

**О.В.Пославська**

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

**Ключові слова:** аналіз цифрових зображень, ImageJ, лінійні розміри, площа.

Надійшла: 24.08.2016

Прийнята: 10.09.2016

УДК: 620.187:539.26

## **ВИЗНАЧЕННЯ ЛІНІЙНИХ РОЗМІРІВ ТА ПЛОЩ ОКРЕМИХ МОРФОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ НА МІКРОФОТОГРАФІЯХ ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОГРАМИ IMAGEJ**

**Реферат.** В статті описані методики вимірювання лінійних розмірів та площ окремих клітин та їх ядер в зразках пухлинної тканини, що забарвлені рутинним методом (гематоксилін-еозин) і імуногістохімічним методом (з хромогеном ДАБ) в програмі для аналізу цифрових мікрофотографій "ImageJ". За мету ставиться ознайомлення студентів медичних факультетів, аспірантів та здобувачів-дослідників з сучасними комп'ютерними технологіями для підвищення їх професійного рівня.

**Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 377-381.

© О.В.Пославська, 2016

✉ alexandra.poslavskaya@gmail.com

**Poslavskaya O.V. Determination of linear dimensions and square surfaces areas of morphological objects on micrographs using ImageJ software.**

**ABSTRACT.** The article describes methods of measurement of linear dimensions and areas of individual cells and their nuclei in the samples of tumor tissue stained with routine method (hematoxylin-eosin) and immunohistochemical method (with chromogen DAB) by the "ImageJ" application for digital analysis of the photomicrographs. The purpose of the article is to familiarize the students of medical faculty, graduated students and researchers with the modern computer technology to enhance their professional skills.

**Key words:** digital image analysis, ImageJ, linear dimensions, area.

### **Citation:**

Poslavskaya OV. [Determination of linear dimensions and square surfaces areas of morphological objects on micrographs using ImageJ software].Morphologia. 2016;10(3):377-81. Ukrainian.

### **Вступ**

Патогістологічне дослідження примірників пухлин завжди починається з оцінки зрізів, забарвлених гематоксиліном-еозином. На цьому етапі тільки досвід лікаря-патогістолога визначає необхідність подальших додаткових методів забарвлення (імуногістохімічний, імунофлюоресцентний) для встановлення остаточного діагнозу. Критерії діагностики, представляють собою різномірні данні, що досвідчений лікар визначає «на око», а саме розміри, форми клітин, їх ядер, взаємне розташування у просторі, структури, які будує пухлина, тощо. Виходячи з цього з'явилися такі емпіричні класифікації пухлин, як велико-клітинні, кругло-клітинні, гігантсько-клітинні, мілкокругло-клітинні і т.і., що певною мірою носять суб'єктивний характер, але доводять, що розрахунок розмірів та площ клітин є важливою стратегією під час діагностичного пошуку.

На сучасному рівні розроблені програми для аналізу цифрових мікрофотографій, як напри-

клад ImageJ, що дозволяють об'єктивно оцінити розміри різних морфологічних об'єктів і провести статистичний аналіз отриманих даних [1-4].

**Мета** статті: познайомити студентів медичних факультетів, аспірантів та здобувачів - дослідників з методикою визначення лінійних розмірів та площ різних морфологічних об'єктів (клітин або ядер) за допомогою програми "ImageJ" на прикладі зразків пухлинної тканини, забарвлених рутинним методом (гематоксиліном і еозином) та імуногістохімічним методом.

### **Матеріали та методи**

Для проведення імуногістохімічного (ІГХ) дослідження використовувалися формалін-фіксовані парафін-залиті блоки. Ідентифікація реакції проводилась завдяки нанесенню хромогену 3-діамінобензидин тетрахлорид (ДАБ).

