



DOI 10.15688/jvolsu11.2015.4.1

УДК 611.72:57.086.2

ББК (Е)26.66

ВОЗМОЖНОСТИ ПОЛНОЦВЕТНОЙ ТРЕХМЕРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ ПОСЛОЙНОГО НАЛОЖЕНИЯ: КОЛЕННЫЙ СУСТАВ КРЫСЫ¹

Алексей Анатольевич Терпиловский

Генеральный директор, ООО «Лаборатория виртуальной биологии»
alexdiess@mail.ru
ул. Мясницкая, 30/1, стр. 2, 101000 г. Москва, Российская Федерация

Харлампович Пантелеевич Тирас

Кандидат биологических наук, проректор по научно-инновационной работе,
Пушкинский государственный естественно-научный институт
tiras1950@yandex.ru
просп. Науки, 3, 142290 г. Пушкино, Российская Федерация

Александр Валентинович Хоперсков

Доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий кафедрой информационных систем и компьютерного моделирования,
Волгоградский государственный университет
ahoperskov@gmail.com, infomod@volsu.ru
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Валерий Валерьевич Новочадов

Доктор медицинских наук, профессор, директор института естественных наук,
Волгоградский государственный университет
novovv@rambler.ru, biobio@volsu.ru
просп. Университетский, 100, 400062 г. Волгоград, Российская Федерация

Аннотация. Объектом исследования был выбран коленный сустав крысы как модельный объект для разработки новых методов диагностики и лечения заболеваний

суставов человека. В работе предпринята попытка создать виртуальную трехмерную реконструкцию коленного сустава на основе оригинальной технологии высокоточного сошлифовывания и сравнить возможности количественного анализа костной и хрящевой ткани на 3D-модели с возможностями морфометрии классических гистологических микропрепаратов.

Полученные оцифрованные изображения шлифов (1 200–2 600 на каждый из 8 суставов) имели размеры пиксела 8×8 мкм, с вертикальным шагом сошлифовывания 8 мкм, их программная обработка позволяла производить построение виртуального среза со смещением и наклоном, необходимыми для наиболее адекватной визуализации строения объекта.

Разработанный метод высокоточного сошлифовывания позволяет получать серию оцифрованных изображений сечений биологических объектов, а созданный на их основе виртуальный объект практически лишен пространственных деформаций и искажений цветопередачи. Морфометрический анализ таких 3D-реконструкций по своей точности и информативности не уступает, а по отдельным показателям превосходит количественное исследование серийных гистологических срезов.

Реконструкции, полученные с помощью метода высокоточного сошлифовывания, могут быть использованы для создания виртуальных музейных экспонатов, атласов и учебных пособий в самых разных биологических науках, основанных на морфологическом подходе к познанию своего объекта исследования. Другое применение реконструкций состоит в преобразовании их в виртуальные тренажеры на принципах дополненной реальности или в модели с последующим 3D-принтингом физических тренажеров и рабочих моделей для нужд медицины, ветеринарии, зоотехнии и смежных областей – везде, где МРТ или гистологические реконструкции не обеспечивают полноценной трехмерной картины.

Ключевые слова: трехмерные изображения, трехмерные реконструкции, коленный сустав, морфология, суставной хрящ, кость, крыса.

Природа человека такова, что ему свойственно трехмерное (3D) восприятие мира. Поскольку оно рождается только в результате совмещения двухмерных (2D) изображений от парных органов зрения и слуха, а также поверхностного (псевдо-3D) восприятия от экстерорецепторов кожи и истинного 3D – от интерорецепторов в центральной нервной системе [9; 18], на практике человек нередко довольствуется технологиями получения и хранения визуальной информации в 2D-форме. В то же время этот дефицит размерности человек стремится вернуть при первой возможности.

Прогресс технологий получения и хранения изображений биологических объектов, по определению имеющих крайне сложную форму и внутреннюю структуру, позволил на настоящий момент вплотную подойти к проблеме перехода на 3D-формат восприятия биологической информации [2; 7].

