

<https://doi.org/10.17116/patol201779549-56>

## Автоматизированный морфометрический анализ как метод определения содержания компонентов внеклеточного матрикса и количественной оценки ядерных антигенов

И.С. ГУМЕНЮК, Л.М. ЧУПРИНЕНКО, А.С. СОТНИЧЕНКО, Т.В. ГАЙВОРОНСКАЯ, С.Е. ГУМЕНЮК, Е.А. ГУБАРЕВА, Е.В. КУЕВДА, В.А. КРУТОВА, С.Н. АЛЕКСЕЕНКО

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия

Автоматизированные методы анализа изображения являются весьма актуальными в биотехнологических исследованиях. Авторы разработали и протестировали программу для морфометрического анализа микрофотографий срезов, обработанных по стандартным протоколам иммуногистохимического исследования. Метод цветовой деконволюции, использованный в алгоритме, оказался эффективным для выделения карты распределения DAB-хромогена в образце, содержащем несколько красителей. В эксперименте продемонстрирована возможность сравнительного количественного анализа содержания белков внеклеточного матрикса в различных группах образцов. Также была протестирована эффективная методика количественного анализа индекса метки Ki-67 с использованием тех же алгоритмов. Разработанная программа опубликована под свободной лицензией GPL 3,0.

*Ключевые слова:* морфометрический анализ, анализ изображения, цветовая деконволюция, иммуногистохимическое исследование, белки внеклеточного матрикса, Ki-67.

## Automatic morphometric analysis as a method for determining the level of extracellular matrix components and for quantifying nuclear antigens

I.S. GUMENYUK, L.M. CHUPRINENKO, A.S. SOTNICHENKO, T.V. GAIVORONSKAYA, S.E. GUMENYUK, E.A. GUBAREVA, E.V. KUEVDA, V.A. KRUTOVA, S.N. ALEKSEENKO

Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnodar, Russia

Automated image analysis methods are highly important for biotechnology research. The authors developed and tested a program for the morphometric analysis of photomicrographs of the sections processed using the standard immunohistochemical examination protocols. The color deconvolution method used in the algorithm was proven to be effective in mapping the distribution of DAB chromogen in the sample containing multiple dyes. The experiment demonstrated that the level of extracellular matrix proteins could be comparatively quantified in different groups of samples. The effective methods for the quantitative analysis of the Ki-67 labelling index were also tested using the same algorithms. The developed program was published under free GPL 3.0.

*Keywords:* morphometric analysis, image analysis, color deconvolution, immunohistochemical examination, extracellular matrix proteins, Ki-67.

Одной из актуальных проблем в области морфологического анализа является поиск способов снижения субъективных факторов, приводящих дополнительную погрешность в результаты исследований. Все чаще специалисты применяют различные методы компьютерного анализа для облегчения рутинных процедур и увеличения точности результатов.

Основной задачей, решаемой коллективом авторов, была разработка метода количественной оценки содержания белков внеклеточного матрикса (ВКМ) в нативных образцах и биологических каркасах после проведения децеллюляризации. Ее главная цель — изоляция компонентов ВКМ ткани без каких-либо потерь, повреждения или разрушений, полное удаление клеточного материала [1].

В настоящее время это представляется маловероятным, так как любой процесс, который разрушает клетки, обязательно изменяет ВКМ. В связи с этим возникает необходимость изучения не только качественного белкового состава получаемых матриксов, но и количественного анализа содержания его компонентов [2].

Стандартным аналитическим методом, направленным на изучение количественного белкового состава матриксов, является вестерн-блот. Однако высокая стоимость диагностикумов для проведения исследований делает данный метод недоступным для использования в

*Сотниченко Александр Сергеевич* — e-mail: alex24.88@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-7322-0459>

Гуменюк И.С. <http://orcid.org/0000-0002-7585-9923>

Губарева Е.А. <http://orcid.org/0000-0003-4307-4774>

Кувда Е.В. <http://orcid.org/0000-0002-7585-9923>

© Коллектив авторов, 2017

большинстве лабораторий. В связи с этим нами предпринята попытка поиска более доступной и экономически менее затратной методики изучения состава ВКМ, основанной на компьютерной обработке изображений, получаемых в ходе иммуногистохимического (ИГХ) анализа.

Вместе с тем после дополнительной адаптации разрабатываемая методика также показала пригодность для ИГХ-анализа одного из маркеров делящихся клеток белка Ki-67, для которого международными диагностическими протоколами предусмотрена количественная оценка [3]. Известно, что трудности, возникающие в процессе определения уровня экспрессии антигена, обусловлены как преаналитическим этапом и методикой проведения ИГХ-исследования, так и корректностью выбранного метода подсчета, связанного с его субъективностью и сложностью воспроизведения. В итоге возникает значительная вариабельность результатов исследования между разными лабораториями [4].

