

ВИКОРИСТАННЯ СУЧАСНИХ ІНСТРУМЕНТІВ ЦИФРОВОЇ ПАТОЛОГІЇ У ДІАГНОСТИЦІ ГЕПАТИТІВ

В. В. Ільченко

Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика

У роботі розглянуто питання використання сучасних доступних інструментів цифрової патології (перед усім програмного забезпечення з відкритим кодом), що можуть полегшити роботу лікаря-патологоанатома при морфологічній діагностиці гепатитів різного генезу та метаболічної жирової хвороби печінки (MAFLD). Головне завдання полягало в аналізі доступного програмного забезпечення, а також розробленні або доопрацюванні окремих його модулів для побудови системи управління зображеннями (СУЗ), перегляду цифрових сканів мікропрепаратів і спрощення оцінювання експресії імуногістохімічних (ІГХ) маркерів CD3, CD68, CD163, CD34 та α -SMA з кінцевою метою покращення вивчення ролі різних субпопуляцій печінкових макрофагів, синусоїдальних ендотеліальних клітин і фібробластів у прогресуванні захворювань печінки та розвитку фіброзу.

За результатами проведеної роботи встановлено можливість розроблення програмного забезпечення для дослідження кількості та співвідношення різних популяцій клітин макрофагів, синусоїдальних ендотеліальних клітин, фібробластів і лімфоцитів у тканині печінки з використанням програмного забезпечення з відкритим кодом. Розроблене та вдосконалене автором програмне забезпечення дозволило створити зручний масив даних із цифрових сканованих зображень мікропрепаратів тканин печінки, з пришвидшеним і зручним доступом до відповідних даних. Модель потребує подальшого вдосконалення для покращення її чутливості в сенсі розпізнавання клітин конкретного типу.

Ключові слова: гепатит, неалкогольний стеатогепатит, метаболічна жирова хвороба печінки, фіброз печінки, макрофаги, Т-лімфоцити, METAVIR, система управління зображеннями, комп'ютерна модель.

USE OF MODERN TOOLS OF DIGITAL PATHOLOGY IN THE DIAGNOSIS OF HEPATITIS

V. V. Ilchenko

Shupyk National Healthcare University of Ukraine

Background. In this work, the issues of using modern available tools of digital pathology (primarily open-source software) were considered, which can facilitate the work of the pathologist in the morphological diagnosis of hepatitis of various genesis and metabolic fatty liver disease. The purpose of the work was to adapt available software and develop separate modules for building an image management system and analyzing them to establish morphological criteria for the development of liver fibrosis according to the METAVIR index based on the study of the role of different subpopulations of liver macrophages, sinusoidal endothelial cells and fibroblasts.

Materials and methods. Results. The main task was to analyze the available software, as well as to develop or refine its individual modules for building an image management system, viewing digital scans of micropreparations and simplifying the evaluation of the expression of immunohistochemical markers CD3, CD68, CD163, CD34 and α -SMA with the ultimate goal of simplifying the study of the role of different subpopulations of liver macrophages, sinusoidal endothelial cells and fibroblasts in progressive liver diseases and the development of fibrosis.

Conclusions. Based on the results of the work, it was established the possibility of developing software to study the number and ratio of different populations of macrophage cells, sinusoidal endothelial cells, fibroblasts and lymphocytes in liver tissue using open-source software. The software developed and improved by us made it possible to create a convenient array of data from digital scans of micropreparations of liver tissues, with accelerated and convenient access to relevant data. The computer model created by us for recognizing and counting populations of liver cells with a positive and negative IGH reaction with monoclonal antibodies to CD3, CD34, CD68, CD163, α -SMA shows a certain difference with the reference assessment by a pathologist, but a statistically significant difference no differences were found between the results of the created model and the reference results. In the future, it is necessary to improve the developed model to increase its sensitivity in the sense of recognizing cells of a specific type.

