

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

## АВТОМАТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ЯДЕРНЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ГИСТОПРЕПАРАТАХ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ДВОРЕЦКИЙ Е.О.\*, ЛЕСНИЧАЯ О.В.\*\*, СЕНЬКОВИЧ С.А.\*\*, ГЕНЕРАЛОВ И.И.\*\*

\*УЗ «Витебская областная клиническая больница», г.Витебск, Республика Беларусь

\*\*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г.Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2016. – Том 15, №1. – С. 37-47.

## AUTOMATIC REAL TIME IHC NUCLEAR MARKERS ASSESSMENT IN HISTOLOGIC SPECIMENS OF BREAST CARCINOMA

DVORETSKY E.O.\*, LYASNICHAYA O.V.\*\*, SENKOVICH S.A.\*\*, GENERALOV I.I.\*\*

\*Public Health Establishment «Vitebsk Regional Clinical Hospital», Vitebsk, Republic of Belarus

\*\*Educational Establishment «Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University», Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2016;15(1):37-47.

---

### Резюме.

Рак молочной железы по-прежнему является ведущей онкопатологией у женщин. Точная оценка экспрессии опухолевых маркеров является принципиальной для подбора химиотерапевтических препаратов, оценки прогноза и экономической эффективности лечения конкретного пациента.

Учитывая известные проблемы применения иммуногистохимических методов в рутинной патоморфологической диагностике, в настоящей работе была разработана методика, способствующая стандартизации, снижению влияния человеческого фактора и уменьшению временных затрат на документирование.

В основе метода лежит разработанное авторами программное обеспечение «Immunору», позволяющее обрабатывать видеопоток с камеры, присоединённой к оптическому микроскопу. Анализ происходит в режиме реального времени одновременно с проведением визуальной оценки гистопрепарата. Программа создаёт видео «дополненной реальности»: поверх позитивных и негативных клеток накладываются цветные маркеры, облегчающие восприятие, а также количественная информация, такая как общее число клеток, индекс позитивных клеток. Вся необходимая информация рассчитывается и отображается автоматически. Пользователь может сохранить фотографии, экспортировать статистику для архивации или дальнейшего анализа в программах для работы с электронными таблицами, таких как Microsoft Excel или LibreOffice Calc.

В настоящей работе проведён корреляционный анализ между визуальной и автоматической оценкой индекса позитивных клеток ( $r_{\text{pearson}}=0,91$ ;  $r_{\text{spearman}}=0,8$ ;  $p<0,0001$ ).

Immunору является свободным программным обеспечением, исходный код программы доступен в сети Интернет под лицензией MIT. Предложенная методика может найти широкое применение в клинической практике и научной работе.

*Ключевые слова:* рак молочной железы, иммуногистохимия, цитометрия, автоматический анализ изображений, машинное зрение, Ki-67, рецепторы эстрогена альфа, рецепторы прогестерона.

### Abstract.

Breast cancer is the most common oncologic pathology among women worldwide. Precise cancer markers assessment is crucial for treatment development, evaluation of prognosis and economic efficiency for a given patient.

Taking into consideration known issues with immunohistochemical techniques in routine pathomorphological

diagnosis, the new method for automatic assay analysis was developed. It reduces interobserver variation, time consumption and requires less effort for documentation.

The method is based on developed original software called «Immunopy», which allows to perform video processing from camera attached to an optical microscope. Analysis accomplishes in real time, simultaneously with visual slide assessment.

The program produces «augmented reality» video with color markers overlay, which facilitates distinguishing between positive and negative cells. Numerical cell features such as count, labeling index displayed as well. User can save acquired photos, and export statistics in spreadsheet programs like Microsoft Excel or LibreOffice Calc. Correlation analysis between visual and automatic assessment of labeling index ( $r_{pearson}=0,91$ ;  $r_{spearman}=0,8$ ;  $p<0,0001$ ) performed as well.

Immunopy is free software and source code is distributed under the terms of MIT license.

Given methods and algorithms can be found useful in clinical practice and research.

*Key words: breast neoplasms, immunohistochemistry, image cytometry, computer-assisted image analysis, computer-assisted image interpretation, Ki-67 antigen, estrogen receptor alpha, progesterone receptors.*

В Республике Беларусь рак молочной железы занимает первое место по частоте среди злокачественных новообразований у женщин [1].

Иммуногистохимическое исследование послеоперационного материала играет ключевую роль в диагностике, оценке прогноза и тактики лечения. Определение ядерных маркеров, таких как рецепторы к эстрогену (ER), прогестерону (PR) и Ki-67, позволяет определить пролиферативную активность опухоли и её чувствительность к химиопрепаратам, что важно для выбора эффективных методов лечения [2, 3].

Рутинные патоморфологические исследования, проводимые с целью определения иммунофенотипического профиля опухоли, имеют ряд недостатков. Так, визуальная оценка с применением полуколичественных методик приводит к появлению элемента субъективизма в работе патоморфологов. В то же время применение методов автоматического анализа препаратов позволит снизить временные затраты и уменьшить влияние человеческого фактора при исследовании биопсийного материала.

Для оценки иммуногистохимических (ИГХ) препаратов другими авторами уже было представлено как общее [4, 5], так и специализированное [6] программное обеспечение (ПО), в том числе с открытым исходным кодом и исчерпывающей документацией. Однако данное ПО предназначено для анализа уже готовых снимков и не может предоставить мгновенный ответ. Кроме того, фотографирование необходимых полей зрения требует времени, утомительно и, при отсутствии специальной подготовки, приводит к неудовлет-

ворительным результатам. Совмещение процессов непосредственного изучения препарата и его автоматической оценки, как нам кажется, значительно упрощает постановку правильного патоморфологического диагноза. Идеальное ПО должно решать следующие задачи:

- а) немедленно получать результат анализа, не изменяя подхода патоморфолога к исследованию микропрепарата;
- б) получать пригодный для архивации снимок и связанную с ним статистику;
- в) обеспечить воспроизводимые результаты при соблюдении стандартных условий съёмки.

