УКРАЇНА

(19) UA (11) 99314 (13) U

(51) МПК (2015.01)
G01N 21/00
G06K 9/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 14103**

(22) Дата подання заявки: **29.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.05.2015**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.05.2015, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
Туманський Валерій Олексійович (UA),
Євсєєв Антон Володимирович (UA),
Коваленко Інна Сергіївна (UA),
Зубко Марія Дмитрівна (UA)

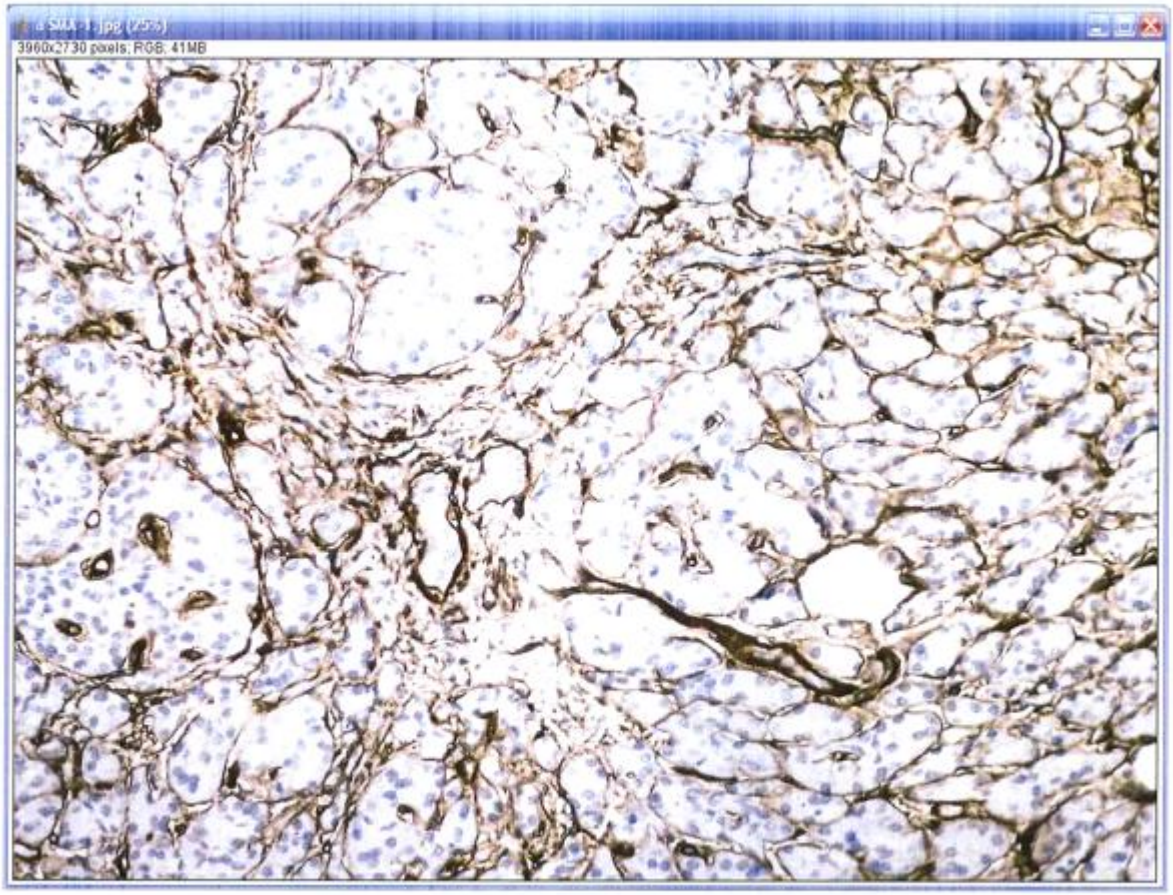
(73) Власник(и):
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA)

(54) СПОСІБ ФОТОЦИФРОВОЇ МОРФОМЕТРІЇ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

(57) Реферат:

Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів включає підрахунок і аналіз кількості точок-пікселів цифрового зображення, визначення середньої величини і довірчого інтервалу оптичної щільності цих точок, сегментацію зображення на чорні та білі пікселі і визначення відсоткової частки, що отримується в результаті ділення числа пікселів, які містяться на вибраному фрагменті зображення, на загальне число пікселів в цьому зображенні. Імуногістохімічно забарвлені з використанням високоафінних первинних антитіл та стандартизованої системи візуалізації препарати аналізують у медичній програмі обробки цифрових зображень Image J з використанням вбудованого плагіну Colour Deconvolution цієї програми і за допомогою схеми аналізу забарвлення "гематоксилін+DAB" в автоматичному режимі визначають середній рівень імуногістохімічного забарвлення з наступним визначенням відносної площі експресії маркерів як відсоткового співвідношення числа пікселів цифрового зображення імунопозитивної реакції до загального числа пікселів в зображенні.

UA 99314 U



Фіг. 1

Корисна модель належить до медицини, а саме до патологічної анатомії, патоморфології, гістопатології, патологічної або структурної морфології, і може бути використаною у патогістологічній діагностиці при інтерпретації кількісних результатів імуногістохімічного дослідження рівня експресії антигенів у гістологічних зрізах тканин і органів.

Існує багато способів кількісної інтерпретації результатів імуногістохімічного дослідження рівня експресії певних клітинних і тканинних антигенів, визначення яких має значення для патоморфологічної діагностики багатьох захворювань, визначення їх прогнозу та призначення тарґетної терапії, але вони недостатньо достовірні, у деяких випадках вони ґрунтуються на суб'єктивній оцінці патоморфологом результатів імуногістохімічної реакції, що викликало необхідність розробки нових способів.

Найбільш близьким за технічною суттю та результатом, що досягається, є спосіб вирахування об'ємної частки повітряних просторів по цифрових зображеннях гістологічних зрізів легенів, у якому використовується підрахунок і аналіз кількості точок-пікселів цифрового зображення, причому додатково обчислюється загальне число точок-пікселів зображення, визначається оптична щільність кожного пікселя зазначених фрагментів, визначаються середня величина і довірчий інтервал оптичної щільності цих точок, при цьому відбувається сегментація зображення на чорні та білі пікселі, потім враховується число тільки тих пікселів цифрового зображення, які відповідають потрібним характеристикам оптичної щільності, визначається частка, що вимірюється у відсотках і отримується в результаті ділення числа пікселів, що містяться на вибраному фрагменті зображення, на загальне число пікселів в цьому зображенні (Пат. 83454 Україна, МПК A61K 35/00. Спосіб вирахування об'ємної частки повітряних просторів по цифрових зображеннях гістологічних зрізів легенів / Новіков М.Ю., Глотов М.О., Сатаєва Т.П.; № u201303894; заявл. 29.03.2013; опубл. 10.09.2013, Бюл. № 17).

Спільними суттєвими ознаками найближчого аналога і корисної моделі, що заявляється, є такі:

- підрахунок і аналіз кількості точок-пікселів цифрового зображення,
- визначення середньої величини і довірчого інтервалу оптичної щільності цих точок,
- сегментація зображення на чорні та білі пікселі,
- визначення відсоткової частки, що отримується в результаті ділення числа пікселів, які містяться на вибраному фрагменті зображення, на загальне число пікселів в цьому зображенні.

Цей спосіб є недостатньо ефективним, тому що необхідні для обчислення фрагменти зображення, дослідник відзначає вручну, а далі шляхом статистичного аналізу визначаються середня величина і довірчий інтервал оптичної щільності точок, і, таким чином, встановлюється "поріг чутливості" для подальшої сегментації зображення на чорні та білі пікселі, але це не є достатньо достовірним, тому що залежить від суб'єктивного сприйняття значущих фрагментів зображення дослідником.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів шляхом введення додаткового етапу імуногістохімічного маркування та використання автоматичного програмного виділення необхідних імунопозитивних мікроструктур, що забезпечить підвищення точності та достовірності морфометричного дослідження і зменшить загальний час, необхідний на обчислення необхідних параметрів та отримання результату.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає підрахунок і аналіз кількості точок-пікселів цифрового зображення, визначення середньої величини і довірчого інтервалу оптичної щільності цих точок, сегментацію зображення на чорні та білі пікселі і визначення відсоткової частки, що отримується в результаті ділення числа пікселів, які містяться на вибраному фрагменті зображення, на загальне число пікселів в цьому зображенні, новим є те, що імуногістохімічно забарвлені з використанням високоафінних первинних антитіл та стандартизованої системи візуалізації препарати аналізують у медичній програмі обробки цифрових зображень Image J з використанням вбудованого плагіну Colour Deconvolution цієї програми і за допомогою схеми аналізу забарвлення "гематоксилін+DAB" в автоматичному режимі визначають середній рівень імуногістохімічного забарвлення з наступним визначенням відносної площі експресії маркерів як відсоткового співвідношення числа пікселів цифрового зображення імунопозитивної реакції до загального числа пікселів в зображенні.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

