



**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS  
ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS FAKULTETAS**

**Andrius Kiškis**

**REIŠMINGŲ UŽDEGIMINIŲ ŽARNYNO LIGŲ DIAGNOSTINIŲ  
POŽYMIŲ IDENTIFIKAVIMAS HISTOLOGINIUISE ŽARNYNO  
AUDINIŲ VAIZDUOSE**

Baigiamasis magistro projektas

**Vadovas**  
Robertas Petrolis

**KAUNAS, 2015**

**KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS**  
**ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS FAKULTETAS**  
**ELEKTRONIKOS INŽINERIJOS KATEDRA**

**REIŠMINGŲ UŽDEGIMINIŲ ŽARNYNO LIGŲ DIAGNOSTINIŲ  
POŽYMIŲ IDENTIFIKAVIMAS HISTOLOGINIUISE ŽARNYNO  
AUDINIŲ VAIZDUOSE**

Baigiamasis magistro projektas  
Biomedicininė inžinerija (kodas 621H16001)

**Vadovas**

(parašas) Robertas Petrolis  
(data)

**Recenzentas**

(parašas) prof. dr. Audris Kopustinskas  
(data)

**Projektą atliko**

(parašas) Andrius Kiškis  
(data)

**KAUNAS, 2015**



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS

(Fakultetas)

Andrius Kiškis

(Studento vardas, pavardė)

Biomedicininė inžinerija, 621H16001

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Baigiamojo projekto „Reikšmingų uždegiminių žarnyno ligų diagnostinių požymių identifikavimas histologiniuose žarnyno audinių vaizduose“

### AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 15 m. birželio 1 d.  
Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Andriaus Kiškio** baigiamasis projektas tema „Reikšmingų uždegiminių žarnyno ligų diagnostinių požymių identifikavimas histologiniuose žarnyno audinių vaizduose“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

\_\_\_\_\_  
(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Kiškis, A. Reikšmingų uždegiminių žarnyno ligų diagnostinių požymių identifikavimas histologiniuose žarnyno audinių vaizduose. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas Robertas Petrolis; Kauno technologijos universitetas, Elektros ir elektronikos fakultetas, Elektronikos inžinerijos katedra.

Kaunas, 2015. 50 psl.

## SANTRAUKA

*Lėtinių uždegiminių žarnų ligų (UŽL) grupei priskiriamos dvi pagrindinės ligos: opinis kolitas (OK) ir Krono liga (KL). Uždegiminių žarnyno ligų diagnostikai taikoma biopsinių preparatų histologinė analizė. Ligos aktyvumo ir sunkumo įvertinimas yra svarbus projektuojant optimalią gydymo strategiją ir tolimesnius tyrimus pacientams. Patologai ekspertai vizualiai vertindami uždegiminį procesą pagal žarnyno histologinius preparatus naudoja kokybinius pažeidimo įverčius – tam tikrų požymių buvimą ar nebuvimą. Tačiau šis vertinimas ne visada pasiteisina, dėl žmogiškosios klaidos. Yra tikimybė, jog tą patį preparatą vertinant tam pačiam ekspertui, bet praėjus tam tikram laiko tarpui, rezultatai skirsis. Deja, kol kas nėra sukurta patikima ir greita lėtinių uždegiminių žarnų ligų automatinė diagnostikos metodologija. Todėl, siekiant ją sukurti reikia įvertinti histologinių preparatų vaizduose esančius uždegimo požymius. Vienas iš jų uždegimo metu atsirandančios imuninės ląstelės. Šio darbo tikslas, sukurti žarnyno audinių uždegimo požymių automatinio vertinimo metodiką. Šiam tikslui pasiekti buvo sukurta registruotų vaizdų pirminio apdoravimo metodika. Eliminuos netolygus absoliutinis apšvietimas tyrinėjamuose vaizduose. Surasta užregistruoto vaizdo transformacija į optimalią spalvų erdvę. Matematinės morfologijos būdu išskirtos tikėtinos uždegiminių ląstelių sritys vaizde. Surasti uždegiminių ląstelių skiriamieji požymiai. Iš turimų uždegiminių ląstelių požymių, išskirti reikšmingiausi. Gauti rezultatai parodė galimą metodo panaudojimą kaip histologo eksperto pagalbinę darbo priemonę.*

Kiškis, A. Identification of Diagnostic Features of Intestine Inflammatory Diseases in Histological Tissue Images. Final project of Master's / supervisor Robertas Petrolis; Kaunas University of Technology, Faculty of Electrical and Electronics Engineering, department of Electronics Engineering.

Kaunas, 2015. 50 psl.

## SUMMARY

*Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) are two principal diseases of chronic inflammatory bowel disease (IBD). For visual evaluation of inflammatory processes according to bowel histological samples, pathology experts use qualitative estimates of infringement – presence or absence of certain signs. However, this evaluation is not always right because of the "human error". There is a great possibility that the same expert evaluating the same sample at different time period will get different results. However, a reliable and fast automatic methodology for diagnostics of inflammatory bowel diseases has not been still developed. For automatic evaluation of histological samples, inflammatory cells forming during inflammation should be considered. Hence, the aim of this work is to create a method for detection of inflammatory cells in histological sample images of mice colon tissue. In order to achieve the goal these tasks were carried out. Image preprocessing was done for registered pictures. Uneven illumination was eliminated and optimal color space transformation was performed by means of principle component analysis images. By the help of mathematical morphology methods probable inflammatory cell areas were detected in the image. The elaborated method then performs feature extraction procedures and discriminant analysis identified the most important ones. Obtained results demonstrated the potential use of created method for histology specialist assistance.*

# TURINYS

SANTRUMPŲ IR ŽENKLŲ AIŠKINIMO ŽODYNAS .....	7
1 ĮVADAS .....	9
1.1 Darbo tikslai ir uždaviniai .....	9
1.2 Darbo aktualumas .....	10
2 LITERATŪROS APŽVALGA .....	12
2.1 Uždegiminės žarnyno ligos .....	12
2.2 Biopsinė diagnostika .....	14
2.3 Histologinio preparato gamyba .....	14
2.3.1 Parafininė technika .....	15
2.3.2 Pjūvių dažymas .....	18
2.3.3 Dažytų pjūvių dengimas .....	18
2.4 Mikroskopinė žarnyno uždegiminių ligų diagnostika .....	18
2.5 Sveikas žarnynas .....	19
2.6 Patologija .....	20
2.7 Šiame darbe ieškomi uždegiminių žarnyno ligų diagnostiniai požymiai .....	22
3 TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI .....	25
3.1 Uždegimo modeliavimas eksperimentiniuose gyvūnuose .....	25
3.2 Histologinių preparatų vaizdų registravimas .....	26
3.3 Pirminis vaizdų apdorojimas .....	29
3.3.1 Vaizdų transformacija į optimalią spalvų erdvę .....	29
3.4 Tikėtinų uždegiminių ląstelių sričių išskyrimas vaizduose .....	33
3.5 Uždegiminių ląstelių skiriamųjų požymių radimas .....	35
3.6 Reikšmingiausių uždegiminių ląstelių požymių išskyrimas .....	38
4 REZULTATAI .....	41
5 Rezultatų aptarimas .....	46
6 IŠVADOS .....	47
7 LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	48
8 PRIEDAI .....	51
8.1 Mokslinės publikacijos darbo tema .....	51
8.2 Sertifikatai .....	51
8.3 Lentelės: .....	52

## SANTRUMPŲ IR ŽENKLŲ AIŠKINIMO ŽODYNAS

*Autolizė* – ląstelių savaiminis irimas, kurį sukelia tų ląstelių hidroliziniai fermentai, pvz., fermentuojantis arbatžolėms, skerdienai, rūgstant silosui.

*Biopsija* – tai ląstelių ar audinių gabalėlio paėmimas ištyrimui. Mėginys imamas iš to organo ar vietos, kur matomi pakitimai.

*Citokinas* – labai didelė grupė baltyminių medžiagų, koordinuojančių imunines reakcijas.

*Dehidratavimas* – vandens pašalinimas.

*Displazija* – audinio, organo vystymosi arba augimo sutrikimas.

*DSS* – natrio dekstrano sulfatas

*Ekscesas* – imties eksceso koeficientas yra histogramos lėkštumo matas

*Enterinė nervų sistema* – nuosava virškinamojo trakto nervų sistema.

*Etiologija* – mokslas apie ligų atsiradimo priežastis ir sąlygas.

*Gastroenterologija* – tai mokslas apie virškinimo sistemos (stemplės, skrandžio, žarnų, kasos, kepenų) ligas.

*Glikokortikoidai* – antinksčių žievės gaminami steroidiniai hormonai, veikiantys angliavandenių, riebalų, baltymų apykaitą, padedantys palaikyti organizmo vidinės terpės pastovumą (homeostazę).

*Histologija* – biologijos sritis, nagrinėjanti daugialąsčių organizmų audinių mikroskopinę sandarą, funkcijas ir jų vystymosi dėsningumus. (Anatomijos dalis, organizmo audinių mokslas).

*Histopatologija* – anatomijos sritis, kuri naudojama mikroskopu tirti ligos sukeltus audinių ir ląstelių pokyčius.

*Hospitalizacija* – paciento guldymas į ligoninę.

*Ideopatija* – pirminė savarankiška liga.

*KL* – Krono liga.

*Kripta* – morfologinis ir funkcinis žarnos gaurelio apibūdinimas.

*Lamina propria* – jungiamojo audinio sluoksnis.

*LSMU* – Lietuvos Sveikatos Mokslų Universitetas

*Monozigotiniai dvyniai* – kitaip vadinami identiškais dvyniais – gimsta, kai iš vienos apvaisintos kiaušialąstės susiformuoja viena zigota, iš kurios vėliau susidaro du embrionai.

*OK* – opinis kolitas.

*Patogenezę* - ligos raida.

*PBS* – fosfatinis buferinis tirpalas

*Preparatas* – audinys ar organas rengiamas tirti.

*Remisija* - laikinas ligos reiškinių susilpnėjimas; ligos atoslūgis.

*Retrakcija* – susitraukimas, sumažėjimas.

*RGB* –(*red green blue*) raudona žalia mėlyna.

*ROI* – (*a region of interest*) –Tiriamasis plotas.

*UŽL* – uždegiminės žarnyno ligos.

*VA* – Veterinarijos Akademija

*Vivariumas* – patalpa laikyti bandomiesiems ar rodomiesiems gyvūnams.



# 1 ĮVADAS

Virškinimo sistema, yra vienas didžiausių barjerinių organų ir nuolat patiria išorinės aplinkos poveikį [1]. Atitinkamas virškinimo sistemos audinių atsakas į šį poveikį, yra generuojami imuninės sistemos kontroliuojami uždegiminiai procesai. Virškinamojo trakto sutrikimai gali išsivystyti į uždegimines žarnyno ligas, sąlygojančias laipsnišką virškinimo trakto audinių struktūrų kaitą [2]. Lėtinių uždegiminių žarnų ligų (UŽL) grupei priskiriamos dvi pagrindinės ligos: opinis kolitas (OK) ir Krono liga (KL). Šios ligos yra idiopatinės (savarankiškos) uždegiminės žarnų ligos, nes iki šiol nėra visiškai aiški ir tiksli šių ligų etiologija bei patogenezė [2]. Kliniškai, abu susirgimai prasideda palaipsniui, tačiau kartais gali prasidėti staiga ir gali būti priskirtos prie „žaibiškų“ ligų. Klinikinėje eigoje yra būdingi paūmėjimai ir spontaniška ar vaistų sukelta remisija. Opinis kolitas ir Krono liga daro neigiamą įtaką sergančiųjų gyvenimo kokybei, mirštamumui bei hospitalizavimų skaičiui [2]. OK ir KL nuolat sparčiai daugėja, per pastaruosius 20–30 metų Vakarų Europoje, užfiksuotas 3–4 kartus didesnis šių ligų paplitimas [3]. Uždegiminių žarnyno ligų diagnostikai taikoma biopsinių preparatų histologinė analizė [1, 4]. Ligos aktyvumo ir sunkumo įvertinimas yra svarbus projektuojant optimalią gydymo strategiją ir tolimesnius tyrimus pacientams. Patologai ekspertai vizualiai vertindami uždegiminį procesą pagal žarnyno histologinius preparatus, naudoja kokybinius pažeidimo įverčius – tam tikrų požymių buvimą ar nebuvimą. Tačiau šis vertinimas ne visada pasiteisina, dėl žmogiškosios histologo klaidos. Yra tikimybė, jog tą patį preparatą vertinant tam pačiam ekspertui, bet praėjus tam tikram laikui tarpui, rezultatai skirsis [5]. Deja, kol kas nėra sukurta patikima ir greita lėtinių uždegiminių žarnų ligų automatinė diagnostikos metodologija. Todėl, siekiant ją sukurti reikia įvertinti histologinių preparatų vaizduose esančius uždegimo požymius. Vienas iš jų uždegimo metu atsirandančios uždegiminės ląstelės [6, 7, 8].

## 1.1 Darbo tikslai ir uždaviniai

**Darbo tikslas** - Šio darbo tikslas, sukurti žarnyno audinių uždegimo požymių automatinio vertinimo metodiką.

### **Darbo uždaviniai :**

1. Sukurti registruotų vaizdų pirminio apdorojimo metodą:
  - 1.1. Eliminuoti netolygų absoliutinį apšvietimą tyrinėjamuose vaizduose.
  - 1.2. Surasti užregistruoto vaizdo transformaciją į optimalią spalvų erdvę.
2. Matematinės morfologijos būdu išskirti tikėtinas uždegiminių ląstelių sritis vaizde.
3. Surasti uždegiminių ląstelių skiriamuosius požymius.
4. Iš turimų uždegiminių ląstelių požymių, išskirti reikšmingiausius.

## 1.2 Darbo aktualumas

Nepagydomas Krono ar opinio kolito ligas histopatologai dažnai vadina civilizacijos ligomis, kurias, sąlygoja tiek genetiniai, tiek aplinkos veiksniai. Šiomis ligomis serga daugiausiai jaunesnio ir vidutinio amžiaus žmonės. Nors šiomis ligomis sergama visame pasaulyje, šios ligos labiau paplitusios Šiaurės Amerikoje, Europoje ir rečiau sutinkamos tropinėje Afrikoje, Pietų Amerikoje ar Japonijoje. Kuo daugiau šalis išsivysčiusi, tuo dažnesni šių žarnyno ligų atvejai. Lietuvoje statistika kol kas nėra labai bauginanti, tačiau – pastaruosius 8 metus Lietuvoje sergamumas šiomis ligomis padidėjo apie du kartus ir šiuo metu tokių ligonių yra maždaug apie pora tūkstančių. Tai 7,5 atvejai 100 tūkst. gyventojų. Sergamumas Krono liga Lietuvoje – 2,1 atvejis 100 tūkst. gyventojų, opinio kolitu – 5,4 atvejai 100 tūkst. [3, 9, 10]. Pagal šiuos rodiklius Lietuva pakliūva į žemesnio sergamumo zoną. Nors susirgimų Lietuvoje maždaug triskart mažiau negu Skandinavijoje, pusantro karto mažiau negu Estijoje. Tačiau nerimą kelia tai, kad ligos atvejų kasmet sparčiai daugėja. Šuolis, kuris įvyko pasikeitus gyvenimo sąlygoms, kai iš esmės pasikeitė mitybos principai – paplito greitas maistas, pasikeitė maisto ruošimo technologijos, per pastaruosius 20–30 metų Vakarų Europoje, Skandinavijos šalyse sukėlė 3–4 kartus didesnę ligų paplitimą [11].

Didelis sanitarijos laipsnis mus apsaugojo nuo infekcinių virškinimo ligų, kurių žymiai sumažėjo, deja, padaugėjo imuninių ligų, taip pat ir opinio kolito bei Krono ligos. Tas pačias tendencijas medikai pastebi ir Lietuvoje. Lietuva per pastaruosius dešimtmečius iš Vakarų perėmė ir greitą maistą ir tam tikras modernias maisto paruošimo technologijas, todėl kartu pasikeitė ir žmogaus žarnyno mikroflora. Netgi lyginant su 2007 m. šių ligų jau yra daugiau kaip du kartus daugiau, taigi per artimiausius 10 metų galime pasiekti ir vakarų šalių lygį [11].

Krono ar opinio kolito ligų gydymas trunka visą gyvenimą, o blogiausiu atveju gali atsirasti rizika susirgti ir žarnyno vėžiu, kurio atvejų pasaulyje taip pat daugėja [11]. Tai labai sunkios, net invalidizuojančios ligos, kai dėl komplikacijų tenka atlikti sudėtingas chirurgines operacijas, kai kada netgi gali tekti pašalinti visą žarnyną, suformuoti dirbtinę išangę. Deja, chirurginiu būdu pagydyti Krono ligos negalima. Chirurgai gali pašalinti tik komplikacijas, tačiau liga vis tiek progresuos toliau. Sunkiausia ligos forma – kai apie išangę formuojasi didžiuliai pūliniai ir susidaro dvi, trys ar net keturios angos tuštiniams. Tai reiškia, kad gydymas pradėtas labai pavėluotai. Mat komplikacijų jau negali pagydyti jokie vaistai. Tuo tarpu pradėjus gydyti laiku, chirurginių intervencijų rizika sumažėja net iki 90 proc., būtent dėl šios priežasties labai svarbu gydymą pradėti kuo anksčiau. Tačiau norint pradėti gydymą laiku, būtina ankstyvoji uždegiminių ligų diagnostika. Žmonės sergantys Krono liga nebūtinai viduriuoja. Liga gali pasireikšti pilvo skausmais, sąnarių skausmais ir pažeidimais, įvairiais odos bėrimais. Todėl ši liga neretai diagnozuojama pavėluotai, žmonės pirmiausiai pradeda vaikščioti pas kitus specialistus, ne gastroenterologus [3, 10].