Таким образом, целью настоящей работы была разработка программного обеспечения, позволяющего автоматически оценивать индекс позитивных ядер в иммуногистохимических препаратах карциномы молочной железы в режиме реального времени с учётом описанных выше требований.

## Материал и методы

### *Исследуемый патоморфологический материал*

Разработанный алгоритм тестировался на готовых гистологических микропрепаратах карциномы молочной железы, взятых из архива УЗ «Витебское областное клиническое патологоанатомическое бюро». Гистологические микропрепараты представляли собой срезы толщиной 5-7 мкм, приготовленные из фиксированных в формалине и уплотнённых парафином фрагментов опухоли. Срезы были окрашены непрямым иммунопероксидазным методом с применением антител к рецепторам

эстрогена и прогестерона, фактору пролиферации Ki-67. В качестве хромогена для срезов был использован 3,3'-диаминобензидин (ДАВ), для фонового контр-окрашивания – гематоксилин (НЕМ) [7, 8].

#### **Оборудование**

Микроскоп Leica DMI 2000 со светофильтром DLF (англ. *daylight filter*).

Цветная камера Leica DFC295 с CMOS матрицей и разрешением 2048×1536 (3,1 МРх).

Персональный компьютер под управлением MS Windows XP Professional x86 (NVIDIA GeForce 9600 GT / Intel Celeron E3300).

#### **Программные средства**

Программное обеспечение было написано на языке Python с использованием библиотек Numpy, Scipy, Scikit-image, OpenCV, PySide (Qt), PyOpenGL, PyOpenCL [9-14]. Для прототипирования алгоритма и генерации иллюстраций к данной работе применялась библиотека Matplotlib [15] в окружении IPython [16].

Leica Microsystems предоставляет два способа захвата изображений со своих камер: посредством Leica Application Suite и через TWAIN-интерфейс. Ни один из них не позволяет работать с камерой из других приложений напрямую и получать видеопоток. Данная проблема была решена с использованием программного адаптера Vaumer optronic проекта µManager [17]. Этот программный пакет разрабатывается Калифорнийским университетом в Сан-Франциско (UCSF) в лаборатории имени Рона Вале и, являясь программным обеспечением с открытым исходным кодом, предоставляет графический интерфейс и библиотеку функций для управления автоматизированными микроскопами.

В процессе использования адаптера были обнаружены ошибки, однако благодаря открытому исходному коду их удалось устранить. Команда разработчиков UCSF приняла от автора Immunору исправленный исходный код в июле 2014 г. [18].

#### **Реализация алгоритма**

##### **Общий принцип исследования**

Приложение Immunору разрабатывалось с учётом используемых в Республике Беларусь протоколов окрашивания и анализа гистологических препаратов [7]. Разработчик программы стремился свести к минимуму ру-

тинные подготовительные операции и полностью избавиться от необходимости подстройки алгоритма в процессе изучения препарата, стремясь создать удобный экономящий время инструмент.

При перемещении препарата компьютер непрерывно обрабатывает изменяющееся изображение с камеры, при этом на мониторе отображается текущее поле зрения с автоматически рассчитанной статистикой (индекс позитивных клеток) и помеченными ядрами клеток. При необходимости можно вывести на экран только негативные или только позитивные ядра, при этом каждое из них помечается индивидуально (рис. 6).

Далее будет рассмотрена подготовка оборудования, все этапы получения и анализа видеопотока, а также подробности, касающиеся тонкой настройки, сохранения статистики и архивации изображений. Скриншот главного окна программы представлен на рисунке 1, также опубликован видеоролик, демонстрирующий работу алгоритма [19].

##### **Настройка микроскопа**

Использование Immunору не требует какой-либо перенастройки оборудования. Описанные ниже аспекты учитываются в любой лаборатории, проводящей микроскопические исследования.

Общей практикой в патоморфологических лабораториях является исследование препаратов на среднем увеличении (объективы 10x и 20x). В сочетании с имеющейся камерой алгоритм лучше всего показал себя в работе с объективом 20x.

Используемые для освещения препарата галогеновые лампы дают мягкий теплый свет. Рекомендуется применить синий светофильтр (DLF) для коррекции жёлтого оттенка. Более тонкая программная настройка баланса белого описана в следующем подразделе.

Оптическая система микроскопа должна быть подготовлена обычным образом: конденсор центрирован, а свет настроен по Кёлеру (нем. *Köhler illumination*).

##### **Требования к камере**

Разрешение получаемого изображения должно быть, как минимум 2 пикселя/мкм, с учётом используемого объектива, и при этом охватывать достаточное поле зрения. Допускается использование оборудования с меньшей разрешающей способностью – кадры бу-