В настоящее время для изучения качественного белкового состава ВКМ большинство исследователей используют ИГХ-анализ гистологических срезов для визуализации отдельных белков [5, 6]. В качестве системы детекции наиболее часто используют DAB-хромоген (3,3'-диаминобензидин), имеющий коричневый оттенок в положительно окрашенной области среза. Эта методика одна из наиболее простых, распространенных и экономически рентабельных в лабораторной практике. Однако ИГХ-окрашивание препарата является лишь качественным методом детекции исследуемого белка. Прямой количественный анализ содержания белков ВКМ при этом затруднен. Во-первых, реакция антиген—антитело не является стехиометрической, что выражается в несоответствии интенсивности окраски количеству продуктов реакции. Во-вторых, данный тип окрашивания не подчиняется закону Бугера—Ламберта—Бера [7], так как продукт реакции DAB-хромогена и меченного пероксидазой вторичного антитела не только поглощает определенные участки спектра видимого излучения, но и рассеивает его. Все это приводит к отсутствию линейной зависимости между оптической плотностью окрашенного продукта реакции и реальной концентрацией комплексов антиген—антитело.

Автоматический анализ распределения DAB-хромогена по микрофотографии среза затрудняется тем, что в стандартном окрашивании наиболее часто используются два красителя и более. В результате некоторые области на окрашенном препарате содержат одновременно несколько пигментов разных оттенков в различных пропорциях. Это делает невозможным сегментацию изображения простыми фильтрами как, например, при использовании иммунофлюоресцентных методов. Для сегментации отдельного красителя применяется метод цветовой деконволюции, разработанный A. Ruifrok и D. Johnston [8]. В дальнейшем данный алгоритм был портирован на Java в виде плагина к программе ImageJ G. Landini [9, 10]. Суть алгоритма заключается в разделении красителей на основании их спектров поглощения. При правильном отборе репрезентативных срезов, полученных с единым режимом фиксации, методикой окрашивания и параметрами микрофотосъемки, становится возможным применение морфометрических методов анализа. Как следует из работы M. Delesse [11], доля площади среза, содержащая исследуемый белок, прямо пропорциональна его доле в общем объеме материала.

В статье предложен метод оценки площади ИГХ-окрашивания тканей в образцах с помощью разработанной программы на языке Python, а также показана потенциальная возможность применения данного алгоритма для оценки индекса метки Ki-67 в образцах тканей опухоли яичника.

## Материал и методы

Тестовыми образцами для первой части исследования послужили органы 4 самцов макак-резус (*Macaca mulatta*). Эксплантацию органов производили на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». Средний возраст животных составил  $8,3 \pm 3,2$  года, масса тела —  $15,2 \pm 3,1$  кг. Все исследования выполняли после одобрения протоколов исследования локальным этическим комитетом. Для получения ацеллюлярных матриц сердца низших приматов применили модифицированный детергент-энзиматический метод децеллюляризации с использованием раствора дезоксихолата натрия и ДНКазы общей продолжительностью 120 ч.

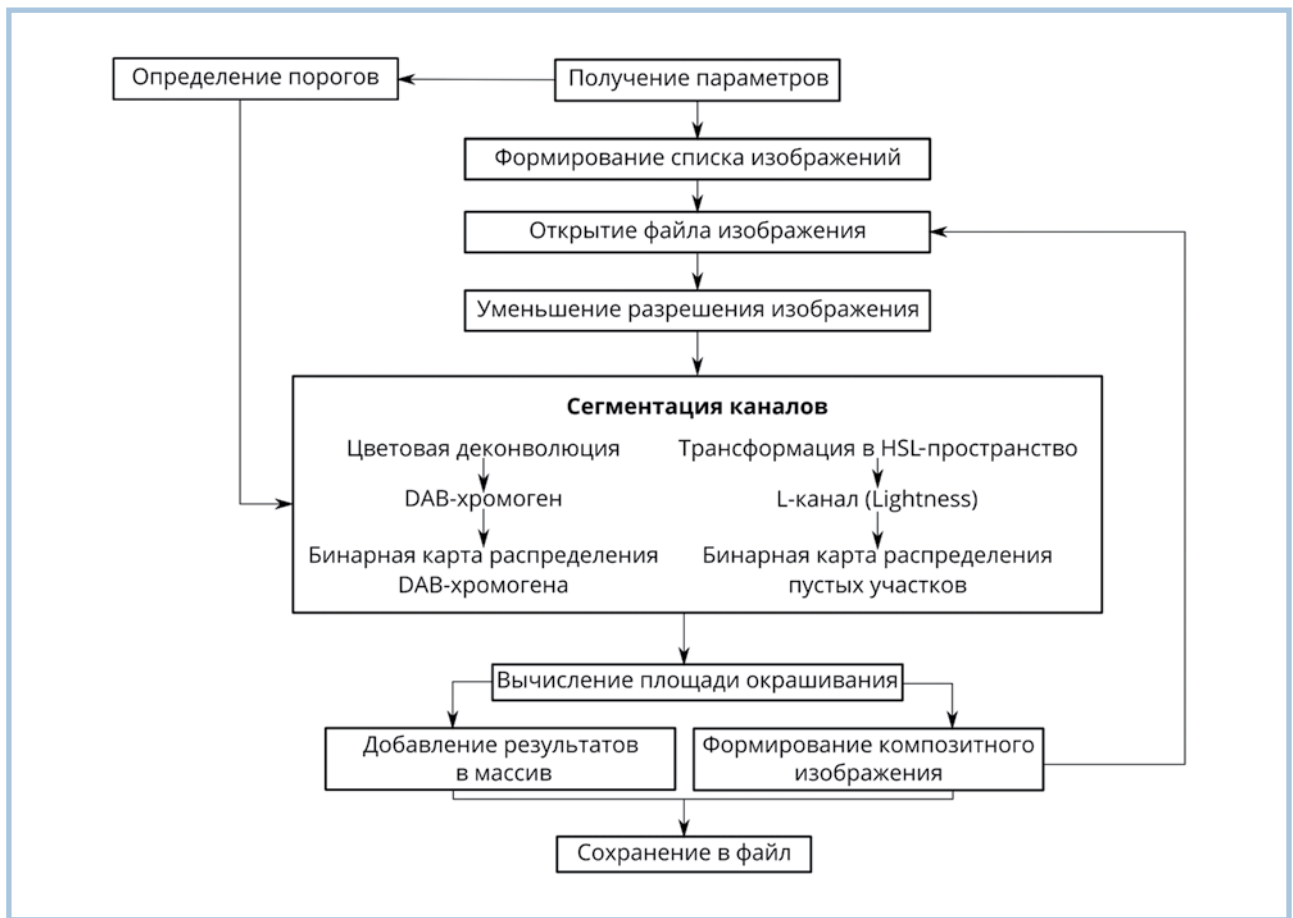
Во второй части исследования в качестве источника образцов выбран случай высокодифференцированного эндометриоидного рака яичника у пациентки 33 лет, находившейся на стационарном лечении в базовой акушерско-гинекологической клинике Кубанского государственного медицинского университета.

