

Автоматизированный метод анализа изображений иммуноцитохимических препаратов молочной железы

02, февраль 2013

DOI: 10.7463/0213.0529424

Клименко Н. С., Артюхова О. А., Амелькина Е. Ю., Самородов А. В.

УДК 57.087

Россия, МГТУ им. Н.Э. Баумана

natasha.klmnk@gmail.com

olga.artyukhova@mail.ru

mencina@mail.ru

avsbmstu@yandex.ru

Введение

Возникновение рака молочной железы многие исследователи связывают с избыточной продукцией эстрогенов или их фракций [1]. Наличие рецепторов различных гормонов у опухолевых клеток дает возможность оценить гормоночувствительность опухоли и, следовательно, эффективность гормонотерапии [2]. Такую оценку осуществляют с помощью иммуноцитохимического (ИЦХ) анализа, в ходе которого проводится микроскопическое исследование специальным образом окрашенных цитологических препаратов и определяются диагностические баллы, характеризующие степень окрашивания клеток в данном препарате и позволяющие вынести решение о гормональном статусе рака [3, 4].

Иммуноцитохимический анализ зарекомендовал как высокоинформативный, обеспечивающий корректное определение факторов прогноза и выбор тактики терапии. Однако визуальное определение диагностических баллов является высоко субъективным. В ходе данного анализа необходимо просматривать практически весь препарат в поисках клеточных элементов, что приводит также к высокой трудоемкости анализа и, следовательно, диагностическим ошибкам. Объективизация и разработка количественных оценок реакций в методе ИЦХ является необходимым условием его широкого использования в клинической практике, что обуславливает актуальность создания аппаратно-программного комплекса (АПК) микроскопического анализа ИЦХ препаратов молочной железы.

1. Особенности исследования препаратов в иммуноцитохимии

В основе иммуноцитохимической реакции лежит взаимодействие антигена с антителом. При гормоночувствительном РМЖ происходит экспрессия рецепторов стероидных гормонов (рецепторов эстрогенов и прогестерона) в ядрах опухолевых клеток. Эти рецепторы выступают в качестве антигенов. Антитела вводят искусственно в ходе специального ИЦХ окрашивания препаратов, в результате которого ядра опухолевых клеток, содержащие рецепторы эстрогенов или прогестерона, приобретают коричневую окраску [4] (рисунок 1).

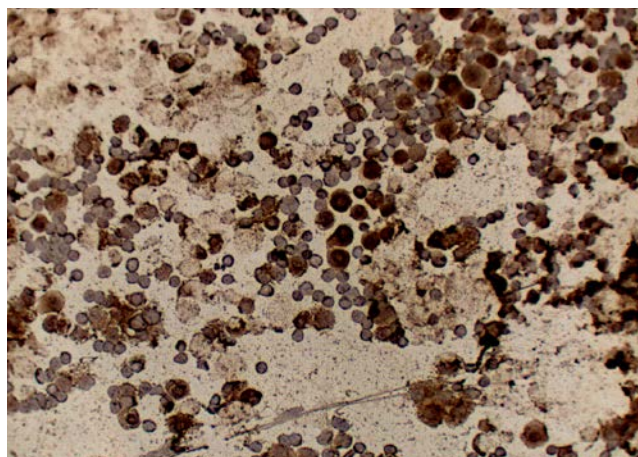


Рисунок 1 – Микроскопическое изображение ИЦХ препарата

Для вынесения решения о гормональном статусе рака проводится исследование изображения окрашенного ИЦХ препарата с использованием светового микроскопа.

Широко используемым в настоящее время является определение по изображению ИЦХ препарата баллов по так называемой системе баллов Оллреда [3]. В указанной системе определяются два балла: балл, характеризующий долю клеток с окрашенными ядрами (proportion score, PS), и балл, характеризующий интенсивность их окрашивания (intensity score, IS). Данные баллы определяются на основе визуального сопоставления наблюдаемой под микроскопом картины с балльной шкалой оценки рецепторов эстрогенов и прогестерона (рисунки 2, 3).

