneous digital color image of the area (a) of interest, containing only high-contrast terminals, and area (b) with contrasting neuron nuclei (white arrows). Immunohistochemical reaction for synaptophysin. Lense 100×, scale bar – 30 μm.

периоде после ишемии (в течение 1 сут) в СА3 статистически значимо уменьшалась, а затем (7 сут) восстанавливалась до контрольного уровня [1, 5].

В настоящей работе машинное обучение, на большем материале и существенно быстрее, позволило получить дополнительную информацию о динамике изменения не только относительной площади конгломератов терминалей, но и их количества, единичных размерах, а также содержания (плотности) в них р38-позитивного материала (рис. 7). Установлено, что относительная площадь синаптофизина при использовании разных способов морфометрии в контроле, в течение 3 сут (среднее через 6 ч, 1 и 3 сут) и от 7 до 30 сут (среднее через 7, 14 и 30 сут) статистически значимо не различалась [1]. То есть, в сравнении с более ранними публикациями, по данному показателю были получены аналогичные изменения – редукция в остром периоде и восстановление через 7 сут.

Кроме относительной площади всех терминалей с помощью машинного обучения мы получали информацию также о численной плотности, размерах и средней яркости р38-позитивных частиц (терминалей) (рис. 7). Через 6 ч после ООСА медиана ЧПТ уменьшалась на 44,3%, затем в течение 7 сут восста-

навливалась до уровня контроля, через 14 сут превышала, а через 30 сут уже не отличалась от него. Средняя площадь терминали через 6 ч и 1 сут была на 16,7% больше контрольного уровня, через 3, 7 и 30 сут не отличалась от него, а через 14 сут – ниже контроля (рис. 7). Яркость пикселей терминали была обратно пропорциональна содержанию в них хромогена; в норме варьировалась от 75 (min) до 115 (max) у.е. После ООСА – сначала (6 ч, 1 сут) увеличивалась до 120–190 у.е., а затем (3, 7, 14 и 30 сут) восстанавливалась до уровня контроля (рис. 7). Вполне вероятно, что это связано с характерным для постшемического периода отеком-набуханием нейропиля и светлым типом деструкции терминалей, выявленным нами ранее [1, 4, 5, 6].

В пользу вышесказанного свидетельствует то, что между изученными независимыми переменными были выявлены статистически значимые корреляционные связи, которые отличались в выбранных временных точках настоящего исследования (табл. 1).

Наиболее сильные связи были между площадью и яркостью терминалей ($\rho=0,78$) через 6 ч после ООСА, что логично объясняется отеком-набуханием синапса и разрушением р38-позитивного материала. Отек-набухание терминалей сопровождался снижением ЧПТ и