Спосіб визначення відносної площі імунопозитивних структур у цифрових зображеннях гістологічних зрізів, забарвлених імуногістохімічним методом, за допомогою схеми аналізу забарвлення "гематоксилін+DAB" є більш об'єктивним морфометричним методом дослідження, ніж метод визначення об'ємної частки однорідних структур у цифрових зображеннях

гістологічних зрізів, завдяки використанню високоспецифічних первинних антитіл, що афінно зв'язуються з певними клітинними або тканинними антигенами, з наступним точним визначенням площі їх експресії.

Більша частина продуктів реакції виявляється стандартизованими системами візуалізації з використанням діамінобензидину (DAB), для якого існує стандартизована шкала інтенсивності експресії, яку неможливо оцінити суб'єктивно при звичайному мікроскопічному дослідженні.

Порівняно із звичайним способом оцінки рівнів експресії, при якому проводиться підрахунок імунопозитивних клітин, що експресують певний антиген, даний спосіб дозволяє інтегрально оцінити експресію в цитоплазмі, ядрах і відростках клітин у стандартизованому полі зору мікроскопа.

Використання автоматичного режиму сегментації цифрового зображення дозволяє уникнути суб'єктивного фактора при проведенні морфометричного дослідження, і водночас прискорює процес отримання результату.

Таким чином, сукупність вищезазначених позитивних характеристик дозволить підвищити точність сумарного визначення рівня експресії антигенів та достовірність результатів морфометричного дослідження, прискорити процес обчислення морфометричних параметрів і отримання кінцевого результату, знизити кількість помилок, пов'язаних із суб'єктивністю сприйняття дослідника, розробити чіткі морфометричні критерії оцінювання результатів експресії певних антигенів.

Спосіб здійснюють таким чином.

Імуногістохімічно забарвлені гістологічні зрізи фотографують в мікроскопі цифровою фотокамерою і аналізують з використанням медичної програми обробки цифрових зображень Image J. У плагіні Colour Deconvolution цієї програми використовують вбудовану схему аналізу забарвлення "гематоксилін+DAB" і визначають середню величину і довірчий інтервал оптичної щільності DAB забарвлення. Далі за стандартною шкалою яскравості рівень експресії маркерів кількісно градують за Katayama A. et al. (2004) в умовних балах (від 0 - білий до 255 - чорний) і розбивають на 4 категорії: негативна реакція - 0-20 балів; слабкий рівень експресії - 21-50 балів; помірний рівень - 51-100 балів; високий рівень експресії - більше 100 балів. Для морфометричного вимірювання відносної площі, яку займають імунопозитивні структури, у відфільтрованій DAB частині встановлюється "поріг чутливості" для подальшої сегментації зображення, яка передбачає розділення всіх точок зображення на два типи - чорні і білі, з наступним обчисленням співвідношення числа пікселів цифрового зображення імунопозитивної реакції (чорних) до загального числа пікселів в зображенні, визначеному в %.