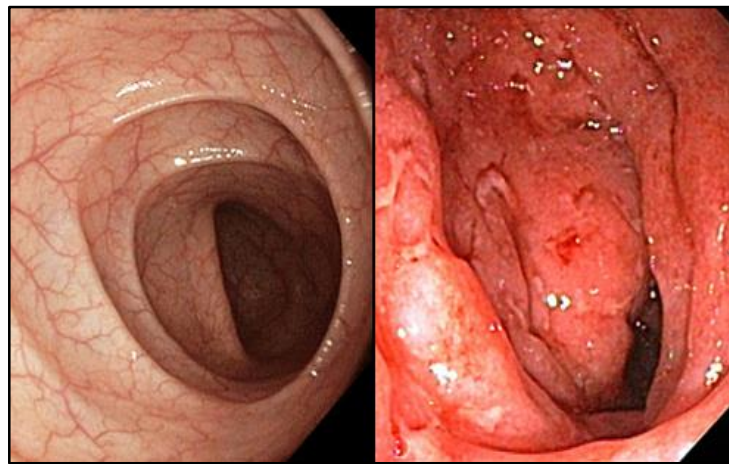
UŽL patvirtinimui atliekama mikroskopinė histologinė analizė, vertinant uždegimo metu atsirandančius žarnyno audinių struktūros pakitimus. Pagal labiausiai histologų naudojamus šių ligų sunkumo vertinimo skales (Geboes, Gramlich, Gupta, Riley požymių skalės), būtent uždegiminės ląstelės, tokios kaip neutrofilai ir eozinofilai, atsiranda tarp žarnyno epitelinio ir raumeninio sluoksnių ir yra pirmieji uždegimo požymiai. O žarnyno audinių struktūrų pakitimai nusako jau tik vėlesnes, bei sunkesnes UŽL stadijas. [Priedai; 8.1-8.4 lentelės], [5, 6, 7]. Žarnyno audinių automatinio vertinimo metodika pagal uždegimo metu atsirandančias imunines ląsteles būtų naudinga ne tik ankstyvajai uždegiminių ligų diagnostikai, bet ir šių ligų vystymosi aiškinimuisi.

Taigi, ankstyvajai uždegiminių žarnyno ligų diagnostikai, būtina vertinti uždegimo metu atsirandančias uždegimines ląsteles.

## 2 LITERATŪROS APŽVALGA

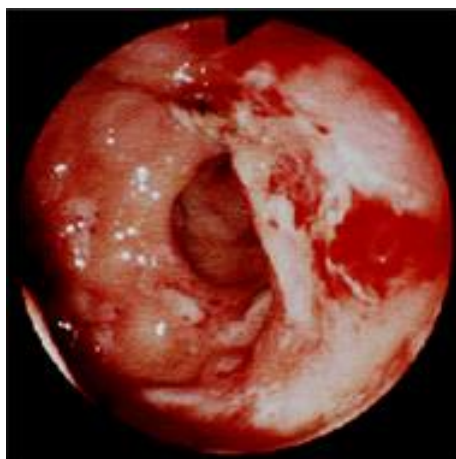
### 2.1 Uždegiminės žarnyno ligos

**Opinis kolitas** yra žarnų lėtinių uždegiminių ligų grupei priklausanti neaiškios etiologijos storosios žarnos liga, kuri pažeidžia jos sienelės sluoksnį – gleivinę. Jam būdinga recidyvinė eiga. Pacientų, sergančių opinio kolitu, imuninė sistema neadekvačiai reaguoja į žarnyno sienelę, sukeldama uždegimą, kraujavimą ir viduriavimą. Dažniausiai, yra pažeidžiama tiesioji žarna ir nusileidžiančioji storosios žarnos dalis, bet uždegimas gali pažeisti ir visą storąjį žarnyną. Svarbiausias klinikinis požymis yra viduriavimas su krauju ir gleivėmis [11, 12].



2.1 pav. Sveikos storosios žarnos dalies – gaubtinės žarnos fotografija (kairėje) ir gaubtinės žarnos su opinio kolito uždegimu fotografija (dešinėje) [13]

**Krono liga** yra lėtinė uždegiminė virškinamojo trakto liga, kuria serga vaikai ir suaugusieji. Opinis kolitas pažeidžia tik vieną, paviršinį, žarnyno sienelės sluoksnį – gleivinę, tuo tarpu Krono liga – visus tris žarnyno sienelės sluoksnius. Krono ligos metu vystosi atskirų virškinamojo trakto vietų (segmentinis) uždegimas. Krono liga gali pažeisti ne tik storąsias žarnas, bet ir visą virškinamąjį traktą: burnos gleivinę, stemplę, skrandį, dvylikapirštę žarną, plonąsias ir storąsias žarnas. Tačiau dažniausia pažeidimo vieta yra plonosios žarnos galinė dalis. Įprasti ligos simptomai yra pilvo skausmai, viduriavimas, svorio kritimas ir karščiavimas. Pacientams taip pat gali pasireikšti simptomai, nesusiję su virškinamuoju traktu – odos bėrimas, sąnarių skausmai, akių paraudimas ir kepenų problemos [11, 12].



2.2 pav. Krono ligos gaubtinėje žarnoje fotografija [14]

Šių dviejų uždegiminių ligų etiologija nėra visiškai aiški. Manoma, kad joje dalyvauja kelios veiksnių grupės:

- **Genetiniai veiksniai.** Kad OK ir KL yra genetinio pobūdžio, rodo:
  - Skirtingas ligos paplitimas įvairiose etninėse grupėse;
  - Šeiminis polinkis sirgti. 20-30% atvejų ligonių giminaičiai yra sirgę uždegiminėmis žarnų ligomis;
  - 10 kartų didesnė rizika susirgti ligonio pirmos eilės giminaičiams, palyginti su bendra populiacija;
  - Didesnis sergamumas tarp monozygotinių dvynių;
  - Ryšys su kitomis genetinio poveikio ligomis.

Konkretūs genetiniai šių ligų žymenys dar nėra nustatyti. b]

- **Imuniniai veiksniai.** Sergantiems OK ir KL yra konstatuoti :
  - CD4+ T ląstelių aktyvacija periferiniame kraujyje ir žarnų gleivinės *lamina propria*;
  - Suaktyvėjusio humoralinio imuniteto požymiai;
  - 80 % sergančiųjų OK nustatomi padidėję pANCA (perinuklerinių antineutrofilinių citoplazminių antikūnų) titrai;
  - 50 % sergančiųjų KL – padidėjęs ASCA (antikūnai prieš *Saccharomyces cerevisiae*);
  - Teigiamas gliukokortikoidų ir kitų imunosupresinių vaistų poveikis.

Tačiau kol kas specifinių imuninių šių ligų žymenų, kurie tiktų klinikinei diagnostikai, iki šiol nenustatyta [11].

- **Aplinkos veiksniai:**
  - Žarnyno mikroflora: eksperimentuojant nepavyko sukelti OP steriliame žarnyne;
  - Konstatuota jog opinis kolitas rečiau būna rūkantiesiems ar liga paūmėja nustojus rūkyti;

- Krono ligos atveju rūkymas yra nepriklausomas rizikos veiksnys.

Tiksli Opinio kolito ir Krono ligos patogenezė dar nėra atskleista. Labiausiai palaikoma hipotezė kad ši liga kyla dėl sutrikusio žarnų gleivinės imuninio atsako į žarnų turinyje esančius antigenus, genetiškai į tai linkusiam asmeniui. Genetiniai pokyčiai lemia imuninio atsako pobūdį ir gaminamų citokininų kombinaciją: padidėja uždegimą sukeliančių ar sumažėja priešuždegiminių cikotininų. Turi reikšmės ir žarnų gleivinės barjerinės funkcijos sutrikimai, enterinės nervų sistemos ir mikro cirkuliacijos būseną. Šioje situacijoje reikalingas antigenas kuris išprovokuotų uždegiminį atsaką. Manoma kad jis yra normali žarnyno flora ar įprastinė infekcija. Šiame procese dalyvauja ir imuninės ir neimuninės ląstelės [11, 15, 12].

## **2.2 Biopsinė diagnostika**

Vienas iš būdų OK ar KL diagnostikai yra histologinis biopsijos metu paimtos medžiagos ištyrimas. Standartinė biopsijos tyrimo vieta yra užpakalinė tiesiosios žarnos sienelė, 6-10 cm nuo išangės, tačiau, kai abejojama dėl diagnozės, gali būti atliekama daugiau biopsijų iš visų pažeistų žarnos (ir netik) segmentų ir iš įtartinų vietų. Biopsijos rezultatus derinant su klinikiniais, laboratoriniais, radiografiniais ir endoskopiniais stebėjimais, galima diagnozuoti OK ir KL ligas (taip pat diferencijuoti (atskirti, suskirstyti) pagal kitas sąlygas). Diferencijacija yra labai svarbus tiksliai diagnostikai, kad būtų galima parinkti tinkamą gydymą. Daugumai pacientų yra įmanoma teisinga diagnozė, nors pasitaiko pacientų su ūmiais ar staigiais susirgimais, kuriems nustatyti tikslią diagnozę gali būti sudėtinga, todėl laikinai diagnozuojama neapibrėžtas kolitas. Biopsija taip pat leidžia įvertinti ligos aktyvumą (veiklą) ir identifikuoti vėžį ir priešvėžinius pakitimus. Klinikinėje praktikoje tik tiesiosios žarnos biopsijos metu gaunama diagnozė. Tačiau, priešingai nei optinis kolitas, pažeidimai tiesiojoje žarnoje, būdingi Krono ligai, ne visada atsiranda normalios gleivinės fone. Dėl to, tikslingiau atlikti daugkartinę endoskopinę biopsiją iš skirtingų gaubtinės ir klubinės žarnos vietų, per pradinį paciento patikrinimą dėl uždegiminio viduriavimo arba per tolesnius tyrimus ir per patikrą dėl vėžio. Daugkartinė biopsija leidžia išsamiai išanalizuoti uždegimo pasiskirstymą ir yra būtina displazijos atpažinimui. Ji taip pat padidina diagnostikos tikslumą [4, 8].

## **2.3 Histologinio preparato gamyba**

Biologinių audinių struktūrą įvairiame lygmenyje galima tirti įvairiais metodais, tokiais kaip liuminiscencinės, šviesinės, poliarizacinės, elektroninės ir kitais mikroskopijos tyrimo metodais,

tačiau prieš tyrimus audiniai turi būti tinkamai paruošti. Audiniai turi būti supjaustomi specialiais prietaisais (mikrotomai, kriotomai, ultramikrotomai) labai plonais, kelių mikronų storio pjūviais. Norint atpjauti plonus pjūvius, reikia audinius sustandinti, išsaugant kuo mažiau pakitusias jų struktūras. Yra keli audinių standinimo būdai. Audinių šaldymas – vienas iš paprasčiausių ir seniausiai naudojamų metodų, kurį pastaruoju metu dalinai pakeitė parafininių pjūvių technika. Pastarąją patogu taikyti kasdieninėje praktikoje, nes ji pritaikyta beveik visų tipų audinių tyrimams, naudojant įvairius imunohistocheminius, histocheminius, histologinius, molekulinius ir kitus tyrimo metodus. Dar vienas šios technologijos privalumas, kad net ir po keliolikos metų iš archyvinių mėginių galima atlikti įvairius tyrimus – nes tokiu būdu paruošti mėginiai gali būti archyvuojami neribotą laiką [16, 17].

### 2.3.1 Parafininė technika

Parafininių pjūvių techniką sudaro keli etapai: audinių fiksavimas, dehidratavimas, skaidrinimas ir impregnavimas standinančiomis medžiagomis (infiltravimas):

*Mėginys → Fiksavimas → Dehidratavimas → Skaidrinimas → Impregnavimas → Parafino blokas*

Audinių fiksavimas, tai pirmoji ir viena kritiškiausių parafininės audinių paruošimo technologijos dalis. Nuo jos kokybės priklauso mikroskopinio tyrimo rezultatas. Fiksavimas – tai cheminių procesų seka, kurios metu audiniai išsaugomi nuo irimo ir parengiami tolimesniems audinių paruošimo etapams. Svarbiausias fiksavimo uždavinys – surinktus iš organizmo mėginius išsaugoti kaip galima labiau nepakitusius. Tai pasiekama laiku užkirtus kelią audinių autolizei, žalingam bakterijų ir pelėsinų grybų poveikiui bei sustabdžius visus mėginiuose dar vykstančias biochemines reakcijas [16, 17].

Fiksacijai naudojami fizikiniai veiksniai bei įvairios medžiagos: oksidatoriai, kalio dichromatas, kalio permanganatas, aldehydai, įvairūs alkoholiniai tirpalai, baltymus denatūruojančios medžiagos, cheminių medžiagų mišiniai. Universaliausias ir dažniausiai taikomas praktikoje fiksatorius – 10 % buferinis formalino tirpalas [17].

Sekantis, taip pat labai svarbus etapas, tai audinių dehidratavimas, kurio metu iš audinių pašalinamas vanduo. Labai svarbu, prieš impregnavimo procedūras, visiškai pašalinti audiniuose esantį vandenį, nes audiniai standinami netirpiaisiais vandenyje vaškais [17].

Vanduo iš audinių gali būti šalinamas naudojant skirtingas medžiagas bei režimus. Cheminės medžiagos turinčios hidrofilinių savybių pritraukia audiniuose esantį vandenį, o turinčios hidrofobinių – šalina vandenį laipsniškai atskiesdamos vandeninius audinių skysčius. Pati didžiausia dehidratuojančių medžiagų grupė, pasižyminti hidrofilinėmis savybėmis, tai alkoholiai: metanolis, etanolis, izopropilo alkoholis [17].

Po dehidratavimo atliekamos įvairios audinių skaidrinimo procedūros, kurių metu audiniai paruošiami infiltruojančių medžiagų sutikimui pašalinant dehidrantus. Šių procedūrų atlikimui naudojami tirpalai sąveikaujantys ne tik su dehidratuojančiomis medžiagomis, bet ir su audinius impregnuojančiomis medžiagomis. Audiniai prisotinti šiais tirpalais tampa skaidrūs ar peršviečiami, dėl naudojamų medžiagų aukšto refrakcijos indekso, kuris artimas baltymų indeksui. Dėl tokių audinių pakitimų šis etapas vadinamas „audinių skaidrinimu“ [17].

Pašalinus vandenį ir nuskaidrinus audinius, juos reikia impregnuoti tvirtinančiomis (standinančiomis) medžiagomis, tam kad net ir pjaustant juos plonais pjūviais, mėginiai išlaikytų audiniui būdingą ląstelių ir tarpląstelių struktūrą padėtį (3.3 pav.) [16,17].

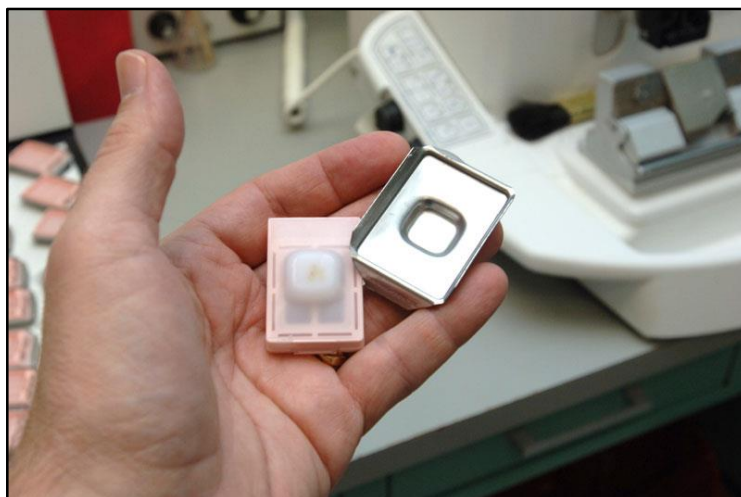


2.3 pav. Parafininė technika – impregnavimo etapas [16]

Impregnuojant audinius, juose esanti skaidrioji medžiaga ir oro tarpai pakeičiami audinius stangrinančia medžiaga (vašku, parafinu ar jų mišiniais) [17].

Impregnuotų mėginių tvirtinimas parafino bloke, arba kitaip blokavimas, tai parafininės technikos baigiamasis etapas. (2.4 pav.). Svarbiausia dalis formuojant parafininius blokus, tai tinkamas mėginių išdėstymas parafininiame bloke. Pradėjus pjauti bloką su netinkamai orientuotu mėginiu, jau su pirmuoju pjūviu galima sugadinti mėginį [17].





2.4 pav. Impregnuotų mėginio parafino blokas paruoštas pjauštamui [16]

Parafininiai pjūviai pjaunami specialiai tam skirtais prietaisais – mikrotomais. Šių prietaisų yra keletas rūšių, kurie pritaikyti įvairiems tiriamiesiems darbams. Kasdieninių tyrimų atlikimui, histologinių tyrimų laboratorijose, dažniausiai naudojami rotaciniai (2.5 pav.) ir roginiai mikrotomai. 0,5  $\mu\text{m}$  plastikinių pjūvių pjauštamui šviesinės mikroskopijos tyrimams ir apie 90  $\mu\text{m}$  storio pjūvių pjovimui elektroninės mikroskopijos tyrimams naudojami ultramikrotomai [18, 17].