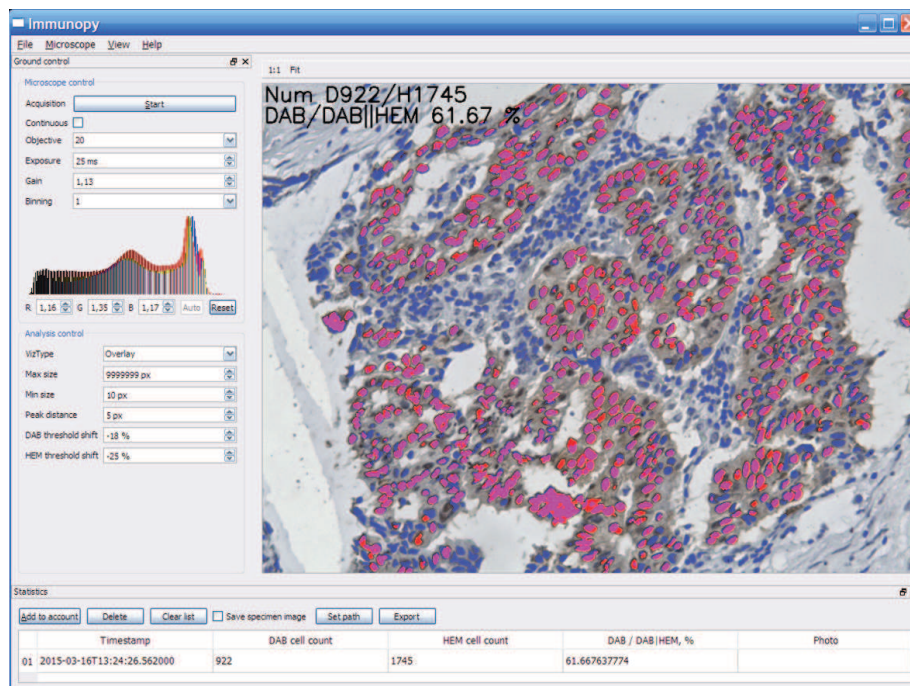


Рисунок 1 – Основное окно программы.

дуг увеличены до необходимого разрешения путём линейной интерполяции, однако качество их анализа не гарантируется.

### Получение изображений

#### Окраска препаратов

Immunopry работает с препаратами, окрашенными 3,3'-диаминобензидином (DAB) и гематоксилином (HEM). Для полного понимания работы алгоритма и получения воспроизводимых результатов потребуется рассмотреть особенности взаимодействия краситель-клетка.

ДАВ (хромоген) даёт окраску золотисто-коричневого цвета. Поскольку в нашем исследовании выявлялись маркеры ER, PR и Ki-67, локализующиеся в ядре, ядра позитивных клеток карциномы молочной железы приобретали золотисто-коричневую окраску.

Базофильный краситель гематоксин также окрашивает ядра, но в синий цвет. Упрощённо оценка экспрессии антигена в препарате (англ. *labeling index*) определяется как отношение количества позитивных (коричневых) ядер ко всем ядрам клеток препарата молочной железы (коричневым и синим). Следует отметить, что ядра позитивных клеток содержат оба красителя одновременно (наблюдается колокализация), хотя это часто незаметно для глаз.

Реакции антиген-антитело (к ним относятся и ИГХ) не являются стехиометрическими, и интенсивность окраски DAB зависит от количества антигена нелинейно. DAB не поглощает свет, а рассеивает его, т. е. не следует закону Бугера-Ламберта-Бера, который описывает линейное отношение между концентрацией вещества в среде и её результирующей оптической плотностью. Кроме того, спектр DAB варьирует в широких пределах в зависимости от концентрации [20].

Таким образом, нестабильность спектра DAB усложняет выделение индивидуальных красителей. Описанные ограничения не позволяют точно измерить количество определяемого в образце антигена.

#### Настройка освещения и баланса белого

В качестве источника света в современных оптических микроскопах используется лампа накаливания. В зависимости от приложенного напряжения она изменяет свою яркость и цветовую температуру: с повышением яркости жёлтый цвет стремится к сине-белому. Изменение цветовой температуры просвечивающего препарат света определяет характер его окраски и значительно влияет на восприятие.

Пучок света от лампы, пройдя через препарат, поглощается красителем. Разные красители имеют разные спектры поглощения,



что и формирует характерный для них цвет окрашивания. Комбинирование различных красителей позволяет получить необходимую контрастность препарата: выделить строму, визуальнo отделить ядра от цитоплазмы.

Immipору выделяет каждый из красителей и обрабатывает их по отдельности. Алгоритм цветовой деконволюции, лежащий в основе данной операции, требует, чтобы поступающее на вход изображение имело корректный баланс белого [21, 22]. Это означает, что не занятый клетками фон должен быть белым или нейтрально-серым. В работе [6] оптимальным значением яркости (средней интенсивности серого) для пустого калибровочного изображения указывается диапазон 200-250.

Для удовлетворения этих требований была применена следующая методика:

а) установить нейтральный или DLF светофильтр, если требуется. Сфокусироваться на препарате и настроить комфортную для человека яркость лампы и экспозицию, избегая пере- и недоэкспонирования. Для удобства проведения этого этапа в графическом интерфейсе (рис. 1) отображается гистограмма;

б) удалить препарат. Поле зрения станет равномерно освещенным, возможно с оттенком, который необходимо убрать;

в) нажать кнопку «Auto». Immipору начнёт воспринимать свет пустого поля как белый. Оттенок, если таковой был, исчезнет (рис. 2б);

г) установить препарат и начать исследование.

По нажатию кнопки «Auto» происходит определение доминирующих значений гистограммы каждого из цветовых каналов и расчёт соответствующих им множителей коррекции [23]. Любой из множителей может быть изменён вручную в любой момент времени.

После коррекции баланса белого яркость изображения регулируется только изменением времени выдержки (экспозиции) камеры, так как изменение яркости лампы приводит к нежелательному сдвигу её цветовой температуры. В любом случае вследствие нелинейных характеристик камер изменение этих параметров в процессе съёмки может привести к смещению цветового баланса.

#### Анализ кадров

##### Соблюдение масштаба

В графическом интерфейсе Immipору имеется список откалиброванных объективов используемого микроскопа. Программа автоматически масштабирует полученное с камеры изображение до разрешения 2 пикселя/мкм, в зависимости от выбранного объектива, путём линейной интерполяции.

##### Фильтрация

Для уменьшения шумов изображение обрабатывается срединным фильтром с размером окрестности 2×2 пикселя.

