

METOD ZA AUTOMATSKO ODREĐIVANJE STATUSA ESTROGENSKIH I PROGESTERONSKIH RECEPTORA A METHOD FOR AUTOMATIC ESTIMATION OF ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTOR STATUS

Slavica Savić, Vladimir Risojević
Elektrotehnički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

Sadržaj – Istraživanja bioloških mehanizama raka dojke su pokazala da, u većini slučajeva, brzina rasta tumora zavisi od prisustva hormona estrogena i progesterona. Status estrogenskih i progesteronskih receptora se može, prema tome, iskoristiti kao prognostički faktor kod pacijenata koji primaju anti-hormonsku terapiju. U ovom radu je izložen algoritam za procjenu statusa ovih receptora određivanjem proporcije i intenziteta bojenja pozitivno obojenih tumorskih ćelija na imunohistološkoj slici neoplastičnog tkiva. Predložena je adaptacija algoritma za segmentaciju kolor-slika za primjenu u segmentaciji imunohistoloških slika. Postignuti rezultati su analizirani i poređeni sa rezultatima dobijenim od strane ljekara.

Ključne riječi: analiza imunohistoloških slika, segmentacija, matematička morfologija.

Abstract - Research into biological mechanisms of breast cancer have found that growth rate in most cases depends on the presence of hormones estrogen and progesterone. Therefore, estrogen and progesterone receptor status can be used as a prognostic and predictive factor in anti-hormonal therapy. This paper presents an algorithm for estimation of receptor status by computing proportion score and intensity score for positive stained tumor cells in immunohistological image of neoplastic tissue. The adaptation of the algorithm for color-image segmentation for application in immunohistological image segmentation is proposed. Achieved results are analyzed and compared with the results obtained by a pathologist.

Keywords: immunohistological image analysis, image segmentation, mathematical morphology.

1. UVOD

Brzina rasta tumorskih ćelija kod većine slučajeva raka dojke zavisi od prisustva hormona estrogena i progesterona [1]. Zbog toga se status estrogenskih (ER) i progesteronskih (PR) receptora u neoplastičnom tkivu može iskoristiti kao prognostički faktor pri uvođenju anti-hormonske terapije. Određivanje ER i PR statusa podrazumijeva utvrđivanje odnosa broja pozitivno obojenih i ukupnog broja jedara tumorskih ćelija u uzorku, te intenziteta bojenja pozitivno obojenih jedara. Ukoliko se ustanovi da je status hormonskih receptora pozitivan, pacijent postaje kandidat za anti-hormonsku terapiju.

U cilju prevazilaženja tradicionalnih dijagnostičkih metoda koje podrazumijevaju ručno prebrojavanje ovih ćelija od strane patologa, te procjenu intenziteta bojenja tumorskih ćelija, od interesa je da se razmotri automatizacija ovog metoda pri čemu bi bili korišteni algoritmi za obradu slike. Prednosti automatske analize imunohistološke slike su ubrzanje procesa, smanjenje troškova za analizu slike, te smanjenje broja pogrešnih dijagnoza izazvanih umorom ljekara.

Razvojem savremene računarske opreme, te primjenom tehnika za digitalnu obradu slike postala je moguća implementacija algoritama koji omogućavaju poluautomatsko ili automatsko određivanje statusa hormonskih receptora. U [2]

je opisana web aplikacija *ImmunoRatio* za određivanje statusa receptora estrogena i progesterona. Autori analizu započinju korekcijom imunohistološke slike na osnovu korekcionne slike kamere, zatim se slika segmentira Isodata algoritmom, te vrši izdvajanje pojedinačnih jedara watershed algoritmom. Pored navedenog, aplikacija od korisnika zahtjeva procjenu veličine ćelijskih jedara kako bi dala precizniju segmentaciju. U radu [3] autori predlažu algoritam za detekciju statusa hormonskih receptora baziran na Laws obilježjima teksture [4], dok se u radu [5] analizira primjena komercijalnog softvera *Adobe Photoshop* u svrhu analize imunohistoloških slika. Segmentacija bazirana na primjeni neuronskih mreža za klasifikaciju boje piksela na imunohistološkoj slici data je u radu [6].