2.5 pav. Rotacinis mikrotomas [18]

Dažniausiai mėginiai mikroskopiniams tyrimams pjaunami 2-4  $\mu\text{m}$  storio mikropjūviais, tam, kad mikropreparatuose matytųsi tik vienas ląstelių sluoksnis.

### **2.3.2 Pjūvių dažymas**

Šaldomąja ar parafinine technika atpjauti mikropjūviai dažomi pačiais įvairiausiai dažymo būdais, kurių metu išryškinaimos įvairios audinių struktūros [17].

#### **Hematoksilino eozino (HE) dažymo metodas.**

Plačiausiai, nuo XVI amžiaus paplitęs histologinis audinių tyrimo metodas yra hematoksilino/eozino (HE) dažymo metodas. Tai gana paprastas, universalus bei labai išsamus metodas, aiškiai atskleidžiantis pačias įvairiausias audinių struktūras. Visa tai lėmė jo populiarumą. HE dažymo metode hematoksilino dažų komponentas nudažo ląstelių branduolius ir išryškina vidines branduolio struktūras, o eozino dažai nudažo ląstelių citoplazmą ir įvairiausiai atspalviais paryškina jungiamojo audinio skaidulas. Dažymo metodas pagrįstas gana paprasta reakcija - baziniai hematoksilino dažai jungiasi su ląstelių branduoliais ir kitomis bazofilinėmis ląstelių struktūromis, nudažydami jas mėlyna spalva. Rūgštiniai eozino dažai jungiasi su acidofilinėmis ląstelių struktūromis, nudažydami jas rožinės – raudonos spalvos atspalviais [17].

### **2.3.3 Dažytų pjūvių dengimas**

Dažyti tiriamieji pjūviai prieš mikroskopinį tyrimą dažniausiai uždengiami dengiamaisiais stikleliais naudojant specialias dengiamąsias terpes. Dengiamieji stikleliais apsaugo tiriamųjų audinių dažytus pjūvius nuo įvairių aplinkos veiksnių ir sudaro geresnes sąlygas mikroskopavimui naudojant įvairius mikroskopinio vaizdo didinimo režimus [17].

## **2.4 Mikroskopinė žarnyno uždegiminių ligų diagnostika**

Tradiciškai, histologiniai tyrimai yra atliekami mikroskopiniame lygmenyje. Šviesos mikroskopija yra pagrindinė ir labiausiai naudojama mikroskopijos rūšis žarnyno uždegiminių ligų diagnostikoje. Analizė apima ląstelių dydžio ir formos matavimus bei jų išsidėstymą. Naudojant mikroskopijos metodus, ląstelės dažniausiai gali būti identifikuojamos, taip pat gali būti pamatuojami kiekvienos ląstelės morfologiniai parametrai tam, kad nustatyti ląstelės kilmę. Gyvų ląstelių vaizdai padeda geriau išanalizuoti biocheminius ir biofizinius procesus, vykstančius ne tik ląstelėse, bet ir tarp jų. Įvairių medžiagų poveikio įtakos tyrimams gyviems audiniams ar tų audinių funkcinių savybių tyrimams, naudojami ląstelių kultūrų modeliai [1, 19].

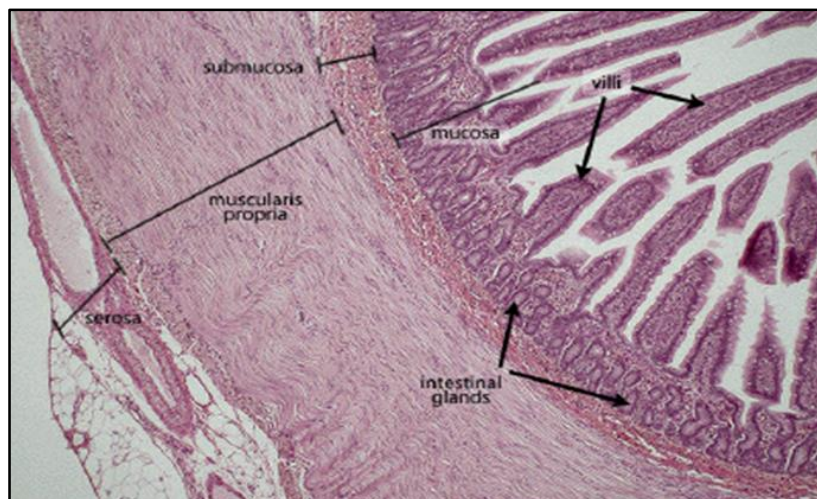
Paskutiniame dešimtmetyje vaizdų ar optikos registravimo technologijos bei programinė įranga, smarkiai pasistūmėjo į priekį, tai leido sukurti sudėtingas duomenų registravimo sistemas.

Komercinės paskirties mikroskopinio skaitmeninio vaizdo gavimo programinė įranga siūlo labai platų įrankių pasirinkimą skirtą ląstelių morfometriniam vertinimui.

Yra taikoma daug metodų žarnyno ligų objektyvizavimui. Vienas iš jų tai aklašis ekspertinis vertinimas (angl. „blind“ arba „double blind“) [20] leidžiantis neatsižvelgti į išankstinę eksperto nuomonę. Vertinimo objektyvumą ir diagnostinę kokybę stipriai didina kiekybinis, aiškiai matomų struktūrinių elementų vertinimas (pvz. nustatytame plote skaičiuojamas tam tikrų ląstelių skaičius ar morfometriniai duomenys) [1].

Įvairių uždegiminių žarnyno ligų, kurios gali sukelti piktybinių auglių atsiradimą, diagnostikai taikoma biopsinių preparatų histologinė analizė. Laipsniška žarnyno audinių struktūrinė kaita, bei tuo pat metu vykstantis atskirų struktūrinių elementų kitimas atspindi ne tik šių ligų atsiradimą, bet ir vystymąsi. Tačiau, dažnai klinikiniai duomenys gaunami jau pažengusiose ligos vystymosi stadijose. Visus ligos vystymosi etapus leidžia atskleisti eksperimentinių gyvūnų modeliai, kurie suteikia galimybę gauti visą histologinių vaizdų rinkinį ir išaiškinti įvairias ligos stadijas. Toks vaizdų rinkinys leidžia išaiškinti pačius svarbiausius diagnostinius požymius, atspindinčius ligos vystymąsi [1,19].

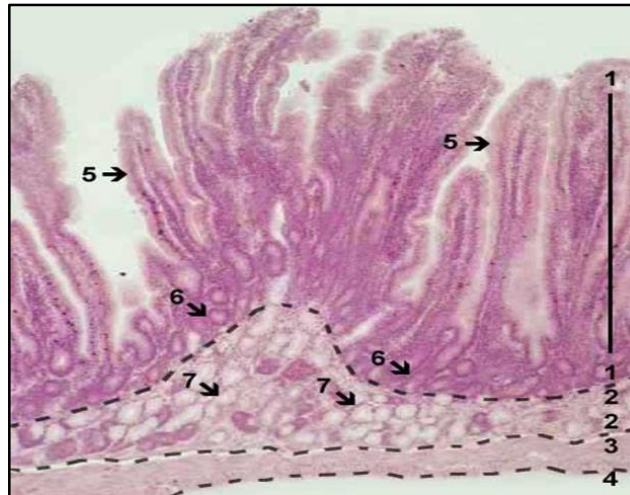
## 2.5 Sveikas žarnynas



2.6 pav. Sveikos storosios žarnos sienelės sluoksnių makroskopinė histologinė fotografija [12]

Virškinimo traktas yra tuščiavidurio vamzdelio pavidalo, kurį sudaro trys sluoksniai: *mucosa* (gleivinė), *submucosa* (pogleivė), *muscularis propria* ir pralaidžių *areolar* audinių, dengtų *mesothelium*, kur traktas ribojasi su kūno ertme (*serosa*). Storosios žarnos gleivinės paviršius yra plokščias su (*crypt*) liaukomis (kriptomis), kaip tiesiais, lygiagrečiais vamzdeliais. Liaukos pagrindas priklauso nuo lygiųjų raumenų ląstelių sluoksnių, *muscularis mucosae*, kurios atskiria gleivinę nuo

pogleivio (*submucosal*) jungiamųjų audinių. Atstumas tarp liaukų ir jų vidaus diametras yra pastovus. Toks paviršius tęsiasi per visą gaubtinę žarną, išskyrus limfinėse zonose, perėjime į plonąją žarnyną, ar ten, kur suragėjęs epitelis. Plonojoje žarnoje paviršius yra nelygus dėl mažų, vienodo dydžio ir formos gaurelių. Klubinėje žarnoje gaureliai yra aukštesni ir liaukos mažiau gilos, palyginti su tuščiąja žarna. Liaukų ir gaurelių paviršius yra padengtas epitelium iš vienaląsčių sluoksnių [12].



2.7 pav. Sveikos storosios žarnos sienelės sluoksnių (pjūvio) makroskopinė histologinė fotografija:  
 1 – mucosa (gleivinė); 2 – submucosa (pogleivė); 3 – muscularis propria; 4 – serosa; 5 – villi (gaureliai); 6 – glands (crypts) of the mucosa (liaukos); 7 – glands in the tunica submucosa (Brunner's glands) [12]

## 2.6 Patologija

Sergant šiomis uždegiminėmis žarnyno ligomis, nustatomi uždegiminiai storosios žarnos pokyčiai.

### ➤ Makroskopiškai matomi pokyčiai:

- Uždegiminiai pokyčiai ištisiniai ir monotipiški, su išopėjimais;
- 95% atvejų prasideda nuo tiesiosios žarnos ir nepertraukiamai plinta proksimaliai;
- Ligai užsitęsus, dėl pogleivio fibrozės ir išilginės retrakcijos storoji žarna sutrumpėja [11].

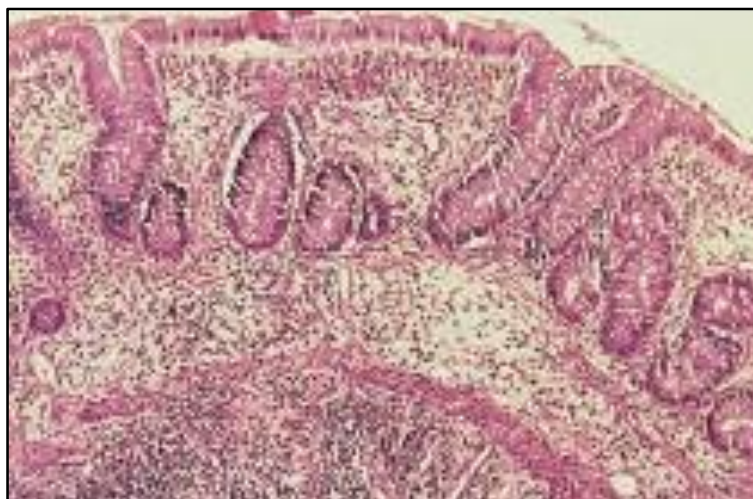
### ➤ Histologiniai Pokyčiai yra nespecifiniai uždegiminiai, apimantys tik gleivinę ir pogleivį. OK būdinga:

- Sumažėjęs kriptų skaičius ir pakitusi jų išvaizda: šakotos, netolygaus pločio, nelygiagrečios;

- Sumažėjęs taurinių ląstelių kiekis kriptų epitelyje ir gleivių kiekis jose;
- Neutrofilinė epitelio, *lamina propria* infiltracija, kriptų mikroabscesai;
- *lamina propria* infiltracija limfocitais, plazminėmis ląstelėmis [11].

Optinio kolito mikroskopinė struktūra (vaizdas), pasižymi gleivinės uždegimine reakcija ir anomalijomis. Uždegimui yra būdingas padidėjęs filtrato sudėties pakitimas. Normalus prasiskverbęs gleivinės ataugėlių filtratas kaupiamas viršutinėje gleivinės dalyje ir ši struktūra išlieka infekciniame kolite. Sergant optiniu kolitu, prasiskverbęs filtratas labiau plinta ir prasiskverbia į gilesnius sluoksnius. Plazminių ląstelių kaupimas vyksta šalia gleivinės pagrindo ir liaukų bazės [11, 19].

Kitas svarbus bruožas, kuris rodo uždegimą, tai neutrofilų (grūdėtieji leukocitai) buvimas, kuris rodo filtrato sudėties pokyčius. Esant kartu ir aiškiam epitelių ląstelių pažeidimams, galima diagnozuoti ligą. Neurofilų su epitelio struktūra, kaip liaukų sienelių pūslės, jų nykimas ar jų pažeidimai gali padėti diagnozei, bet patikimumas šių veiksnių yra mažas. Kriptitas ir liaukų pūslės, pūliniai iš tiesų gali būti matomi esant infekciniam kolitui, Krono kolitui ir diversiniam kolitui. Grūdėtųjų leukocitų (*eosinophilis*) gali būti tiek daug, kad tai gali reikšti eozinofilinį kolitą, ypač esant lėtiniai formai arba kai liga yra neprogresuojanti. Tai galima paaiškinti tuo, kad kitas uždegimines ląsteles gydymas sumažino. Struktūriniai pokyčiai paveikia paviršių, tai pakeičia gaurelių (*villi*) ar liaukų (*crypt*) struktūrą, ji tampa netaisyklinga [12]. Tai pavaizduota penktoje iliustracijoje.



2.8 pav. Opinis kolitas – storosios žarnos gleivinės histologinis mikroskopinis vaizdas. Gleivių liaukos atsiskyrusios nuo pagrindinio gleivinės sluoksnio [12]

Esant optiniam kolitui, toks paviršius pasireiškia 60 % atvejų. Liaukų pakitimai yra dažnesni ir labiau išplitę. Jie yra pastebėti 57-100 % atvejų [12] [11] [1]. Tam, kad būtų lengviau apibrėžti ligos



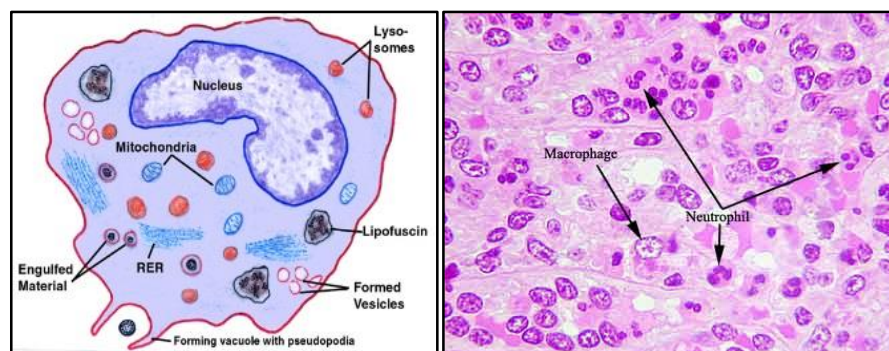
sunkumo stadiją, yra naudojamos įvairios požymių skalės. Labiausiai histologų tarpe paplitusios „Geboes, Gramlich, Gupta bei Riley“. [Priedai; 8.1-8.4 lentelės]

## 2.7 Šiame darbe ieškomi uždegiminių žarnyno ligų diagnostiniai požymiai

Tiriamąjį darbo metu kuriamas metodas reikšmingų uždegiminių žarnyno ligų diagnostinių požymių identifikavimui. Šie diagnostiniai požymiai, tai uždegiminių procesų metu atsirandančios ląstelės :

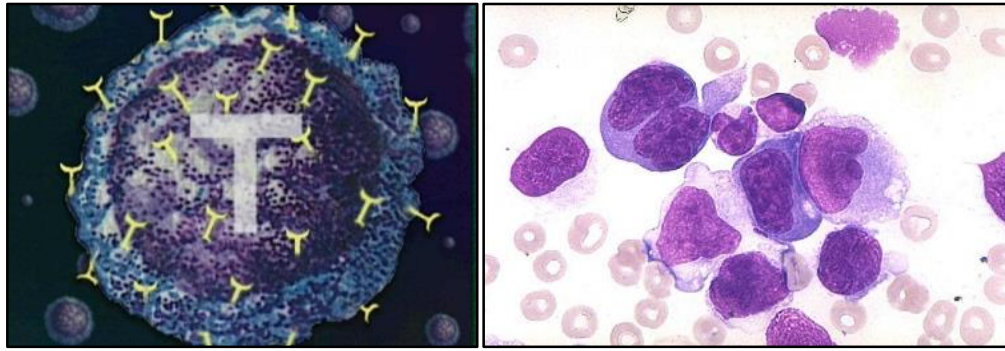
- Makrofagai
- T ląstelės
- Neutrofilai
- Monocitai
- Eozinofilai

Makrofagai – tai yra didieji (14–20  $\mu\text{m}$ ) daugiabranduoliai fagocitai, aptinkami beveik visuose organuose. Jie yra mezenchiminės kilmės ląstelės, gebančios aktyviai suimti ir suvirškinti bakterijas, žuvusių ląstelių liekanas ir kitas organizmui svetimas ir toksines daleles. Uždegimo metu, makrofagai išskiria daugybę nespecifinių imuniteto veiksnių: transferiną, komplementą, lizocimą, interferono pirogenus ir kt., pasižyminčių antibakteriniu poveikiu.