Чтобы достичь этого, необходимо воспроизводимо получать 3D-реконструкции, то

есть виртуальные объекты-модели, являющиеся точными цифровыми копиями (цифровыми клонами) объектов-оригиналов. При этом необходимо понимать, что получение полной идентичности – идеал, к которому реальная технология может стремиться только на основе последовательных взаимосвязанных и взаимокompенсирующих приближений [3; 8]. Сущность этого отражена в краткой формуле 3D-реконструкции:

$$3D = 2D + 3D'; 3D = 3D'.$$

Два основных подхода к получению первичных изображений биологических объектов для 3D-реконструкции, используемых на настоящий момент, имеют ряд неустраняемых недостатков. Технологии, основанные на «неинвазивном» получении изображений путем просвечивания тканей различными видами проникающего излучения (магнитно-резонансная томография, микрорентгеномография, позит-

ронно-эмиссионная томография и т. п.), несущие в себе искажения, обусловленные многоэтапностью поступления данных, обладают эффектом «засвечивания», связанного с неодинаковым лучепреломлением и поглощением структур внутри биообъекта. При визуализации изображений используется искусственная цветопередача, а объекты различаются друг от друга по свойствам, не всегда позволяющим идентифицировать реальную форму отдельных структур. Поэтому при работе в режиме диагностики нередко используются не естественные, привязанные к реальным структурам понятия, а искусственные наборы индикаторов, позволяющие интерпретировать визуальную картину применительно к данной диагностической процедуре [15; 16; 22].

Другой подход для создания 3D-реконструкций основан на оцифровке серийных гистологических срезов. При использовании этого подхода неизбежны пространственные деформации на всех этапах получения среза, а замена естественной окраски на искусственную (пусть и информативную) дополняется неравномерностью окрашивания тканей. В итоге большое количество искажений каждого среза не позволяет создать приемлемую виртуальную модель исходного биологического объекта, даже для объекта небольших размеров, необходимых от нескольких сотен до нескольких тысяч срезов, что делает задачу крайне трудоемкой и ресурсоемкой [12; 14].

Кости и суставы как объект реконструкций интересуют специалистов как в силу чисто медицинских аспектов (высокая распространенность патологии, необходимость точных манипуляций при лечении), так и ввиду относительно высокой прочности и трудности исследования способами классического препарирования [10; 11]. Методы диагностики и лечения заболеваний костей и суставов в настоящее время включают в себя малоинвазивные микрохирургические, тканеинженерные, клеточные, молекулярные и генные технологии [5; 13; 19]. Все это требует детальных сведений об изменениях 3D-организации опорных тканей, как в норме, так и при развитии патологии и в процессе лечения [1; 4; 17].

Одним из авторов настоящей работы разработан, запатентован и создан в качестве действующего инструмента комплекс по со-

зданию 3D-реконструкций реальных биологических объектов, основанный на технологии высокоточного послойного сошлифовывания и цифровой съемки объектов в реальном цветовом диапазоне [6]. Нам представилось целесообразным использовать данный инструмент для изучения 3D-организации костей и суставов.

Цель работы

Создать виртуальную трехмерную реконструкцию сложного биологического объекта (коленного сустава) на основе технологии высокоточного сошлифовывания и сравнить возможности количественного анализа костной и хрящевой ткани на 3D-модели с возможностями морфометрии гистологических микропрепаратов.

Материал и методы исследования

Объектом 3D-реконструкции стали суставы 8 белых крыс-самцов линии Wistar массой 180–240 г. Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных». Материал получали у интактных животных после эвтаназии препаратом «Золетил» в дозе 200 мг/кг массы путем частичной препаровки с каждой стороны единым костно-мышечным блоком в объеме от дистальных эпифизов бедренной кости до проксимальных эпифизов большеберцовой кости. С латеральной стороны делали надрез до суставной полости разделения мягких тканей для доступа фиксатора или заливочного материала в суставную полость. Блоки разделяли на правые и левые, после чего в каждой выборке в случайном порядке половину использовали для 3D-реконструкций, половину – для приготовления гистологических препаратов.

При создании 3D-реконструкций была использована технология высокоточного послойного сошлифовывания в сочетании с цифровой съемкой шлифов и программное обеспечение для создания виртуальной модели объекта-оригинала [6].