U ovom radu je predložen algoritam za procjenu statusa estrogenskih i progesteronskih receptora određivanjem proporcije i intenziteta bojenja pozitivno obojenih tumorskih ćelija na imunohistološkoj slici. Algoritam je inspirisan činjenicom da za procjenu ER/PR statusa nije potrebno tačno prebrojavanje jedara već samo procjena odnosa broja pozitivnih i ukupnog broja jedara. Imajući u vidu da su jedra tumorskih ćelija približno iste veličine, predloženo je da se odnos broja pozitivnih i ukupnog broja jedara procijeni kao odnos površine pozitivnih i ukupne površine svih jedara tumorskih ćelija. Na ovaj način se izbjegava potreba da se tačno segmentiraju

pojedina jedra. Pored toga, intenzitet bojenja jedara se može procijeniti na osnovu intenziteta piksela pozitivno obojenih jedara. Predloženi algoritam je implementiran i testiran na skupu imunohistochemijskih slika. Dobijeni rezultati su poređeni sa onima dobijenim od strane ljekara.

Rad je dalje organizovan kako slijedi. U drugom poglavlju je data teorijska analiza problema automatske segmentacije imunohistoloških slika, te je predložen algoritam za određivanje statusa estrogenskih i progesteronskih receptora. Treće poglavlje daje komparativnu analizu predloženog algoritma sa rezultatima dobijenim od strane ljekara. Četvrto poglavlje je zaključak.

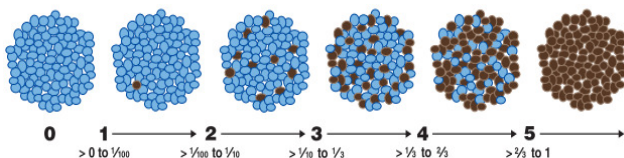
2. ALGORITAM ZA PROCJENU STATUSA ER/PR RECEPTORA

Imunohistochemija je proces lokalizacije antigena (npr. proteina) u ćelijama presjeka tkiva zasnovan na korištenju antitijela koja se vezuju za antigene u biološkim tkivima [8]. Imunohistochemijsko bojenje se tipično koristi za dijagnostikovanje abnormalnih ćelija, kao npr. ćelija raka. Pošto su antitijela nevidljiva, za vizuelizaciju interakcije antitijela i antigena se koriste razne tehnike. Jedna od njih je da se antitijelo poveže sa enzimom koji će katalizirati hemijsku reakciju i obojiti antitijelo kada se poveže sa antigenom. Tako obojeni preparat se, zatim, posmatra pod mikroskopom i broje se obojena antitijela.

Pokazano je da se imunohistochemijski određen status ER/PR receptora može iskoristiti u planiranju terapije i kao prediktor ishoda u liječenju raka dojke [1]. Tradicionalno, patolog svjetlosnim mikroskopom posmatra uzorak neoplastičnog tkiva obojen imunohistochemijskom tehnikom i određuje status ER/PR receptora. Kako bi se ubrzao proces analize, u ovom radu je prikazan algoritam za automatsko određivanje statusa ER/PR receptora u ćelijama raka dojke.

2.1. Određivanje hormonskog statusa

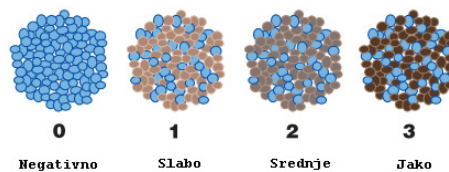
Određivanje statusa receptora podrazumijeva da se na imunohistološkoj slici prvo ustanovi prisutnost receptora hormona estrogena i progesterona u vidu proporcije pozitivno obojenih ćelijskih jedara i ukupnog broja jedara neoplastičnog tkiva (Proportion Score - PS), te intenziteta bojenja prethodno izdvojenih pozitivno obojenih ćelijskih jedara (Intensity Score - IS) [1].



Slika 1 – Ocjena zastupljenosti pozitivno obojenih jedara u uzorku

Na Slici 1. prikazane su smjernice za određivanje PS. Ćelije sa pozitivnim statusom prikazane su smeđom bojom, a

ćelije sa negativnim statusom su prikazane plavom bojom. PS se ocjenjuje vrijednostima od 0 do 5.



Slika 2 – Određivanje intenziteta bojenja jedara tumorskih ćelija

IS predstavlja prosječan intenzitet bojenja prethodno detektovanih pozitivnih tumorskih ćelija. Određivanje ovog statusa je ilustrovano na Slici 2.