Зрізи забарвлених тканин під збільшенням  $\times 400$  світлового мікроскопу Leica DMLS були зафіксовані, як цифрові зображення JPG формату (світлочутливість ISO 100, експозиція 1/15 секунди, діафрагма 1,6мм) за допомогою цифрової

фотокамери Canon EOS 30D.

#### Описання методики

Для виконання вимірів об'єктів зображень в метричних одиницях (мм, мкм), необхідно зробити калібрування мікрофотографії. При цьому використовують спеціалізовану еталонну «калібровочну шкалу», що входить до комплексу світлового мікроскопу (Рис. 1) або сітку з відомим розміром комірки (Рис. 2). Треба додати, що процес калібрування буде коректним, якщо фотографії еталонної шкали та зображення об'єкту виконанні при однакових умовах (збільшення, мікроскоп, фотокамера).

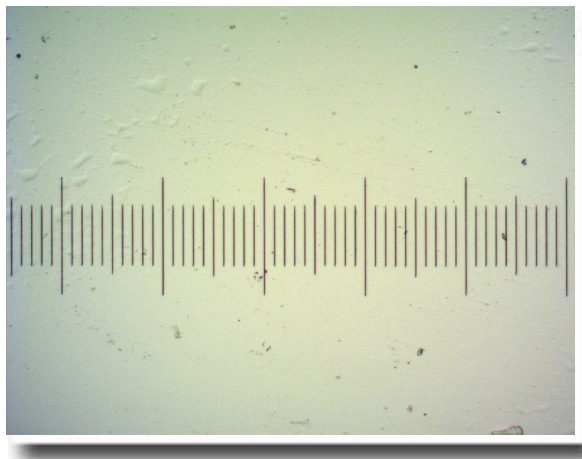


Рис. 1. Калібровочна шкала світлового мікроскопу.

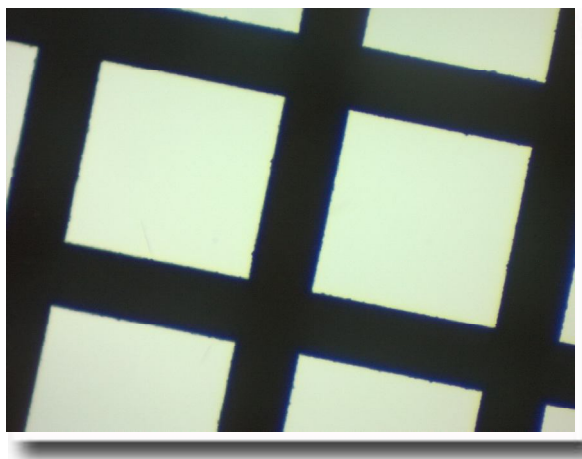


Рис. 2. Еталонна сітка з розміром комірки 90мкм x 90мкм.

Продемонструємо процес калібрування з використанням сітки із розмірами комірки 90мкм × 90мкм, під збільшенням ×400 світлового мікроскопу Leica DMLS, що була зафіксована цифровою фотокамерою Canon EOS 30D.

Відкриваємо фотографію еталонної шкали *File>Open*, на панелі інтерфейсу програми "ImageJ" вибираємо інструмент для вимірювання ліній і з'єднуємо границі еталонної комірки (90мкм). Наступним кроком виконуємо розраху-

нок масштабного коефіцієнту: *Analyze>Set Scale...* В діалоговому вікні *Set Scale*, що відкривається, буде вказана виміряна довжина в пікселях (*Distance in pixels*), необхідно вказати відоме значення еталонної відстані (*Known distance*) та одиниці виміру (*Unit of length*). Для того щоб застосувати розрахований масштабний коефіцієнт для всіх відкритих зображень необхідно активувати опцію *Global* і натиснути кнопку *Ok* (Рис. 3). Після закінчення процесу калібрування можна приступати до аналізу зображень.