Для получения 3D-реконструкции блоки замораживали на твердом диоксиде углерода

при $-72\text{ }^{\circ}\text{C}$, погружали их в специальный заливочный материал при $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего подвергали циклам высокоточного торцевого фрезерования (сошлифовывания) с дискретным шагом $8\text{ }\mu\text{m}$ и цифровой съемки поверхности камерой Canon 5D с объективом Canon EF Macro USM (180 mm f/3.5 , $4\text{ }800 \times 2\text{ }600$ пкс), что соответствовало размеру пиксела $8 \times 8\text{ }\mu\text{m}$. Полученные 2D-изображения, по $1\text{ }200\text{--}2\text{ }600$ изображений разрешением порядка $1\text{ }500 \times 1\text{ }250$ пкс в файлах формата .tiff для каждого из 8 объектов, подвергали программной обработке для создания профайла, содержащего необходимую информацию для 3D-реконструкции с минимальными искажениями цветовых и геометрических параметров объекта-оригинала. Экспорт программы позволял производить построение и сохранение в формате .tiff виртуального среза со смещением исходной точки ($x = y = z = 0$) по оси Z на произвольное число пикселей и далее с наклоном в горизонтальной и/или сагиттальной плоскости на произвольное число градусов от 1 до 90 включительно.

Равное количество (8) блоков, содержащих коленные суставы, фиксировали в 10% -м растворе забуференного формалина ($\text{pH} = 7,4$) и декальцинировали в растворе «Cal-Ex®» (Fisher Scientific), проводили по общепринятой гистологической методике и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления структуры и плотности хрящевого матрикса – сафранином O [14].

Количественное сравнительное исследование было проведено с помощью программы свободного доступа «ImageJ» (США). На гистологических препаратах и виртуальных объектах определяли радиальную толщину хряща (мкм), фактор поверхности хряща, среднюю толщину кортикального слоя кости и костных балок (мкм). Эквивалентом оптической плотности матрикса (усл. ед.) на гистологических препаратах в случае анализа реконструкций служила средняя яркость матрикса, которую рассчитывали по формуле:

$$I = 0,299R + 0,587G + 0,114B,$$

где R , G и B – средние значения показателей цвета на участке матрикса.

Количественные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с расчетом показателей, принятых для характеристики непараметрических выборок в медико-биологических исследованиях: медиана [1-й квартиль, 3-й квартиль]. Для анализа различий между выборками использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

Результаты исследования

При анализе изображений шлифов было хорошо видно сохранение формы и натурального цвета биологического объекта. Разрешающая способность была достаточна для экспертной оценки костной и хрящевой тканей сустава и окружающих тканей (см. рис. 1).

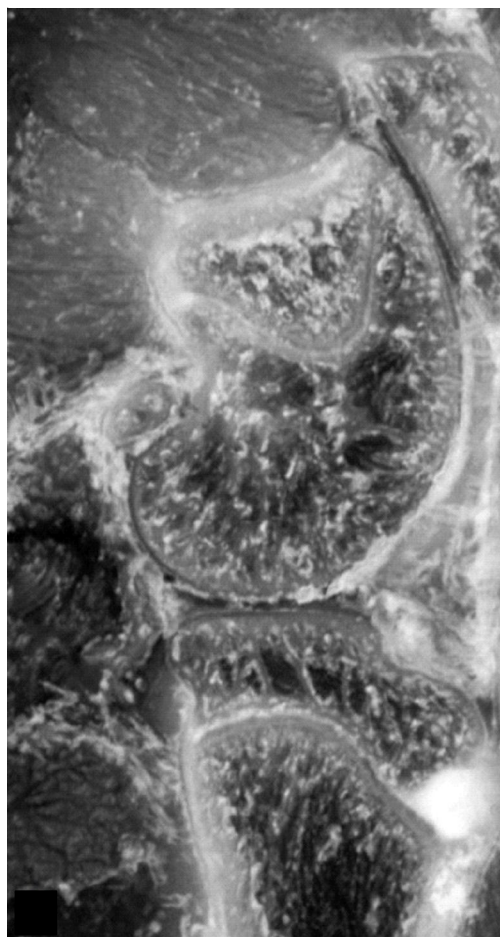


Рис. 1. Случайный (1116-й от поверхности блока) срез через левый коленный сустав крысы, полученный методом высокоточного сошлифовывания (хорошо видны все тканевые структуры, сохранен натуральный цвет и форма объектов). $\times 10$

Полученные 3D-реконструкции со сменением углов зрения позволяли, по желанию пользователя, визуализировать строение изучаемых тканей, подчеркивая детали, лучше видимые, например, при продольном или поперечном сечениях (см. рис. 2).