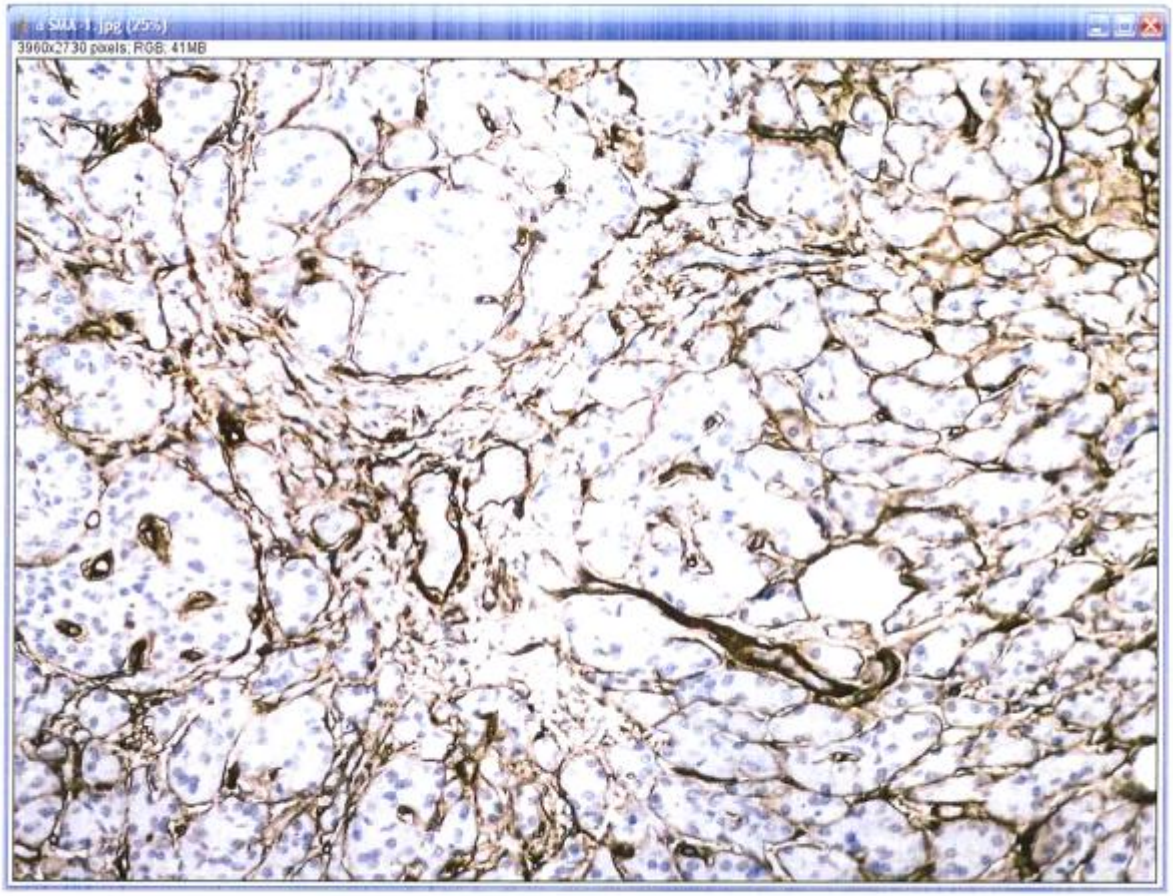
Пропонована корисна модель ілюструється фотографіями, де на фіг. 1 зображено початковий знімок імуногістохімічного препарату, на фіг. 2 - результат застосування схеми аналізу "гематоксилін+DAB" (відфільтрована DAB-частина), на фіг. 3 - результат автоматичної сегментації цифрового зображення, на фіг. 4 - кінцевий результат обчислення гістограми.

Приклад. Хворому Н. 1958 р.н., 27.01.2014 була виконана інтраопераційна біопсія підшлункової залози, за результатами якої встановлено діагноз "хронічний панкреатит з фіброзом підшлункової залози". Для кількісної оцінки інтенсивності експресії α-ізоформи гладком'язового актину (α-SMA) панкреатичними зірчастими клітинами імуногістохімічно забарвлені зрізи підшлункової залози фотографували цифровою фотокамерою "Olympus" (Японія) в мікроскопі Axioplan 2 ("Carl Zeiss", Німеччина) при збільшенні х400 і аналізували з використанням медичної програми обробки цифрових зображень Image J (фіг. 1). У плагіні Colour Deconvolution цієї програми використовували вбудовану схему аналізу забарвлення "гематоксилін+DAB" (фіг. 2) з подальшим встановленням "порогу чутливості" і сегментацією зображення (фіг. 3). Визначали середній рівень DAB забарвлення в балах за Katayama A. et al. (2004) та відносну площу, яку займають α-SMA-позитивні зірчасті клітини.