Фиксацию нативных и децеллюляризованных образцов сердца, кусочков опухоли яичника выполняли в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч с последующей дегидратацией и заключением в парафин с использованием автоматического гистопроцессора Leica TP1020 (Германия) и модульной установки Leica EG1150N (Германия).

Для проведения ИГХ-анализа срезы депарафинизировали и гидратировали, блокировали эндогенную пероксидазную активность 3% раствором пероксида водорода в течение 10 мин, демаскировали антигены в цитратном буферном растворе (ab 64236, «Abcam», США) на водяной бане в течение 40 мин. В качестве первичных антител для первой части исследования использовали поликлональные антитела к коллагену I типа (ab34710, «Abcam», США), для второй части — готовые к применению моноклональные антитела к ядерному антигену клеток Ki-67, клон SP-6 («Spring BioScience», США). Нами была выбрана система детекции с использованием набора Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab 64261, «Abcam», США) Докрашивание клеточных ядер выполняли гематоксилином Майера в течение 10 с. Препараты заключали в монтирующую среду Consul-Mount («Thermo Scientific», Англия). Всего получено по 7 тестовых изображений для препаратов нативных и децеллюляризованных сердец, 58 изображений опухоли яичника.

Для получения тестовых изображений во всех случаях применен микроскоп Olympus CX41 (Япония) с камерой Olympus XC30. Микрофотографии срезов сохранены в виде 16-битных изображений в TIFF-формате в разрешении  $2080 \times 1544$ . При выборе полей зрения для обеих групп руководствовались следующими критериями: отсутствие краевых дефектов и артефактов в поле зрения, а также областей с избыточной либо недостаточной экспозицией.

На следующем этапе изображения обработаны в RawTherapee для нормализации экспозиции и баланса белого. Результат сохранен в виде 8-битных TIFF-файлов.



**Рис. 1. Архитектура приложения DAB Proteomics analyzer.**

Основные этапы анализа серии изображений на примере сегментации канала DAB-хромогена.

Векторы красителей получены в программе ImageJ с помощью плагина «color deconvolution» с использованием метода «From ROI». Полученные векторы интегрированы в разработанную нами программу для морфометрического анализа ИГХ-препаратов DAB Proteomics analyzer (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016660185 от 08.09.16).

В первой группе образцов, состоящих из нативных и децеллюляризованных сердец низшего примата, после сегментации DAB-хромогена провели измерение площади надпорогового окрашивания. Корректность заданного порога оценивали по сформированным программой композитным референсным изображениям. Результат был сохранен в виде табличных значений и изображений с графическим представлением данных исследования.