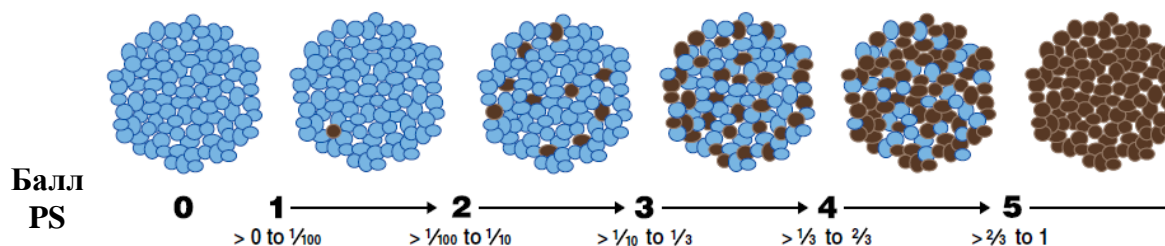


Рисунок 2 – Балльная шкала оценки доли клеток с окрашенными ядрами в препарате [5]

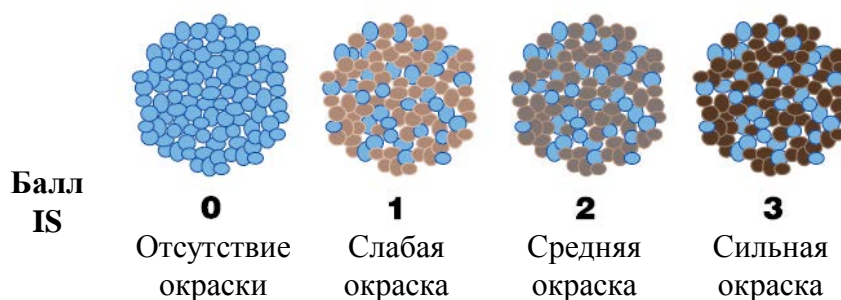


Рисунок 3 – Балльная шкала оценки интенсивности окрашивания ядер клеток в препарате [5]

Общее заключение по результатам анализа ставится врачом на основании общего балла (total score, TS), являющегося суммой баллов PS и IS. Статус рака определяется как гормоннезависимый, если TS равен нулю или двум, и как гормонозависимый – если значение TS больше двух баллов.

2. Автоматизация микроскопического анализа ИЦХ препаратов молочной железы

Основными элементами АПК микроскопического анализа ИЦХ препаратов молочной железы являются оптический микроскоп-тринокуляр с автоматизированным предметным столом, блоком автофокусировки и цифровой камерой, а также специальное программное обеспечение (СПО) анализа регистрируемых изображений ИЦХ препаратов. Структурная схема данного комплекса представлена на рисунке 4.



Рисунок 4 – Структурная схема АПК микроскопического анализа ИЦХ препаратов молочной железы

Регистрация изображений ИЦХ препарата осуществляется в автоматическом режиме. В процессе сканирования препарата для каждого поля зрения осуществляется вычисление характеристик резкости и, при необходимости, автофокусировка оптической системы [6].

СПО анализа изображений ИЦХ препарата включает в себя два блока: блок сегментации изображений и блок расчета диагностических баллов. Основным этапом анализа, наиболее тяжело поддающимся автоматизации, является сегментация изображений, от качества которой существенно зависит результат исследования препарата в целом [7].

3. Разработка и реализация алгоритмов сегментации микроскопических изображений ИЦХ препаратов

Для определения диагностических баллов на изображении препарата необходимо выделить область клеток, ядра которых в ходе окрашивания приобрели коричневый оттенок из-за наличия рецепторов гормонов, и область клеток, ядра которых не имеют рецепторов, то есть произвести сегментацию изображения [8]. Из-за значительной вариабельности цветоярких характеристик разных препаратов, являющейся следствием особенностей взятия пункционного материала, нанесения его на стекло и, собственно, окрашивания, для сегментации целесообразно использовать двухэтапную процедуру [9]. На первом этапе строятся маски областей, гарантированно относящихся к фону, клеткам с окрашенными и неокрашенными ядрами, по которым рассчитываются средние цветояркие характеристики данных областей. На втором этапе с использованием полученных цветоярких характеристик выполняется попиксельная сегментация всего изображения с последующей постобработкой.