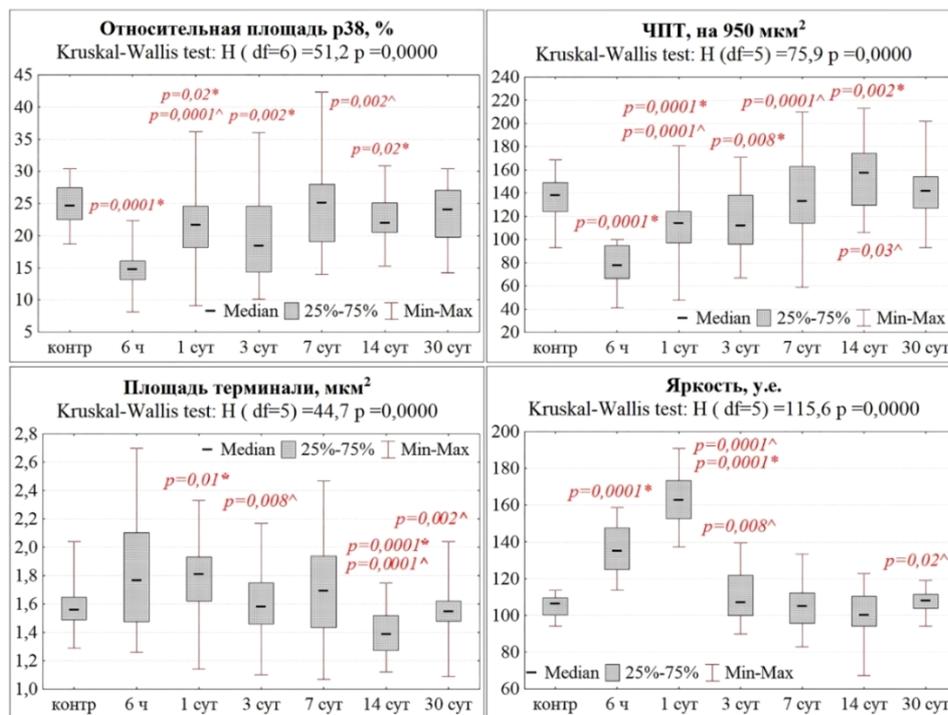


Рис. 7. Относительная площадь p38-позитивного материала, численная плотность терминалей (ЧПТ), площадь терминали и яркость метки терминали в stratum lucidum гиппокампа после OCCA.

Примечание: * – сравнение с контролем, ^ – сравнение с предыдущим сроком (Mann–Whitney U test). Различия статистически значимы при $p < 0,01$. Материал предоставлен как медиана (Q2) и 25–75% квартили (Q1–Q3). Различия между всеми сроками (6 ч – 30 сут) после OCCA статистически значимы по результатам ANOVA Kruskal–Wallis (K–W).

Fig. 7. The relative area of p38-positive material, numerical density of terminals (NDT), terminal area, and brightness of terminal labels in the stratum lucidum of the hippocampus after the OCCA staining. Note. * – comparison with the control, ^ – comparison with the previous time point (Mann–Whitney U test). Differences are statistically significant at $p < 0.01$. The data are presented as median (Q2) and 25–75% quartiles (Q1–Q3). Differences between all time points (6 hours – 30 days) after the intervention are statistically significant according to the results of the Kruskal–Wallis ANOVA (K–W).

Таблица 1 / Table 1

Парные корреляционные связи (метод Спирмена) между изученными независимыми переменными
Pairwise correlation relationships (Spearman's Method) between the studied independent variables

Сроки	Переменные	ЧПТ	Площадь	Яркость
6 ч	ЧПТ	–	-0,64*	-0,48*
	Площадь	-0,64*	–	0,78*
	Яркость	-0,48*	0,78*	–
1 сут	ЧПТ	–	0,07	0,61*
	Площадь	0,07	–	0,24
	Яркость	0,61*	0,24	–
3 сут	ЧПТ	–	0,25	0,49*
	Площадь	0,25	–	0,38*
	Яркость	0,49*	0,38*	–
7 сут	ЧПТ	–	-0,19	0,57*
	Площадь	-0,19	–	0,23
	Яркость	0,57*	0,23	–
14 сут	ЧПТ	–	-0,47*	0,25
	Площадь	-0,47*	–	0,20
	Яркость	0,25	0,20	–
30 сут	ЧПТ	–	-0,17	0,23
	Площадь	-0,17	–	0,28
	Яркость	0,23	0,28	–

Примечание: * – наличие статистически значимых связей (при $p < 0,05$).

увеличением их площади – отрицательная корреляционная связь ($r=0,64$).

Заключение

Ранее в специальном сравнительном исследовании было показано, что алгоритмы плагинов StarDist и водораздела, реализованные для решения аналогичных нашим задач сегментации с применением машинного обучения, продемонстрировали наилучшую совместимость, а также самую высокую корреляцию с ручным подсчетом, который является общепринятым эталоном [18]. Авторы, основываясь на результатах пяти протестированных методов, пришли к выводу, что использование StarDist и водораздела для сегментации и подсчета объектов изображений является наиболее подходящими и рекомендуемыми методами. Это обосновано их высокой точностью, простотой в применении и эффективностью. Метод водораздела, в частности, может быть использован в тех случаях, когда нет доступа к предварительно обученным моделям, что делает его универсальным инструментом. Однако в нашем исследовании мы использовали программу Ilastik-1.3.3post3 – простой и удобный инструмент для интерактивной классификации, сегментации и анализа изображений [7] – в сочетании с уже доступной предварительно обученной моделью StarDist [26]. Это позволило значительно повысить точность результатов.