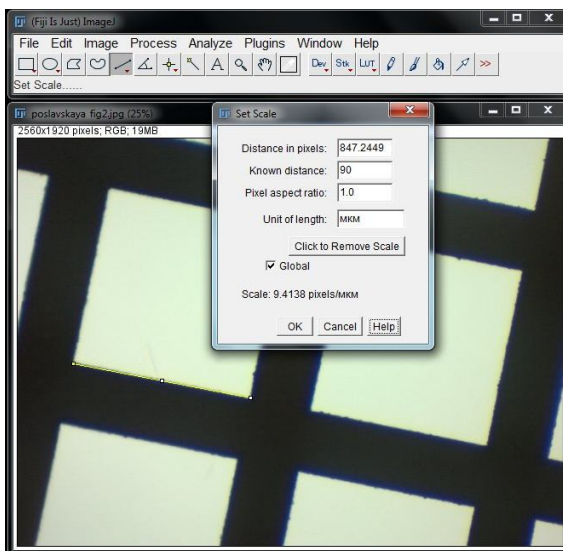


Рис. 3. Розрахунок масштабного коефіцієнту.

Відкриваємо фотографію об'єкту і встановлюємо масштабну шкалу *Analyze>Tools>Scale Bar...* з зазначенням параметрів її відображення: довжини в одиницях виміру (*Width in ...*), кольору (*Color*), розміщення (*Location*), тощо (Рис. 4).

Далі викликаємо вікно *ROI Manager* (панель управління областями інтересу): *Analyze>Tools>ROI Manager* для зберігання вимірів, що виконуються. Використовуючи інструменти для вимірювання довжини та площі, виділяємо інтересуючі області (після кожного обведення натискаємо літеру *t* і в вікні *ROI Manager* з'явиться відповідний запис). Після натискання кнопки *Measure*, у вікні *Results*, отримуємо значенні всіх визначених довжин та площ (Рис. 5).

Для контрастних рівномірних забарвлень (ПГХ та імунофлюоресцентний методи забарвлення) програма дозволяє проводити автоматичний розрахунок площин об'єктів. Для цього необхідно зробити сегментацію зображення з метою виділення границь об'єктів інтересу. Процедура сегментації багатокрокова і залежить від типу забарвлення досліджених зрізів.