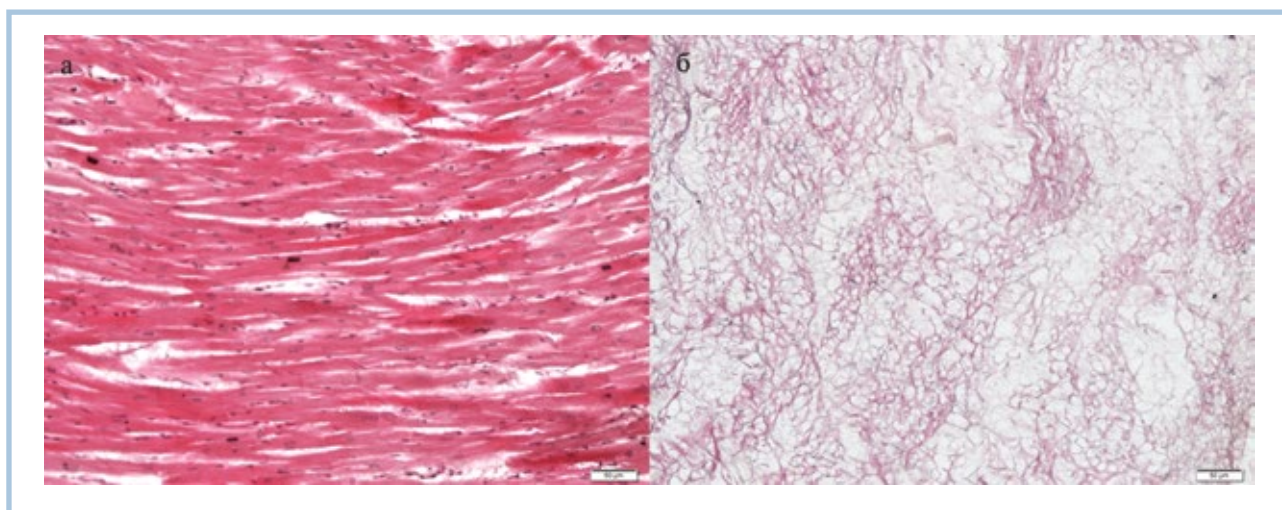
Для второй группы образцов разработанная программа сохраняла в отдельном каталоге сегментированные каналы DAB-хромогена и гематоксилина в виде изображений в градациях серого. Полученные каналы красителей передавали для обработки в CellProfiler, в котором по написанному нами алгоритму проводилась сегментация ядер с позитивным и негативным ИГХ-окрашиванием. Основными параметрами для выделения объектов были: диаметр от 6 до 30 пикселей, адаптивная стратегия определения порога сегментации с размером окна 15 пикселей, метод вычисления порога Otsu с разделением на 3 класса. Разделение границ близкорасположенных ядер

выполнялось на основании формы объектов. Для канала DAB-хромогена применялся коэффициент коррекции порога 1,2, для канала гематоксилина наиболее оптимальные результаты показал коэффициент 0,9. Результаты количественного анализа во второй группе сохранены в виде табличных данных для последующего анализа.

Алгоритм был реализован на языке Python. Архитектура приложения представлена на **рис. 1**. Полученные данные по серии образцов подвергались статистической обработке в GraphPadPrism 6.0.

## Результаты и обсуждение

Для проведения децеллюляризации сердца был выбран детергент-энзиматический метод, позволяющий наиболее полным образом удалять клетки из тканей, но в то же время щадящий по отношению к белкам волокон внеклеточного матрикса сердца. В результате децеллюляризации сердце низшего примата изменило свой цвет с бордового на молочно-белый. Иных макроскопических изменений не отмечено. Окрашивание гематоксилином и эозином нативного сердца выявило продольно расположенные кардиомиоциты с периферически расположенными клеточными ядрами, межмышечную рыхлую волокнистую соединительную ткань, многочисленные сосуды и капилляры. В ацеллюлярной ткани интактные мышечные клетки и клеточные ядра не выявляли, однако



**Рис. 2.** Нативное (а) и децеллюляризованное (б) сердце низшего примата.

Окраска гематоксилином и эозином. об.  $\times 20$ , ок.  $\times 10$ .

визуализировали тончайшие, рыхло расположенные эозинофильные волокна внеклеточного матрикса сердца, которые в нативном органе окружают кардиомиоциты со всех сторон, формируя строму органа. Набухания либо иных патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани не обнаружено (рис. 2, а, б). В нативном сердце определен белок внеклеточного матрикса — коллаген I типа, который преимущественно определяют вдоль кардиомиоцитов в составе эндомизия и перимизия (рис. 3). В децеллюляризованной ткани сердца качественная ИГХ-реакция также выявила наличие позитивной реакции с антителами к коллагену I типа (рис. 4).

Результаты измерения площади положительного окрашивания для указанных белков ВКМ в нативных и децеллюляризованных образцах статистически обработаны. Средняя площадь окрашивания коллагеном I типа в нативном сердце составила 14,91 ( $\sigma=3,81$ ), в децеллюляризованном — 6,094 ( $\sigma=0,98$ ). Таким образом, количество коллагена I типа после децеллюляризации в матриксе составило 40,87% исходного содержания. Разработанная программа показала свою эффективность при решении реальной задачи сравнения количественного белкового состава тканеинженерных каркасов и нативных образцов. Благодаря жестко заданному порогу для сегментации положительно окрашенных областей для всей серии изображений были устранены операторзависимые погрешности оценки. Также положительным эффектом применения данной методики является ее невысокая стоимость и возможность получения результатов анализа в короткие сроки.