##### Выделение красителей

Красители разделяются при помощи метода обратной цветовой свёртки (англ. *color deconvolution*) на два полутоновых изображения: для НЕМ и для DAB (рис. 3) [22]. До этапа подсчёта статистики они обрабатываются независимо друг от друга.

##### Порог

Для отделения клеток от фона (первичной сегментации) используется метод глобальной пороговой бинаризации (англ. *threshold*). Значение порога находится по математическому методу, предложенному Yen [24]; полученное значение изменяется в соответствии с константой, определённой экспериментально (рис. 4). Отделённые от фона данным методом клетки представлены на рисунке 5а, д.

##### Сегментация и фильтрация

Сегментация путём определения глобаль-

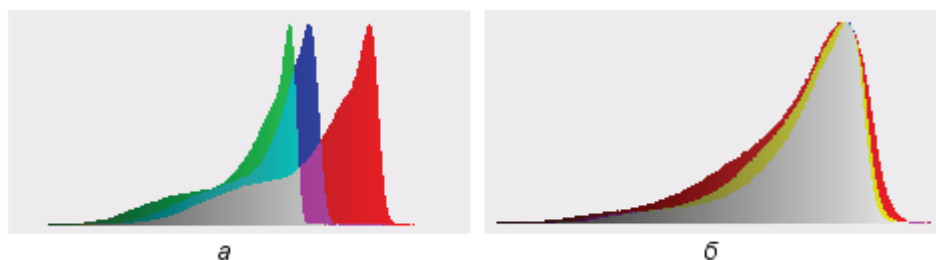


Рисунок 2 – RGB гистограммы до (а) и после (б) коррекции баланса белого.

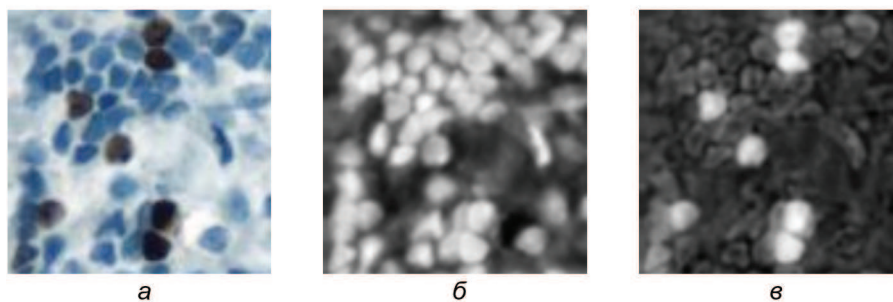


Рисунок 3 – Исходное изображение (а); выделенные при помощи обратной свёртки изображения оптической плотности НЕМ и DAB соответственно (б, в).

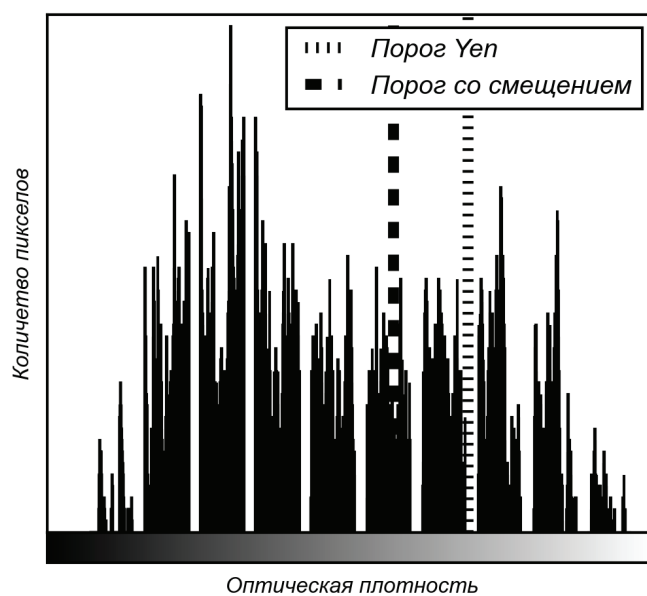


Рисунок 4 – Пример гистограммы изображения оптической плотности DAB с рассчитанным по алгоритму Уеп порогом.

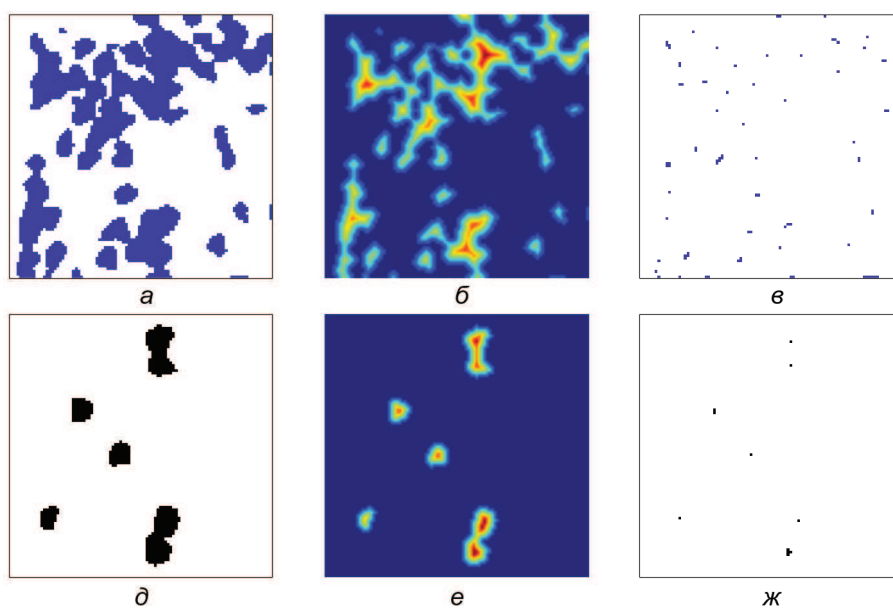


Рисунок 5 – Маска для НЕМ (а); EDT для НЕМ (б); точки роста, соответствующие индивидуальным ядрам, для НЕМ (в); маска для DAB (д); EDT для DAB (е); точки роста, соответствующие индивидуальным ядрам, для DAB (ж).