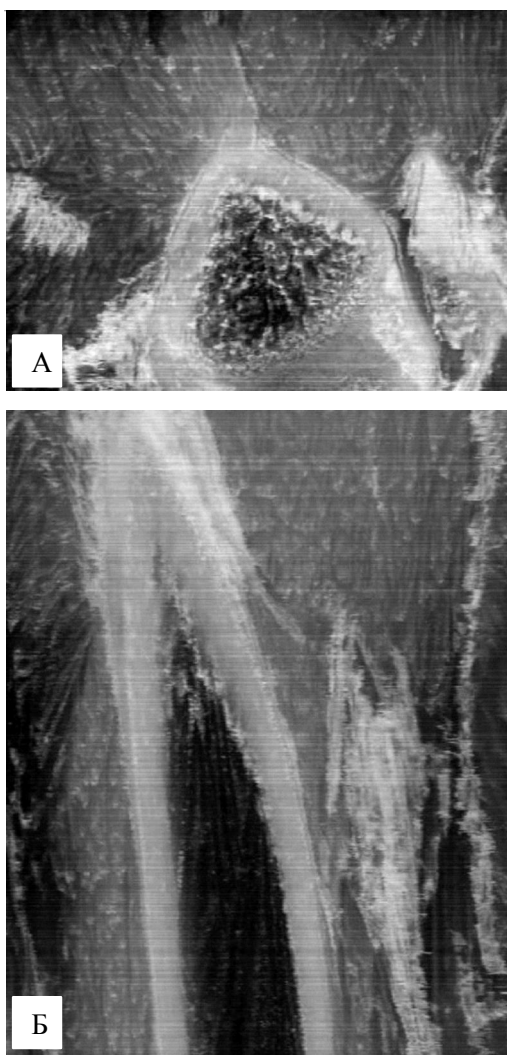


Рис. 2. Визуализации поворотов большеберцовой кости на заданные углы к поверхности сошлифовывания, позволяющие лучше визуализировать строение на поперечном и продольном сечениях ($\times 5$):
 А – поперечное сечение; Б – продольное сечение

В таблице представлены результаты сопоставления некоторых количественных показателей строения хряща и костной ткани, полученных при анализе гистологических изображений и 3D-реконструкций.

Как видно, анализ 3D-реконструкций позволяет получить показатели со сходной размерностью и информативностью. Ради-

альная толщина хряща – единственный показатель, по которому при реконструкциях регистрировалась большая величина по сравнению с аналогичным показателем на гистологическом изображении. Мы связываем этот факт с отсутствием деформаций и уменьшения блока в результате его фиксации формалином и декальцинации. Анализ яркости тканей на 3D-реконструкциях – новая возможность, которая не может быть адекватно оценена при анализе гистологических изображений, и заслуживает дальнейшего изучения.

В качестве дальнейшего развития данного направления визуализации биологических объектов необходимо решить несколько задач по повышению ценности и востребованности получаемой информации (см. рис. 3).

Во-первых, такие реконструкции могут стать хорошей основой для создания физиолого-математических (например, биомеханических) моделей. Это позволяет решать задачи о взаимном пространственном расположении органов и тканей, позиционировании инструмента во время оперативных вмешательств, объемном воздействии на орган при лечении и т. п.

Во-вторых, 3D-реконструкция может использоваться как виртуальный музейный экспонат. В этом случае она обеспечивает детальное знакомство с внутренним строением сложных и редких объектов.

Определенные перспективы использования таких реконструкций связаны с технологиями восстановления тканей путем 3D-принтинга [19; 20], которые находятся еще только в начале пути внедрения в практическую деятельность в биологии и медицине.

На основе 3D-реконструкции может быть создана обучающая компьютерная игра. В этом случае необходима программа, позволяющая подключать на каждом этапе работы с изображением инструменты для дополнительного информирования о названии, свойствах элементов, активные ссылки, а также вводить элементы контроля усвоения материала.