Необходимо отметить, что инструменты, предоставляемые для морфометрического анализа, такие как ImageJ/Fiji, Ilastik и StarDist, являются бесплатными программами, что делает их доступными для широкой исследовательской аудитории. В данном проекте мы применили существующую обученную модель StarDist Versatile (плагин для H&E ядер) для определения численной плотности и площади срезов терминалей синапсов после их сегментации от других структур stratum lucidum САЗ гиппокампа с помощью Ilastik. Таким образом, выделенный с использованием программы Ilastik p38-позитивный материал впоследствии подвергался более детальному количественному и качественному анализу с применением StarDist. Важно отметить, что ручные пороговые методы сегментации не обеспечивали достаточную точность в определении общей численной плотности синапсов и площади каждого отдельного объекта. Поэтому сравнить результаты наших более ранних исследований, проведенных после двусторонней ООСА, с текущими данными мы смогли лишь по показателю относительной площади всех терминалей в нейропиле [1, 4, 5, 6]. При этом в ходе сравнения не было выявлено значимых различий.

Таким образом, синергия методов Ilastik и StarDist на платформе ImageJ/Fiji для морфометрического исследования межнейронных

синапсов, выявленных с помощью иммуногистохимической реакции на белок p38 в области САЗ гиппокампа, позволила не только сохранить высокое качество анализа изображений на экспертном уровне, но и существенно увеличить точность измерений и сегментации отдельных объектов. Применение Ilastik обеспечивало эффективную сегментацию объектов на изображениях, в то время как StarDist гарантировал высокую точность распознавания форм и размеров синаптических терминалов. Это сочетание современных и классических методов не только упростило процесс обработки данных, но и повысило воспроизводимость полученных результатов, что крайне важно для дальнейших нейроморфологических исследований. Такой подход открывает новые горизонты для более точного изучения закономерностей морфологии и распределения синапсов, что, в свою очередь, может привести к пониманию особенностей организации межнейронных синаптических связей в гиппокампе и их изменений при разнообразных неврологических заболеваниях.

В рамках данного исследования мы стремились продемонстрировать, как сочетание традиционных методов морфологического анализа и современных вычислительных подходов может значительно углубить количественное понимание нейропластичности и восстановительных процессов, происходящих в гиппокампе после ишемии. Мы надеемся, что результаты нашего исследования послужат основой для дальнейших работ и откроют новые перспективы в области нейроморфологии, предоставляя исследователям новые данные и инструменты для анализа и сравнения данных.

Список источников / References

1. Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов А.С., Горбунова А.В., Степанов С.С. Плейотропные ферменты апоптоза и синаптическая пластичность гиппокампа белых крыс после окклюзии общих сонных артерий. *Сибирский медицинский журнал*. 2018;33(3):102–110. Avdeev DB, Akulinin VA, Stepanov AS, Gorbunova AV, Stepanov SS. Pleiotropic ferments of apoptosis and synaptic plasticity of hippocampus of white rats after occlusion of common carotid arteries. *Sibirskij medicinskij zhurnal*. 2018;33(3):102–110. (In Russ.). doi: 10.29001/2073-8552-2018-33-3-102-110.
2. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-ое изд. СПб: Питер; 2003. 688. Borovikov V. *Statistica. Iskusstvo analiza dannyh na komp'yutere*. 2-oe izd. SPb: Piter; 2003: 688. (In Russ.).
3. Семченко В.В., Степанов С.С., Еренев С.И. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). М: Директ-Медиа; 2024. 416. Semchenko VV, Stepanov SS, Ereniev SI. *Sinapticheskaya plastichnost' golovnogo mozga*