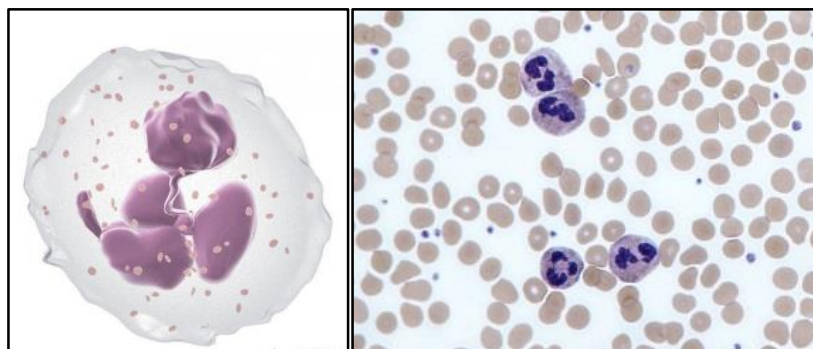
2.9 pav. Makrofagai [21]

T ląstelės - kraujo ląstelės, priklausančios leukocitų agranulocitų grupei, viena iš limfocitų populiacijų. Sudaro 70 % visų limfocitų. T limfocitai yra 7–12  $\mu\text{m}$  skersmens, nefagocituojančios ląstelės, turinčios didžiulį branduolį, užimančią beveik visą citoplazmą. T limfocitai organizme lemia ląstelinį imunitetą t. y. naikina užkrėstas ir vėžines ląsteles, taip pat svarbūs imuniteto reguliacijai.



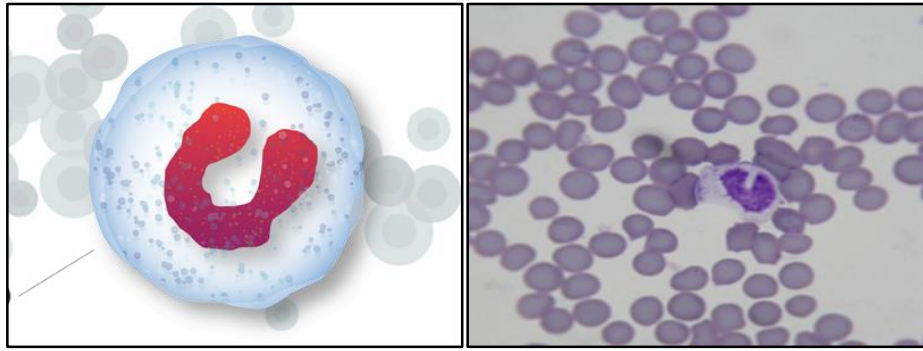
2.10 pav. T ląstelės [22]

Neutrofilai - tai yra grūdėtieji leukocitai, kurių citoplazmoje esančios granulės nusidažo neutraliaisiais dažais. Jie sudaro 50–75 proc. ir yra judriausi iš visų leukocitų. Viename mikrolitre kraujo yra 3000–5000 neutrofilų. Neutrofilų skersmuo – 10–12 mikronų. Subrendusių ląstelių branduolį sudaro 3–4 segmentai, sujungti plonais chromatino siūlais. Pagrindinė funkcija – fagocitozė. Neutrofilai išskiria fermentų, kurie stabdo arba naikina bakterijas, ardo pažeistas audinių ląsteles, o patys žūva uždegimo vietoje ir kartu su audinių irimo produktais sudaro pūlius.



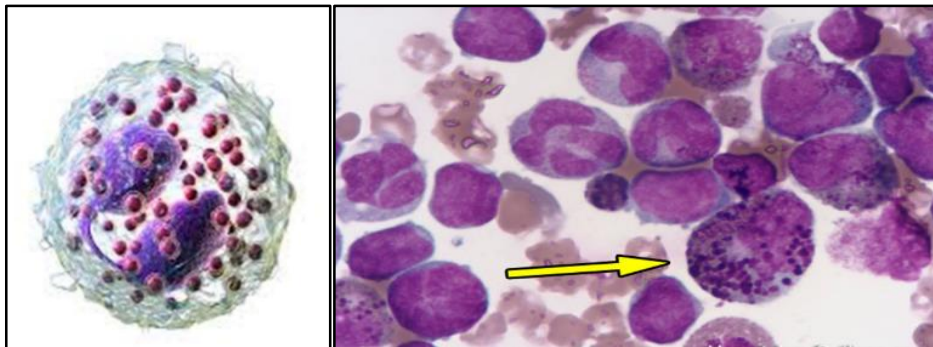
2.11 pav. Neutrofilai [22]

Monocitai – tai yra didieji fagocitai (10–14  $\mu\text{m}$ ). Jie cirkuliuoja kraujyje gana neilgai (nuo 24 val. iki kelių parų), po to patenka į audinius ir diferencijuojasi į brandžius makrofagus. Jie fagocituoja ląstelių irimo produktus ir bakterijas.



2.12 pav. Monocitai [22]

Eozinofilai – tai grūdėtieji leukocitai, dalyvaujantys alerginėse, uždegiminėse ir prieš parazitus vykstančiose reakcijose ląstelėse. Eozinofilams tenka 1–5 proc. kraujyje cirkuliuojančių leukocitų. Daugelis jų palieka kraujotaką ir migruoja į audinius, sąveikaujančius su aplinka (virškinamoji, kvėpavimo takų, šlapimo sistema ir kt.). Eozinofilai ypač aktyvūs parazitų patekimo vietose. Aktyvinti eozinofilai išskiria granulių turinį ir lipidų mediatorius, Tai pažeidžia mikroorganizmus.



2.13 pav. Eozinofilas [23]

Šios visos ląstelės, uždegiminių žarnyno ligų vertinimo skalėse (Geboes, Gramlich, Gupta, Riley požymių skalės) vadinamos uždegiminėmis (angl. *inflammatory cell*) [ Priedai; 8.1-8.4 lentelės]. Apžvelgus uždegiminių ląstelių morfologiją, galima teigti, jog visų šių ląstelių branduoliai, turi savotišką formą, kuri gali būti vienas iš pagrindinių „raktų“ išskirti uždegimines ląsteles iš likusių žarnyno audinių ląstelių.



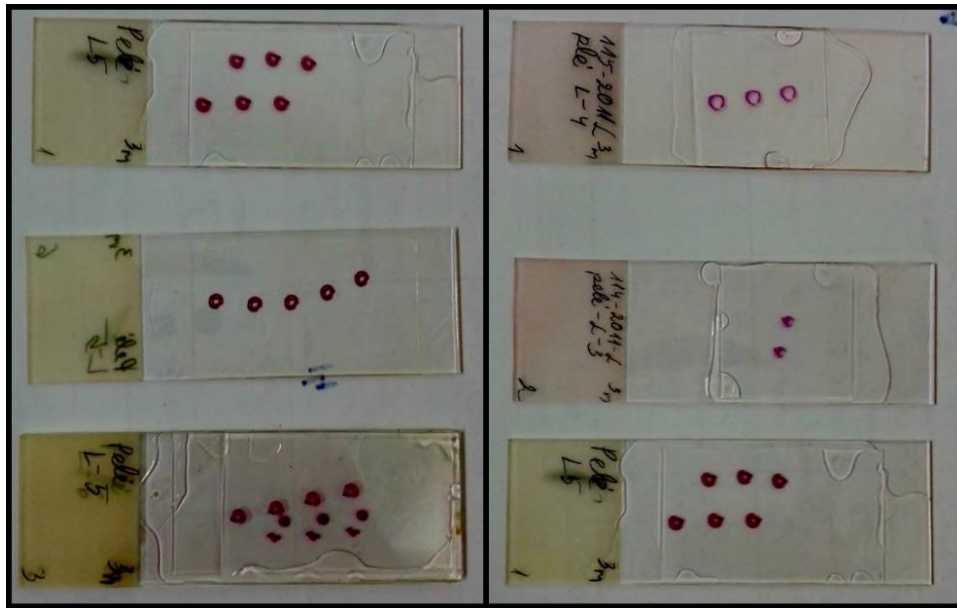
### 3 TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

#### 3.1 Uždegimo modeliavimas eksperimentiniuose gyvūnuose

Atliekant daugiaveiksmių ligų, tokių kaip epilepsijos, vėžio, cukrinio diabeto, nutukimo, infarkto ir kt. tyrimus, nagrinėjančius šių susirgimų patogenezę ir etiologiją yra plačiai taikomi gyvūnų eksperimentiniai modeliai. Eksperimentiniuose gyvūnuose modeliuojant ligą gaunamas diagnostikai reikšmingas laipsniškas žarnų audinių kaitos procesas, kuris ir išryškina pagrindinius diagnostikos simptomus. Taigi storosios žarnos uždegimo modelis buvo įgyvendintas ir ištirtas pasinaudojus LSMU (Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto) VA (Veterinarijos Akademija) vivariumo (Kaunas, Lietuva) laboratorinėmis pelėmis – patinėliais, kurių amžius eksperimento pradžioje buvo 6-8 savaitės, o vidutinis svoris 16-21g. Pelės laikytos 12 valandų šviesos ir tamsos ciklo kambaryje, kuriame buvo palaikoma 22°C temperatūra. Gyvūnai buvo šeriami pagal standartinę dietą, o vanduo buvo neribojamas ir laisvai prieinamas. Eksperimentą patvirtino Lietuvos bioetikos komitetas (protokolas nr. 0201) [19,26].

Eksperimentinių pelių žarnyną veikiant DSS (angl. „Dextran Sulfate Sodium“ - natrio dekstrano sulfato) tirpalu, kuris sukelia žarnyno uždegimą, gaunami histologinių vaizdų masyvai, parodantys įvairias UŽL stadijas. Šis uždegimas pasireiškęs pelėse yra artimas žmogaus žarnyno uždegiminėms ligoms. Siekiant sukelti uždegimą, pelės buvo girdomos 2,5% DSS ištirpinto distiliuotame vandenyje tirpalu, kurio jos gerdavo tiek, kiek norėdavo. Norint gauti kuo įvairesnius rezultatus, eksperimentiniai gyvūnai buvo padalinti į tris grupes: siekiant sukelti ūminį DSS kolitą, 5 pelės 7 paras buvo girdomos 2,5% DSS tirpalu; siekiant sukelti lėtinį DSS kolitą 3 pelės 5 paras buvo girdomos 2,5% tirpalu, o 6 paras vandeniui, toks ciklas buvo kartojamas 4 kartus (iš viso eksperimentas užtruko 44 dienas); likusios 5 pelės buvo paliktos kaip kontrolinė grupė ir buvo girdomos tik grynu vandeniui [7, 25, 26].

Atliekant eksperimento analizę visa storoji žarna buvo išplauta Mg<sup>+2</sup> arba Ca<sup>+2</sup> befosfačiu suminkštintu tirpalu (PBS) ir iškart užfiksuojama neutraliu 10% formalinu, laikant 4 valandas kambario temperatūroje parafininiame suformavimui. Visas traktas buvo padalintas ir supjaustytas į 4 –ūm paeiliui į vienodas dalis, kurios buvo nudažytos hematoksilino – eozino dažais. Nudažyti tiriamieji pjūviai buvo uždengti dengiamaisiais stikleliais, naudojant specialias dengiamąsias terpes. Paruošti mikroskopiniam tyrimui mėginiai pavaizduoti 3.1 iliustracijoje [26].

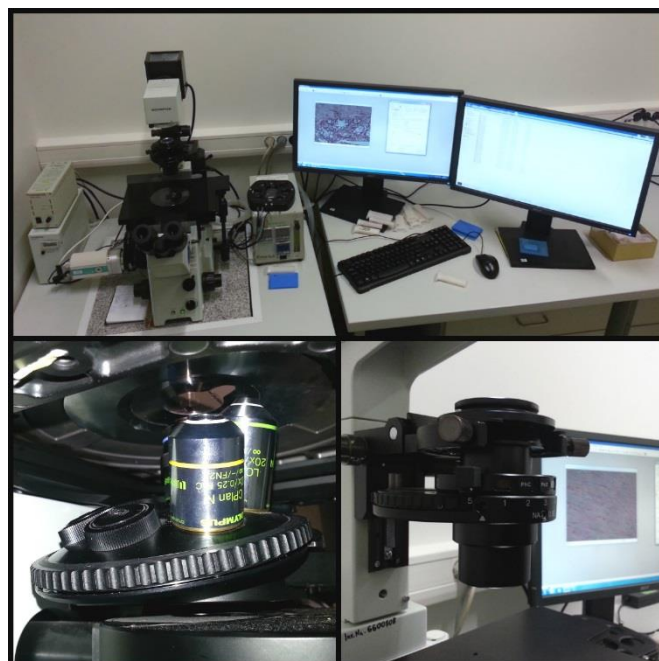


3.1 pav. Dažyti tiriamieji pjūviai paruošti mikroskopiniam tyrimui.

Šioje iliustracijoje matyti maža dalis tyrimams panaudotų skirtingo uždegiminio audinio, o taip pat sveiko audinio preparatų mėginių paruoštų mikroskopiniams tyrimams.

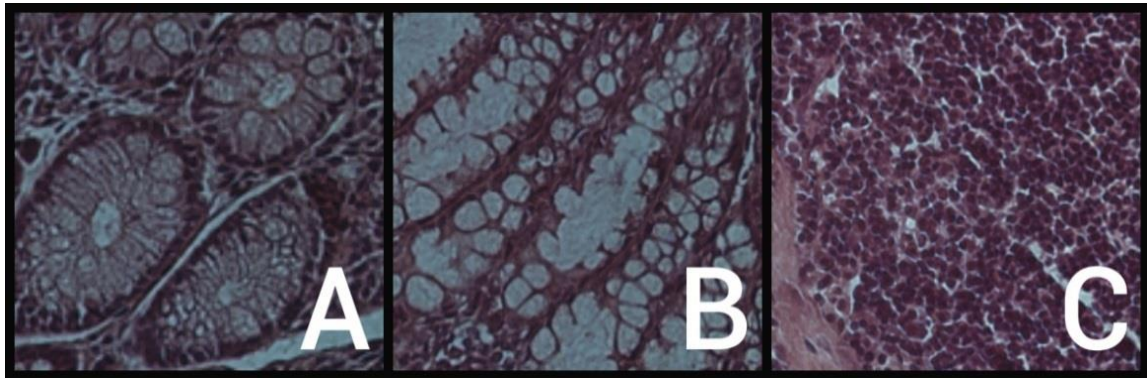
### 3.2 Histologinių preparatų vaizdų registravimas

Histologiniams žarnyno audinių vaizdams registruoti naudojamas OLYMPUS IX71 šviesos mikroskopas su Q IMAGING EXI aqua vaizdo kamera.



3.2 pav. OLYMPUS IX71 šviesos mikroskopas su Q IMAGING EXI aqua vaizdo kamera.

Šis vaizdų registravimas buvo atliekamas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Neuromokslų instituto biochemijos laboratorijoje. Dalis vaizdų registravimui naudojamos įrangos pavaizduota 3.2 iliustracijoje. Vaizdai registruoti 1392x1040 raiška, naudojant 40 kartų didinimą. Tai didžiausias naudojamo mikroskopo galimas didinimas. Atlikus histologinių vaizdų registravimą. Buvo gauti daugiau kaip trys šimtai dvidešimt įvairaus uždegiminio sunkumo, histologinių preparatų vaizdų fragmentai. Šių fragmentų pavyzdžiai pateikti 3.3 ir 3.4 iliustracijose.



3.3 pav. Užregistruotų histologinių preparatų vaizdų fragmentai: A – kontrolinė grupė, B – lėtinio uždegimo grupė , C – ūmaus uždegimo grupė .

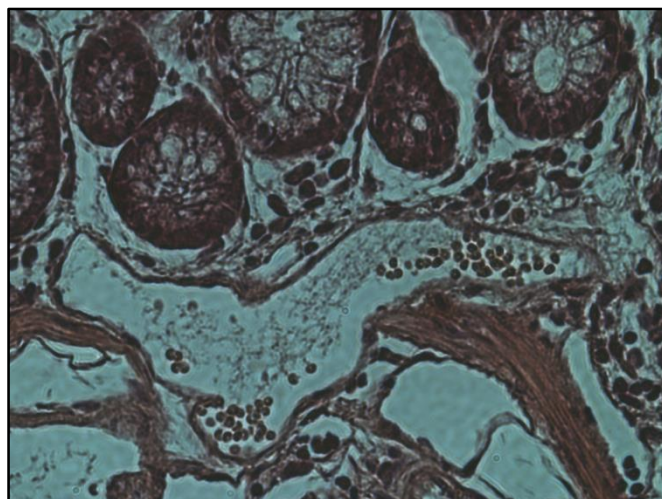
Šešioliktoje iliustracijoje, pateikti trys skirtingi histologinių preparatų vaizdų fragmentai. Vizualiai vertinant šias nuotraukas, puikiai matomi akivaizdūs audinių struktūrų skirtumai, tarp sveikos grupės preparato, lėtinio uždegimo grupės preparato, bei ūmaus uždegimo preparato vaizdų.

Kontrolinės grupės preparatų vaizduose matyti sveika audinio struktūra, vienas greta kito taisyklingai išsidėstę, kokonai (kriptos). Kriptas jungia tarpląstelinis audinys (3.3; A pav.)

Lėtinio uždegimo grupės preparatų vaizduose matomas epitelinio audinio paviršiaus irimas, dauguma kriptų praradusios taisyklingą savo forma, dalis jų - pratrūkusios.(3.3; B pav.).