Keywords: hepatitis, non-alcoholic steatohepatitis, metabolic fatty liver disease, liver fibrosis, macrophages, T-lymphocytes, METAVIR, image management system, computer model.

Вступ. Хронічні гепатити, зокрема неалкогольний стеатогепатит (НАСГ), що є запальним підтипом метаболічної жирової хвороби печінки (МЖХП), яка раніше мала назву неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) за даними досліджень останніх років стають основною глобальною причиною захворювань печінки, прогресуванням до розвитку цирозу та швидко стають лідируючою причиною проведення трансплантації [1, 2, 3].

Порушення функціонування різних популяцій клітин печінки включаючи макрофаги печінки (їх субпопуляції M1 – або класично активовані) і M2 (або альтернативно активовані), синусоїдальні ендотеліальні клітини, фібробласти і лімфоцити лежить в основі патогенезу хронічних гепатитів (зокрема НАСГ) і прогресуванні перебігу захворювань. Для дослідження кількості та співвідношення вищезгаданих клітин у тканині печінки, прогнозуванні розвитку фіброзу

застосовуються такі ІГХ маркери: CD68, CD163, CD34 та α -SMA.

Використання програмного забезпечення для зберігання, каталогізації сканованих зображень біоптатів, резекційних та аутопсійних мікропрепаратів, отриманих із тканин печінки, значно спрощує роботу з гістологічним матеріалом, проведенням морфометрії, оцінювання ступеню фіброзу, експресії відповідних ІГХ маркерів, статистичного та іншого оброблення даних, дає можливість проведення консультацій конкретних клінічних випадків (кейсів) із колегами-патологоанатомами, які знаходяться в інших містах і навіть країнах.

У той же час, при використанні пропрієтарного програмного забезпечення в рамках нашої роботи відмічено певні особливості, пов'язані з вартістю ліцензії, що може перевищувати вартість оптичного й іншого обладнання, з обмеженням функціоналу (наприклад, кількість одночасних під'єднань до

сервера СУЗ), неможливість модифікувати код програмного забезпечення та додавати потрібний для конкретного дослідження функціонал, нові специфічні налаштування тощо. Тому враховуючи власний досвід програмування автором поставлено завдання розробити програмне забезпечення на базі доступних рішень із відкритим кодом на мовах програмування Java та Python.

Мета дослідження: адаптування доступного програмного забезпечення та розроблення окремих модулів для побудови системи управління зображеннями та їх аналізу для встановлення морфологічних критеріїв розвитку фіброзу печінки за індексом METAVIR на підставі вивчення ролі різних субпопуляцій печінкових макрофагів, синусоїдальних ендотеліальних клітин і фібробластів.

Концепція роботи. Для дослідження кількості і співвідношення різних популяцій клітин макрофагів, синусоїдальних ендотеліальних клітин, фібробластів і лімфоцитів у тканині печінки, ролі даних клітин у вивченні прогресування захворювань та розвитку фіброзу можливо і доцільно розробити, вдосконалити під потреби конкретного дослідження програмне забезпечення, використовуючи базові програмні продукти з відкритим програмним кодом. Обґрунтування вибору даного підходу полягає в тому, що створення масиву даних із цифрових сканованих зображень мікропрепаратів тканин печінки з використанням розробленого та вдосконаленого нами програмного забезпечення дозволить створити зручну цифрову базу даних із відібраних для дослідження клінічних випадків із відповідними інструментами для швидкого доступу, перегляду, аналізу наявних даних, реєстрації, систематизації і оцінювання результатів дослідження. Використання даного підходу дозволить об'єктивізувати та прогнозувати розвиток фіброзу печінки у конкретного пацієнта.

Матеріал і методи дослідження. Для реалізації мети дослідження відібрано 103

випадки з хронічними гепатитами (невірусної, неалкогольної та неаутоімунної етіології), із них 53 з діагнозом НАЖХП та 12 випадків аутопсійного матеріалу пацієнтів без уражень печінки в якості групи порівняння. Відібрані випадки були розподілені по групам: група А1 (37 випадків) зі ступенем фіброзу печінки за Індексом METAVIR від F0 до F1, група А2 (31 випадок) з Індексом METAVIR від F2 до F3, група А3 (23 випадки) з Індексом METAVIR F4 і цирозом печінки, група А4 (12 випадків) група порівняння.