Алгоритм автоматического нахождения масок заключается в пороговой обработке полутонового изображения, построенного по координате «В» цветового пространства RGB. Гистограмма яркости по указанной координате имеет явный локальный минимум, разделяющий фон и клетки (рисунок 5). Абсцисса точки минимума (3, рисунок 5) определяется автоматически по сглаженной гистограмме и далее используется как пороговое значение для построения маски фона.

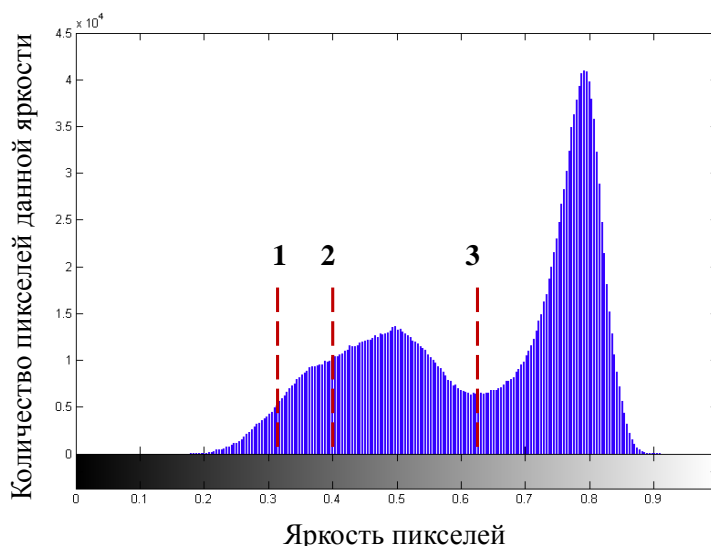
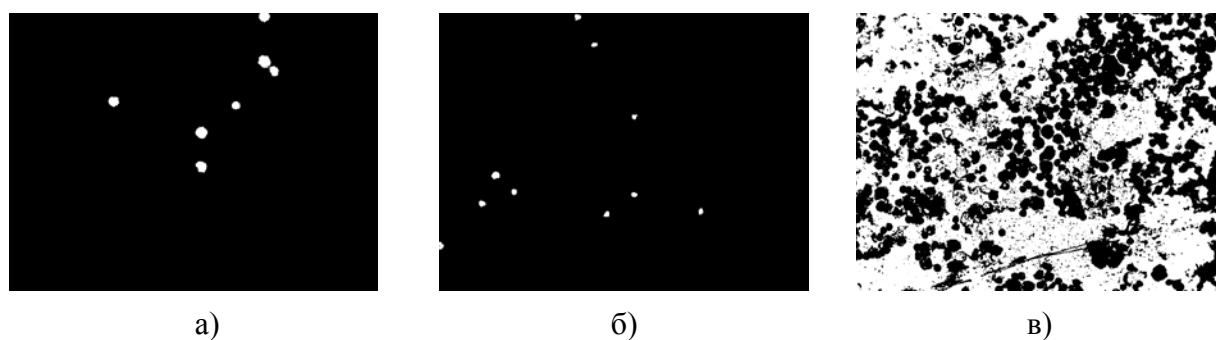


Рисунок 5 – Гистограмма яркости изображения ИЦХ препарата по цветовой координате «В».
1, 2 и 3 – границы для построения масок областей (пояснения в тексте)