ного порога является быстрым, но неточным методом, так как не учитывает локальные вариации оптической плотности красителя на изображении. В итоге переходы между двумя близко расположенными клетками могут не быть идентифицированы как фон. Определение расположения индивидуальных ядер определяется на основе пиков (рис. 5в, ж), рассчитанных при помощи функции преобразования расстояния EDT (англ. *euclidean distance transform*) (рис. 5б, е). Эта информация учитывается алгоритмом водораздела [25], который и осуществляет окончательную сегментацию. Описанные преобразования позволяют получить два изображения (для НЕМ и DAB), каждое из которых содержит объекты, соответствующие индивидуальным окрашенным клеткам (рис. 6).

На изображении встречаются обломки клеток, дефекты окрашивания, а также лишние клетки (например, фибробласты), подсчёт которых не требуется. Для их удаления применяется фильтрация по размеру: удаляются слишком маленькие и слишком большие объекты. Предельные размеры подлежащих фильтрации частиц могут быть изменены пользователем. Сегментированные клетки с удалёнными артефактами продемонстрированы на рисунке 6б, в.

Методы количественной оценки маркеров

Программа позволяет оценивать количество ядер в поле зрения, а также соотношения занимаемых ими площадей.

Поскольку гематоксилин должен окрашивать все ядра, индекс позитивных клеток (англ. *labeling index*) может быть рассчитан путём подсчёта индивидуальных ядер по формуле 1:

$$I_{positive} = \frac{N_{DAB}}{N_{HEM}} \times 100 \quad (1)$$

где I – индекс позитивных клеток, %;  
N – количество ядер, окрашенных НЕМ или DAB.

Однако на практике данный подход применять затруднительно, так как артефакты окрашивания снижают точность сегментации. Так, если интенсивность DAB велика, а контрастирование гематоксилином не выражено, часть отрицательных ядер не будет подсчитана. Применение хромогена с более ясным спектром и линейными характеристиками светопоглощения, такого как АЕС (3-амино-9-этилкарбазол), уменьшает данный неблагоприятный эффект.

Поскольку необходимо измерить соотношение позитивных и негативных ядер клеток одного типа, то можно допустить, что частное площадей ядер будет примерно равно частному от их абсолютного количества. Учитывая возможную колокализацию красителей (ядро может содержать и DAB, и НЕМ), за общую площадь можно принять попиксельную дизъюнкцию их масок (матриц) по формуле 2:

$$I_{positive} = \frac{S(M_{DAB})}{S(M_{HEM} \vee M_{DAB})} \times 100 \quad (2)$$

где I – индекс позитивных клеток, %;  
S(M) – площадь, занимаемая красителем на двумерной матрице M, в пикселях.

Графическое представление данного метода представлено на рисунке 6а как отношение площади колокализованного DAB и НЕМ (розовый цвет) ко всей окрашенной площади (розовый и синий цвета). Данный подход показал наибольшую стабильность и был использован как основной при тестировании программы.

Сбор и сохранение результатов анализа

Immipору в процессе анализа препарата предоставляет следующие возможности:

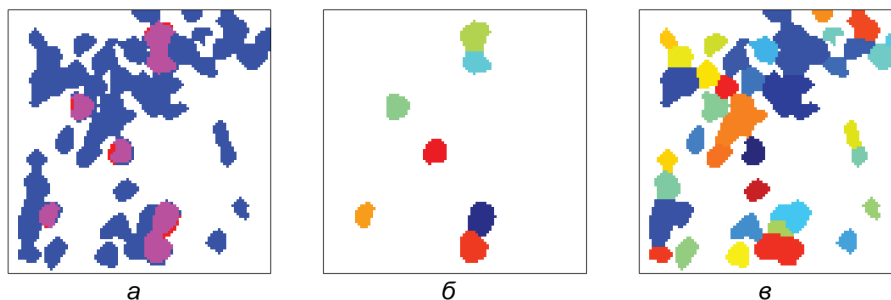


Рисунок 6 – Сегментированные изображения в псевдоцветах, часть объектов отфильтрована по размеру. Колокализация обоих красителей (а); ядра, меченные НЕМ (б); ядра, меченные DAB (в).

а) сохранение количественных данных по проанализированным полям зрения с привязкой по времени (в виде таблицы);

б) сохранение изображения текущего поля зрения в формате TIFF (с компрессией или без неё);

в) экспорт накопленных данных в формат электронных таблиц CSV (данный формат поддерживается программами MS Excel и Libreoffice Calc).

### Результаты и обсуждение

Для тестирования программы использовались препараты инвазивного рака молочной железы. Срезы были окрашены непрямым иммунопероксидазным методом (выявлялась экспрессия рецепторов эстрогена, прогестерона и Ki-67) [7, 8].

Репрезентативным считалось поле зрения, в котором инвазивный компонент опухоли, взятый из периферической зоны карциномы, имел минимальное количество артефактов приготовления и окрашивания срезов и для изучаемого среза максимально экспрессировал исследуемые маркеры. В каждом поле зрения находилось как минимум 500 клеток инвазивного компонента рака.