Гістологічний матеріал усіх 103 випадків забарвлено гематоксилином та еозином, за Ван Гизоном, ІГХ методом з моноклональними антитілами до CD3 (EP41), CD34 (QEnd/10), CD68 (PG-M1), CD163 (EP324), α -SMA (1A4).

Для створення цифрової бази даних, СУЗ і оцінювання експресії ІГХ маркерів вирішено створити прототип на базі портативного персонального комп'ютера System76 Galargo Pro Galp3 (процесор: Intel® Core(TM) i7-8565U @ 1.80 GHz, оперативна пам'ять: DDR4 3200 Mhz 32.0 Gb, SSD: 2TB+3Tb), на який була встановлена операційна система Ubuntu 24.04, що вільно розповсюджується в якості операційної системи з частково відкритим кодом за ліцензіями типу Apache-2.0, GPL-3.0.

Обрано дві мови програмування Java та Python, встановлено імплементації платформ відповідних мов із відкритим кодом – Open JDK 11 та Anaconda 2024.02-1.

В якості серверного програмного забезпечення для СУЗ обрано OMERO Server 5.6.11 (створений на мові Java з відкритим кодом), за базу даних обрано PostgreSQL 11, для візуального оцінювання, морфометрії та калькуляції експресії ІГХ маркерів обрано програмне забезпечення з відкритим кодом QuPath v0.5.1.

Для отримання сканів мікропрепаратів використовували цифровий сканер 3dHISTECH

Ranogamic DESK DWII, що створює скановані зображення у форматі MRXS – багатофайловому форматі з дуже складними метаданими в суміші текстових і бінарних форматів [4]. Даний формат є пропрієтарним і з ним незручно працювати використовуючи програмне забезпечення з відкритим кодом. Тому на базі існуючих конвертерів з відкритим кодом bioformats2raw та raw2ometiff і відповідних підходів до роботи з ними [5] нами на мові програмування Java був написаний власний конвертер в формат OME-TIFF (з використанням оптимізованого методу компресії JPEG 2000 для зменшення вихідного розміру отриманих файлів [6]), що працює на операційній системі Ubuntu й автоматично конвертує, як за таймером, так і примусово всі файли в форматі MRXS у файли формату OME-TIFF, які потім за допомогою написаної нами програмної утиліти автоматично завантажуються на OMERO Server.

Після завантаження сканованих зображень мікропрепаратів на OMERO Server виконується додаткова нормалізація даних і створення додаткових індексів у базі даних PostgreSQL для прискорення пошуку та роботи нашої системи з завантаженими даними [7].

Для аналізу зображень цифрових сканованих зображень мікропрепаратів обрано програмне забезпечення з відкритим кодом QuPath-0.5.0 [8] і плагін StarDist [9]. На початку роботи використано вбудований у QuPath функціонал “Cell detection” для розпізнавання клітин і підібрано такі параметри з якими досягли, на нашу думку, найкращих можливих результатів із даним функціоналом: “Detection image = Optical density sum”, “Score compartment = Nucleus: DAB OD mean”, “Threshold = 0.05”, “Threshold 1+ = 0.05”, “Threshold 2+ = 0.4”, “Threshold 3+ = 0.6”, “Sigma = 1.3 μ m”. Для подальшого покращення якості фенотипування клітин шляхом визначення експресії ІГХ маркерів створено власну комп’ютерну модель для плагіна StarDist. На основі коду з репозиторію плагіна

StarDist нами написано дороблений скрипт для експорту з програмного забезпечення QuPath анотацій зображень сканованих зображень скелець мікропрепаратів для використання їх у плагіні StarDist.