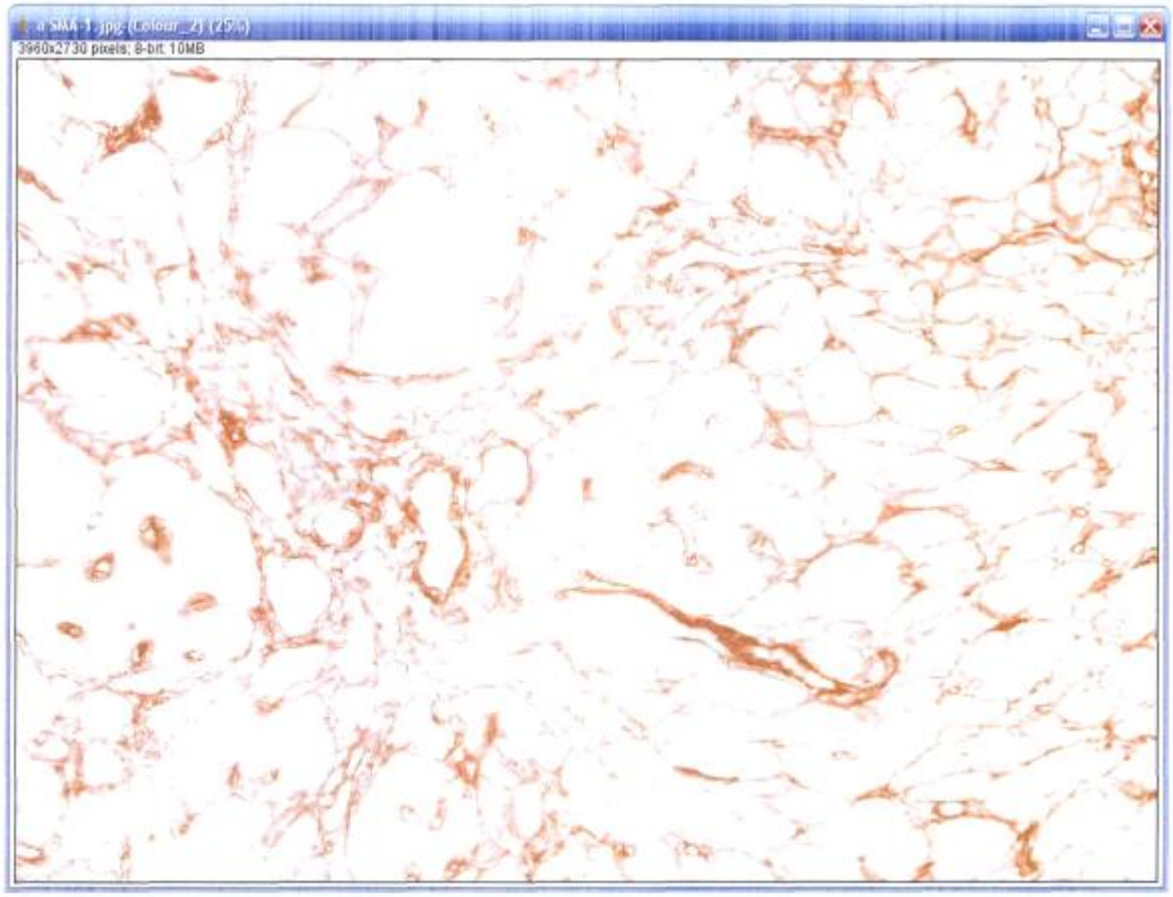
У запропонованому зображенні чорних, відповідних імунопозитивним ділянкам, пікселів було 2 297 135, білих було 8 513 665. Всього зображення було складено з 10 810 800 пікселів (фіг. 4). Розрахунок відносної площі імунопозитивних ділянок проводили обчисленням частки від ділення числа "чорних" пікселів на загальне число пікселів в зображенні - 2 297 135/10 810 800*100 % = 21,25 %. В даному випадку відносна площа, яку займали α-SMA-позитивні зірчасті клітини, склала 21,25 %, а 78,75 % припадає на тканину підшлункової залози. Рівень експресії α-SMA склав 54,18 балів (умовних одиниць оптичної щільності), що відповідає помірному рівню експресії за Katayama A. et al. (2004), який визначається при F2 - помірному ступені фіброзу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

