

CRITERII MORFOMETRICE ÎN EVALUAREA FROTIURILOR MAMARE

Daniela Mihalache^{1,2}, Simona-Eliza Giușcă³, Carmen Ionescu⁴,
Irina-Draga Căruntu⁴, Adriana Grigoraș⁴

1. doctorand Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași
2. Serviciul de Anatomie Patologică și Prosectură, Spitalul Județean Brăila
3. Spitalul Clinic Județean de Urgență Sibiu
4. Disciplina Histologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași

MORPHOMETRIC CRITERIA IN THE ASSESSMENT OF MAMMARY SMEARS (ABSTRACT):

The applications of the computer-assisted image processing and analysis in the field of pathology are now developed in order to design, validate and implement supplementary and/or complementary tools for automated identification and classification, based on the characterization of the lesions in terms of the measurement values. The aim of our study is to create an original computerized technique for the investigation of the mammary smears. The study group included 20 Papanicolaou mammary smears, diagnosed as normal, benign and malign. From all smears, we captured digitized images, corresponding to significant microscopic fields – as cellularity. By using the Zeiss KS400 software, we constructed the macro generically named MAMAR, which includes a sequence of the automated operations allowing the extraction of the morphometric parameters for the representative cells. For all defined parameters (cell area, nuclear area, nucleo-citoplasmic ratio, equivalent diameter and form factor), an automated measurement function was applied. The comparison between the morphometric parameters that characterize normal, benign and, respectively, malign cells offers a unbiased point of view that certainly increase the accuracy of the diagnosis. Within the framework of this morphometric analysis, the equivalent diameter and the form factor ensure the refinement of the numerical information given by the cellular and nuclear areas.

KEYWORDS: BREAST CANCER, SMEAR, COMPUTERIZED MORPHOMETRY

Correspondență: Adriana Grigoras, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T. Popa” Iași, Disciplina Histologie, str. Universității, nr.16, e-mail: a_grigoras6600@yahoo.com*

INTRODUCERE

În medicină și biologie, preocupările legate de analiza și procesarea asistată de calculator a imaginilor datează de la începutul anilor 90, făcându-se apel la diverse produse program ce înglobau facilități de tip sistem-expert orientate pe problematica bio-medicală studiată [1,2]. Spre deosebire de aceste abordări de pionierat (în cea mai mare măsură bazate pe programe elaborate artizanal), a doua jumătate a deceniului zece a însemnat derularea și raportarea cercetărilor în conformitate cu standardele create prin apariția unor produse ale firmelor de software internaționale de prestigiu [2].

Aplicațiile analizei și procesării de imagine asistate de calculator [3-5] în domeniul patologiei sunt orientate cu predilecție asupra studiului biologiei tumorale, în scopul de a concepe, valida și implementa instrumente suplimentare și/sau complementare pentru identificare și clasificare automată, în baza caracterizării leziunilor în termeni absoluți (valori de măsurători) [2].

* received date: 12.09.2011

accepted date: 03.11.2011

Astfel, este acceptată utilitatea analizei de imagine asistate de calculator în identificarea celulelor maligne în leziuni care conțin un număr important de celule aparent benigne (de exemplu în neoplasmul tiroidian folicular) [6,7], definirea punctelor de referință în transformarea de la statusul normal la cel neoplazic (secvența colon normal – adenom – adenocarcinom) [8], diferențierea între tipuri aparent similare de neoplasme (carcinom pulmonar cu celule mici / limfom cu celule mici) [9,10].

Trecerea în revistă a literaturii dedicate aplicațiilor de morfometrie computerizată pentru citologia mamară relevă existența unui număr relativ mic de lucrări, comparativ cu publicațiile axate pe cercetarea morfologică microscopică clasică de tip calitativ sau semi-cantitativ. Acest fapt este explicabil prin complexitatea demersului de investigare computerizată, ce impune existența unei tehnologii software specializate, alături de capacitatea utilizatorului de a dezvolta programe aplicabile pentru obiectivele definite [3-5].

În acest context, studiul nostru își justifică caracterul de noutate, obiectivul urmărit fiind dezvoltarea unei tehnici originale de citometrie computerizată care să permită un studiu complex în patologia mamară.

MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul de studiu a fost reprezentat de un număr de 20 cazuri cu frotiuri mamare corespondente (Serviciul de Anatomie Patologică și Prosectură, Spitalul Județean Brăila, Cytopath SRL), recoltate prin puncție cu ac fin și colorate Papanicolaou, încadrate, sub raportul diagnosticului, ca normale, leziuni benigne (boală fibrochistică) și maligne. Frotiurile normale au format lotul martor. Toate frotiurile au fost utilizate pentru realizarea de imagini digitizate corespunzătoare unor câmpuri reprezentative, sub raportul celularității.

Metodologia de lucru a utilizat mediul software Zeiss KS400 [11], disponibil în cadrul Disciplinei de Histologie, UMF „Gr. T. Popa” Iași și a constat în analiza cantitativă computerizată a imaginilor digitizate, în vederea conceperii unui macrou aplicabil pentru întreaga cazuistică.

REZULTATE - ALGORITM DE EVALUARE PRIN MORFOMETRIE COMPUTERIZATĂ

Macroul denumit generic MAMAR a fost conceput ca succesiune de operații care să conducă la extragerea trăsăturilor morfometrice de interes pentru celulele considerate reprezentative. Selectarea interactivă a celulelor de interes a fost realizată cu ajutorul editorului grafic, pe imaginile sursă. Dezvoltarea macroului a permis practicarea algoritmului de măsurare succesiv, pe fiecare imagine sursă. Pentru fiecare astfel de imagine sursă au fost create două imagini binare, complet negre, spre a servi drept suport pentru aplicarea planului grafic în care s-a realizat desenarea conturilor. Desenarea acestor contururi a fost făcută în două etape distincte: pentru celule și, respectiv, pentru nuclei. Prin aplicarea planului grafic cu conturile celulare peste prima imagine binară a rezultat o primă imagine alb-negru, iar prin aplicarea planului grafic cu conturile nucleare peste a doua imagine binară a rezultat o a doua imagine alb-negru. Aceste imagini intermediare au avut rolul de imagini de lucru, aplicându-li-se procedeul de umplere a găurilor și, ulterior, operația booleană SAU-EXCLUSIV (XOR). Rezultatelor noastre sunt exemplificate pentru un fibroadenom mamar (Fig. 1-5) și pentru un carcinom mamar (Fig. 6-10).

Parametrii pentru măsurători, definiți în cadrul macroului, au fost: aria celulară, aria nucleară, raportul nucleo-citoplasmatic, diametrul echivalent și factorul de formă. Pentru acești parametri a fost aplicată funcția de măsurare automată.

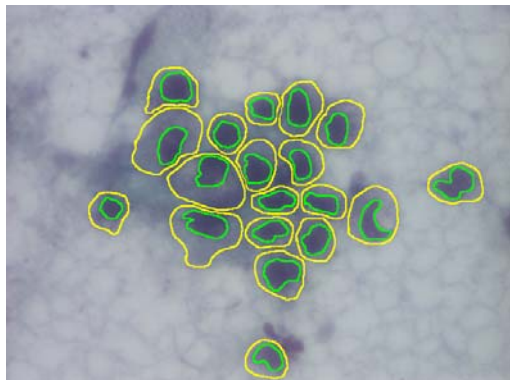


Fig. 1 Frotiu mamar benign (Pap, x 20) – contururi celulare și nucleare trasate interactive.

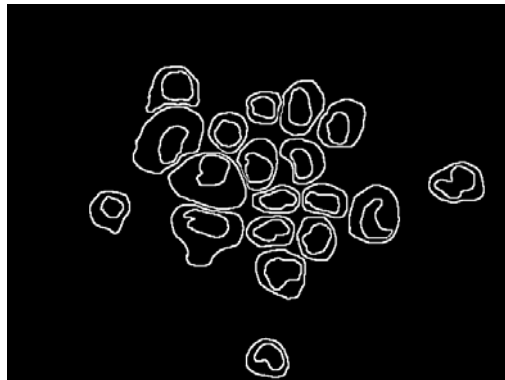


Fig. 2 Frotiu mamar benign – aplicarea conturilor celulare și nucleare în imagine binară