Участок гистограммы с интенсивностью меньше найденного порога соответствует клеткам. Эмпирически было установлено, что первая треть данного участка гистограммы (верхняя граница – точка 1, рисунок 5) соответствует окрашенным ядрам клеток. Клетки с неокрашенными ядрами более светлые, их маска задается диапазоном интенсивностей между значением, делящим область гистограммы клеток пополам (точка 2, рисунок 5) и ранее найденным порогом для выделения фона (точка 3, рисунок 5). В ходе ИЦХ окрашивания препарата на рецепторы эстрогенов или прогестерона часть красителя, не полностью удаленного в ходе промывки, может осесть в области цитоплазмы клеток. Для предотвращения попадания в маску клеток с неокрашенными ядрами области слабоокрашенной цитоплазмы клеток, строится ее маска в разностном канале «R» и «B», которая затем вычитается из маски клеток с неокрашенными ядрами. На рисунке 6 приведен пример результата автоматического нахождения масок областей клеток с окрашенными ядрами, клеток с неокрашенными ядрами и фона.



а) маска клеток с окрашенными ядрами, б) маска клеток с неокрашенными ядрами, в) маска фона

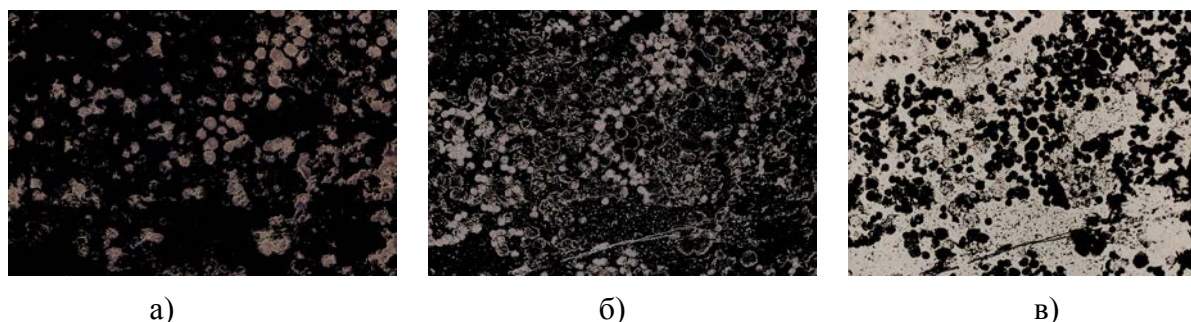
Рисунок 6 – Пример результата автоматического нахождения масок областей изображения

По полученным маскам трех областей ($j = \{1, 2, 3\}$) рассчитываются средние значения яркости (m_{ij}) в трех цветовых координатах ($i = \{R, G, B\}$).

На втором этапе сегментации для каждого пикселя анализируемого изображения, имеющего цветные координаты z_i , вычисляются три евклидовых расстояния – меры близости классифицируемого пикселя к клеткам с окрашенными ядрами (ε_1), с неокрашенными ядрами (ε_2) и фону (ε_3):

$$\varepsilon_j = \left[(z_S - m_{Rj})^2 + (z_V - m_{Gj})^2 + (z_Y - m_{Bj})^2 \right]^{\frac{1}{2}}.$$

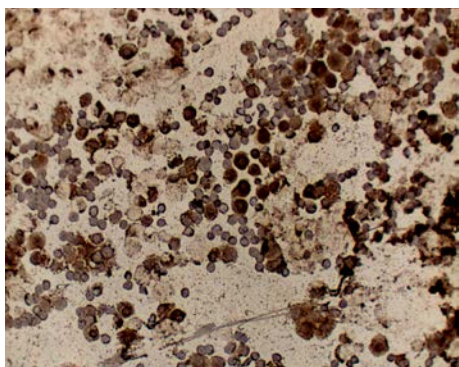
Пиксель изображения относится к той области, для которой вычисленное расстояние минимально. Пример результата классификации пикселей изображения на области клеток с окрашенными ядрами, клеток с неокрашенными ядрами и фона приведен на рисунке 7.