Lėtinio uždegimo grupės preparatų nuotraukose visai nebesimato gleivinėje buvusių kriptų, vietoj aiškios audinio struktūros yra atsiradus neaiški, sunkiai nusakoma audinio bei ląstelių visuma (3.3; C pav.).

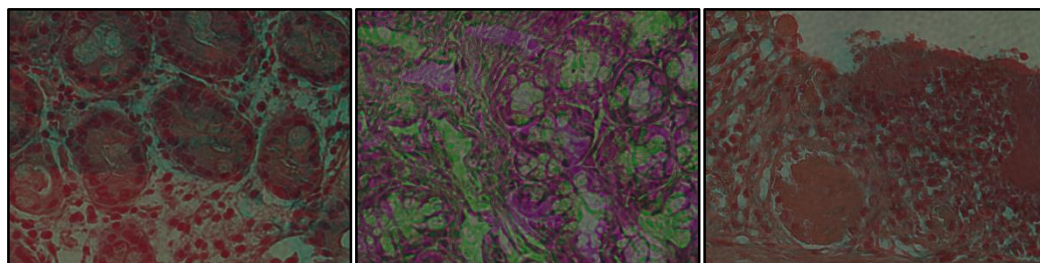
Taigi šiose iliustracijose puikiai matomi audinio struktūros pokyčiai, o 3.4 iliustracijoje galima įžvelgti žarnos audiniuose esančias ląsteles.



3.4 pav. Užregistruoto lėtinio uždegimo grupė histologinio preparato vaizdo fragmentas.

3.4 iliustracijoje be lėtinio uždegimo grupei būdingų histologinės struktūros pokyčių, galima matyti ir audinyje esančias įvairias ląsteles, tačiau nesant įgudusiam specialistui - histologui, identifikuoti jas, vizualinio vertinimo metodu, yra be galo sudėtinga. Ko pasėkoje, buvo kuriamas metodas automatiniam uždegimo metu atsiradusių ląstelių identifikavimui. Kaip jau buvo minėta, Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Neuromokslų instituto biochemijos laboratorijoje buvo užfiksuota daugybė histologinių preparatų vaizdų fragmentų, su kuriais ir buvo dirbama toliau.

Atlikus užregistruotų histologinių preparatų vaizdų vizualinę analizę, buvo rasta tolimesnei analizei netinkamų vaizdų (3.5 pav.). Dėl blogo fokusavimo, neturintys pakankamo ryškumo, su įvairiais triukšmais, ar su pašalinėmis preparatų priemaišomis, dalis vaizdų buvo atmesta. Geriausios kokybės, tinkamų tolimesniems tyrimams, buvo atrinkta 140 nuotraukų, kuriose geriausiai matėsi ląstelių struktūra.



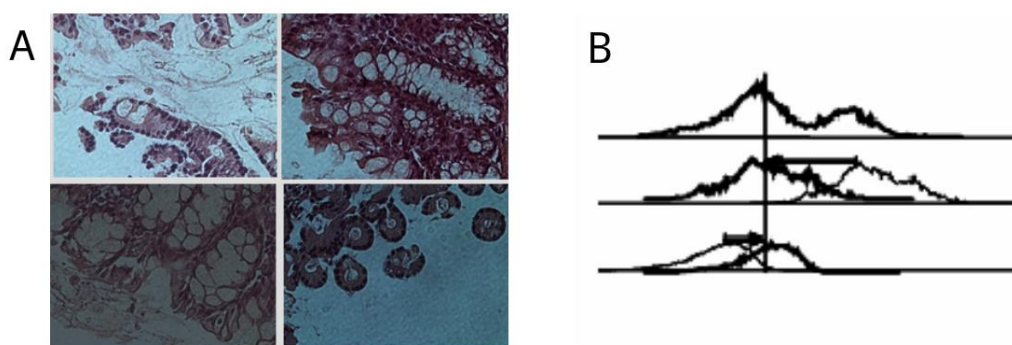
3.5 pav. Tolimesnei analizei netinkamų vaizdų pavyzdžiai.

Taigi atrinkus vaizdus tolimesniems tyrimams kuriuose visi struktūriniai audinių elementai buvo neiškraipyti ir gerai matomi toliau buvo atliktas pirminis vaizdų apdorojimas.



### 3.3 Pirminis vaizdų apdorojimas

Tyrinėjant gautus histologinių vaizdų fragmentus, buvo pastebėti apšvietimo neatitikimai, kurie yra nepageidaujami tolimesnės analizės metu. Nevienodas apšvietimas analizuojamose nuotraukose buvo panaikintas atliekant pirminį apdorojimą. Šiam tikslui, histogramų sulyginimo metodu [27, 28] panaudojant MATLAB programinį paketą atliktas turimų vaizdų apšvietimo suvienodinimas. Iš pasirinktos etaloninės nuotraukos buvo iškirptas plotas be audinio (vaizde baltos spalvos zona), pagal kurios histogramos viršūnę (maksimumą) toliau buvo daromas sulyginimas. Tam tikslui buvo iškirptas kiekvieno histologinio vaizdo fragmento šviesios spalvos plotai ir gautos jų histogramos buvo sulygintos kryžminės koreliacijos pagalba su etaloninės nuotraukos iškarpos be audinio histogramos viršūnę. Tokiu būdu analizuojamos histologinių preparatų nuotraukos transformuotos į vienodo apšvietimo vaizdus [28].



3.6 pav. A) žarnyno audinių mikroskopinės nuotraukos. B) histogramų sulyginimas.

3.6 iliustracijoje pateiktos tipinės analizuojamų nuotraukų su nevienodu apšvietimu (A) ir histogramų sulyginimo pavyzdys. Po tokio sulyginimo, transformavus visus analizuojamus vaizdus į vienodo apšvietimo, buvo ieškoma optimali spalvų erdvės transformacija, kurioje maksimaliai įmanomai išryškėtų mus dominantys uždegiminės ląstelės.

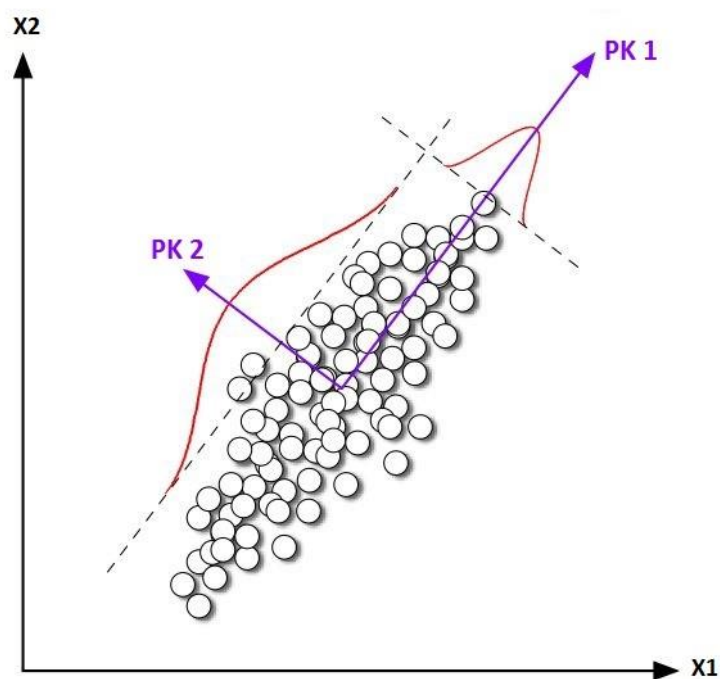
#### 3.3.1 Vaizdų transformacija į optimalią spalvų erdvę

Įprasti spalvoto vaizdo pikseliai yra atvaizduoti kaip taškai ortogonalioje RGB (*R-red* – raudona, *G-green* – žalias, *B-blue* – mėlyna.) erdvėje. Visi tos pačios spalvos, bet skirtingų intensyvumų taškai yra rodomi kartu su tam tikra kryptimi į RGB. Taigi galima rasti optimalią transformaciją tikros RGB erdvės, kad viena iš naujosios koordinatinių sistemos ašių eitų kartu šia kryptimi atstovaujanti

uždegiminė ląstelė spalvą. Tokią transformaciją galima rasti naudojantis pagrindine komponentių analize [29].

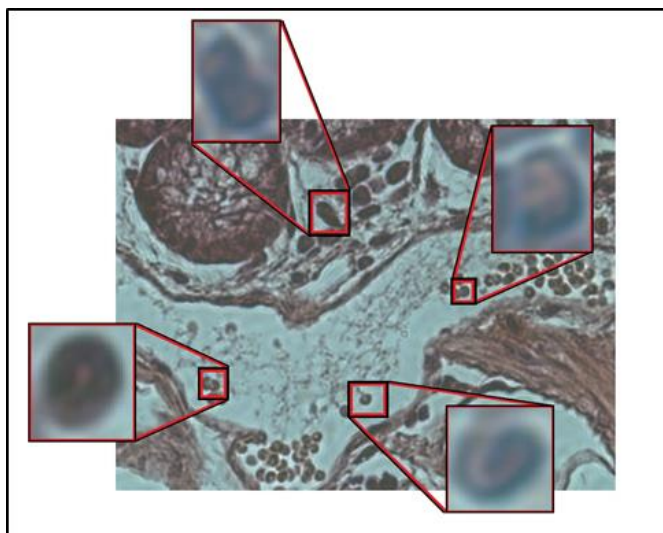
Pagrindinių komponentių analizė (PKA, *principal component analysis, PCA*) - tai klasikinis matematinės statistikos metodas. Kitaip apibūdinama kaip tiesinė duomenų transformacija, naudojama duomenų analizei kaip daugiamačių duomenų matmenų skaičiaus mažinimo metodas. Metodo tikslas – rasti didžiausios dispersijos kryptį. Didžiausią dispersiją turinti kryptis yra pirmoji pagrindinė komponentė (PK1). Ji eina per duomenų centrinį tašką [29,30].

Tai taškas, kurio komponentės yra analizuojamą duomenų aibę sudarančių taškų atskirų komponentių vidurkiai. Visų taškų vidutinis atstumas iki šios tiesės yra minimalus, t. y. ši tiesė yra kiek galima arčiau visų duomenų taškų. Antrosios pagrindinės komponentės (PK 2) ašis taip pat turi eiti per duomenų centrinį tašką ir ji turi būti statmena pirmosios pagrindinės komponentės (PK 1) ašiai (nekoreliuota), (3.7 pav.). Esminė PKA idėja yra sumažinti duomenų dimensiją kiek galima tiksliau išlaikant duomenų dispersijas [29,30].



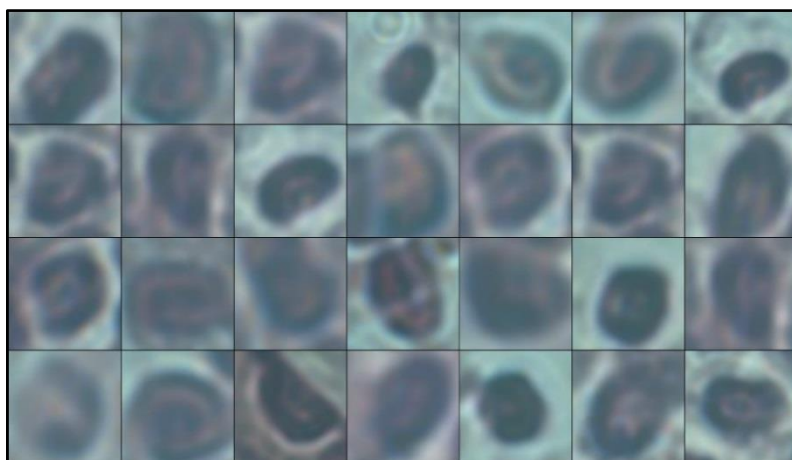
3.7 pav. Pirmoji (PK 1) ir antroji (PK 2) pagrindinės komponentės

Tolesnei analizei, buvo išskirta daugiau kaip 500 tariamų uždegiminių ląstelių vaizdų. Išskyrimo procesą iliustruojantis paveikslas pateiktas 3.8 pav.



3.8 pav. Tariamų uždegiminių ląstelių vaizdų iškirpimo pavyzdys.

Iš šių vaizdų, histologai ekspertai pažymėjo 59 tikrųjų uždegiminių ląstelių plotus originaliose žarnyno histologiniuose vaizduose (3.9 pav.). Būtent šie 59 atrinkti vaizdai toliau buvo naudojami pagrindinių komponentų analizėje.



3.9 pav. Išskirti uždegiminių ląstelių plotai žarnyno histologiniuose vaizduose.

Iš šių 59 vaizdų, buvo atrinkta nuotrauka su maksimaliais dydžio parametrais (didžiausiais matmenimis) ir su *imresize* funkcija, MATLAB programinio paketo pagalba visi vaizdai buvo transformuoti į vienodo dydžio vaizdus.

Ekspertų atrinkti histologinio preparato uždegiminės ląstelės 59 vaizdai susidedantys iš trijų raudonos (angl. *R* - red), žalios (angl. *G* - green) ir mėlynos (angl. *B* - blue) spalvų pikselių verčių dvimačių masyvų buvo transformuoti į vienmačius masyvus. PKA analizei skirta duomenų matrica *X* buvo suformuota iš trijų vektorių, kurie susideda iš kiekvieno vaizdo iškarpos raudonos (R), žalios (G) ir mėlynos (B) spalvų pikselių verčių. Pirmas vektorius buvo suformuotas iš visų 59 vaizdų

raudonos (R) pikselių verčių sugrupuotu paeiliui. Antras ir trečias vektorius buvo suformuoti analogiškai, tik iš žalios (G) ir mėlynos (B) spalvų pikselių verčių.

$$X = \begin{bmatrix} X_{R1} & X_{R2} & \cdots & X_{Rn} \\ X_{G1} & X_{G2} & \cdots & X_{Gn} \\ X_{B1} & X_{B2} & \cdots & X_{Bn} \end{bmatrix} \quad (3.3.1)$$

Čia  $X$  – duomenų matrica. Matricos  $X$  stulpeliai – duomenų parametrai,  $X$  eilutės – daugiamačiai vektoriai.

Pagrindinių komponentių analizės metu originalus vaizdas paverčiamas nauja kintamųjų erdve maksimaliai padidinant nuokrypį ir sutelkiant koreliuotus originalius kintamuosius [29, 31, 30]. Jeigu uždegiminių ląstelių zonų pikselių vertės gana daug prisideda prie bendros vaizdo pikselių verčių sklaidos, galima tikėtis, kad pirmasis arba bent jau vienas iš pirmų naujų kintamųjų (pagrindinių komponentių) maksimaliai padidins uždegiminių ląstelių plotų kontrastą palyginti su likusiu vaizdu. Originalaus vaizdo  $X$  erdvinę koreliaciją galima įvertinti:

$$R_x = \frac{1}{3N} X * X^T \quad (3.3.2)$$

Tikrinių verčių radimui naudojam tikrinių vektorių ir  $R_x$  tiesinę daugdarą:

$$\Psi * \Lambda = R_x * \Psi \quad (3.3.3)$$

Čia  $\Lambda$  yra tikrinių verčių matrica, kurios vertės išrūšiuotos mažėjančia tvarka, o  $\Psi$  yra atitinkama tikrinio vektoriaus matrica. Matrica  $\Psi$  apibūdina ortonormalią transformaciją, taikomą originaliems duomenims  $X$  siekiant gauti transformuotą vaizdą, kurio eilėse būtų  $X$  pagrindinės komponentės [30].

$$Y = \Psi^T * X \quad (3.3.4)$$

Pagrindinės komponentės buvo vėl pakeistos į dvimačius masyvus ir pateiktos ekspertams. Kontrasto ir triukšmo santykis įvertintas pagal (3.3.5) formulę pirmoje pagrindinėje komponentėje, kurioje uždegiminių ląstelių zonos matosi aiškiausiai. Pagrindinių komponentių analize paremtas uždegiminių ląstelių vaizdo išankstinis apdorojimas žymiai padidina uždegiminių ląstelių zonos kontrasto ir triukšmo santykį vykdant tolesnius automatinius aptikimus bei apžiūrą [29].

$$C = \frac{|M_l - M_n|}{s_n} \quad (3.3.5)$$

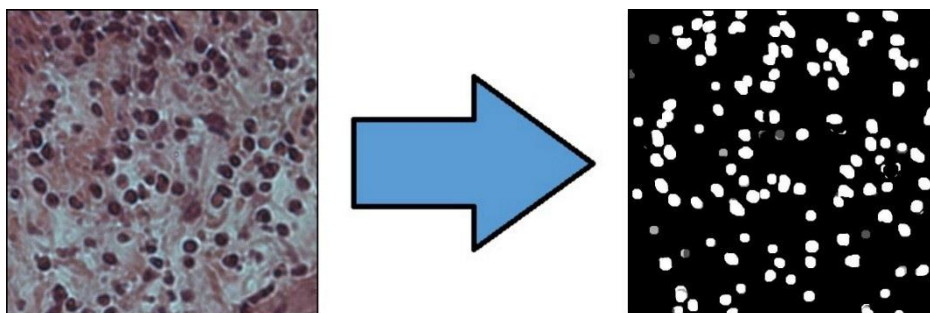


Čia  $M_1$  – pikselių vertė uždegiminės ląstelės plote,  $M_n$  – pikselių vertė histologinio audinio be uždegiminės ląstelės plote,  $S_n$  - histologinio audinio be uždegiminės ląstelės ploto pikselių standartinis nuokrypis.