Для «тренування» створеної нами комп’ютерної моделі відібрано як власні скановані зображення мікропрепаратів тканин печінки, що не використовувались у дослідженні раніше, так і скановані зображення з вільного доступу на вебсайтах <https://pathpresenter.net>, <https://www.virtualpathology.leeds.ac.uk> та <https://histology.medicine.umich.edu>. Всі відібрані з даною метою скановані зображення мікропрепаратів забарвлено з використанням таких ІГХ маркерів: CD3, CD34, CD68, CD163, α -SMA. В результаті відібрано кількість сканованих зображень із використанням кожного ІГХ маркеру: CD3 – 27, CD34 – 35, CD68 – 33, CD163 – 17, α -SMA – 39. З кожного відібраного сканованого зображення екстрактовано у форматі TIFF найбільш репрезентативні регіони інтересу для тренування комп’ютерної моделі. В результаті для кожного з ІГХ маркерів отримано таку кількість зображень у форматі TIFF: CD3 – 133, CD34 – 142, CD68 – 197, CD163 – 87, α -SMA – 153. Далі, у програмному забезпеченні QuPath із використанням сервера СУЗ (що значно спростило роботу та дозволило проводити її дистанційно зі збереженням результатів на сервері) створено маски з анотацій [10] для тренування нашої комп’ютерної моделі, в якій двома різними категоріями “positive” і “negative” розмічено клітини однакового фенотипового ряду (наприклад, макрофаги для маркерів CD68 і CD163) відповідно забарвлені позитивно і негативно даним ІГХ маркером. Регіони інтересу у форматі TIFF із відповідними файлами з масками анотацій розподілено між тренувальним і валідаційним сетами [11] таким чином, щоб в останній потрапило близько 10 % зображень. Отримано такий розподіл між сетами для маркерів: CD3 – 119/14, CD34 – 127/15, CD68 – 177/20, CD163 – 78/9, α -SMA – 137/16. У результаті тренувальний

сет складався з 638 зображень і анотованих файлів із масками до них, а валідаційний сет відповідно з 74, що, на нашу думку, достатньо для тренування комп'ютерної моделі. В якості базової моделі для тренування нами обрано модель “StarDist 2D” з використанням доступних модулів у середовищі мови програмування Python пакету Anaconda 2024.02-1. Отриману модель експортовано для подальшого використання з плагіном StarDist у програмному забезпеченні QuPath.

Результати та їх обговорення. Отриману нами модель використано для автоматичного розрахунку експресії ІГХ маркерів CD3, CD34, CD68, CD163 та α -SMA у зонах інтересу сканованих зображень мікропрепаратів відібраних 103 випадків і порівняно з результатами оцінювання експресії лікарем–патологоанатомом (також із використанням сервера СУЗ) у відповідних зонах інтересу, що прийняті за еталон (табл. 1).

Таблиця 1

Результати порівняння розрахунку експресії ІГХ маркерів

ІГХ маркер	Автоматизований розрахунок кількості позитивних клітин із використанням створеної моделі		Еталонний розрахунок кількості позитивних клітин лікарем–патологоанатомом		p
	абс.	%	абс.	%	
CD3	1835	11,0	2038	12,0	0,37
CD34	1651	21,0	1836	23,0	0,33
CD68	1974	34,0	2161	36,0	0,46
CD163	754	17,0	852	18,0	0,68
α -SMA	1125	26,0	1238	27,0	0,76

У табл. 1 представлено порівняння розрахунку кількості детектованих клітин певних типів, зокрема забарвлених ІГХ маркером і розрахованих за допомогою плагіну Stardist, із використанням розробленої моделі та еталонним розрахунком таких клітин лікарем–патологоанатомом. Для оцінювання частоти кількості детектованих клітин певних типів використовували критерій узгодження Пірсона (χ^2) для незалежних груп. Порівняння проводилося на рівні значущості $p=0,05$.