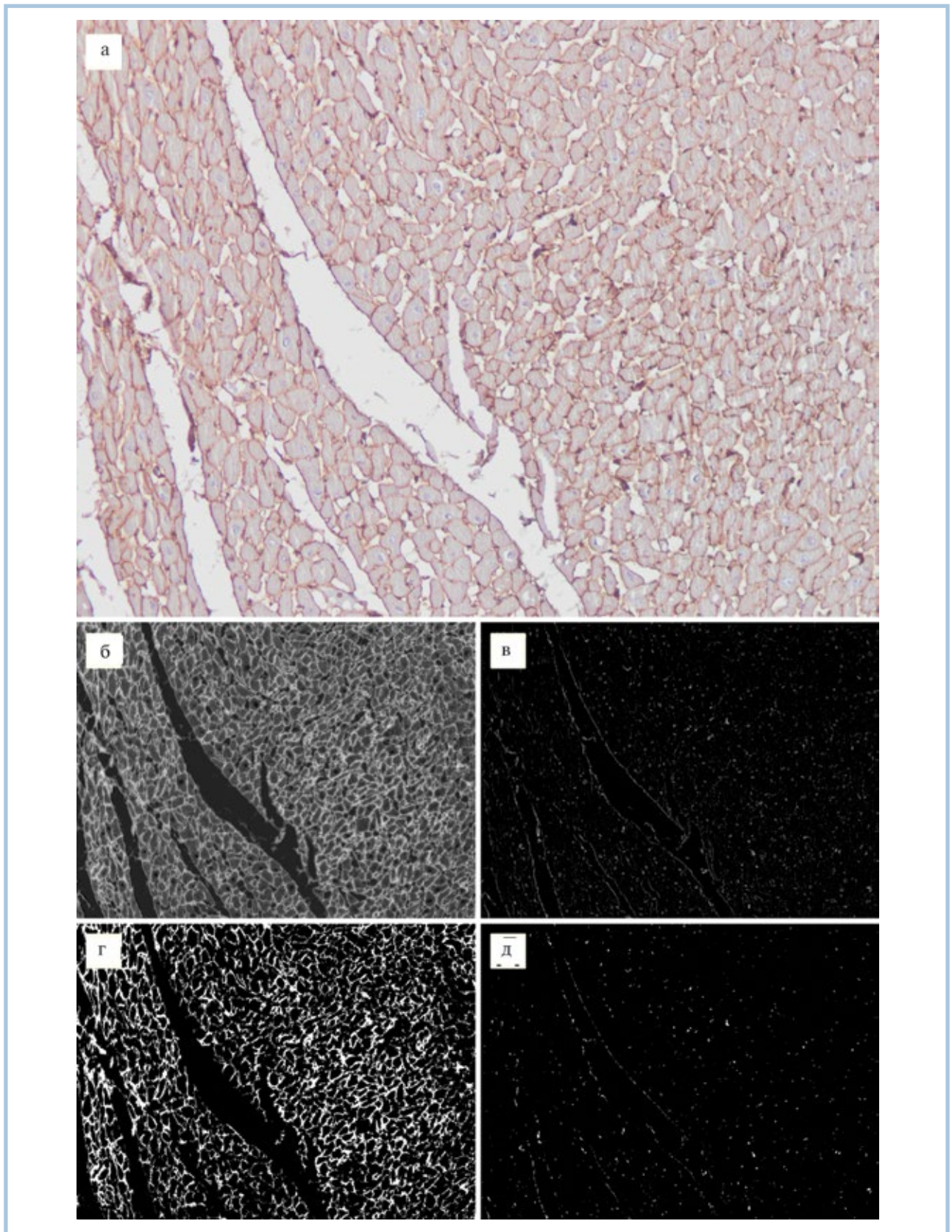
Во второй группе образцов провели количественный анализ клеток опухоли в трех серийных срезах. В исследованных образцах в автоматическом режиме проведен подсчет около 120 тыс. ядер клеток за 31 мин, что является практически невыполнимой и крайне трудозатратной задачей для персонала лаборатории при визуальной оценке препарата. Использовали стандартную формулу вычисления индекса метки Ki-67: количество DAB-окрашенных ядер/общее количество подсчитанных ядер  $\cdot 100$  (%). По-

лучили индекс метки Ki-67 для каждого поля зрения. При визуальном подсчете ядер в эпителиальном компоненте опухоли он составил 76%. Проведенный программный морфометрический анализ индекса метки Ki-67 в исследуемой опухоли составил в среднем 43,77% ( $\sigma=7,6$ ) с интервалом от 21 до 60,27% (рис. 5). Разброс данных обусловлен различным соотношением эпителиальных и стромальных компонентов опухоли в полях зрения. Авторы связывают это с тем, что программное обеспечение не способно морфологически отделить ядра клеток эпителия от ядер клеток стромы. Дополнительной проблемой автоматизированного анализа, вносящей незначительные искажения в итоговый результат, является затрудненное корректное распознавание контуров вакуолизированных ядер.