- (fundamental'nye i prikladnye aspekty). М: Direkt-Media; 2024. 416. (In Russ.).
4. Степанов С.С., Козман И.П., Шоронова А.Ю., Калинин В.А., Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Маркелова М.В. Структурные основы изменения межнейронной коммуникации нейронов поля СА3 гиппокампа белых крыс после тяжелой черепно-мозговой травмы. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021;65(1):22–34. Stepanov SS, Koshman IP, Shoronova AYU, Kalinichev AG, Akulinin VA, Stepanov AS, Avdeev DB, Markelova MV. Strukturnye osnovy izmeneniya mezhejronnoj kommunikacii nejronov polya СА3 gippokampa belyh kryс posle tyazhelej cherepno-mozgovej travmy. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2021;65(1):22–34. (In Russ.). doi: 10.25557/0031-2991.2021.01.22-34.
 5. Степанов А.С., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Горбунова А.В. Коммуникация нейронов поля СА3 гиппокампа головного мозга белых крыс после острой ишемии. Общая реаниматология. 2018;12(5):38–49. Stepanov AS, Akulinin VA, Stepanov SS, Avdeev DB, Gorbunova AV. Kommunikaciya nejronov polya СА3 gippokampa golovnogogo mozga belyh kryс posle ostroj ishemii. Obshchaya reanimatologiya. 2018;12(5):38–49. (In Russ.). doi: 10.15360/1813-9779-2018-5-38-49.
 6. Степанов С.С., Макарьева Л.М., Акулинин В.А., Коржук М.С., Шоронова А.Ю., Авдеев Д.Б., Цускман И.Г., Слободская А.В. Сопоставление иммуногистохимического и ультраструктурного изучения реакции аксональных терминалей сенсорной коры белых крыс на перевязку общих сонных артерий. Журнал анатомии и гистопатологии. 2022;11(3): 65–74. Stepanov SS, Makar'eva LM, Akulinin VA, Korzhuk MS, SHoronova AYU, Avdeev DB, Cuskman IG, Slobodskaya AV. Sopotavlenie immunogistohimicheskogo i ul'trastrukturnogo izucheniya reakcii aksonal'nyh terminalnej sensornoj kory belyh kryс na perevyazku obshchih sonnyh arterij. Zhurnal anatomii i gistopatologii. 2022;11(3):65–74. (In Russ.). doi: 10.18499/2225-7357-2022-11-3-65-74.
 7. Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle Ch. et al. Ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nature Methods*. 2019;16(12):1226–1232. doi: 10.1038/s41592-019-0582-9.
 8. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*. 1996;25(1):821–828. doi: 10.1007/BF02284844.
 9. Ciresan Dan, Meier U, Schmidhuber J. Multicolumn deep neural networks for image classification. 2012 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition: journal. 2012:3642–3649. doi: 10.1109/cvpr.2012.6248110.
 10. Cortada M, Sauteur L, Lanz M, Levano S, Bodmer D. A deep learning approach to quantify auditory hair cells. *Hear Res*. 2021;15(409):108317. doi: 10.1016/j.heares.2021.108317.
 11. Dailey ME, Buchanan J, Bergles DE, Smith SJ. Mossy fiber growth and synaptogenesis in rat hippocampal slices in vitro. *J Neurosci*. 1994;14(3Pt1):1060–1078. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-03-01060.
 12. Fazeli E, Roy NH, Follain G, Laine RF, von Chamier L, Hänninen PE, Eriksson JE, Tinevez JY, Jacquemet G. Automated cell tracking using StarDist and TrackMate. *F1000Res*. 2020;28(9):1279. doi: 10.12688/f1000research.27019.1.
 13. Grys BT, Lo DS, Sahin N, Kraus OZ, Morris Q, Boone C, Andrews BJ. Machine learning and computer vision approaches for phenotypic profiling. *J Cell Biol*. 2017;2(216(1)):65–71. doi: 10.1083/jcb.201610026.
 14. Herbert AD, Carr AM, Hoffmann E. FindFoci: A Focus Detection Algorithm with Automated Parameter Training That Closely Matches Human Assignments, Reduces Human Inconsistencies and Increases Speed of Analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e114749. doi: 10.1371/journal.pone.0114749.
 15. Ippolito DM, Eroglu C. Quantifying Synapses: an Immunocytochemistry-based Assay to Quantify Synapse Number. *J Visual Experiments*. 2010;16(45):2270. doi: 10.3791/2270.
 16. Kreshuk A, Zhang C. Machine Learning: Advanced Image Segmentation Using Ilastik. *Methods Mol Biol*. 2019;2040:449–463. doi: 10.1007/978-1-4939-9686-5_21.
 17. Kreshuk A, Straehle CN, Sommer C, Koethe U. et al. Automated Detection and Segmentation of Synaptic Contacts in Nearly Isotropic Serial Electron Microscopy Images. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e24899. doi: 10.1371/journal.pone.0024899.
 18. Kurnia KA, Sampurna BP, Audira G, Juniardi S, Vasquez RD, Roldan MJM, Tsao CC, Hsiao CD. Performance Comparison of Five Methods for Tetrahymena Number Counting on the ImageJ Platform: Assessing the Built-in Tool and Machine-Learning-Based Extension. *Int J Mol Sci*. 2022;26(23(11)):6009. doi: 10.3390/ijms23116009.
 19. Kurnia KA, Lin YT, Farhan A, Malhotra N, Luong CT, Hung CH, Roldan MJM, Tsao CC, Cheng TS, Hsiao CD. Deep Learning-Based Automatic Duckweed Counting Using StarDist and Its Application on Measuring Growth Inhibition Potential of Rare Earth Elements as Contaminants of Emerging Concerns. *Toxics*. 2023;8(11(8)):680. doi: 10.3390/toxics11080680.
 20. Laux L, Cutiongco MFA, Gadegaard N, Jensen BS. Interactive machine learning for fast and robust cell profiling. *PLoS One*. 2020;11(15(9)):e0237972. DOI: 10.1371/journal.pone.0237972
 21. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5-th ed. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press, 2005.
 22. Pelkey KA, McBain CJ. Target-cell-dependent plasticity within the mossy fibre-CA3 circuit reveals compartmentalized regulation of presynaptic function at divergent release sites. *J Physiol*. 2008;586(6):1495–1502. doi: 10.1113/jphysiol.2007.148635.
 23. Sommer C, Straehle C, Koethe U, Hamprecht FA. "Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit". 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. 2011:230–233. doi: 10.1109/ISBI.2011.5872394.
 24. Tinevez JY, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM,