### 3.4 Tikėtinų uždegiminių ląstelių sričių išskyrimas vaizduose

Atlikus optimalią spalvų transformaciją, buvo imtasi ieškoti tikėtinų uždegiminių ląstelių plotų turimuose histologiniuose vaizduose. Kadangi išryškėjo ieškomų ląstelių kontrastas, buvo nuspręsta tolimesniam vaizdų apdorojimui, taikyti granulometriją.

Tradicškai, histologiniai tyrimai yra atliekami mikroskopiniame lygmenyje. Analizė apima ląstelių dydžio ir formos matavimus bei jų išsidėstymą. Naudojant mikroskopijos metodus, ląstelės dažniausiai gali būti identifikuojamos, taip pat gali būti pamatuojami kiekvienos ląstelės morfologiniai parametrai. Tiriant ląsteles mikroskopijos metodu, jos gali būti sunkiai individualizuotos dėl rezoliucijos trūkumo ir galimo kelių ląstelių sluoksnių persidengimo. Tačiau ląstelių dydžio ir orientacijos svyravimai dažnai išsiskiria stebint vizualiai. Tokiais atvejais, vaizdo tekstūros analizė yra alternatyva kiekybinei individualių ląstelių morfologijai. Vaizdo tekstūra gali būti apibrėžta kaip erdvinis pilkos spalvos lygių vaizdų išsidėstymas [32]. Ko pasekoje tolimesniam uždegiminių žarnyno audinių vertinimui pasinaudojus MATLAB įrankiu buvo atlikta vaizdų apdorojimo bei vertinimo metodika - granulometrija (angl. *granulometry*). Ši metodika leidžia kiekybiškai įvertinti audinių struktūrą sudarančių elementų kiekybę - apskaičiuoti tam tikrų smulkių objektų dydžio pasiskirstymą skaitmeniniuose vaizduose [33, 32]. Šiuo būdu apdoroto histologinio žarnyno audinių vaizdo pavyzdys pateiktas 3.10 paveiksle. Šiuo atveju granulometrija leidžia greitai išskirti potencialias vietas su ieškomomis imuninėmis ląstelėmis.



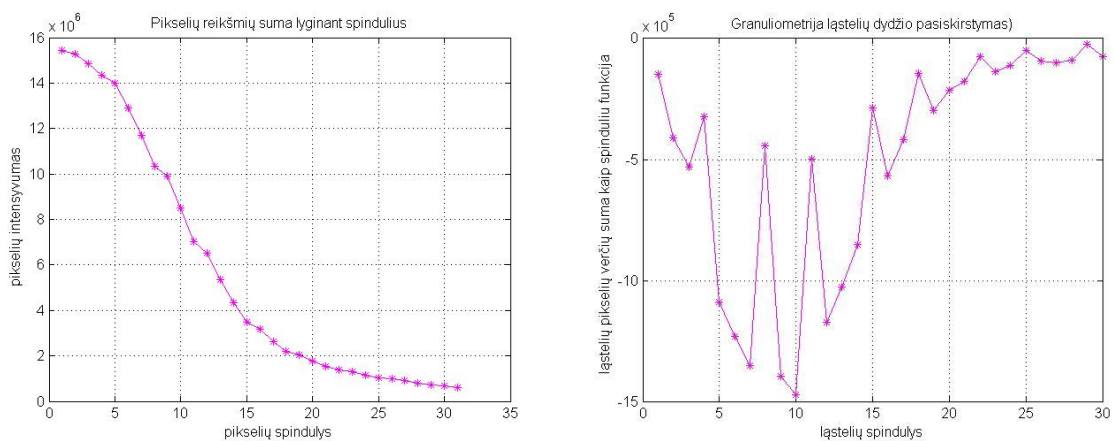
3.10 pav. Vaizdo apdorojimas taikant granulometrijos metodą.

Ląstelių dydis, forma ir struktūra dažnai yra nagrinėjama ryšium su jų savybėmis. Mikroskopai leidžia įsisavinti tipiškas skirtingų audinių ląstelių reprezentacinių nuotraukų gausybę. Įprastas būdas

vaizdo analizėje yra identifikuoti ląsteles, išmatuoti ir įvertinti jų dydį ir formą. Mikroskopinėse nuotraukose ląsteles gali būti sunku segmentuoti. Alternatyva yra išgauti morfologinę informaciją tiesiogiai iš pilko lygio vaizdų naudojant vaizdo tekstūros analizės metodus. Taigi dėl to buvo nuspresta naudoti pilkumo lygio granulometriją sukurtą naudojant matematinius morfologinius įrankius šiame kontekste tam, kad būtų išskirta potencialios uždegiminių ląstelių vietos histologiniuose žarnyno vaizduose.

Granulometrijos metodu buvo apdoroti visi vaizdo fragmentai, gauti atlikus pagrindinių komponentų analizę. Pirmas žingsnis atliekant granulometriją buvo maksimizuoti vaizdų kontrasto intensyvumą. Tai buvo atliekama pasinaudojus MATLAB programinio paketo funkciją *adapthisteq*, kuri atlieka adaptyvų histogramos išlyginimą [34]. Vėliau tirinėjamas vaizdas koreguojamas panaudojant funkciją *imadjust* [35], taip, kad nuotraukos pikselių minimalios ir maksimalios vertės sudarytu tik 1% visų reikšmių. To pasekoje pasiekiamas maksimalus kontrastas. Paskutiniame žingsnyje matematinės morfologijos pagalba, MATLAB programinio paketo funkcijų *imopen* ir *imclose* (parinkus struktūrinio elemento dydį pagal spėjamą uždegimines ląstelės matmenis) [36, 37], vaizde išskiriamos tikėtinos uždegiminių ląstelių vietos.

Šis metodas leidžia skaičiavimus tiesiai iš pilko lygio vaizdų granulometrinių kreivių, kurios nusako ryšį tarp pilkumo lygio kitimo ir objekto dydžio, be vienas kito identifikavimo. Metodas gali būti taikomas visam vaizdui, ar tik konkrečiam dominančiam regionui.

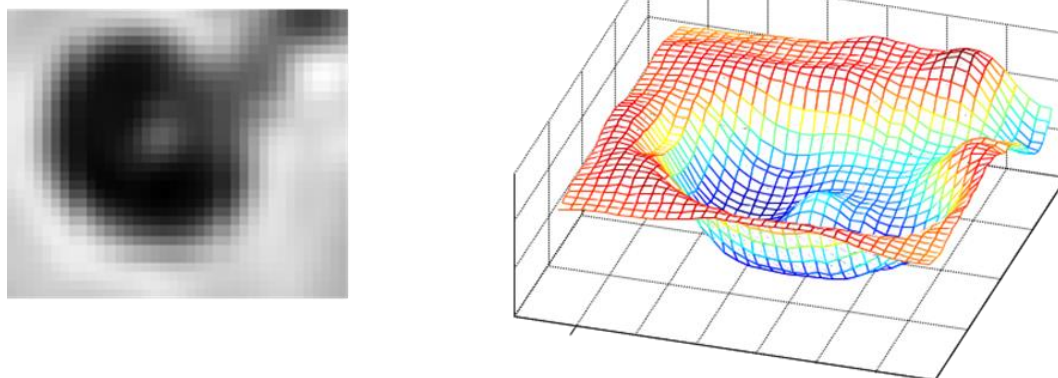


3.11 pav. Granulometrijos metodo taikymo metu gautų grafikų pavyzdžiai, atspindintys vaizdo pikselių vertes.

### 3.5 Uždegiminių ląstelių skiriamųjų požymių radimas

Buvo skaičiuojami šie granulometrijos metodu išskirtų uždegiminių ląstelių sričių standartiniai struktūros išskyrimo požymiai.

Granulometrijos išskirtų vietų, po optimalios spalvos radimo buvo rasti tokie vaizdai:



3.12 pav. Iliustracijos kairėje pavaizduota po granulometrijos procedūros išskirta potenciali uždegiminės ląstelės vieta, iliustracijos dešinėje šio vaizdo fragmento dvimatis vaizdas ( x ašis – vaizdo taškų adresas, y ašis - intensyvumas).

Iš šio paveiksluko buvo skaičiuojama:

1) Entropija

$E = \text{entropy}(I)$ , gražina E, skaliarinė vertė reiškia pilkos skalės vaizdo I entropiją. Entropija yra statistinis atsitiktinumo matas, kuris gali būti panaudojamas apibūdinti pradinio vaizdo struktūrą. Entropija apibūdinama kaip  $-\sum(p_i \cdot \log_2(p_i))$ , kur p talpina histogramos skaičiavimo rezultata.

2) Vidurkis

3) Standartinis nuokrypis

4) Ekscesas (vaizdo histogramos)

Imties eksceso koeficientas (kurtosis) yra histogramos lėkštumo matas:

$$g_2 = \frac{m_4}{s^4} - 3 \quad (3.5.1)$$

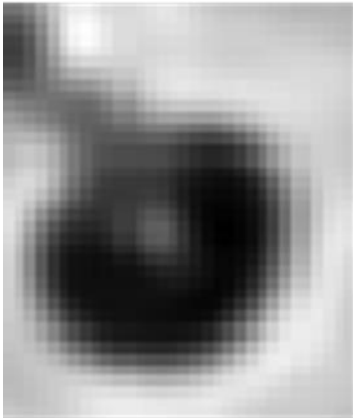
Jeigu  $g_2=0$ , tai sklaida apie vidurkį tokia pati kaip ir normaliosios kreivės. Jeigu  $g_2>0$  – histograma smaila t.y. duomenų sklaida apie vidurį yra mažesnė nei normaliosios kreivės (tankio grafikas dešinėje). Jeigu  $g_2<0$ , tai histograma lėkšta, t.y. duomenų sklaida apie vidurį didesnė nei normaliosios kreivės atveju (tankio grafikas kairėje).

5) Asimetrijos koeficientas (vaizdo histogramos)

Inties asimetrijos koeficientas(*skewness*):

$$g_1 = \frac{m_3}{s^3} \quad (3.5.1)$$

Asimetrijos koeficientas yra histogramos simetrijos matas. Jeigu  $g_1 > 0$ , tai histogramos asimetrija teigiama, jeigu  $g_1 < 0$ , tai asimetrija neigiama. Histograma simetriška, kai  $g_1 = 0$ . Jei  $g_1 > 0$  ( $g_1 < 0$ ), tai  $x > M_d$  ( $x < M_d$ ).



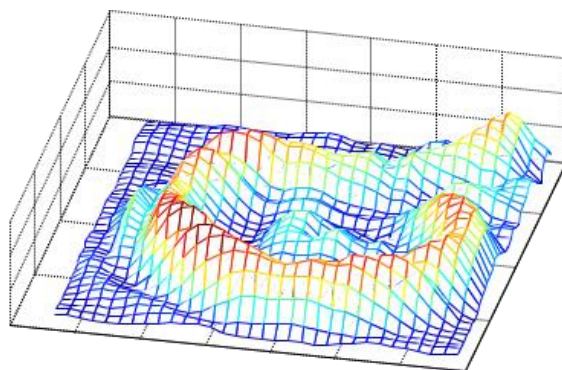
3.13 pav. Iliustracijos kairėje pavaizduota uždegiminės ląstelės vieta po PKA procedūros, iliustracijos dešinėje šio vaizdo fragmento binarinis juodai baltas vaizdas (0 ir 1).

Vaizdas buvo paverstas į juodai baltą vaizdą (0 ir 1) ir skaičiuojami šie parametrai:

6) *Extent* – išskirto branduolio ploto santykis su mažiausiu įmanomu jį apribojančiu stačiakampio plotu.

7) *Solidity* - išskirto branduolio ploto santykis su mažiausiu įmanomu jį apribojančiu daugiakampio plotu.

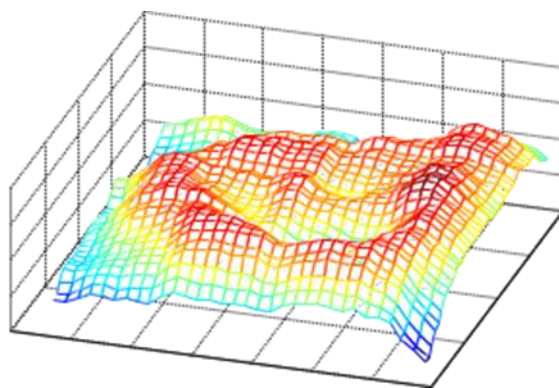
8) Branduolio ploto ir perimetro santykis.



3.14 pav. Iliustracijos kairėje pavaizduota uždegiminės ląstelės vieta po *rangefilt* procedūros, iliustracijos dešinėje šio vaizdo fragmento dvimatis vaizdas ( x ašis – vaizdo taškų adresas, y ašis - intensyvumas).

Uždegiminės ląstelės vieta po PKA nufiltruojama *rangefilt* ir skaičiuojami šie parametrai [38]:

- 9) Entropija
- 10) Vidurkis
- 11) Standartinis nuokrypis
- 12) Ekscesas (vaizdo histogramos)
- 13) Asimetrijos koeficientas (vaizdo histogramos)



3.15 pav. Iliustracijos kairėje pavaizduota uždegiminės ląstelės vieta po *entropyfilt* procedūros, iliustracijos dešinėje šio vaizdo fragmento dvimatis vaizdas ( x ašis – vaizdo taškų adresas, y ašis - intensyvumas).

Uždegiminės ląstelės vieta po PKA nufiltruojama *entropyfilt* ir skaičiuojami šie parametrai [39]:

- 14) Entropija
- 15) Vidurkis
- 16) Standartinis nuokrypis
- 17) Ekscesas (vaizdo histogramos)
- 18) Asimetrijos koeficientas (vaizdo histogramos)

*Rangefilt* ir *entropyfil* buvo pasirinkti dėl to, kad tai tipinės vaizdo tekstūrinės analizės išskyrimo funkcijos [38, 39].

### 3.6 Reikšmingiausių uždegiminių ląstelių požymių išskyrimas

Toliau buvo pritaikyta diskriminantinės analizės metodika, leidžianti išskirtą ląstelę priskirti vienai iš grupių, pagal ją apibūdinančius duomenis. Mūsų atveju iš turimų duomenų sprendėme ar ląstelė yra uždegiminė, ar ne. Tai daugiamatės statistikos analizės metodas, priskiriantis tam tikrą objektą vienai iš kelių iš anksto apibrėžtų grupių. Diskriminantinės analizės tikslas yra remiantis objekto kintamaisiais, kurie vadinami požymiais, kaip galima tiksliau nustatyti nežinomo objekto (ląstelės iškarpos) klasę. Šie požymiai turi būti išmatuoti santykių arba intervalinėje skalėse. Diskriminantinės analizės modelis yra sudaromas, panaudojus išanalizuotų objektų, kurių klasės jau žinomos, požymius. Vėliau modelis taikomas nežinomo objekto klasei prognozuoti. Objekto priskyrimas klasei dar vadinamas klasifikavimu. Diskriminavimo tikslas – nustatyti požymius, padedančius atskirti tiriamų objektų grupes bei įvertinti diskriminavimo kokybę. Taigi diskriminavimas yra susijęs su priklausomybės struktūros analize. Klasifikavimo tikslas – remiantis požymių matavimais, objektus priskirti vienai iš grupių bei įvertinti klasifikavimo patikimumą. Konkreti prognozė – klasifikavimo uždavinio dalis [40, 41].

Diskriminantinė analizė siekia dviejų tikslų:

1. Įvertinti grupių diskriminavimo galimybes.
2. Rasti optimalias klasifikavimo taisykles [40].

Tiesinė diskriminantinė analizė yra naudojama tada, kai norime rasti tiesines kombinacijas bruožus, požymius, kurie geriausiai atskiria (izoluoja) du ar daugiau klasių, objektų arba atsitiktinių įvykių. Rezultate kombinacijos gali būti naudojamos kaip tiesinis klasifikatorius arba matuojamasis mažėjime aukščiau vėliausios klasifikacijos. LDA tinka, kai objektų stebėjimų požymiai yra iki galo kiekybiniai (išmatuojami). Diskriminantinė analizė padeda pagal intervalinių kintamųjų reikšmes nuspręsti apie objekto priklausomybę vienai iš keleto grupių. Visais atvejais tenka spręsti atskiriamumo (diskriminavimo) ir (arba) klasifikavimo uždavinius. Diskriminantinės analizės nereikia painioti su klasterine – skirtingai nei klasterinėje analizėje, čia iš anksto yra žinomas grupių skaičius, be to, yra „mokymo imtis“, t.y. informacija apie dalies tiriamųjų objektų požymių reikšmes ir priklausomybę vienai ar kitai grupei [41]. Šiuo atveju histologo eksperto nustatytų uždegiminių ląstelių apskaičiuoti tam tikri įverčiai. Skiriami šie pagrindiniai diskriminantinės analizės etapai:

1. Nustatoma, kurie kintamieji tinka tiriamų objektų diskriminavimui. Pašalinami kintamieji, nepadedantys nustatyti grupių skirtumų;
2. Sudaromas diskriminantinės analizės modelis, remiantis objektų, kurių klasės žinomos, atrinktais požymiais;
3. Įvertinama diskriminavimo kokybė;

4. Parenkamas labiausiai tinkamas klasifikavimo būdas. Sudaromos klasifikavimo taisyklės.
5. Įvertinamas klasifikavimo patikimumas. Sudaromos klasifikavimo lentelės. Skaičiuojami klaidingos klasifikacijos tikimybių įverčiai [40].