Существующие рекомендации, как правило, предлагают проводить подсчет окрашенных ядер не менее чем в 3–5 полях зрения при увеличении 400 [4]. Для оценки индекса метки Ki-67 разными исследователями определяется доля окрашенных ядер на 500–2000 клеток. Если подсчет DAB-окрашенных ядер с экспрессией искомого маркера при большом увеличении микроскопа не вызывает больших трудностей, то определение количества всех ядер клеток в изучаемом поле может представлять значительную сложность. Автоматизированный анализ подсчета окрашенных гематоксилином ядер снимает с исследователя задачу определения общего количества клеток в каждом изучаемом поле зрения.

При разработке алгоритма проведен анализ действий оператора для возможности их формализации и реализации в виде программы. Оценивая окрашивание конкретной области микропрепарата, исследователь полагается на субъективный критерий интенсивности красителя. При превышении субъективного порога область оценивается как положительно окрашенная, что служит потенциальным источником возникновения ошибок. Также результаты исследования могут меняться в зависимости от интерпретации конкретным исследователем, степени его утомления и других субъективных факторов. В то же время с помощью программы можно выполнять действия по

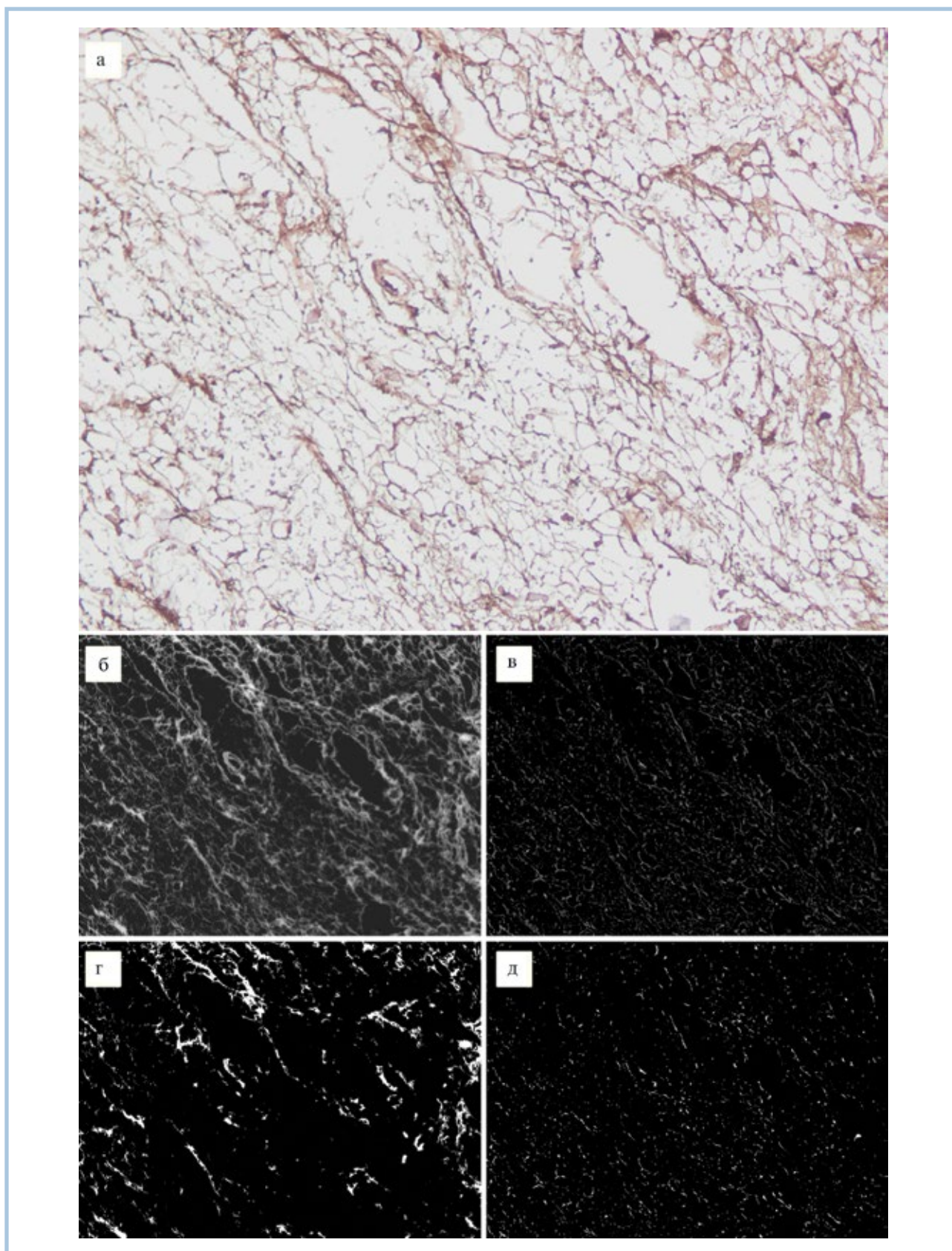




**Рис. 3.** Нативное сердце.

ИГХ-реакция с антителами к коллагену I типа (а). Позитивное окрашивание волокон ВКМ вокруг кардиомиоцитов в составе эндомизия и перимизия. Сегментированный канал DAB-хромогена (б) и гематоксилина Майера (в), карта распределения надпороговых участков окрашивания DAB-хромогеном (г) и гематоксилином Майера (д).