- Reynolds GD, Laplantine E, Bednarek SY, Shorte SL, Eliceiri KW. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*. 2017 Feb 15;115:80–90. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.09.016.
25. Urru A, González Ballester MA, Zhang C. 2D + Time Object Tracking Using Fiji and ilastik. *Methods Mol Biol*. 2019;2040:423–448. doi: 10.1007/978-1-4939-9686-5_20.
26. Weigert M, Schmidt U. Nuclei instance segmentation and classification in histopathology images with StarDist. In: Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Imaging Challenges (ISBIC), Kolkata, India, 2022. doi: 10.1109/ISBIC56247.2022.9854534.
27. Zhu J, Zou H, Rosset S, Hastie T. Multi-class AdaBoost. *Statistics and Its Interface*. 2009;2: 349–360. doi: 10.4310/SII.2009.v2.n3.a8

Информация об авторах

Степанов Сергей Степанович – д-р мед. наук, старший научный сотрудник кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; serg_stepanov@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

SPIN 3241-2441

Степанов Александр Сергеевич – канд. мед. наук, зав. отделением хирургических методов лечения опухолей головы и шеи; Клинический онкологический диспансер Омской области; ctepan55@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>

Цускман Ирина Геннадиевна – канд. ветеринар. наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета; ira.tsuskman@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3667-7905>

Акулинин Виктор Александрович – д-р. мед. наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета, ул. Ленина, 12, Омск, 644099, Россия; v_akulinin@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

SPIN 3806-2878

Information about the authors

Sergei S. Stepanov – Doct. Sci. (Med.), Senior Rresearcher of Histology, Cytology and Embryology Department of Omsk State Medical University;

serg_stepanov@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

SPIN 3241-2441

Aleksandr S. Stepanov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Surgical Treatment of Head and Neck Tumors; Clinical Oncology Dispensary of Omsk Region;

ctepan55@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>

Irina G. Tsuskman – Cand. Sci. (Vet.), associate professor of the Department of histology, cytology and embryology of Omsk State Medical University;

ira.tsuskman@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-3667-7905>

Viktor A. Akulinin – Doct. Sci. (Med.), Professor, Head of Histology, Cytology and Embryology Department of Omsk State Medical University;

v_akulinin@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

SPIN 3806-2878

Статья поступила в редакцию 22.01.2025; одобрена после рецензирования 14.03.2025; принята к публикации 24.03.2025.
Submitted 22.01.2025; Revised 14.03.2025; Accepted 24.03.2025.