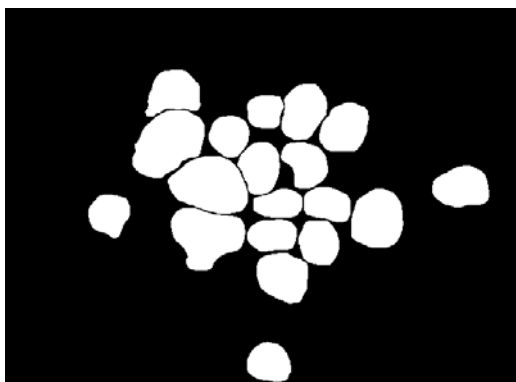


Fig. 3 Frotiu mamar benign – imagine binară utilizată pentru măsurarea ariei celulare



Fig. 4 Frotiu mamar benign – imagine binară utilizată pentru măsurarea ariei nucleare

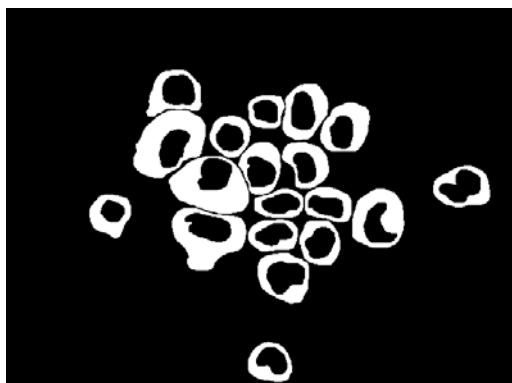


Fig. 5 Frotiu mamar benign – imagine binară utilizată pentru măsurarea raportului nucleo-citoplasmatic

Informațiile numerice obținute au fost memorate succesiv într-o bază de date special creată, de unde au fost extrase și organizate de KS400, în formă tabelară.

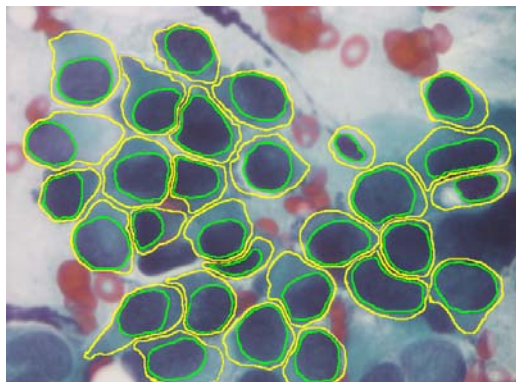


Fig. 6 Frotiu mamar malign (Pap, x 20)
– contururi celulare și nucleare trasate
interactiv

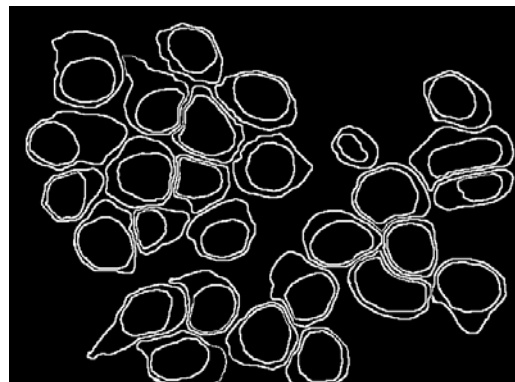


Fig. 7 Frotiu mamar malign – aplicarea
contururilor celulare și nucleare în
imagine binară

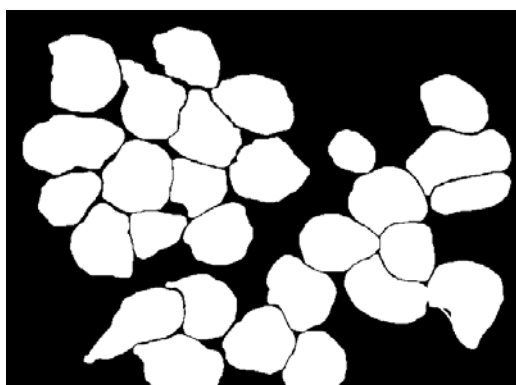


Fig. 8 Frotiu mamar benign – imagine
binară utilizată pentru măsurarea ariei
celulare

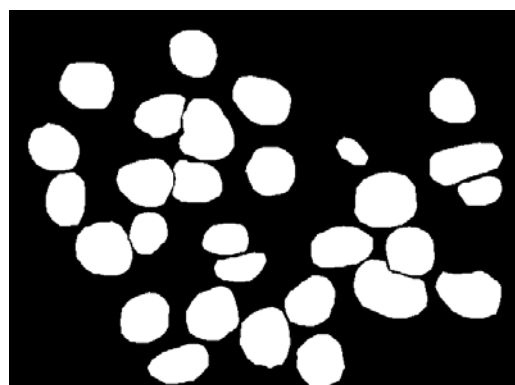


Fig. 9 Frotiu mamar benign – imagine
binară utilizată pentru măsurarea ariei
nucleare