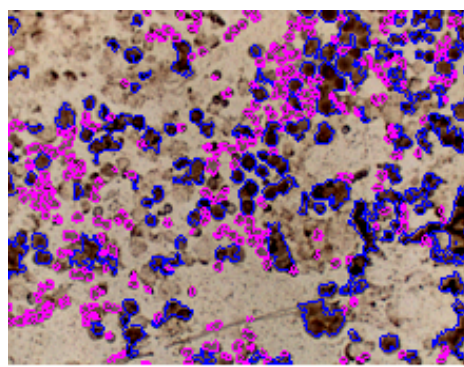
а) область клеток с окрашенными ядрами, б) область клеток с неокрашенными ядрами, в) область фона

Рисунок 7 – Пример результата классификации пикселей изображения

Постобработка изображения заключается в удалении из областей клеток с окрашенными и неокрашенными ядрами связанных участков, размер и форма которых явно отличаются от соответствующих параметров клеток. Пример окончательного результата сегментации изображения ИЦХ препарата приведен на рисунке 8.



а)



б)

а) исходное изображение, б) результат сегментации

Рисунок 8 – Пример окончательного результата сегментации изображения ИЦХ препарата

Экспериментальные исследования разработанного метода сегментации проводились на выборке из 11 препаратов, приготовленных в лаборатории онкоцитологии МНИОИ им. П.А. Герцена, имеющих различные цветояркие характеристики.

Сегментация изображений на области клеток с окрашенными ядрами, с неокрашенными ядрами и фона проводилась по разработанному алгоритму. Результаты автоматической сегментации подвергались визуальной верификации. Анализ полученных данных показал, что погрешность выделения областей клеток обоих типов по площади не превышает 5 %, что не приведет к ошибочному изменению итогового заключения о гормональном статусе РМЖ.

Заключение

Иммуноцитохимическое исследование препаратов при раке молочной железы позволяет определить его гормональный статус, что существенно влияет на тактику назначаемого лечения. Визуальный анализ данных препаратов является трудоемким и высокосубъективным; повышение достоверности и разработка количественных оценок реакций в методе ИЦХ является необходимым условием широкого использования данного анализа в клинической практике.

В работе представлены результаты разработки метода и алгоритма сегментации изображений ИЦХ препаратов, являющейся ключевым этапом создания АПК для их автоматизированного анализа. Разработанный метод сегментации адаптирован к принятой в настоящее время методике приготовления ИЦХ препаратов и обеспечивает возможность работы с изображениями препаратов, отличающихся по своим цветоярким характеристикам.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 14.В37.21.1912.

Список литературы

1. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. СПб.: Наука, 2000. 199 с.
2. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Биологические маркеры рака молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации // Маммология. 2005. № 1. С. 65-70.
3. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis // Modern Pathology. 1998. Vol. 11, no. 2. P. 155-168.
4. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Иммуноцитохимическое исследование цитологических препаратов с использованием метода жидкостной цитологии. М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2008. 21 с.
5. Allred D.C. Assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemistry // Connection. 2005. No. 9. P. 4-5.
6. Artyukhova O.A., Samorodov A.V. Investigation of image sharpness characteristics in the field of automated microscopy of cytological preparations // Pattern Recognition and Image Analysis. 2011. Vol. 21, no. 2. P. 171-175. DOI: 10.1134/S1054661811020118
7. Самородов А.В., Полянская М.Г., Славнова Е.Н., Спиридонов И.Н., Волченко Н.Н. Определение рецепторного статуса по результатам автоматизированного анализа изображений препаратов в иммуноцитохимии // Нанотехнологии в онкологии: сб. трудов II Всероссийской научной конференции. Москва, 2009. С. 45-46.
8. Amelkina E.Y., Samorodov A.V. Development of cytologic preparations image analysis algorithm for solving immunocytochemistry tasks // Proceedings of the 6th Russian-Bavarian Conference on Biomedical Engineering. Moscow, 2010. P. 8-9.
9. Клименко Н.С., Артюхова О.А., Самородов А.В., Славнова Е.Н., Волченко Н.Н. Разработка алгоритма сегментации микроскопических изображений препаратов в иммуноцитохимии // Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы V Всероссийской научно-практической конференции. М., 2012. С. 53-54.