Наконец, одним из наиболее ценных продолжений 3D-реконструкций является разработка на ее основе профессионального (например, хирургического) тренажера [21].

Показатели морфометрии гиалинового хряща и костной ткани интактных суставов крыс, Ме [1-й кв. + 3-й кв.]

Показатель	3D-реконструкции	Гистологические изображения	Различия
<i>Гиалиновый хрящ</i>			
Радиальная толщина хряща, мкм	232 [193 ÷ 270]	185 [170 ÷ 202]	< 0,01
Фактор суставной поверхности	1,16 [1,05 ÷ 1,20]	1,08 [1,04 ÷ 1,16]	Н. д.
Оптическая плотность матрикса, усл. ед.	–	1,84 [1,63 ÷ 1,96]	–
Средняя яркость ткани, усл. ед.	73,9 [57,3 ÷ 88,4]	–	–
<i>Костная ткань</i>			
Толщина кортикального слоя кости, мкм	1 270 [1 063 ÷ 1 388]	1 225 [1 048 ÷ 1 407]	Н. д.
Толщина костных трабекул, мкм	310 [240 ÷ 320]	275 [223 ÷ 302]	Н. д.
Оптическая плотность матрикса, усл. ед.	–	2,73 [2,55 ÷ 3,09]	–
Средняя яркость, усл. ед.	178 [151 ÷ 193]	–	–

Примечание. Н. д. – не достоверно, $p > 0,5$.

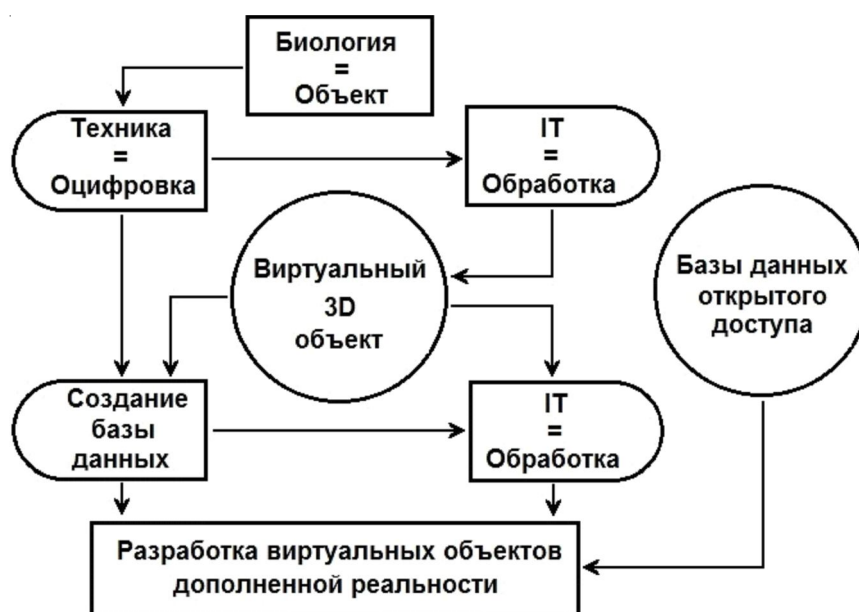


Рис. 3. Блок-схема получения 3D-реконструкций биологических объектов и направления их дальнейшего применения

Заключение

Метод высокоточного сошлифовывания позволяет получать множественные оцифрованные изображения сечений биологических объектов, после 3D-реконструкций которых в виртуальном объекте практически отсутствуют пространственные деформации и искаже-

ния цветопередачи. Морфометрический анализ таких 3D-реконструкций по своей точности информативности не уступает, а по отдельным показателям превосходит количественное исследование серийных гистологических срезов. Критической технологией для совершенствования данного подхода к получению количественной биологической информации на

настоящий момент является программное обеспечение, совершенствование которого необходимо для сокращения сроков получения производных изображений по запросам пользователя и автоматического экспорта в типовые программы анализа изображений.