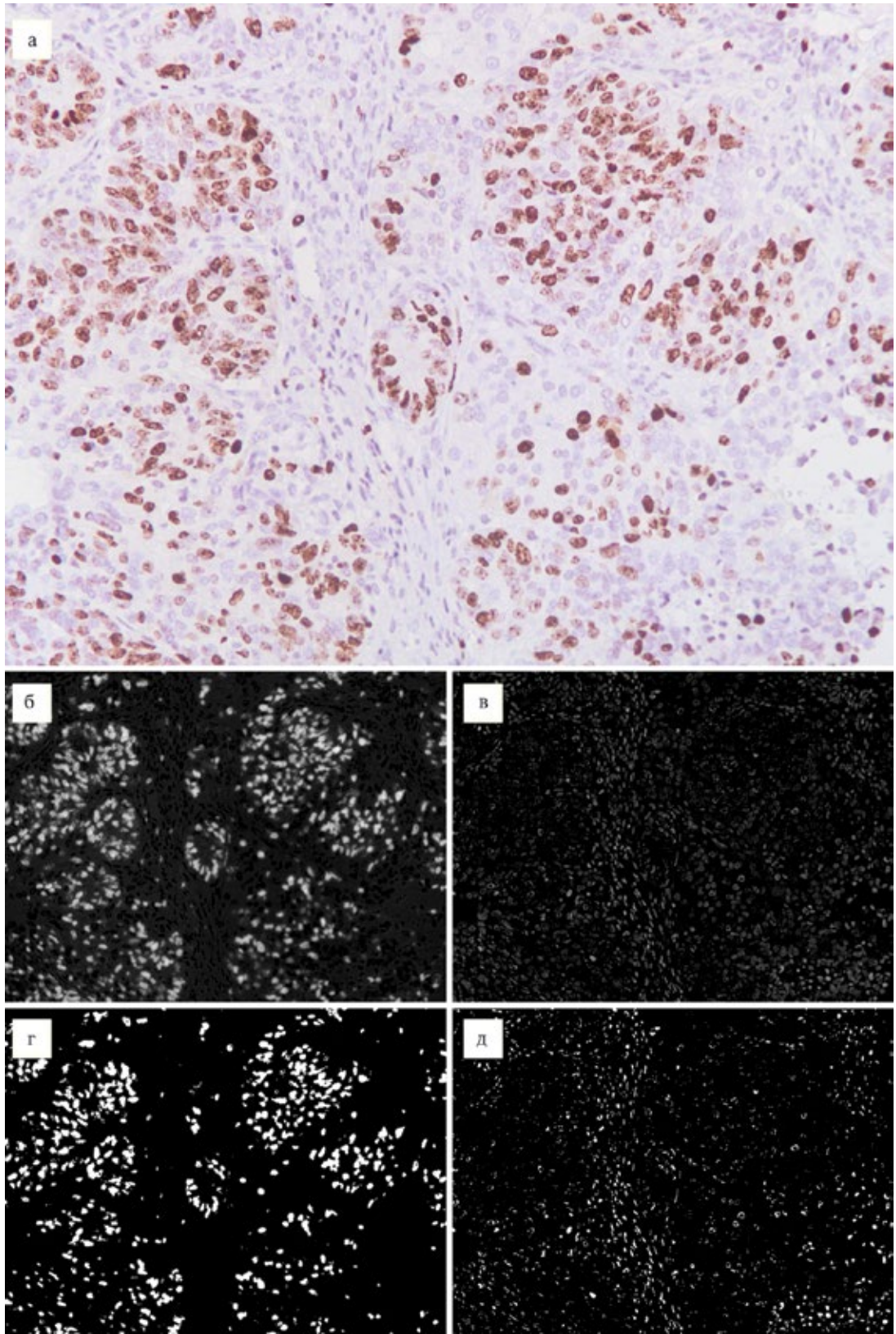




**Рис. 4.** Децеллюляризованное сердце.

ИГХ-реакция с антителами к коллагену I типа (а). Позитивное окрашивание части волокон ВКМ. Сегментированный канал DAB-хромогена (б) и гематоксилина Майера (в), карта распределения надпороговых участков окрашивания DAB-хромогеном (г) и гематоксилином Майера (д).