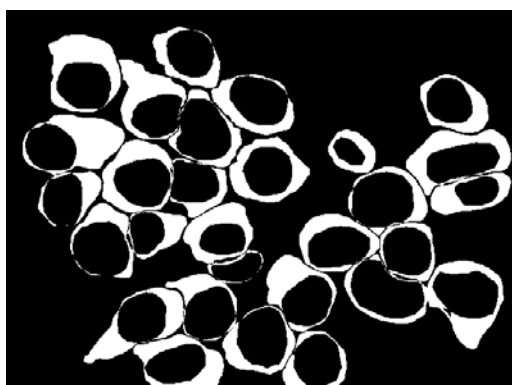


Fig. 10 Frotiu mamar benign – imagine
binară utilizată pentru măsurarea
raportului nucleo-citoplasmatic

DISCUȚII

Repere fundamentale pentru aplicațiile morfometriei în patologia mamară

O scurtă trecere în revistă a principalelor rezultate raportate în literatură este relevantă pentru a încadra demersul nostru de cercetare în ansamblul preocupărilor existente, cu accent asupra elementelor care individualizează prezentul studiu doctoral și care justifică, implicit, modalitatea de abordare prin morfometrie computerizată.

Un prim studiu de morfometrie computerizată, publicat în 1987 de Malberger et al., a vizat modificările celulare în epiteliul glandei mamare în raport de ciclul menstrual [12]. Rezultatele au confirmat faptul că modificările celulare în epiteliul mamar sunt corelate cu ciclul menstrual. Consecutiv, deoarece unele modificări proliferative pot sugera atipie, este recomandată efectuarea puncțiilor mamare în timpul fazei preovulatorii a ciclului.

Un alt studiu de pionierat în investigarea automată a leziunilor citologice mamare a fost publicat de către Spina et al. în 1992, fiind axat pe densitometrie realizată pe nucleii din linia celulare epiteliale benigne și maligne [13]. Prin analiza de varianță a tuturor valorilor pentru indexul de gradient de contrast nuclear a fost obținută o diferență semnificativă între populațiile de celule epiteliale benigne și maligne.

La finalul anilor 90, Herrera-Espiñeira et al. introduc pentru prima dată ideea unui „clasificator” al leziunilor de sân, pentru a diferenția leziunile citologice de tip benign și, respectiv, malign [14]. Metodologia de lucru a constat în tehnici de segmentare automată care au fost aplicate pe imagini microscopice reprezentative. Regiunile de interes vizate au fost nucleii celulelor epiteliale, pentru care au fost investigate 28 de variabile. Rezultatele au demonstrat faptul că tehnicile de segmentare automată sunt eficiente în discriminarea între benign și malign.

O altă preocupare în studiul morfometric computerizat al frotiurilor mamare a vizat identificarea și validarea celor mai fiabili parametri morfometrici: aria nucleară medie, deviația standard a ariei nucleare, diametru nuclear, aria convexă, perimetrul convex și perimetrul [15-18], anizonucleoza, cromatina și iregularitatea membranei nucleare [19].

Pornind de la ideea conform căreia tehnica de realizare a frotiurilor poate afecta rezultatele, a fost investigat potențialul morfometriei nucleare în interpretarea frotiurilor realizate prin fixare și, respectiv, prin centrifugare, în cancer mamar, fibroadenom și boală fibrochistică [20, 21]. Datele obținute demonstrează că, indiferent de tehnica utilizată în realizarea frotiurilor, parametrii morfometrici nucleari și densitometria ADN pot contribui la diferențierea leziunilor premaligne și, respectiv, maligne.

Cercetările realizate de Ohri et al. [22] au introdus analiza fractală asociată tehnicilor de analiză automată a imaginilor, în scopul de a evalua potențialul standardizării măsurării automate a dimensiunii fractale în diferențierea celulelor benigne și, respectiv, maligne.