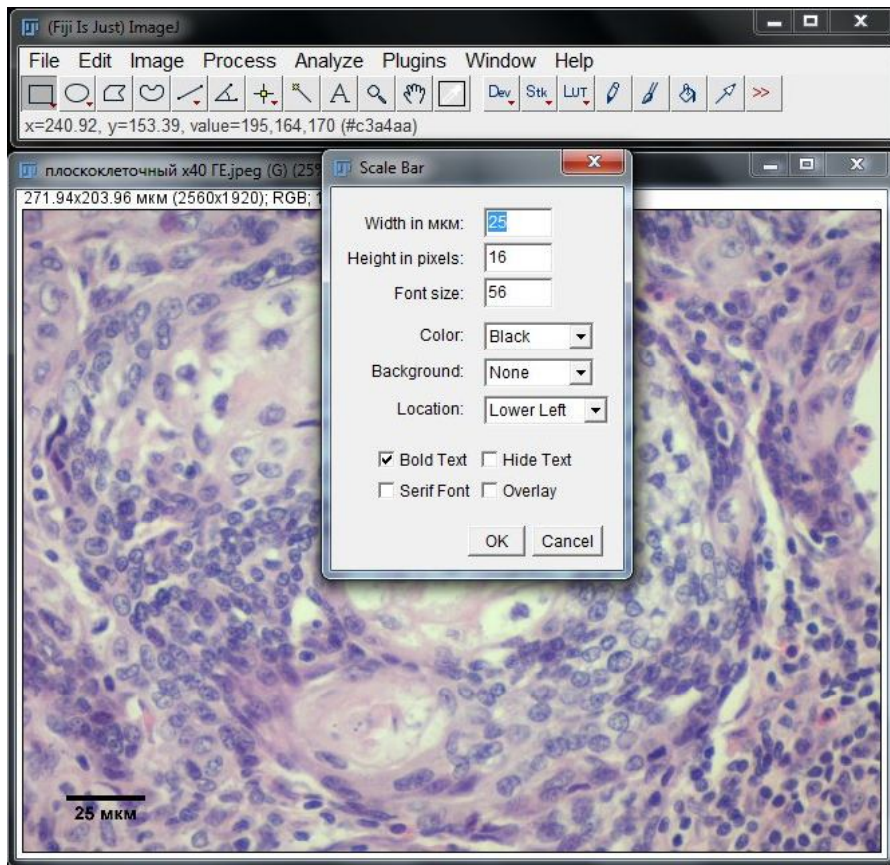


Рис. 4. Встановлення масштабної шкали.

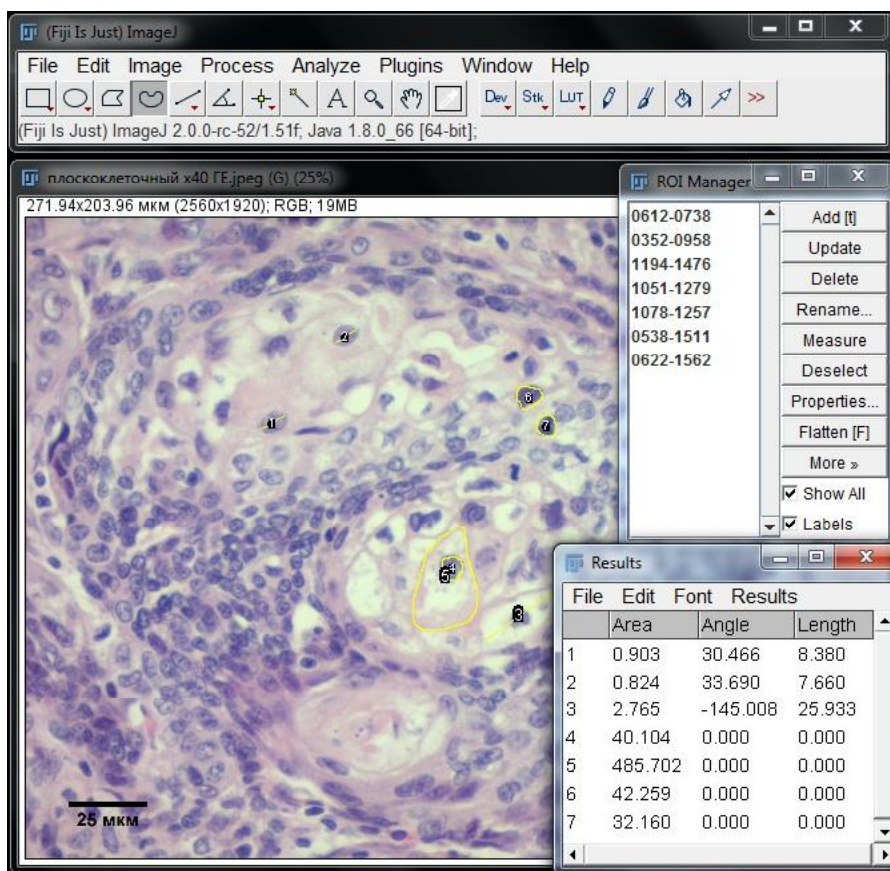


Рис. 5. Вимірювання довжин та площ.



Продемонструємо сегментацію зображення на прикладі ІГХ забарвлення зразку пухлини з використанням в якості хромогену ДАБ коричневого кольору (тип забарвлення гематоксилін + ДАБ). На першому етапі використовується процедура *Colour Deconvolution* для розділення забарвлення гематоксилін і ДАБ (*Image>Color>Colour Deconvolution >Vectors >H DAB*) (Рис. 6). **Colour 1** відповідає забарвленню гематоксиліном, **Colour 2** – відповідно реакції ДАБ. Для аналізу розмірів площин ядер з ІГХ забарвленням або без, необхідно використовувати відповідне зображення.