Частотні показники, отримані за допомогою автоматизованого розрахунку демонструють дещо нижчі результати, ніж ті, що розраховані спеціалістом патологоанатомом, але статистично

значущої різниці означених показників не було знайдено (рівень значущості 0,05).

Як бачимо з табл. 1 відсоток детектованих клітин певного типу з використанням нашої моделі та плагіну Stardist виявився меншим у порівнянні з еталонним розрахунком лікарем–патологоанатомом, відсоток позитивних клітин більшим ніж при еталонному розрахунку лікарем–патологоанатомом.

Отримані результати можна пояснити тим, що при обробці цифрових даних досліджуваною моделлю позитивно забарвлені ІГХ маркером клітини розпізнаються з більшою точністю ніж незабарвлені (негативні) ІГХ маркером клітини певного фенотипового ряду, що можуть

мати нечіткі клітинні межі на сканованому зображенні, відрізняються за формою, розмірами та іншими характеристиками, при відсутності більш вираженої кольорової контрастності (ступінь експресії) у порівнянні з забарвленими ІГХ маркером клітинами комп'ютерній моделі їх важче розпізнавати.

Однак, у цілому результати розрахунку експресії відповідних маркерів комп'ютерною моделлю виявилися зіставними з еталонним оцінюванням лікарем–патологоанатомом.

Висновки. 1. Встановлено можливість розроблення програмного забезпечення для дослідження кількості та співвідношення різних популяцій клітин макрофагів, синусоїдальних ендотеліальних клітин, фіброblastів і лімфоцитів у тканині печінки з використанням програмного забезпечення з відкритим кодом.

Література.

1. Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults / Marengo A., Jouness R. I. K., Bugianesi E. // *Clin Liver Dis.* – 2016. – № 20 (2). – P. 313–324.

2. Metabolic associated fatty liver disease: Addressing a new era in liver transplantation / Gill M. G., Majumdar A. // *World J Hepatol.* – 2020. – № 12 (12). – P. 1168–1181.

3. Роль макрофагів у морфо– і патогенезі неалкогольного стеатогепатиту / Ільченко В. В., Дядик О. О., Заріцька В. І., Бекетова Ю. І. // *Медична інформатика та інженерія.* – 2022. – № 3 (59). – С. 18–23.

4. OpenSlide. A vendor–neutral software foundation for digital pathology / Goode A., Gilbert B., Harkes J., Jukic D., Satyanarayanan M. // *J Pathol Inform.* – 2013. – Vol. 4, Is. 1. – P. 4–27.

5. OME–NGFF: a next–generation file format for expanding bioimaging data–access strategies / Moore

2. Розроблене та вдосконалене автором програмне забезпечення дозволило створити зручний масив даних із цифрових сканованих зображень мікропрепаратів тканин печінки з пришвидшеним і зручним доступом до відповідних даних.

3. Створена комп'ютерна модель для розпізнавання та розрахунку популяцій клітин печінки з позитивною та негативною ІГХ реакцією з моноклональними антитілами до CD3, CD34, CD68, CD163, α -SMA продемонструвала певну відмінність від еталонного оцінювання лікарем–патологоанатомом, проте статистично значущої різниці між результатами їх роботи не виявлено.

4. В подальшому необхідно вдосконалити розроблену модель для підвищення її чутливості в сенсі розпізнавання клітин конкретного типу.

J., Allan C., Besson S. et al. // *Nat Methods.* – 2021. – Vol. 18, Is. 12. – P. 1496–1498.

6. Optimized JPEG 2000 Compression for Efficient Storage of Histopathological Whole–Slide Images / Helin H., Tolonen T., Ylinen O., Tolonen P., Napankangas J., Isola J. // *J Pathol Inform.* – 2018. – Vol. 9, Is. 1. – P. 9–20.

7. Normalizing Large Scale Sensor–Based MWD Data: An Automated Method toward A Unified Database / Abbaszadeh Shahri A., Shan C., Larsson S., Johansson F. // *Sensors (Basel).* – 2024. – Vol. 24, Is. 4. – P. 1209.