Jeigu duomenys yra tinkami diskriminantinei analizei, tai toliau sudaromas diskriminantinės analizės modelis. Nustatoma, kurie objektai tinka tiriamų objektų diskriminavimui. Yra pašalinami kintamieji, nepadedantys nustatyti grupių skirtumų. Objektų kintamieji turi būti nepriklausomi, matuojami santykių arba intervalinėje skalėje ir pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį. Klasių skaičius turi būti baigtinis, klasės negali būti priklausomos ar turėti bendrų objektų. Požymiai, kurie netenkina šių sąlygų, pašalinami. Taip pat atmetami ir požymiai, kurie neatspindi skirtumų tarp grupių. Sekančiame skyrelyje aprašoma koku būdu sudaromas diskriminantinės analizės modelis bei duomenų tinkamumo diskriminantinei analizei tyrimas ir atranka [40].

Specifinė branduolio struktūra yra pagrindinis požymis identifikuojant imuninę ląstelę. Mes naudojome diskriminantinę analizę iš pagrindinių aprašomųjų statistinių pikselių verčių parametrų (spindulys, histogramos asimetrija, entropija ir t.t.) identifikuoti, ar analizuota potenciali vieta turi uždegiminę ląstelę ar ne. Pirmiausiai buvo nustatyti, kurie duomenys tinka tiriamų objektų diskriminavimui ir pašalinami, nepadedantys nustatyti grupių skirtumų. Tam, kad sužinoti, ar kintamasis statistiškai reikšmingai diskriminuoja grupes, buvo tikrinama tokia statistinė hipotezė [41]:

$$\begin{cases} H_0: \mu_{i1} = \mu_{i2} = \dots = \mu_{ig}, \\ H_1: \mu_{ik} \neq \mu_{il} \text{ bent viena } i \text{ porai } (k \neq l); \end{cases} \quad (3.6.1)$$

čia  $k, l = 1, \dots, g$ .

Skaičiuojama statistika:

$$F_i = \frac{(t_{ii} - w_{ii})(n - g)}{w_{ii}} \quad (3.6.2)$$

Jeigu  $F_i > F_{\alpha/2}(g - 1, n - g)$  hipotezė  $H_0$  atmetama.

Atrinkus visus reikšmingus uždegiminę ląstelę apibūdinančius žymenys diskriminuojame atsižvelgiant į juos visus. Paprasčiausias būdas – paimti jų tiesinę daugdarą (3.6.3). Mūsų tikslas – koeficientus  $l$  parinkti taip, kad vidurkiai grupėse kuo labiau skirtųsi [41].

$$Y_i = l_1^i X_1 + l_2^i X_2 + \dots + l_p^i X_p + C_i \quad (3.6.3)$$

Kur  $l_j^i$  yra funkcijos (daugdaros) koeficientas,  $C_i$  – klaidos koeficientas (funkcijos konstanta),  $X_p$  – analizuojami duomenys [41].

Sekantis etapas - ląstelių klasifikavimas. Pagrindinė klasifikavimo idėja – objektas priskiriamas tai grupei, nuo kurios centro (grupės centras, t.y. grupės stebėjimų vidurkių vektorius) nutolęs mažiausiai. Atstumo matas – Mahalanobio atstumas (3.6.4) [40, 41].

$$\Delta^2 = (\vec{\mu}_1 - \vec{\mu}_2)' \Sigma^{-1} (\vec{\mu}_1 - \vec{\mu}_2) \quad (3.6.4)$$

Diskriminantinė analizė buvo atlikta „IBM SPSS statistic 20 – version“ programiniu paketu (angl. *Statistical Package for the Social Sciences*) – tai vienas labiausiai paplitusių statistinės informacijos apdorojimo programinių paketų, tinkamų ir pradedančiajam, ir patyrusiam vartotojui.

Norėdami įvertinti sukurto metodo tikslumą, kurio dėka siekiama identifikuoti uždegimines ląsteles, buvo pasinaudota matematinės morfologijos būdu išskirtomis, 206 tikėtinomis uždegiminių ląstelių sričių iškarpomis ir paskaičiuoti statistiniai kriterijai – specifiškumas ir jautrumas.

Specifiškumas (angl. *specificity*) – tai rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad neuždegiminės ląstelės ploto tyrimo duomenys patvirtina, jog šis plotas tikrai neuždegiminė ląstelė. Specifiškumas yra santykis tarp neteisingai identifikuotų tyrimo metu ir „auksinio standarto“ metu neteisingai identifikuotų ląstelių. Specifiškumas parodo tyrimo gebėjimą nustatyti, jog uždegiminės ląstelės nėra, kai jos iš tikrųjų nėra, kitaip tariant tai teisingai neigiamų rezultatų dalis iš rezultatų visumos.

Jautrumas (angl. *sensitivity*) – tai rodiklis, apibūdinantis diagnostikos metodo tikslumą ir rodantis tikimybę, kad uždegiminės ląstelės ploto tyrimo duomenys patvirtina uždegiminės ląstelės buvimą. Jautrumas yra santykis tarp teisingai identifikuotų tyrimo metu ir teisingai identifikuotų „auksinio standarto“ būdu ląstelių. Jautrumas parodo tyrimo gebėjimą diagnozuoti uždegiminę ląstelę, kai uždegiminė ląstelė iš tikrųjų yra, kitaip tariant tai teisingai teigiamų rezultatų dalis iš rezultatų visumos.

$$JAUTRUMAS = \frac{TP}{TP+FN} = \frac{92}{92+15} = \frac{92}{107} = 85,6\% \quad (3.6.5)$$

$$SPECIFIŠKUMAS = \frac{TN}{TN+FP} = \frac{80}{80+19} = \frac{80}{99} = 80,8\% \quad (3.6.6)$$



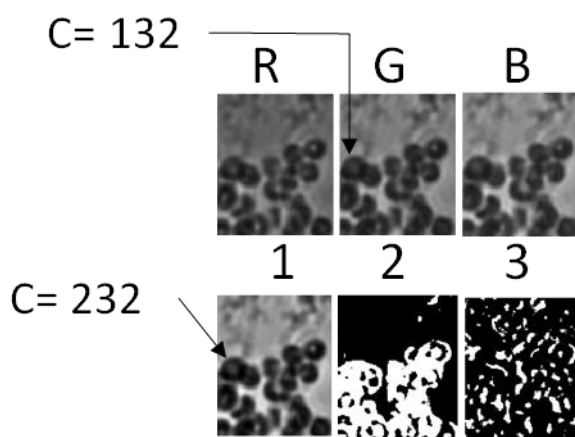
## 4 REZULTATAI

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos, Neuromokslų instituto biochemijos laboratorijoje buvo užregistruoti daugiau kaip 320 histologiniai žarnyno preparatų vaizdai. Pirminio vaizdų apdorojimo metu buvo atlikta vizualinė analizė bei turimų vaizdų apšvietimo suvienodinimas, po kurios tinkamų tolimesniems tyrimams buvo atrinkta 140 vaizdų.

Po vaizdų transformacijos į optimalią spalvų erdvę gautas ženklus kontrasto padidėjimas uždegiminių ląstelių vaizduose.

4.1 iliustracijoje pavaizduotas tipinis histologinio preparato vaizdo, kuriame yra uždegiminių ląstelių, pagrindinių komponentių analizės rezultatas. Trijuose vaizduose viršutinėje eilutėje pavaizduotos originalaus vaizdo raudonos (angl. *red*), žalios (angl. *green*) ir mėlynos (angl. *blue*) komponentės. Apatinėje vaizdų eilutėje pavaizduotos trys pagrindinės šio vaizdo komponentės. Matyti, kad maksimalus vizualinis skirtumas tarp uždegiminių ląstelių ploto ir likusios vaizdo dalies intensyvumo yra pirmojoje pagrindinėje komponentėje. Čia jis atrodo daug didesnis nei originalaus vaizdo žalioje komponentėje.

Buvo paskaičiuota vidutinė maksimalių kontrasto triukšmo skaitinė reikšmė – 132, prie žalios spalvos komponentės originalioje nuotraukoje. Atlikus pagrindinių komponentių analizę, apskaičiuotas kontrastas tose pačiose vietose kaip ir žalios komponentės atveju buvo pakilęs iki 232 ar net daugiau. Tai parodo žymų kontrasto padidėjimą po PKA procedūros.



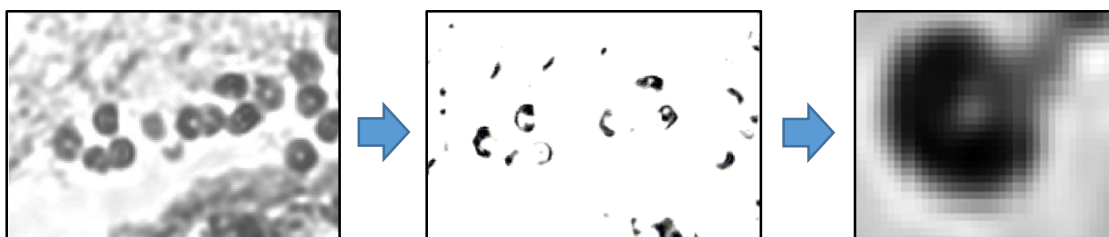
4.1 pav. Originalios R (raudona, angl. *red*), G (žalia, angl. *green*) ir B (mėlyna, angl. *blue*) nuotraukos komponentės pateiktos viršutinėje eilėje ir tos pačios nuotraukos pagrindinės komponentės pateiktos apatinėje eilėje.

Tikrinių vektorių koeficientai panaudoti optimaliam uždegiminių ląstelių vaizdų atrinktų eksperto vaizdavimui, yra parodyti 4.1 lentelėje. Vertės panaudotos sudaryti pirmą principinę šios nuotraukos komponentę, yra paryškintos.

4.1 lentelė. Tikrinių vektorių koeficientai

<b>-0,053</b>	0,848	0,525
<b>0,758</b>	-0,307	0,574
<b>-0,649</b>	-0,429	0,627

Po granulometrijos metodo panaudojimo buvo aptiktos ir iškirptos 206 tikėtinos potencialios uždegiminių ląstelių vietos (4.2 pav.).



4.2 pav. Potencialių uždegiminių ląstelių vietų išskyrimas granulometrijos būdu.

Surasti uždegiminių ląstelių skiriamieji požymiai bei diskriminantinės analizės dėka iš jų išskirti reikšmingiausi. Atlikus diskriminantinę analizę „IBM SPSS statistic 20 – version“ programiniu paketu buvo gauti tokie rezultatai:

4.2 lentelės pirmoje dalyje (angl. *Eigenvalues*) pateiktos tikrinės reikšmės. Matome, kad kanoninę funkciją atitinkanti tikrinė reikšmė lygi  $\lambda_1 = 0,985$ . Kadangi yra tik dvi grupės (uždegiminė ląstelė arba neuždegiminė ląstelė), yra apskaičiuota viena kanoninė funkcija, kuri lyginama pati su savimi, kas paaiškina 100% dispersijos (4.2 lentelė). Lentelėje taip pat matyti kanoninė koreliacija (angl. *Canonical Correlation*) – tai diskriminavimo galios matas (reikšmių sritis nuo 0 iki 1). Kuo koeficientas arčiau 1 tuo diskriminavimas yra geresnis. Šiuo atveju kanoninė koreliacija lygi 0,704.

4.2 lentelė. Tikrinės reikšmės

Summary of Canonical Discriminant Functions				
Eigenvalues				
Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	0,985 <sup>a</sup>	100,0	100,0	0,704

a. First 1 canonical discriminant function were used in the analysis

Wilks' Lambda				
Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1	0,504	138,165	5	0,000

4.2 lentelės antroje dalyje (angl. *Wilks' Lambda*) pateikti rezultatai parodo kaip atlikta diskriminantinė analizė gerai atskiria grupes (angl. *Wilks' Lambda*) Vilksono  $\Lambda$  gali įgyti reikšmės nuo 0 iki 1, kuo  $\Lambda$  mažesnė, tuo funkcijų diskriminavimo galia didesnė. Iš apskaičiuotų rezultatų matyti jog kanoninės funkcijos diskriminavimo galia yra vidutinė. Tai labiausiai sąlygojo nepakankama histologinių preparatų vaizdų registravimo skiriamoji geba.

Kanoninė funkcija yra diskriminavimo kintamųjų tiesinė daugdara, todėl natūralu įvertinti kiekvieno kintamojo įtaką jai. Tam naudojamos standartizuotųjų kanoninių funkcijų koeficientai kurie padeda įvertinti kiekvieno kintamojo indėlį į kanoninės funkcijos didumą. Pažymėtina, kad standartizuotųjų kanoninių funkcijų koeficientai rodo kintamojo svarbą, kai jau pašalinta jo priklausomybė nuo kitų kintamųjų. Koeficiento ženklas parodo kokios krypties yra kintamojo poveikis. Jei koeficientas teigiamas, tai kintamajam didėjant funkcijos reikšmė didėja, jei neigiamas – mažėja. Koeficiento svarba lemia jo absoliutinis didumas. 4.3 lentelėje pateikti rasti penki reikšmingiausi uždegiminių ląstelių požymių. Iš šios lentelės taip pat matyti, jog kanoninei funkcijai didžiausią įtaką daro plotas/perimetras, ženkliai mažesnę – entropija po *entropyfilt*. Likusių kintamųjų koeficientai daug mažesni (4.3 lentelė).

4.3 lentelė. Standartizuotosios kanoninės funkcijos koeficientai

	Function
	1
Po PKA išskirto vaizdo histogramos asimetrijos koeficientas	0,101
Plotas/daugiakampio plotas	0,255
Entropija po <i>rangefilt</i>	0,588
Plotas/perimetras	-1,659
Entropija po <i>entropyfilt</i>	0,939

Kitas kintamųjų priklausomybės matas yra struktūrinio koeficiento didumas (4.4 lentelė). iš pateiktų rezultatų matyti, jog standartizuotoji kanoninė funkcija stipriausiai koreliuoja su kintamuoju – plotas/perimetras.

4.4 lentelė. Struktūriniai koeficientai

	Function
	1
Plotas/perimetras	-0,633
Entropija po <i>entropyfilt</i>	-0,495
Entropija po <i>rangefilt</i>	0,487
Po PKA išskirto vaizdo histogramos asimetrijos koeficientas	0,460
Plotas/daugiakampio plotas	0,321

Iš gautų rezultatų, galima daryti išvadą kad geriausiomis diskriminavimo savybėmis išsiskiria kintamasis – entropija.

4.5 lentelėje pateikti turimų duomenų (111 uždegiminių ląstelių vaizdų iškarpos ir 95 neuždegiminių ląstelių vaizdų iškarpos) klasifikavimo rezultatai. Iš rezultatų matyti, jog 82,9% uždegiminių ląstelių identifikuota teisingai – iš 111 uždegiminių ląstelių identifikuota 92 kaip uždegiminės ir 19 kaip neuždegiminės ląstelės. O iš 95 neuždegiminių ląstelių neuždegiminėms priskirta 80, tai yra 84,2 % tikslumas. Antra lentelės dalis (angl. *cross validated*), tai tarsi metodikos patikrinimas. Šiuo atveju vykdant ląstelės vaizdo priskyrimą vienai iš grupių, klasifikavimo modelio apmokymui, buvo nenaudojami nagrinėjamos ląstelės duomenys. Iš gautų rezultatų matyti, jog iš 111 uždegiminių ląstelių vaizdų uždegiminių ląstelių grupei priskirta 91 – tai 82 % tikslumas. O iš 95 neuždegiminių ląstelių vaizdų, neuždegiminių ląstelių grupei priskirta 80 tai klasifikavimo tikslumas yra 84.2 %.

4.5 lentelė. Klasifikavimo tikslumo vertės

			PREDICTED GROUP		TOTAL
			0	1	
ORIGINAL	COUNT	0	80	15	95
		1	19	92	111
	%	0	84,2	15,8	100
		1	17,1	82,9	100
CROSS VALIDATED	COUNT	0	80	15	95
		1	20	91	111
	%	0	84,2	15,8	100
		1	18,0	82,0	100

Diagnostiniams metodams labai svarbu yra jo patikimumas. Tam, kad įvertinti sukurto metodo patikimumą, kurio dėka siekiama identifikuoti uždegimines ląsteles, buvo pasinaudota matematinės morfologijos būdu išskirtomis 206 tikėtinomis uždegiminių ląstelių sričių iškarpomis ir paskaičiuoti statistiniai kriterijai – specifiškumas bei jautrumas. Gauti rezultatai pateikti 4.6 lentelėje.

4.6 lentelė. Klasifikavimo tikslumo vertės

		„Auksinis standartas“		
		Uždegiminė ląstelė	Neuždegiminė ląstelė	Viso
Metodo vertinimo testas	Testas teigiamas	Teisingai teigiamas 92	Klaidingai teigiamas 19	111
	Testas neigiamas	Klaidingai neigiamas 15	Teisingai neigiamas 80	95
	Viso	107	99	206
Jautrumas = 85,6%				
Specifiškumas = 80,8%				

Iš 4.6 lentelės matyti, jog sukurtas metodas identifikuoti uždegimines ląsteles histologiniuose žarnyno audinių vaizduose, turi didelį jautrumą ir specifiškumą. Tai leidžia teigti, jog šis metodas aptinka didžiąją dalį uždegiminių ląstelių, ir daro labai nedaug neteisingų sprendimų, kada paprasta iškarpa identifikuojama kaip uždegiminė ląstelė. Taigi, buvo sukurta patikima žarnyno audinių uždegimo požymių automatinio vertinimo metodika.