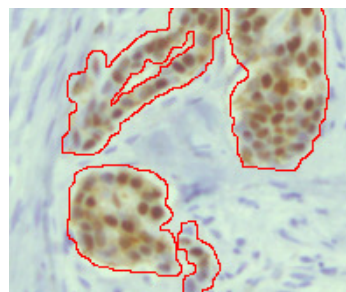
Konačan status se dobija kombinacijom prethodno utvrđenih statusa u vidu Total Score – TS, gdje je:

$$TS = PS + IS. \quad (1)$$

Dalje se na osnovu konačnog statusa određuje da li je receptorski status pozitivan ili negativan: ako je $TS < 3$ status je negativan, u suprotnom, hormonski status tumorskih ćelija proglašava se pozitivnim.

2.2. Detalji algoritma

U cilju određivanja proporcije i intenziteta bojenja pozitivnih tumorskih ćelija, te utvrđivanja konačnog hormonskog statusa na imunohistološkim slikama vršena je njihova analiza, te su utvrđene karakteristike koje bi se mogle iskoristiti za pojednostavljenje procesa segmentacije tumorskih ćelija. Na Slici 3, se vidi da u tkivu postoje grupe tumorskih ćelija pozitivnog, odnosno negativnog statusa koje treba pojedinačno izdvajati i brojati. Shodno tome, razvila se ideja da se implementira algoritam koji ne vrši segmentaciju slike na ćelije, već regione sa negativnim, odnosno pozitivnim tumorskim ćelijama, te traži odnos površina ovih regiona. Ovaj odnos će, ekvivalentno brojanju negativnih i pozitivnih tumorskih ćelija, dati procjenu PS. Kasnije se i intenzitetski status (IS), pozitivnih tumorskih ćelija, može odrediti kao prosječni intenzitet bojenja površine zahvaćene ovim ćelijama.



Slika 3 – Grupe tumorskih ćelija

Ova ideja je implementirana u predloženom algoritmu za automatsko određivanje receptorskog statusa, što u mnogome pojednostavljuje proces segmentacije ćelijskih jedara na slici.

Izdvajanje jedara tumorskih ćelija na imunohistološkoj slici se vrši određivanjem vrijednosti praga segmentacije pomoću Otsuovog algoritma [7] primjenjenog na V komponentu slike iz HSV kolor-prostora. U cilju korekcije izdvojenih regiona, na dobijenoj binarnoj slici se popunjavaju izolovani regioni pozadine, a zatim se koristi morfološki filter sa strukturnim elementom dimenzija 5×5 . Potom je izvršeno uklanjanje ostataka pozadine čije su karakteristike uočene u RGB kolor-prostoru. Naime, činjenica da G komponenta pozadine na slikama ima znatno veću vrijednost od G komponente tumorskih ćelija dovela je do odabira pogodnog praga koji rezultuje njihovim preciznijim izdvajanjem. Kao rezultat, dobijena je slika sa označenim regionima u kojim se nalaze ćelije tumorskih jedara, Slika 4a.

Dalja analiza slike se odnosi na izdvajanje regiona koji zauzimaju tumorske ćelije pozitivnog hormonskog statusa iz prethodno izdvojenog regiona koji zauzimaju tumorske ćelije. Činjenica da se pozitivne tumorske ćelije na imunohistološkoj slici boje smeđom, a negativne plavom bojom je iskorištena za njihovu dalju segmentaciju. Kako B (*blue*) komponenta RGB kolor-prostora tumorskih ćelija negativnog statusa ima veću vrijednost od one koju imaju tumorske ćelije pozitivnog statusa, odaban je praga koji rezultuje razdvajanjem negativnih i pozitivnih ćelija u odvojene regione. Kao rezultat se dobija slika sa označenim regionom koji zauzimaju tumorske ćelije pozitivnog hormonskog statusa na imunohistološkoj slici, Slika 4b.

Računanjem odnosa površine regiona sa tumorskim ćelijama pozitivnog statusa i regiona koje zajedno čine sve tumorske ćelije određuje se PS za datu imnohistološku sliku.

Dalja analiza imunohistološke slike se bazira na određivanju intenziteta bojenja (IS) jedara u regionu kojem pripadaju pozitivno obojene tumorske ćelije. Ocjena intenziteta bojenja se vrši analizom luminantne (V) komponente slike iz HSV kolor prostora na mjestima regiona koji zauzimaju tumorske ćelije pozitivnog statusa, tj. određivanjem histograma ove komponente sa tri nivoa svjetline. Nivo koji sadrži najveći broj piksela određuje IS analiziranog uzorka. Prema Slici 2, bojenje pozitivnih jedara može biti *Slabog* (ocjena 1), *Srednjeg* (ocjena 2) ili *Jakog* (ocjena 3) intenziteta [1]. Ukoliko se radi o slici na kojoj nema izdvojenih regiona sa pozitivnim ćelijama, što se detektuje nultom vrijednošću ranije određene proporcije (PS), intenzitetski status je *Negativan*, tj. ima ocjenu 0.