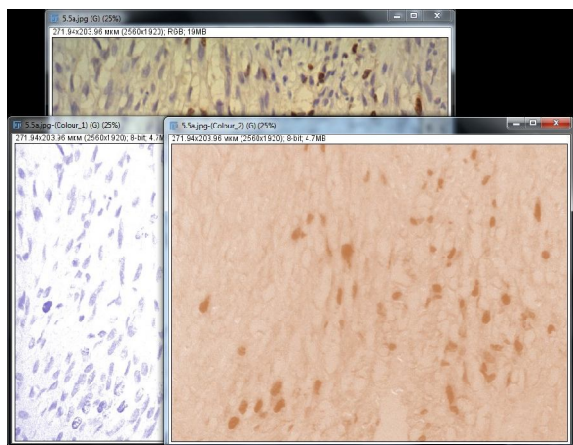


Рис. 6. Процедура *Colour Deconvolution* для сегментації зображення пухлини, ІГХ метод (тип забарвлення гематоксилін + ДАБ).

На наступному етапі, за допомогою регуляції порогових значень яскравості відокремлюються границі об'єктів (*Image>Adjust>Threshold*) (Рис. 7).

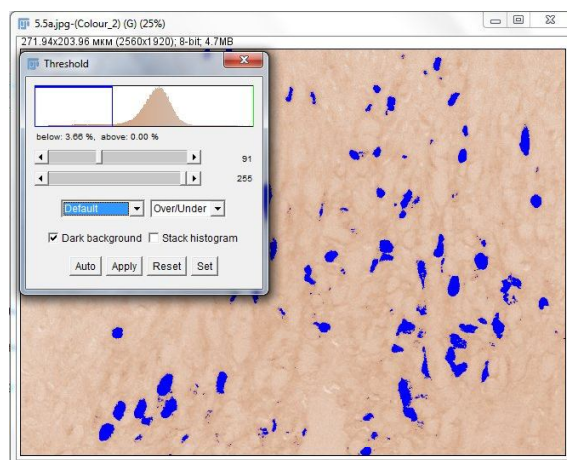


Рис. 7. Регуляція порогових значень яскравості (вікно *Threshold*).

Далі за допомогою процедури *Analyze Particles* проводиться остаточна сегментація і розрахунок величин (*Analyze>Analyze Particles*). Через параметр *Size* в діалоговому вікні задаються мінімальні та максимальні площі об'єктів, що досліджуються для зменшення впливу артефактів зображення.

В результаті у вікні *Summary* отримаємо сумарну кількість об'єктів (*Count*), середнє значення площі (*Average Size*) та загальну площу (*Total Area*). А в вікні *Results* – детальну інформацію по кожному об'єкту (Рис. 8).