8. QuPath: Open-source software for digital pathology image analysis / Bankhead P., Loughrey M. B., Fernandez J. A. et al. // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, Is. 1. – P. 16878.

9. StarDist Image Segmentation Improves Circulating Tumor Cell Detection / Stevens M., Nanou A., Terstappen L. W. M. M., Driemel C., Stoecklein

N. H., Coumans F. A. W. // *Cancers* (Basel). – 2022. – Vol. 14, Is. 12. – P. 2916.

10. Quick Annotator: an open–source digital pathology based rapid image annotation tool / Miao R., Toth R., Zhou Y., Madabhushi A., Janowczyk A. // *J Pathol Clin Res.* – 2021. – Vol. 7, Is. 6. – P. 542–547.

References.

1. Marengo, A., Jouness, R. I. K., Bugianesi, E. (2016). Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. *Clin Liver Dis*, 20 (2), 313–324. DOI: 10.1016/j.cld.2015.10.010.

2. Gill, M. G., Majumdar, A. (2020). Metabolic associated fatty liver disease: Addressing a new era in liver transplantation. *World J Hepatol*, 12 (12), 1168–1181. DOI: 10.4254/wjh.v12.i12.1168.

3. Ilchenko, V. V., Dyadyk, O. O., Zaritska, V. I., Beketova, Yu. I. (2022). The role of macrophages in the morpho- and pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Medychna informatyka ta inzheneriia [Medical informatics and engineering]*, 3 (59), 18–23. DOI: 10.11603/mie.1996–1960.2022.3.13367. [In Ukrainian].

4. Goode, A., Gilbert, B., Harkes, J., Jukic, D., Satyanarayanan, M. (2013). OpenSlide. A vendor–neutral software foundation for digital pathology. *J Pathol Inform*, 4 (1), 4–27. DOI: 10.4103/2153–3539.119005.

5. Moore, J., Allan, C., Besson, S. et al. (2021). OME–NGFF: a next–generation file format for expanding bioimaging data–access strategies. *Nat Methods*, 18 (12), 1496–1498. DOI: 10.1038/s41592–021–01326–w.

6. Helin, H., Tolonen, T., Ylinen, O., Tolonen, P., Näpänkangas, J., Isola, J. (2018). Optimized JPEG 2000 Compression for Efficient Storage of Histopathological Whole–Slide Images. *J Pathol Inform*, 9 (1), 9–20. DOI: 10.4103/jpi.jpi_69_17.

11. Practical guide to training and validation for primary diagnosis with digital pathology / Williams B. J., Treanor D. // *J Clin Pathol.* – 2020. – Vol. 73, Is. 7. – P. 418–422.

7. Abbaszadeh Shahri, A., Shan, C., Larsson, S., Johansson, F. (2024). Normalizing Large Scale Sensor–Based MWD Data: An Automated Method toward A Unified Database. *Sensors* (Basel), 24 (4), 1209. DOI: 0.3390/s24041209.

8. Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A. et al. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, 7 (1), 16878. DOI: 10.1038/s41598–017–17204–5.

9. Stevens, M., Nanou, A., Terstappen, L. W. M. M., Driemel, C., Stoecklein, N. H., Coumans, F. A. W. (2022). StarDist Image Segmentation Improves Circulating Tumor Cell Detection. *Cancers* (Basel), 14 (12), 2916. DOI: 10.3390/cancers14122916.

10. Miao, R., Toth, R., Zhou, Y., Madabhushi, A., Janowczyk, A. (2021). Quick Annotator: an open–source digital pathology based rapid image annotation tool. *J Pathol Clin Res*, 7 (6), 542–547. DOI: 10.1002/cjp2.229.

11. Williams, B. J., Treanor, D. (2020). Practical guide to training and validation for primary diagnosis with digital pathology. *J Clin Pathol*, 73 (7), 418–422. DOI: 10.1136/jclinpath–2019–206319.

ORCID:

Vladyslav V. Ilchenko: 0000–0002–6790–9230