Konačan status (TS) se određuje formulom (1), te se na osnovu dobijene vrijednosti receptorski status proglašava negativnim ($TS < 3$), odnosno pozitivnim ($TS \geq 3$).

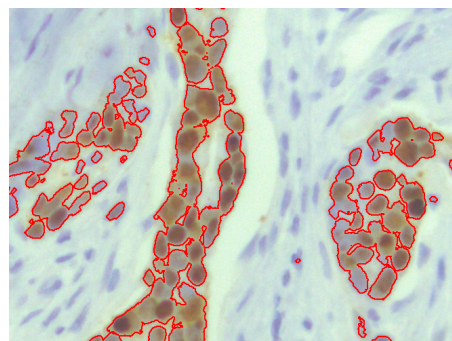
3. REZULTATI

Opisani algoritam za utvrđivanje receptorskog statusa je testiran na skupu od 9 imunohistoloških slika. Za akviziciju slika korišten je mikroskop Leica DM 2500 i kamera Leica DFC 290 HD. Slike su snimljene na uvećanju od 200 puta, sa rezolucijom 1536×2048 piksela i sačuvane su u TIFF formatu.

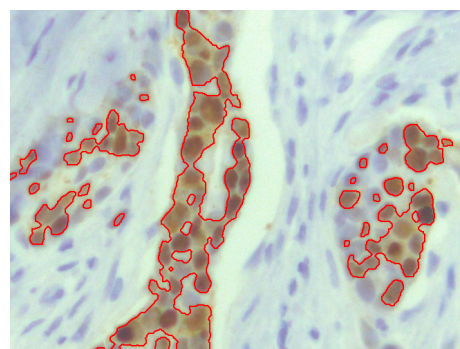
Ilustracija segmentacije tumorskih ćelija na imunohistološkoj slici je data na Slikama 4 i 5. Radi bolje uočljivosti prikazani su samo uvećani dijelovi imunohistoloških slika, a segmentacija je vršena na originalnim slikama. Bitno je naglasiti da na slici sve plave ćelije nisu od interesa, već samo one koje pripadaju tumoru, što se može uočiti i na pomenutim primjerima.

Tabela 1 – Vrijednosti PS i IS parametara dobijene ručnom, te automatskom metodom

Slika	Metod	PS	IS	TS
1	Ručno	4	2	Pozitivan
	Automatski	4	2	Pozitivan
2	Ručno	5	3	Pozitivan
	Automatski	5	3	Pozitivan
3	Ručno	5	3	Pozitivan
	Automatski	5	3	Pozitivan
4	Ručno	0	0	Negativan
	Automatski	0	0	Negativan
5	Ručno	5	3	Pozitivan
	Automatski	5	3	Pozitivan
6	Ručno	4	2	Pozitivan
	Automatski	4	2	Pozitivan
7	Ručno	5	3	Pozitivan
	Automatski	5	3	Pozitivan
8	Ručno	5	3	Pozitivan
	Automatski	5	2	Pozitivan
9	Ručno	5	3	Pozitivan
	Automatski	5	3	Pozitivan