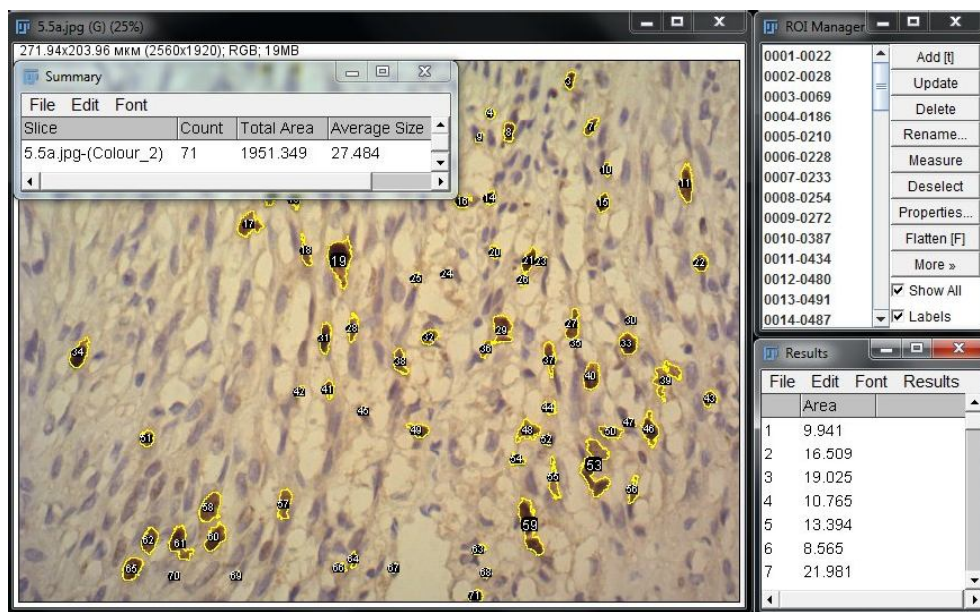


Рис. 8. Результати автоматичного методу розрахунків площ ядер.

### Висновки

Ручний метод вимірювання лінійних розмірів та площ клітин або їх ядер в програмі «ImageJ» дозволяє з мінімальними похибками відокремити об'єкти дослідження навіть при рутинному забарвленні, в скупчені клітин із нечіткими межами, в зразках пухлинної тканини з плеоморфними ядрами або в неоднорідних тканинах (метастази в лімфатичних вузлах, склеротичні зміни, наявність запального інфільтрату). Автоматичний метод розраховує тільки площі об'єктів і потребує попередньої сегментації, яка стає можливою при використанні більш контрастних барвників (ІГХ або імунофлюоресценція); він надає меншу точність розрахунків, порівняно

з ручним, але аналізує більшу кількість об'єктів при значно менших витратах часу, що вкрай необхідно в дослідженнях з великою кількістю випадків; він дозволяє також виділити окремо і порівняти загальні площі ядер клітин, які мають та не мають реакцій із специфічним антитілом (в випадку ІГХ забарвлення), що може мати діагностичне або прогностичне значення.

### Перспективи подальших досліджень

Це друга стаття, що продовжує цикл науково-методичних публікацій, присвячених методикам аналізу цифрових мікрофотографій морфологічних об'єктів програмою "ImageJ" для студентів, аспірантів та здобувачів вищих медичних закладів.

### Літературні джерела References

1. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques*. 2007; 43: S25-S30.
2. Jie Shu, Hao Fu, Guoping Qiu, Mohammad Ilyas. An Efficient Gland Detection Method Based on Texture and Morphological Transformation. *Medical Image Understanding and Analysis*. 2013; 173-8.
3. Mezei T, Szakács M, Dénes L, Jung J, Egyed-Zsigmond I. Semiautomated image analysis

of high contrast tissue areas using Hue/Saturation/Brightness based color filtering. *Acta Medica Marisiensis*. 2011; 57 (6): 679-84.

4. Schindelin J, Rueden C T, Hiner MC, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*. 2015 Jul-Aug;82(7-8):518-29. doi: 10.1002/mrd.22489.

**Пославская О.В. Определение линейных размеров и площади отдельных морфологических объектов на микрофотографиях с помощью программы IMAGEJ.**

**Реферат.** В статье описаны методики измерения линейных размеров и площадей отдельных клеток и их ядер в образцах опухолевой ткани, окрашенных рутинным методом (гематоксилин-эозин) и иммуногистохимическим методом (с хромогеном ДАБ) в программе для анализа цифровых микрофотографий "ImageJ". Цель статьи ознакомление студентов медицинских факультетов, аспирантов и соискателей-исследователей с современными компьютерными технологиями для повышения их профессионального уровня.

**Ключевые слова:** анализ цифровых изображений, ImageJ, линейные размеры, площадь.