Экспрессия маркеров была оценена в 51 поле зрения как визуально, так и с помощью программы Immunору (с подсчётом DAB-позитивных клеток и общего количества опухолевых клеток в поле зрения). Про-

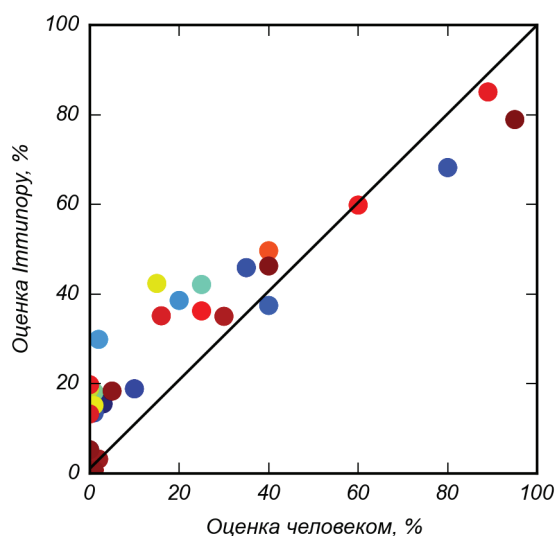


Рисунок 7 – Корреляционная взаимосвязь оценки индекса позитивных клеток патоморфологом и программой.

граммное обеспечение показало высокий уровень корреляции с оценкой, данной человеком ( $r_{pearson}=0,91$ ;  $r_{spearman}=0,8$ ;  $p<0,001$  (рис. 7).

Immunору разрабатывался с расчётом на высокую производительность и может использовать преимущества современных многоядерных процессоров и графических ускорителей (табл. 1). Так, во время работы Immunору запущен пул процессов для параллельной сегментации изображения, а также несколько потоков для неблокирующего захвата видеопотока, вывода графики и пр. Если в системе присутствует современная видеокарта с поддержкой OpenCL (General Purpose Graphic Processor Unit – GPGPU), алгоритм цветовой деконволюции выполняется на ней [14, 26].

Как видно из таблицы 1, обработка видеопотока в реальном времени — ресурсоёмкий процесс. Различие в FPS для одного и того же CPU обусловлено большей площадью поля зрения для объектива 10x. Для удобства работы рекомендуется использование производительного компьютера. В случае отсутствия в лаборатории такового, в Immunору предусмотрен режим анализа полей зрения «по требованию»: программа выводит на экран необработанное видео, а при нажатии соответствующей кнопки проводится расчёт статистики для последнего кадра.

В процессе тестирования работы Immunору сформировались определённые требования к используемому оборудованию и качеству исследуемых препаратов. В целом они не отличаются от общепринятых, логичны и соответствуют наиболее комфортным условиям для работы патоморфолога.

Некоторые исследователи отмечают, что, несмотря на использование общепринятых протоколов, имеются существенные различия в качестве окраски и интерпретации результатов иммуногистохимической реакции в разных лабораториях [3]. Поэтому для получения стабильных, воспроизводимых результатов рекомендуется применять аутостейнер. Остаётся открытым вопрос выбора хромогена. Продукт полимеризации DAB не поглощает, а рассеивает свет, при этом давая широкий безликий спектр [21]. Таким образом, избыток или недостаток хромогена даёт различный спектр, что неблагоприятно для алгоритма обратной цветовой свертки. Несмотря на недостатки данного красителя, он лучше подходит



Таблица 1 – Сравнение производительности алгоритма для разных объективов и CPU

CPU	Объектив	FPS	FPS с OpenCL (GPGPU)
Intel® Celeron™ E3300 2.50GHz, два ядра	10x	0,19	0,28
Intel® Celeron™ E3300 2.50GHz, два ядра	20x	0,59	0,73
Intel® Core™ i7-2600 3.40GHz, четыре ядра	10x	0,64	1,1
Intel® Core™ i7-2600 3.40GHz, четыре ядра	20x	2,7	3,0

для длительного хранения препаратов, так как потенциально более привлекательный АЕС со временем выцветает.

В условиях недостаточного прокрашивания препарата алгоритмом могут выявляться не все клетки. Пользователь может понизить установленный по умолчанию порог ядра/фон, чтобы восстановить подсчёт слишком бледных ядер.

В случае избытка DAB, хромоген выявляется в цитоплазме, что приводит к увеличению ложнопозитивных результатов. К сожалению, DAB не пропускает свет, и сегментировать широкие коричнево-чёрные поля, захватывающие целые группы ядер, в этом случае практически невозможно.

Наиболее неблагоприятным вариантом является избыточное окрашивание одним красителем и недостаточное – другим.

Следует отметить, что препараты с описанными выраженными дефектами непригодны для оценки как машиной, так и человеком.

## Заключение

Разработан алгоритм, позволяющий достоверно оценивать индекс позитивных клеток (англ. *labeling index*) в иммуногистохимически окрашенных препаратах молочной железы.

Написано и апробировано программное обеспечение, позволяющее автоматически оценивать индекс позитивных ядер в иммуногистохимических препаратах карциномы молочной железы в режиме реального времени.

Исходный код программного обеспечения опубликован в сети Интернет и свободно доступен по лицензии MIT [27].

Реализован новый подход к патоморфологическому исследованию, при котором изучение препарата невооружённым глазом

сопровождается видео с помеченными на нём клетками и рассчитанной статистикой, облегчающими постановку патоморфологического диагноза («дополненная реальность»).

Проведено тестирование работы программы на препаратах карциномы молочной железы (выявлялись маркеры ER, PR, Ki-67). ПО показало высокий уровень корреляции с «золотым стандартом» – ручным патоморфологическим исследованием ( $r_{\text{pearson}}=0,91$ ;  $r_{\text{spearman}}=0,8$ ;  $p<0,001$ ).

Благодаря функциям сохранения фотографий и экспорта статистики, данное ПО является удобным инструментом для проведения научных и рутинных патоморфологических исследований. Мгновенное получение результата анализа исключает непреднамеренное сохранение некачественных фотографий и ошибочных данных.