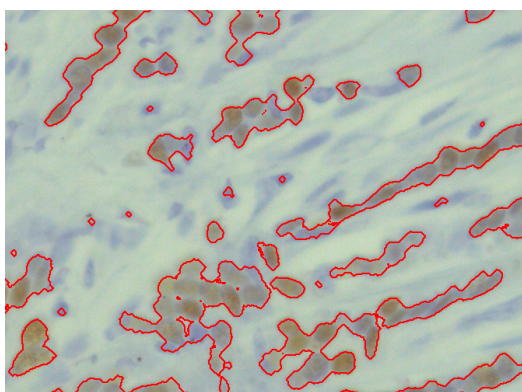


a) Izdvojen region sa tumorskim ćelijama

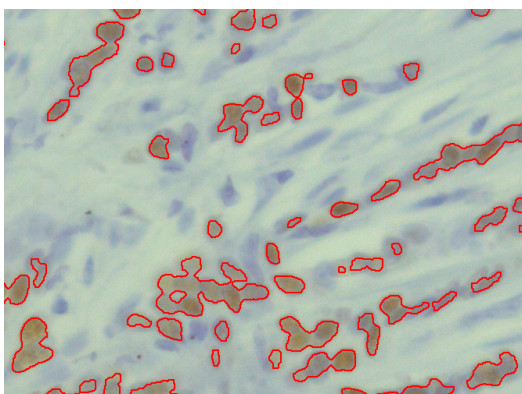


b) Izdvojen region sa pozitivnim tumorskim ćelijama

Slika 4 – Segmentacija imunohistološke slike sa $PS=5$, $IS=3$



a) Izdvojen region sa tumorskim ćelijama



b) Izdvojen region sa pozitivnim tumorskim ćelijama

Slika 5 - Segmentacija imunohistološke slike parametara $PS=4$, $IS=2$

Rezultati dobijeni ovim algoritmom su poređeni sa ručnim određivanjem vrijednosti PS i IS od strane patologa, a uporedni rezultati su dati Tabelom 1. U svim primjerima, osim primjera broj 8, vrijednosti PS i IS dobijene predloženim algoritmom podudaraju se sa vrijednostima koje je dao patolog. Dakle, iako nije vršeno izdvajanje svake od tumorskih ćelija posebno, moguće je izvršiti automatsku procjenu PS i IS na osnovu izdvojenih regiona od interesa.

U primjeru broj 8, međutim, tumorske ćelije zauzimaju manji dio slike i na određivanje praga segmentacije nepovoljno utiču strukture koje nisu od interesa. Kao rezultat se u region od interesa uključe i plavo obojene ćelije koje ne pripadaju tumorskim ćelijama, već drugim ćelijama jedra ili tkiva, a takođe su obojene u plavo. Segmentacija se može poboljšati određivanjem praga samo na osnovu regiona u kojem se nalaze tumorske ćelije.

4. ZAKLJUČAK

U ovom radu predložen je algoritam za automatsko određivanje statusa hormonskih receptora u tumorskim

ćelijama raka dojke. Prednost predloženog algoritma je u tome što je potpuno automatski i zasniva se na jednostavnim operacijama čime se zaobilaze složeni algoritmi za segmentaciju kolor slika.

Dobijeni rezultati obećavaju i ukazuju na mogućnost razvoja automatskih rješenja za analizu imunohistohemijskih slika. Kao rezultat bi se dobila brža analiza slike, uz uklanjanje mogućnosti greške ljekara usljed umora.

Dalje istraživanje treba usmjeriti ka automatskoj detekciji regiona u kojem se nalaze tumorske ćelije te analizi imunohistoloških slika na različitim uvećanjima.

5. ZAHVALNOST

Autori se zahvaljuju prof. dr Radoslavu Gajaninu, načelniku Zavoda za patologiju, KC Banja Luka na pomoći prilikom realizacije ovog rada.

6. LITERATURA

- [1] ER/PR PharmDx – Interpretation Manual, www.dako.com
- [2] V. J Tuominen, S. Ruotoistenmäki, A. Viitanen, Mervi Jumppanen, J. Isola, „ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67“, *Breast Cancer Research*, 12:R56, 2010
- [3] S. Kostopoulos, D. Cavouras, A. Daskalakis, P. Bougioukos, P. Georgiadis, G. C. Kagadis, I. Kalatzis, P. Ravazoula, G. Nikiforidis, „Colour-Texture based image analysis method for assessing the Hormone Receptors status in Breast tissue sections“, *Proc. of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS Cité Internationale*, Lyon, France, August 23-26, 2007
- [4] K.I. Laws, "Rapid Texture Identification," *Proc. SPIE Conf. Image Processing for Missile Guidance*, pp. 376-380, 1980.
- [5] H.A. Lehr, D. A. Mankoff, D. Corwin, G. Santeusano, and A. M. Gown, „Application of Photoshop-Based Image Analysis to Quantification of Hormone Receptor Expression in Breast Cancer“, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Volume 45(11): 1559–1565, 1997
- [6] P. Phukpattaranont, P. Boonyaphiphat, „Color Based Segmentation of Nuclear Stained Breast Cancer Cell Images“, *ECTI Trans. on Electrical Eng., Electronics, and Communications Vol.5, No. August 2007*
- [7] R.C. Gonzalez, R.E. Woods, *Digital Image Processing*, 3rd Ed., Prentice Hall, 2008
- [8] <http://en.wikipedia.org/wiki/Immunohistochemistry>