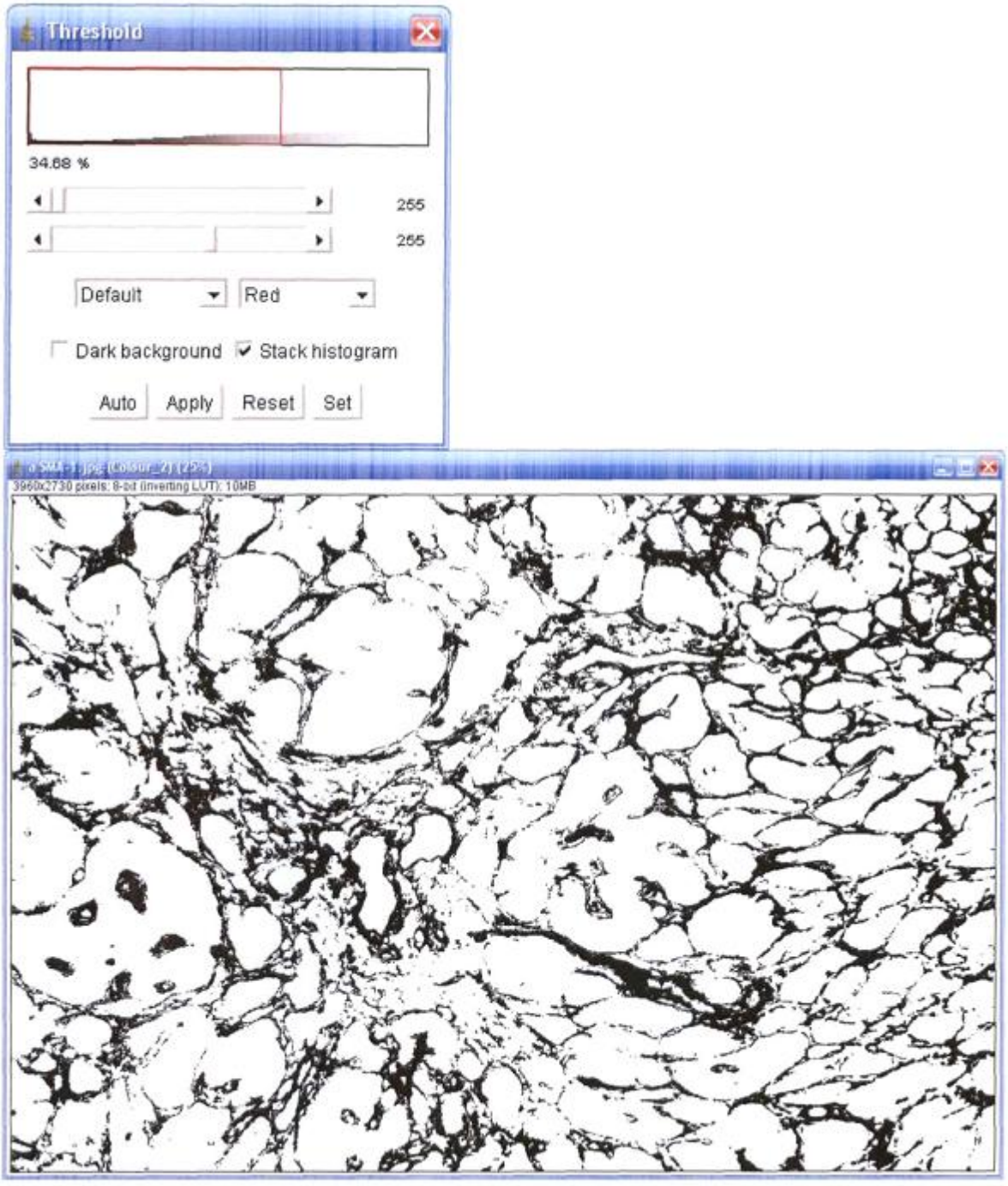
Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів, який включає підрахунок і аналіз кількості точок-пікселів цифрового зображення, визначення середньої величини і довірчого інтервалу оптичної щільності цих точок, сегментацію зображення на чорні та білі пікселі і визначення відсоткової частки, що отримується в результаті ділення числа пікселів, які містяться на вибраному фрагменті зображення, на загальне число пікселів в цьому зображенні, який **відрізняється** тим, що імуногістохімічно забарвлені з використанням високоафінних первинних антитіл та стандартизованої системи візуалізації препарати аналізують у медичній програмі обробки цифрових зображень Image J з використанням вбудованого плагіну Colour Deconvolution цієї програми і за допомогою схеми аналізу забарвлення "гематоксилін+DAB" в автоматичному режимі визначають середній рівень імуногістохімічного забарвлення з наступним визначенням відносної площі експресії маркерів як відсоткового співвідношення числа пікселів цифрового зображення імунопозитивної реакції до загального числа пікселів в зображенні.