## Литература

1. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2009 г. / под ред. М. И. Давыдова, Е. М. Акселя // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 22, № 3, прил. 1. – С. 9–170.
2. Герштейн, Е. С. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы / Е. С. Герштейн // Практ. онкология. – 2002. – Т. 3, № 1. – С. 38–44.
3. Allred, D. C. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer / D. C. Allred // Modern Pathology. – 2010 May. – Vol. 23, suppl. 2. – P. S52–59.
4. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes / A. E. Carpenter [et al.] // Genome Biol. – 2006. – Vol. 7, N 10. – P. R100.
5. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software / L. Kametsky [et al.] // Bioinformatics. – 2011 Apr. – Vol. 27, N 8. – P. 1179–1180.
6. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67 / V. J. Tuominen

- [et al.] // *Breast. Cancer. Res.* – 2010. – Vol. 12, N 4. – P. R56.
7. Иммуногистохимические методы исследования новообразований различного генеза : инструкция по применению / Э. А. Надьров [и др.]. – Гомель, 2011. – 23 с.
  8. Метод иммуногистохимической оценки гормонорецепторного статуса и HER2/NEU при раке молочной железы : инструкция по применению / О. В. Лесничая [и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2014. – 8 с.
  9. Oliphant, T. E. Python for Scientific Computing / T. E. Oliphant // *Computing in Science & Engineering.* – 2007 Jun. – Vol. 9, N 3. – P. 10–20.
  10. van der Walt, S. The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation / S. van der Walt, S. C. Colbert, G. Varoquaux // *Computing in Science & Engineering.* – 2011. – Vol. 13, N 2. – P. 22–30.
  11. SciPy: Open source scientific tools for Python [Electronic resource]. – 2001. – Mode of access: <http://scipy.org/>. – Date of access: 15.11.2015.
  12. Scikit-image: image processing in Python / S. van der Walt [et al.] // *PeerJ.* – 2014. – Vol. 2. – P. e453.
  13. Bradski, G. The opencv library / G. Bradski // *Doctor Dobbs Journal.* – 2000 Nov. – Vol. 25, N 11. – P. 120–126.
  14. PyCUDA and PyOpenCL: A Scripting-Based Approach to GPU Run-Time Code Generation / A. Klöckner [et al.] // *Parallel Computing.* – 2012 Mar. – Vol. 38, N 3. – P. 157–174.
  15. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D Graphics Environment / J. D. Hunter // *Computing in Science Engineering.* – 2007 May-Jun. – Vol. 9, N 3. – P. 90–95.
  16. Pérez, F. IPython: A System for Interactive Scientific Computing / F. Pérez, B. E. Granger // *Computing in Science Engineering.* – 2007 May-Jun. – Vol. 9, N 3. – P. 21–29.
  17. Computer control of microscopes using µManager / A. Edelstein [et al.] // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2010 Oct. – Chapter. – Unit14.20.
  18. Дворецкий, Е. О. Разработка протоколов захвата изображений с использованием свободного программного обеспечения Micro-manager / Е. О. Дворецкий // *Студенческая медицинская наука XXI века : материалы XIV междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию образования ВГМУ, Витебск, 23–24 окт. 2014. – Витебск, 2014. – С. 59–60.*
  19. Dvoretzky, E. Ki67 labeling index in breast carcinoma slice (colorized) [Electronic resource] / Eugene Dvoretzky // *Youtube.* – 2015. – Mode of access: <https://www.youtube.com/watch?v=jwfPKooYHZs>. – Date of access: 15.11.2015.
  20. van der Loos, C. M. Multiple Immunoenzyme Staining: Methods and Visualizations for the Observation With Spectral Imaging / C. M. van der Loos // *J. Histochem. Cytochem.* – 2008 Apr. – Vol. 56, N 4. – P. 313–328.
  21. Landini, G. Colour Deconvolution [Electronic resource] / G. Landini. – 2015. – Mode of access: <http://mecourse.com/landing/software/cdeconv/cdeconv.html>. – Date of access: 03.10.2014.
  22. Ruifrok, A.C. Quantification of histochemical staining by color deconvolution / A. C. Ruifrok, D. A. Johnston // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* – 2001 Aug. – Vol. 23, N 4. – P. 291–299.
  23. Viggiano, J. A. S. Comparison of the accuracy of different white-balancing options as quantified by their color constancy / J. A. S. Viggiano // *Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography. Applications V.* – San Jose, California, 2004. – P. 323–333.
  24. Sezgin, M. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation / M. Sezgin, B. Sankur // *Journal of Electronic Imaging.* – 2004 Jan. – Vol. 13, N 1. – P. 146–168.
  25. Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei / N. Malpica [et al.] // *Cytometry.* – 1997. – Vol. 28. – P. 289–297.
  26. Дворецкий, Е. О. Вычислительная оптимизация метода спектрального разделения гистологических красителей / Е. О. Дворецкий // *Актуальные вопросы современной медицины и фармации : материалы 67-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 23–24 апр. 2015 г. – Витебск, 2015. – С. 699–701.*
  27. Dvoretzky, E. Immunopy [Electronic resource] / Eugene Dvoretzky // *Github.* – 2015. – Mode of access: <https://github.com/radioxoma/immunopy>. – Date of access: 10.10.2015.