Реконструкции, полученные с помощью метода высокоточного сошлифовывания, могут быть использованы для создания виртуальных музейных экспонатов, атласов и учебных пособий в самых разных биологических науках, основанных на морфологическом подходе к познанию своего объекта исследования. Другое применение 3D-реконструкций состоит в преобразовании их в виртуальные тренажеры на принципах дополненной реальности или в модели с последующим 3D-принтингом физических тренажеров и рабочих моделей для нужд медицины, ветеринарии, зоотехнии и смежных областей – везде, где МРТ или гистологические реконструкции не обеспечивают полноценной трехмерной картины.

ПРИМЕЧАНИЕ

¹ Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-47-02642 и Госзадания Министерства образования и науки РФ, № 2912.

Авторы выражают благодарность М.Е. Ковалеву за использование его программного продукта 3DBioGraph 1.0, а также С.В. Клименко и А.А. Широкому за плодотворное обсуждение технических деталей исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инновационные технологии в восстановлении коленного сустава при его повреждениях и заболеваниях / Д. А. Маланин [и др.] // Вестник Волгогр. гос. мед. ун-та. – 2009. – № 2. – С. 7–13.
2. Компьютерная биология – проблемы и перспективы / Х. П. Тирас [и др.] // Горизонты биофизики / под ред. Г. Р. Иваницкого. – Серпухов, 2003. – С. 62–66.
3. Минимизация погрешностей морфометрии регенерирующих планарий / Х. П. Тирас [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2–7. – С. 1412–1416.
4. Новочадов, В. В. Неоднородность строения гиалинового хряща коленного сустава у интактных крыс и при экспериментальном остеоар-

трозе / В. В. Новочадов, П. А. Крылов, В. Г. Зайцев // Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки. – 2014. – № 4. – С. 6–15.

5. Новые анатомо-функциональные характеристики нижних конечностей человека / А. А. Воробьев [и др.] // Вестник Волгогр. гос. мед. ун-та. – 2013. – № 2. – С. 20–24.

6. Способ создания виртуальной модели биологического объекта и устройство для его осуществления : пат. 2418316 РФ / А. А. Терпиловский, А. Л. Кузьмин, Р. А. Лукашкина. – Оpubл. 10.05.2011.

7. Тирас, Х. П. Компьютерная биология – основания и определения / Х. П. Тирас // Компьютерная биология – от фундаментальной науки к биотехнологии и медицине : материалы I Междунар. науч.-техн. конф. – Пушино, 2011. – С. 81–82.

8. A method for accurate spatial registration of PET images and histopathology slices / P. Tanuj [et al.] // EJNMMI Res. – 2015. – Vol. 5. – 64 p.

9. A putative model of multisensory object representation / S. Lacey [et al.] // Brain Topogr. – 2009. – Vol. 21, № 3–4. – P. 269–274.

10. Cho, H. J. Morphometric evaluation of Korean femurs by geometric computation: comparisons of the sex and the population / H. J. Cho, D. S. Kwak, I. B. Kim // Biomed. Res. Int. – 2015. – P. 538–730.

11. Development and validation of a computational model of the knee joint for the evaluation of surgical treatments for osteoarthritis / R. Mootanah [et al.] // Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng. – 2014. – Vol. 17, № 13. – P. 1502–1517.

12. Different phenotype of chondrocytes in articular cartilage: mapping, possible mechanisms, and impact to implant healing / V. V. Novochadov [et al.] // Eur. J. Mol. Biotech. – 2014. – Vol. 2, № 4. – P. 210–222.

13. Gattazzo, F. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche / F. Gattazzo, A. Urciuolo, P. Bonaldo // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – Iss. 1840 (8). – P. 2506–2519.

14. Handbook of histology methods for bone and cartilage / ed. by Y. H. An, K. L. Martin. – N. Y. : Humana Press, 2003. – 587 p.

15. Harrison, K. D. Modalities for visualization of cortical bone remodeling: the past, present, and future / K. D. Harrison, D. M. L. Cooper // Front Endocrinol (Lausanne) 2015; 6: 122.

16. Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering / A. A. Appel [et al.] // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34, № 28. – P. 6615–6630.

17. Mechanomics: an emerging field between biology and biomechanics / J. Wang [et al.] // Protein Cell. – 2014. – Vol. 5, № 7. – P. 518–531.

18. Multi-stable perception balances stability and sensitivity / A. Pastukhov [et al.] // Front. Comput. Neurosci. – 2013. – Vol. 7. – 17 p.

19. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine / P. Bajaj [et al.] // *Ann. Rev. Biomed. Eng.* – 2014. – Vol. 16. – P. 247–276.
20. Ventola, C. L. Medical applications for 3D printing: current and projected uses // *PT.* – 2014. – Vol. 39, № 10. – P. 704–711.
21. Vision-based markerless registration using stereo vision and an augmented reality surgical navigation system: a pilot study / H. Suenaga [et al.] // *BMC Med Imaging.* – 2015. – Vol. 15. – 51 p.
22. Wörtler, K. Shoulder: postoperative imaging / K. Wörtler // *Лучевая диагностика и терапия.* – 2015. – № 2 (6). – С. 37–40.

REFERENCES

1. Malanin D.A., et al. Innovatsionnye tekhnologii v vosstanovlenii kolennogo sustava pri ego povrezhdeniyakh i zabolevaniyakh [Innovative Technologies in Restoration of Damaged or Diseased Knee Joint]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2009, no. 2, pp. 7-13.
2. Tiras Kh.P., et al. Kompyuternaya biologiya – problemy i perspektivy [Computing Biology: Problems and Prospects]. Ivanitzkiy G.R., ed. *Gorizonty biofiziki* [Horizons of Biophysics]. Serpukhov, 2003, pp. 62-66.
3. Tiras Kh.P., et al. Minimizatsiya pogreshnostey morfometrii regeneriruyushchikh planariy [Minimizing Morphometric Errors in Planarian Regeneration]. *Fundamentalnye issledovaniya*, 2015, no. 2-7, pp. 1412-1416.
4. Novochadov V.V., Krylov P.A., Zaytsev V.G., et al. Neodnorodnost stroeniya gialinovogo khryashcha kolennogo sustava u intaktnykh krysi i pri eksperimentalnom osteoartroze [Clusterization of Knee Joint Hyaline Cartilage of Intact Rats and Rats With Experimental Osteoarthritis]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 11, Estestvennye Nauki* [Science Journal of Volgograd State University. Natural Sciences], 2014, (4), pp. 6-15.
5. Vorobyev A.A., et al. Novye anatomo-funktsionalnye kharakteristiki nizhnikh konechnostey cheloveka [New anatomic and functional characteristics of lower limbs in humans]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2013, no. 2, pp. 20-24.
6. Terpilovskiy A.A., Kuzmin A.L., Lukashkina R.A. *Sposob sozdaniya virtualnoy modeli biologicheskogo obyektu i ustroystvo dlya ego osushchestvleniya: patent 2418316 RF* [The Method of Creating a Virtual Model of a Biological Object and Device for Its Implementation: RF Patent no. 2418316]. Date of publication May 10, 2011.
7. Tiras Kh.P. Kompyuternaya biologiya – osnovaniya i opredeleniya [Computing Biology: Basis and Definitions]. *Kompyuternaya biologiya ot fundamentalnoy nauki k biotekhnologii i meditsine: materialy I mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Computing Biology from Fundamental Science to Biotechnology and Medicine: Proceeding of the 1st International Scientific and Practical Conference]. Pushchino, 2011, pp. 81-82.
8. Tanuj P., et al. A Method for Accurate Spatial Registration of PET Images and Histopathology Slices. *EJNMMI Res.*, 2015, vol. 5. 64 p.
9. Lacey S., et al. A Putative Model of Multisensory Object Representation. *Brain Topogr.*, 2009, vol. 21, no. 3-4, pp. 269-274.
10. Cho H.J., et al. Morphometric Evaluation of Korean Femurs by Geometric Computation: Comparisons of the Sex and the Population. *Biomed. Res. Int.*, 2015, pp. 538-730.
11. Mootanah R., et al. Development and Validation of a Computational Model of the Knee Joint for the Evaluation of Surgical Treatments for Osteoarthritis. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.*, 2014, vol. 17, no. 13, pp. 1502-1517.
12. Novochadov V.V., et al. Different Phenotype of Chondrocytes in Articular Cartilage: Mapping, Possible Mechanisms, and Impact to Implant Healing. *Eur. J. Mol. Biotech.*, 2014, vol. 2, no. 4, pp. 210-222.
13. Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P. Extracellular Matrix: a Dynamic Microenvironment for Stem Cell Niche. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, iss. 1840(8), pp. 2506-2519.
14. An Y.H., Martin K.L. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. New York, Humana Press, 2003. 587 p.
15. Harrison K.D., Cooper D.M.L. Modalities for Visualization of Cortical Bone Remodeling: the Past, Present, and Future. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2015, vol. 6, p. 122.
16. Appel A.A., et al. Imaging Challenges in Biomaterials and Tissue Engineering. *Biomaterials*, 2013, vol. 34, no. 28, pp. 6615-6630.
17. Wang J., et al. Mechanomics: an Emerging Field Between Biology and Biomechanics. *Protein Cell*, 2014, vol. 5, no. 7, pp. 518-531.
18. Pastukhov A., et al. Multi-Stable Perception Balances Stability and Sensitivity. *Front. Comput. Neurosci.*, 2013, vol. 7, p. 17.
19. Bajaj P., et al. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 2014, vol. 16, pp. 247-276.
20. Ventola C.L. Medical Applications for 3D Printing: Current and Projected Uses. *PT*, 2014, vol. 39, no. 10, pp. 704-711.
21. Suenaga H., et al. Vision-Based Markerless Registration Using Stereo Vision and an Augmented Reality Surgical Navigation System: a Pilot Study. *BMC Med Imaging*, 2015, vol. 15, p. 51.
22. Wörtler K. Shoulder: Postoperative Imaging. *Luchevaya diagnostika i terapiya*, 2015, no. 2 (6), pp. 37-40.