Automated method for image analysis of breast immunocytochemical preparations

02, February 2013

DOI: 10.7463/0213.0529424

Klimenko N.S., Artyukhova O.A., Amel'kina E.Yu., Samorodov A., V.

Bauman Moscow State Technical University, 105005, Moscow, Russian Federation

natasha.klmnk@gmail.com

olga.artyukhova@mail.ru

mencina@mail.ru

avsbmstu@yandex.ru

This paper presents results of developing a segmentation method and algorithm for microscopic images of breast immunocytochemical smears; this method is the key stage in creating a system of smears' automated analysis. The developed segmentation method was adapted to the currently used method of preparing immunocytochemical smears and provided an opportunity to work with microscopic images of smears with different color-luminance characteristics. The obtained results will allow to objectify quantitative assessment of immunocytochemical reactions and contribute to widespread usage of this type of analysis in clinical practice.

Publications with keywords:

[automation](#), [segmentation](#), [image](#), [immunocytochemistry](#), [microscopic analysis](#), [hormone receptor status](#), [breast cancer](#)

Publications with words:

[automation](#), [segmentation](#), [image](#), [immunocytochemistry](#), [microscopic analysis](#), [hormone receptor status](#), [breast cancer](#)

References

1. Bershtein L.M. *Gormonal'nyi kantserogenez* [Hormonal carcinogenesis]. St. Petersburg, Nauka, 2000. 199 p.
2. Gershtein E.S., Kushlinskii N.E. Biologicheskie markery raka molochnoi zhelezy: metodologicheskie aspekty i klinicheskie rekomendatsii [Biological markers of breast cancer: methodological aspects and clinical recommendations]. *Mammologiya*, 2005, no. 1, pp. 65-70.

3. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology*, 1998, vol. 11, no. 2, pp. 155-168.
4. Volchenko N.N., Savostikova M.V. *Immunotsitokhimicheskoe issledovanie tsitologicheskikh preparatov s ispol'zovaniem metoda zhidkostnoi tsitologii* [Immunocytochemical study of cytological preparations using the method of liquid-based cytology]. Moscow, Herzen Moscow Research Oncological Institute, 2008. 21 p.
5. Allred D.C. Assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemistry. *Connection*, 2005, no. 9, pp. 4-5.
6. Artyukhova O.A., Samorodov A.V. Investigation of image sharpness characteristics in the field of automated microscopy of cytological preparations. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 2011, vol. 21, no. 2, pp. 171-175. DOI: 10.1134/S1054661811020118
7. Samorodov A.V., Polianskaia M.G., Slavnova E.N., Spiridonov I.N., Volchenko H.N. Opredelenie retseptornogo statusa po rezul'tatam avtomatizirovannogo analiza izobrazhenii preparatov v immunotsitokhimii [Determination of receptor status on the results of automated analysis of image of preparations in immunocytochemistry]. *Nanotekhnologii v onkologii: sb. trudov 2 Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii* [Nanotechnology in Oncology: collection of papers of the 2nd all-Russian scientific conference]. Moscow, 2009, pp. 45-46.
8. Amelkina E.Y., Samorodov A.V. Development of cytologic preparations image analysis algorithm for solving immunocytochemistry tasks. *Proc. of the 6th Russian-Bavarian Conference on Biomedical Engineering*. Moscow, 2010, pp. 8-9.
9. Klimenko N.S., Artiukhova O.A., Samorodov A.V., Slavnova E.N., Volchenko N.N. Razrabotka algoritma segmentatsii mikroskopicheskikh izobrazhenii preparatov v immunotsitokhimii [The development of algorithm of segmentation of microscopic images of preparations in immunocytochemistry]. *Tsitomorfometriia v meditsine i biologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: Materialy 5 Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii* [Cytomorphometry in medicine and biology: fundamental and applied aspects: proc. of the 5th all-Russian scientific-practical conference]. Moscow, 2012, pp. 53-54.