## 5 REZULTATŲ APTARIMAS

Pelės žarnyno audinių histologinių preparatų vertinimas naudojant sukurta metodiką, išryškino jos galimybes ir trūkumus. Pirminio vaizdų apdorojimo metu eliminavus apšvietimo netolygumą tiriamuose vaizduose, panaikinome su tuo susietą pikselių verčių dispersijos dalį, trukdančią rasti optimalią spalvų erdvę. Tai leido PKA pagalba gauti koeficientus, transformuojančius tiriamą vaizdą į jo atvaizdą optimalioje spalvų erdvėje, maksimizuojančioje uždegiminių ląstelių kontrastą likusios vaizdo dalies atžvilgiu. Tai pagerino šių ląstelių atpažinimą. Sekančiame etape pasitelkus matematinę morfologiją, buvo išskirtos tikėtinos uždegiminių ląstelių vietos registruotose nuotraukose. Rastuose analizuojamuose plotuose buvo išskirti dažniausiai skaičiuojami vaizdų analizės požymiai ir ląstelės branduolio formą atspindintys įverčiai. Diskriminantinės analizės dėka iš išskirtų požymių suformavome optimaliai reikšmingiausių rinkinį, skirstantį tiriamus vaizdus į grupes. Žinodami reikšmingiausius požymius ir iš jų sudarytą kanoninę lygtį, galime priskirti tiriamą plotą uždegiminei ląstelei arba ne. Tai daryti galime su dideliu tikslumu (jautrumas – 85,6 %; specifiškumas – 80,8% ).

Vis dėlto skaitinės metodo įvertinimo reikšmės nėra idealios. Tai labiausiai sąlygojama nepakankamos histologinių preparatų vaizdų registravimo skiriamosios gebos. Naudoto mikroskopo maksimalus didinimas buvo x40, kurio dėka buvo įmanoma išskirti ląstelės branduolį iš vaizdo iškarpos, bet rezultatas buvo tik patenkinamas. Turint vaizdų su didesne skiriamąja geba, uždegiminių ląstelių identifikacija, ar net jų klasifikavimas pagal išskirtus požymius pagerėtų. Taip pat tikėtina, kad galutinius rezultatus gali sąlygoti fizinis histologinių preparatų pažeidimas užnešant mėginius ant stiklo, nereikalingų priemonių atsiradimas gaminant preparatą ir tyrinėjamų audinių uždegiminių ląstelių spalvų erdvių nesutapimai. Tikėtina ir „žmogiškoji“ klaida, atsirandanti vertinant mokomosios imties iškarpas pateikiamas diskriminantinei analizei.

Automatinio uždegiminio proceso vertinimo žarnyne rezultatai buvo sulyginami su ekspertų vertinimais. Šio lyginimo rezultatai nuteikia optimistiškai. Ekspertų vertinimai daugumoje atliekami vizualiai vertinant visą histologinio preparato vaizdą, tuo tarpu siūlomas automatinės analizės metodas įgalina išskirti vaizdų fragmentus, kuriuose galime tikėtis rasti lokalių uždegiminių vietų užuomazgų, jų plitimo tendencijas ir išvengti informatyvių požymių nuslėpimo duomenų aibėje. Todėl tikimės, kad mūsų tyrimo rezultatai prisidės prie tolesnio automatinio histologinių preparatų vertinimo metodikos tobulinimo ir mūsų patirtis bus naudinga tobulinant automatinę žarnyno ligų diagnostiką.

## 6 IŠVADOS

Šio darbo metu buvo dirbama su daugiau kaip trimis šimtais, mikroskopu bei vaizdo kamera užfiksuotų, įvairaus uždegiminio sunkumo žarnyno histologinių preparatų vaizdų fragmentų. Ko pasekoje buvo sukurtas registruotų vaizdų pirminio apdorojimo metodas, kuris eliminavo netolygų absoliutinį apšvietimą tyrinėjamuose vaizduose bei atliko užregistruotų vaizdų transformaciją į optimalią spalvų erdvę. Tokiu būdu gautas ženklus uždegiminių ląstelių kontrasto padidėjimas vaizduose, kuris leido matematinės morfologijos būdu, išskirti tikėtinų uždegiminių ląstelių sritis analizuojamuosiuose vaizduose.

Surasti uždegiminių ląstelių skiriamieji požymiai bei diskriminantinės analizės dėka iš jų išskirti reikšmingiausi suklasifikavę turimus tikėtinų uždegiminių ląstelių vaizdus į grupes – uždegiminė ląstelė ar ne.

Taigi tokiu būdu buvo sukurta žarnyno audinių uždegimo požymių automatinio vertinimo metodika. Diskriminantine analize atskleistas vidutinis 82 proc. teisingas histologinių vaizdų klasifikavimas bei didelis specifiškumas ir jautrumas parodė galimą metodo panaudojimą kaip histologo eksperto pagalbinę darbo priemonę ankstyvajai uždegiminių žarnyno ligų diagnostikai, bei moksliniam šių ligų vystymosi aiškinimuisi.

## 7 LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1]. Nenorta V., Sakalauskas A., Petrolis R., Ramonaitė R., Kupčinskas L., Kriščiukaitis A. Patologinių pokyčių virškinamojo trakto histologiniuose vaizduose vertinimas erdvinio dažnio savybėmis. *Virtualūs instrumentai biomedicinoje 2013*, ISBN 9789955187363. 2013. p. 69-74
- [2]. Žvirblienė A., Kiudelis G., Kupčinskas L. Ligonų, sirgusių opinio kolitu ir Krono liga, ligos istorijų retrospektyvioji analizė. *MEDICINA*, 2003; 39 (8): p. 745-750
- [3]. Imuninės sistemos ligos ir darbingumas 2014 *Konferencijos medžiaga 2014*
- [4]. McCann M. T., Bhagavatula R., Fickus M. C., Ozolek J. A., Kovačević J. Automated colitis detection from endoscopic biopsies as a tissue screening tool in diagnostic pathology. *Proceedings of 19th IEEE International Conference on Image processing*, 2012, p. 2809-2812
- [5]. Bressenot A., Salleron J., Bastien C., Danese S., Boulagnon-Rombi C., Peyrin-Biroulet L. Comparing histological activity indexes in UC. *Gut*, 2014
- [6]. Riley S.A., Mani V., Goodman M.J., Dutt S., Herd M.E.. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut*, 1991; 32(2): p. 174-178
- [7]. Gomes P., du Boulay C., Smith C.L., Holdstock G. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut*, 1986;27(1): p. 92-95
- [8]. Geboes K., Dalle I. Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation. *Gut*, 2002;50: p.37-42
- [9]. Šventoraitytė-Skiecevičienė J. Uždegiminėmis žarnyno ligomis sergančių Lietuvos ir Latvijos ligonių genetinės ypatybės. 2011, p. 6 – 7
- [10]. Saukienė I. Medikai įspėja apie naują pasikeitusio maisto grėsmę: gyvenimą košmaru paverčianti liga. 2014, Prieiga per internetą: <http://www.delfi.lt/sveikata/sveikatos-naujienos/me-dikai-ispeja-apie-nauja-pasikeitusio-maisto-gresme-gyvenima-kosmaru-pavercianti-liga.d?id=64824793>
- [11]. Valantinas J., Kupčinskas L., Adamonis K., Bierontienė D., Denapienė G., Garalevičius R., Irnius A., Ivanauskas A., Jančorienė L., Jonaitis L. V., Kazėnaitė E., Kiudelis G., Kondrackienė J., Kupčinskas L., Lunevičius R., Samalavičius N. E., Saukienė J., Speičienė D. M., Šumskienė J., Valantinas J., Žvirblienė A. Klinikinė gastroenterologija. *Vaistų žinios*, 2010, ISBN 9789955884361. p. 197-213
- [12]. Geboes K., Satsangi J., Sutherland L. R. Histopathology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis *IBD4E-18*. 2003. p. 255-276



- [13]. Cure Crohn's Colitis, Ulcerative Colitis Cure. Prieiga per internetą: <http://www.curecrohnscolitis.org/about-crohns-disease-and-ulcerative-colitis/ulcerative-colitis-cure/>
- [14]. Fraser A., Crohn's Disease. Prieiga per internetą: [http://www.gastro-info.co.nz/\(S\(t24rosvka1djjkv0xsbren45\)\)/gastro-information.aspx?pid=1#.U1VpLvl\\_vNk](http://www.gastro-info.co.nz/(S(t24rosvka1djjkv0xsbren45))/gastro-information.aspx?pid=1#.U1VpLvl_vNk)
- [15]. Gastroenterologija. p. 240-267.
- [16]. Paraffin Processing of Tissue. Prieiga per internetą: <http://protocolsonline.com/histology/sample-preparation/paraffin-processing-of-tissue/>
- [17]. Žalgevičienė V. Bendrosios histologijos pradmenys. *Vaistų žinios*, ISBN 978-9955-884-22-4 2009 p. 9-17
- [18]. Mikronet, Meditome. Prieiga per internetą: <http://www.mikronet.com/histology/medite-meditome-microtome.shtml>
- [19]. Kozłowski C., Jeet J., Beyer J., Guerrero S., Lesch J., Wang X., DeVoss J., Diehl L. An entirely automated method to score DSS-induced colitis in mice by digital image analysis of pathology slides. *Disease Models & Mechanisms, PubMed* 2013, p. 855-865
- [20]. Lorenz R, Weber PC, Szimnau P, Heldwein W, Strasser T, Loeschke K. Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease a randomized, placebo-controlled, double-blind cross-over trial. *Journal of Internal Medicine* 1989, 731: p. 225-232
- [21]. Background: the immune system and parasitic evasion. Prieiga per internetą: <http://www.stanford.edu/class/humbio153/ImmuneEvasion/Background.html>
- [22]. Prieiga per internetą: <http://pathy.med.nagoya-u.ac.jp/atlas/doc/node66.html>
- [23]. Prieiga per internetą: [http://hematologyoutlines.com/atlas\\_topics/143.html](http://hematologyoutlines.com/atlas_topics/143.html)
- [24]. Petrolis R., Ramonaitė R., Kupčinskas L., Kriščiukaitis A. Digital Imaging Of Colon Tissue: p. 1-11
- [25]. Hausmann M., Obermeier F., Paper D. H., Balan K., Dunger N., Menzel K., Falk W., Schoelmerich J., Herfarth H., Rogler G. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clinical and Experimental Immunology. PubMed* 2007. p. 373-81
- [26]. Ramonaite R. epitelio ląstelių NADPH oksidazės vaidmuo žarnų uždegimo patogenezėje *Daktaro disertacija, LSMU*, 2014, p. 18-56
- [27]. Petrolis R., Ramonaitė R., Kupčinskas L., Kriščiukaitis A. Method for fast seamless stitching of histological images. *Proceedings of international conference "Biomedical engineering – 2012"*, 2012. p. 29-33

- [28]. Petrolis R., Čižas P., Borutaitė V., Kriščiukaitis A. Method of fluorescence imaging for evaluation of membrane potential in cultured neurons using transmembrane voltage sensitive dye. *Proceedings of international conference "Biomedical engineering – 2011"*, 2011. p. 1-5
- [29]. Kriščiukaitis A., Petrolis R., Stanislovaitienė D., Žaliūnienė D. Principal Component Analysis based Colour Scheme Optimisation in Eye Fundus Images. Contrast Enhancement for Detection and Evaluation of Drusen in Age Related Macular Degeneration Patients' Follow up. *Proceedings of 1st International Conference on Bioimaging*, 2014. p. 66-69
- [30]. Dzemydaolga G., Kurasova O., Žilinskas J. Daugiamačių duomenų vizualizavimo metodai. *Mokslo aidai 2008* ISBN 978-9986-680-42-0 p. 44-75
- [31]. Jolliffe I. T. Principal Component Analysis. *Springer - Verlag; 2nd edition 2002* ISBN: 0387954422
- [32]. Devaux M. F., Legland D. Grey level granulometry for histological image analysis of plant tissues. *Formatex, Microscopy: advances in scientific research and education*, 2014, p. 681-688
- [33]. Improving histology images segmentation through spatial constraints and supervision Herv'ea N., Servaisb A., Thervetb E., Olivo-Marina J. C., Meas-Yedida V. *Proceedings of 2010 IEEE 17th International Conference on Image Processing 2010*, Hong Kong. p.26-29
- [34]. *Mathworks* dokumentacija. Prieiga per internetą <http://se.mathworks.com/help/images/ref/adapthisteq.html>
- [35]. *Mathworks* dokumentacija. Prieiga per internetą <http://se.mathworks.com/help/images/ref/imadjust.html>
- [36]. *Mathworks* dokumentacija. Prieiga per internetą <http://se.mathworks.com/help/images/ref/imopen.html>
- [37]. *Mathworks* dokumentacija. Prieiga per internetą: <http://se.mathworks.com/help/images/ref/imclose.html>
- [38]. *Mathworks* dokumentacija. Prieiga per internetą <http://se.mathworks.com/help/images/ref/rangefilt.html>
- [39]. *Mathworks* dokumentacija. Prieiga per internetą <http://se.mathworks.com/help/images/ref/entropyfilt.html>
- [40]. Čekanavičius V., Murauskas G. Statistika ir jos taikymai II. *TEV* ISBN 9955-491-16-7. 2008, p. 215-236
- [41]. Petrolis R., Vilkė A., Šimoliūnienė R., Macas A., Kriščiukaitis A. Intensyvios terapijos pacientų būklės prognozavimas. *Virtualūs instrumentai biomedicinoje 2012*. ISBN 978-9955-18-660-1. p.13-18.

## 8 PRIEDAI

### 8.1 Mokslinės publikacijos darbo tema

Kiškis A., Petrolis R., Ramonaitė R., Kupčinskas L., Kriščiukaitis A., Identification of Diagnostic Features of Intestine Inflammatory Diseases in Histological Tissue Images. *Virtualūs instrumentai biomedicinoje 2015*: tarptautinės mokslinės-praktinės konferencijos pranešimų medžiaga, Klaipėda, 2015/Klaipėdos universitetas. ISBN 978-9955-18-856-8 p. 6-13

### 8.2 Sertifikatai



8.1 pav. Pažymėjimas liudijantis dalyvavimą tarptautinėje mokslinėje – praktinėje konferencijoje „Virtualūs instrumentai biomedicinoje 2015“

### 8.3 Lentelės:

8.1 lentelė. Geboes požymių skalė [8]

Optinio kolito sunkumo, laipsniai	
0 laipsnio: Struktūrinis (architektūriniai pokyčiai)	
Ne anomalinis	0.0
Nestiprus anomalinis	0.1
Lengvas arba vidutinio stiprumo išplitusi arba daugiažidininė anomalija	0.2
Stipriai išplitusi arba daugiažidininė anomalija	0.3
1 laipsnis: Lėtinis uždegiminis įsiskverbimas	
Nedidėjanti, ne auganti	1.0
Nestiprus, bet aiškus augimas	1.1
Vidutinis augimas	1.2
Stiprus augimas	1.3
2 laipsnio: Jungiamojo audinio sluoksnio (Lamina propria) neutrofilai ir eozinofilai (grūdėtieji leukocitai)	
2A Eozinofilų	
Nedidėjanti, ne auganti	2A.0
Nestiprus, bet aiškus augimas	2A.1
Vidutinis augimas	2A.2
Stiprus augimas	2A.3
2B Neutrofilų	
Nedidėjanti, ne auganti	2B.0
Nestiprus, bet aiškus augimas	2B.1
Vidutinis augimas	2B.2
Stiprus augimas	2B.3
3 laipsnio: Neutrofilai epitelyje	
Nėra	3.0
<5% paveiktų liaukų	3.1
<50% paveiktų liaukų	3.2
>50% paveiktų liaukų	3.3
4 laipsnio: Liaukų sunaikinimas	
Nėra	4.0
Tikėtinas – vietinis perteklius neutrofilų dalyje liaukų	4.1
Tikėtinas – ryškus slopinimas	4.2

Visiškas liaukų sunaikinimas	4.3
5 laipsnio: Erozija ar išopėjimas	
Nėra erozijos, išopėjimo ar audinio smulkinimo	5.0
Atsinaujinantis epitelis, greta uždegimo	5.1
Tikėtina erozija	5.2
Aiški erozija	5.3

8.2 lentelė. Riley požymių skalė [8]

Kiekvienas bruožas yra įvertinamas 4-balėje skalėje atitinkančią nėra/lengvas/vidutinio sunkumo/sunkus
Liaukų struktūriniai pažeidimai
Lėtinis uždegiminių ląstelių prasiskverbimas
Ūmus uždegiminių ląstelių prasiskverbimas
Liaukų pūlinys
Mucino* išsekvojimas
Paviršiaus epitelio vientisumas

\***Mucinas** - (lot. *mucus* - gleivės) - glikoproteinas, gleivių ir kitų klampųjų organizmo skysčių sudedamoji dalis.

8.3 lentelė. Gramlich požymių skalė [8]

Ne aktyvus	0
Uždegiminių ląstelių buvimas audinio epiteliniame sluoksnyje	1
Liaukų pūlinys	2
Išopėjimas	3

8.4 lentelė. Gupta požymių skalė [8]

Neaktyvus/nesamas (nėra neutrofilų įsiskverbimo)	0
Neutrofilų prasiskverbimas <50% iš liaukų mėginių ar skerspjūvio	1
Neutrofilų prasiskverbimas >50% iš liaukų mėginių ar skerspjūvio	2
Erozija ar išopėjimas	3