*Поступила 11.01.2016 г.*

*Принята в печать 19.02.2016 г.*

## References

1. Davydov MI, Aksel EM, red. Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2009 g. [Statistics of malignant neoplasms in Russia and the CIS countries in 2009]. *Vestn RONTs im NN Blokhina RAMN.* 2011;22(3) pril 1:9-170.
2. Gershteyn ES. Tkanevye markery kak faktory prognoza pri rake molochnoi zhelezy [Fabric markers as forecast factors at a breast cancer]. *Prakt Onkologiya.* 2002;3(1):38-44.
3. Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol.* 2010 May;23 Suppl 2:S52-9.
4. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 2006;7(10):R100.
5. Kamentsky L, Jones TR, Fraser A, Bray MA, Logan DJ, Madden KL, Ljosa V, Rueden C, Eliceiri KW, Carpenter AE. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics.* 2011 Apr;27(8):1179-80.
6. Tuominen VJ, Ruotoistenmäki S, Viitanen A, Jumppanen M, Isola J. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4):R56.
7. Nadyrov EA, Rogov YuI, Dubrovskiy ACh, Voropaev

- EV, Achinovich SL, Krylov AYu, Bogdanovich AP, Prokopovich AS. Immunogistokhimicheskie metody issledovaniia novoobrazovaniia razlichnogo geneza [Immunohistochemical methods of research of neoplasms of various genesis]: instruktsiia po primeneniiu. Gomel, RB; 2011. 23 p.
8. Lesnichaya OV, Krylov EYu, Dubrovskiy ACh, Vozmitel MA. Metod immunogistokhimicheskoi otsenki gormonoretseptornogo statusa i HER2/NEU pri rake molochnoi zhelezy [A method of an immunohistochemical assessment of the gormonoretseptorny status and HER2/NEU at a breast cancer]: instruktsiia po primeneniiu. Vitebsk, RB: VGMU; 2014. 8 p.
  9. Oliphant TE. Python for Scientific Computing. Computing in Science & Engineering. 2007 Jun;9(3):10-20.
  10. van der Walt S, Colbert SC, Varoquaux G. The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. Computing in Science & Engineering. 2011;13(2):22-30.
  11. SciPy: Open source scientific tools for Python [Internet]. 2001 [cited 2015 Nov 15]. Available from: <http://scipy.org/>.
  12. van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, Boulogne F, Warner JD, Yager N, Gouillart E, Yu T. Scikit-image: image processing in Python. PeerJ. 2014;2:e453.
  13. Bradski G. The opencv library. Doctor Dobbs Journal. 2000 Nov;25(11):120-6.
  14. Klöckner A, Pintob N, Leed Yu, Catanzarod B, Ivanove P, Fas A. PyCUDA and PyOpenCL: A Scripting-Based Approach to GPU Run-Time Code Generation. Parallel Computing. 2012 Mar;38(3):157-74.
  15. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. Computing in Science Engineering. 2007 May-Jun;9(3):90-5.
  16. Pérez F, Granger BE. IPython: A System for Interactive Scientific Computing. Computing in Science Engineering. 2007 May-Jun;9(3):21-9.
  17. Edelstein A, Amodaj N, Hoover K, Vale R, Stuurman N. Computer control of microscopes using µManager. Curr Protoc Mol Biol. 2010 Oct;Chapter:Unit14.20.
  18. Dvoretzkiy EO. Razrabotka protokolov zakhvata izobrazheniispolzovaniemsvobodnogo programmogo obespecheniia Micro-manager [Development of protocols of capture of images with use of the free software of Micro-manager]. Studencheskaia meditsinskaia nauka XXI veka: materialy XIV mezhdunar nauch-prakt konf, posviashch 80-letiiu obrazovaniia VGMU, Vitebsk 23–24 okt 2014. Vitebsk, RB; 2014. P. 59-60.
  19. Dvoretzkiy E. Ki67 labeling index in breast carcinoma slice (colorized) [Internet]. Youtube. 2015 [cited 2015 Nov 15]. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=jwfPKooYHZs>.
  20. van der Loos CM. Multiple Immunoenzyme Staining: Methods and Visualizations for the Observation With Spectral Imaging. J Histochem Cytochem. 2008 Apr;56(4):313-28.
  21. Landini G. Colour Deconvolution [Internet]. 2015 [cited 2014 Oct 3]. Available from: <http://mecourse.com/landing/software/cdeconv/cdeconv.html>.
  22. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. Anal Quant Cytol Histol. 2001 Aug;23(4):291-9.
  23. Viggiano JAS. Comparison of the accuracy of different white-balancing options as quantified by their color constancy. In: Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography. Applications V. San Jose, California; 2004. P. 323-33.
  24. Sezgin M, Sankur B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. Journal of Electronic Imaging. 2004 Jan;13(1):146-68.
  25. Malpica N, de Solo'zano CO, Vaquero JJ, Santos A, Vallcorba I, Garcí'a-Sagredo JM, del Pozo F. Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. Cytometry. 1997;28:289-97.
  26. Dvoretzkiy EO. Vychislitel'naia optimizatsiia metoda spektral'nogo razdeleniia gistologicheskikh krasitelei [Computing optimization of a method of spectral separation of histological stains]. V: Aktual'nye voprosy sovremennoi meditsiny i farmatsii: materialy 67-i itogovoi nauch-prakt konf studentov i molodykh uchenykh, Vitebsk 23–24 apr 2015 g. Vitebsk, RB; 2015. P. 699-701.
  27. Dvoretzkiy E. Immunopy [Internet]. Github. 2015 [cited 2015 Oct 10]. Available from: <https://github.com/radioxoma/immunopy>.

Received 11.01.2016

Accept 19.02.2016

#### Сведения об авторах:

Дворецкий Е.О. – врач-интерн УЗ «Витебская областная клиническая больница»;

Лесничая О.В. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии УО «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет»;

Сенькович С.А. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет»;

Генералов И.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической микробиологии УО «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет».

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет», кафедра клинической микробиологии. E-mail: [radioxoma@gmail.com](mailto:radioxoma@gmail.com) – Дворецкий Евгений Олегович.