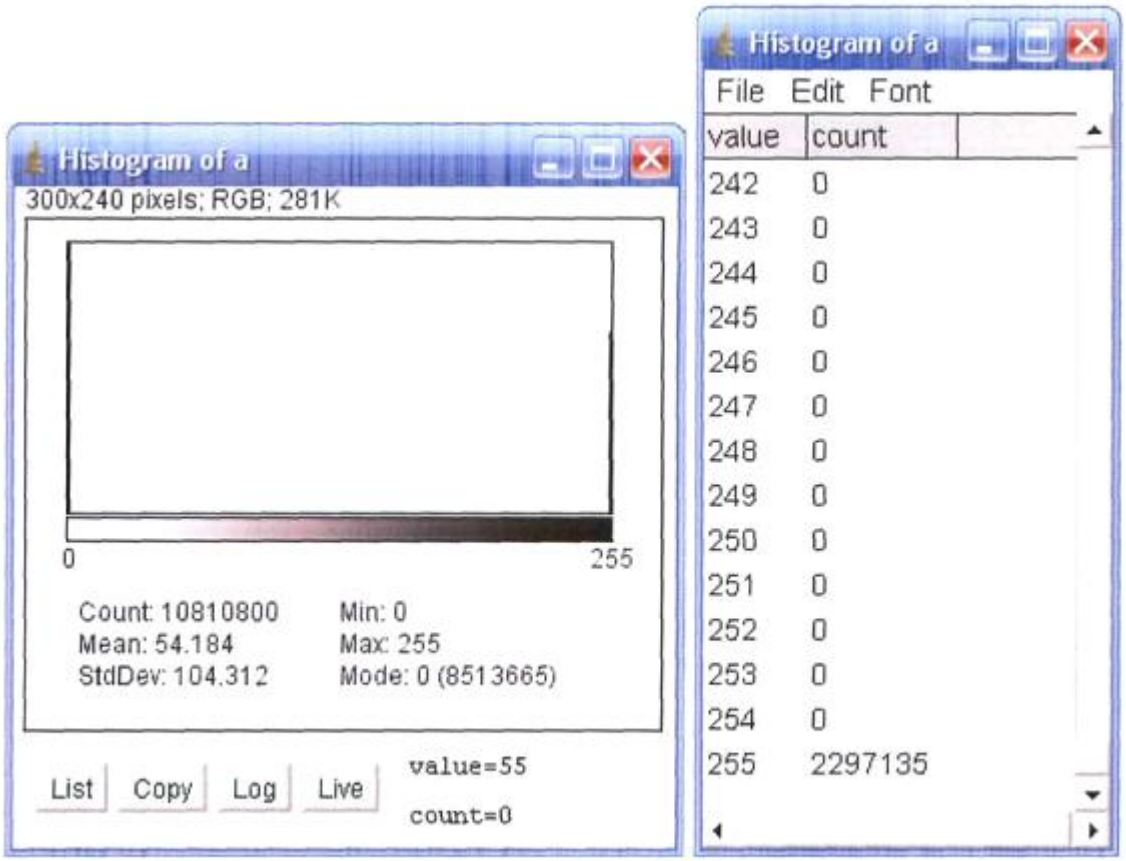
Фіг. 1



Фіг. 2


Threshold
34.68 %
255
255
Default
Red
Dark background
Stack histogram
Auto
Apply
Reset
Set
3960x2730 pixels; 8-bit (inverting LUT); 10MB

Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601