**Рис. 5.** Эндометриоидная аденокарцинома яичника (а).

Выраженная ядерная экспрессия Ki-67. об.  $\times 40$ , ок.  $\times 10$ . Сегментированный канал DAB-хромогена (б) и гематоксилина Майера (в), карта распределения надпороговых участков окрашивания DAB-хромогеном (г) и гематоксилином Майера (д).

оценке площади окрашивания с надпороговыми значениями интенсивности в полностью автоматическом режиме. Результат работы формализован, оператор выполняет только функцию контроля финального результата для проверки корректности заданных порогов.

Большим преимуществом автоматического морфометрического анализа является скорость обработки изображений. При традиционных визуальных методах количественного анализа используются планиметрические сетки и линейки, такие как планиметрические линейки Автандилова [12]. Процесс подсчета ячеек исследователем является очень трудоемким и значительно ограничен по количеству обработанных срезов вследствие утомления исследователя. Автоматизированный анализ, напротив, отличается высокой скоростью обработки и может использоваться для быстрой оценки десятков тысяч изображений.

## Заключение

Программное обеспечение продемонстрировало высокую эффективность при выполнении своей основной функции — морфометрического анализа компонентов ВКМ. Предложенная методика может применяться в экспериментальной практике при условии соблюдения правил отбора образцов для исследования.

Алгоритм применим в качестве вспомогательного инструмента при количественном подсчете индекса пролиферативной активности по уровню экспрессии Ki-67. Однако проведенная работа выявила определенные ограничения в применении данной методики. Авторы считают нецелесообразным использование такого программного обеспечения для оценки эпителиальных опухолей вслед-

ствие высокой погрешности результатов. Тем не менее, несмотря на указанные ограничения и определенные требования к подготовке исходных изображений, проведение данного анализа является простым и удобным для персонала лаборатории. Ввиду экспериментального характера методики ее применение в клинической практике ограничено и требует верификации при помощи традиционных методов исследования.

Исходный код программы и серия тестовых изображений размещены под свободной лицензией GPL 3,0 в открытом доступе и могут быть использованы исследователями [13].

Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (от 28.01.15 ч. 1, раздел 1) «Разработка экспериментальных образцов тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованных матриц для применения в регенеративной медицине» и комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интраоральных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».

Концепция и дизайн исследования: И.С.Г., Т.В.Г., Е.А.Г., В.А.К., С.Н.А.

Разработка алгоритма и его реализация на Python: И.С.Г., С.Е.Г.

Сбор и обработка материала: А.С.С., Е.В.К., Л.М.Ч.

Статистическая обработка: И.С.Г.

Написание текста: И.С.Г., Л.М.Ч., А.С.С.

Редактирование: Т.В.Г., С.Е.Г., Е.А.Г., В.А.К., С.Н.А.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater.* 2009;5(1):1-13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>
2. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng.* 2006;12(3):519-526. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.519>
3. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer highlights of the St Gallen International Exprt Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* 2013;24(9):2206-2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>
4. Должников А.А., Петров С.В. Трудности в выявлении и оценке уровня пролиферации, эстрогеновых и прогестероновых рецепторов. В кн.: *Большая конференция RUSSCO: рак молочной железы*. М.: RUSSCO; 2014:62-67. [Dolzhnikov AA, Petrov SV. Trudnosti v vyvlenii i ocnke urovnja proliferacii, jestrogenovyh i progesteronovyh receptorov. In: *Bol'shaya konferentsiya RUSSCO: rak molochnoi zhelezy*. Moscow: RUSSCO; 2014:62-67. (In Russ.)].
5. Baignera S, Gonfiotti A, Jaus M, Comin CE, Paglierani M, Del Gaudio C, Macchiariini P. Development of bioengineered human larynx. *Biomaterials.* 2011;32(19):4433-4442. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.055>
6. Sánchez PL, Fernández-Santos ME, Costanza S, Climent AM, Moscoso I, Gonzalez-Nicolas MA, et al. Acellular human heart matrix: a critical step toward whole heart grafts. *Biomaterials.* 2015;61:279-289. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.056>
7. Loos CM. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(4):313-328. <https://doi.org/10.1369/jhc.2007.950170>
8. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001;23(4):291-299.
9. Landini G, Perryer G. Digital enhancement of haematoxylin- and eosin-stained histological images for red-green colour-blind observers. *J Microsc.* 2009;234(3):293-301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03174.x>
10. Landini G, Othman IE. Estimation of tissue layer level by sequential morphological reconstruction. *J Microsc.* 2003;209(2):118-125. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2003.01113.x>
11. Delesse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C R Acad Sci. (Paris)*. 1847;25:544-545.
12. Автандилов Г.Г. *Медицинская морфометрия. Руководство*. М.: Медицина; 1990. [Avtandilov GG. *Meditsinskaya morfometriya. Rukovodstvo*. Moscow: Meditsina; 1990. (In Russ.)].
13. DAB analyzer. Ссылка активна на 2 июня 2016. Доступно по: [https://github.com/meklon/DAB\\_analyzer/](https://github.com/meklon/DAB_analyzer/)

Поступила 14.11.2016