**THE POSSIBILITIES
OF FULL-COLOR THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION
OF BIOLOGICAL OBJECTS
BY THE METHOD OF LAYER-BY-LAYER OVERLAPPING:
KNEE JOINT OF A RAT**

Aleksey Anatolyevich Terpilovskiy

General Director, Laboratory of Virtual Biology LTD
alexdie@mail.ru
Myasnitskaya St., 30/1, Bd. 2, 101000 Moscow, Russian Federation

Kharlampiy Panteleevich Tiras

Candidate of Biological Sciences, Vice-Rector in Science and Management,
Pushchino State Natural Science Institute
tiras1950@yandex.ru
Prosp. Nauki, 3, 142290 Pushchino, Russian Federation

Aleksandr Valentinovich Khoperskov

Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Professor,
Head of Department of Information Systems and Computer Simulation,
Volgograd State University
ahoperskov@gmail.ru, infomod@volsu.ru
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Valeriy Valeryevich Novochadov

Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of Institute of Natural Sciences,
Volgograd State University
novovv@rambler.ru, biobio@volsu.ru
Prosp. Universitetsky, 100, 400062 Volgograd, Russian Federation

Abstract. The article has a goal to demonstrate capabilities of layer-by-layer overlapping method for 3D-reconstruction of knee joint. The model object was chosen for this research to provide the base for new methods in diagnostics and treatment of human orthopedic diseases. We used the original technology of high-precision grinding and compared the ability of quantitative analysis of bone and cartilage tissue on 3D models to the capabilities of classical morphometry of histological slices.

Obtained digitized images of thin sections (1200-2600 on each of the 8 joints) had a pixel size of 8 x 8 μm , with a vertical step grinding 8 μm . Its software processing allows for the construction of a virtual slice with an offset and slope, required for the adequate visualization of the biological structures.

The developed method of high-precision grinding allows obtaining series of digitized cross-sectional images of biological objects, so the virtual object created on its base, is almost devoid of spatial deformations and distortions of color. Morphometric analysis of these 3D reconstructions in terms of precision and informativeness is not inferior, and according to some indicators it exceeds the quantitative study of serial histological sections.

The reconstruction, obtained using the high-precision grinding, can be used to create virtual museum exhibits, atlases and manuals in various biological sciences, based on morphological approach to the cognition of its objects. Another application of reconstruction is to convert them into virtual simulators on the principles of augmented reality or into the models for 3D printing of physical simulators and working prototypes for medicine, veterinary, animal science and related areas. This will be of most value where an MRI or histological reconstruction did not provide full three-dimensional picture.

Key words: 3D imaging, 3D reconstruction, knee joint, morphology, articular cartilage, bone, rat.