O direcție de cercetare recentă este orientată asupra caracterizării morfometrice a celulelor cilindrice prezente pe în citologia mamară [23], dimensiunea nucleară având valoare de parametru cheie în evaluarea atipiei nucleare.

Dezvoltarea tehnicilor de morfometrie computerizată a permis, prin caracterizarea nucleară și celulară obiectivă, stabilirea unor corelații directe cu impact asupra prognosticului și terapiei. Astfel, valoarea grading-ului nuclear, ca și trăsătura nucleară cantitativă, în carcinomul ductal in situ, a fost asociată cu recurența și progresia spre carcinom invaziv [24].

Aria nucleară medie mare prezentă în carcinomul ductal invaziv se corelează cu grading-ul histologic și negativitatea ER, reprezentând un indicator de agresivitate [25]. Studiul dezvoltat de Serrano et al. [26] susține calitatea modificărilor cantitative nucleare, ca biomarker în trialurile de chimioprevenție.

Dezvoltarea “know-how”-ului în analiza de imagine asistată de calculator – contribuții personale

În utilizarea analizei de imagine asistată de calculator, complexitatea implementărilor poate varia de la nivelul unor programe simple, al căror control necesită intervenția utilizatorului (măsurătorile sunt proiectate și realizate efectiv de către un observator uman, care, în final, furnizează rezultatele determinărilor numerice) [27], până la aplicații ce includ elemente de inteligență artificială, de tipul sistemelor expert [3, 4]. Stadiul actual de dezvoltare al resurselor software cu care pot fi dotate calculatoarele personale permite înglobarea instrumentelor de procesare a imaginilor histo-patologice în aplicații de mare complexitate organizate pe principiul sistemelor expert [2]. Pe lângă efectuarea automată a măsurătorilor (ca urmare a procesării digitale a imaginilor), un sistem expert dedicat morfologiei microscopice este capabil să interpreteze rezultatele respectivelor măsurători, îndeplinind astfel sarcini care uzual necesită intervenția inteligenței umane [3-5, 28]. Facilitățile de această factură oferite de sistemul expert sunt asigurate de posibilitatea interogării automate a unor baze de date și a unor baze de cunoștințe, construite anume (în faza de proiectare a sistemului expert) pentru a păstra informații numerice și principii calitative ce constituie esența experienței practice a morfologului în formularea diagnosticului. În consecință, aplicația software, în ansamblul ei, acționează asemănător unui “expert” în probleme de patologie, ceea ce, din punct de vedere etimologic, a condus la apariția denumirii de “sistem expert”, conferită acestor tipuri de aplicații.

Multiple rapoarte de cercetare științifică informează asupra aplicabilității mediului software KS400 [11] în diverse tipuri de investigații (mineralogie, tehnologia materialelor, control de calitate, medicină, biologie) [29-34], gama largă de aplicabilitate rezultând din însăși filozofia de realizare a software-ului. În baza experienței existente

Trecerea în revistă a principalelor rezultate raportate în literatură relevă faptul că autorii nu oferă decât rareori date concrete despre software-ul utilizat, cu detalii referitoare la etapa de programare esențială în realizarea unei aplicații automatizate, care poate fi utilizată repetitiv pe preparate microscopice cu caracteristici similare de culoare. Absența acestor informații reflectă în esență interesul major pentru protecția know-how-ului, ca proprietate intelectuală.

În mod concret, contribuția personală a dezvoltarea know-how-ului în analiza de imagine asistată de calculator este reprezentată de conceperea și testarea unui macrou dedicat investigării citologiei mamare. Acest rezultat se bazează pe dezvoltarea abilităților personale de scriere în limbajul specific KS400, care permite exploatarea profesionistă a software-ului prin eliminarea apelării la cutiile de dialog, și reducea timpul efectiv de lucru. Prin elaborarea macroului MAMAR, măsurătorile proiectate sunt implementate sub formă de program care permite efectuarea lor automată și returnarea rezultatelor determinărilor numerice. Precizia ridicată pe care o asigură această tehnică este o consecință a rafinării măsurătorilor la nivel de pixel. Macroul conceput a fost testat pe frotiurile corespunzătoare celor 20 de cazuri selectate.

Evaluarea fiabilității sale susține calitatea de instrument operațional pentru o analiză obiectivă a celulelor tumorale din cancerul mamar, ale căror modificări nucleare și citoplasmice semnificative pot constitui elemente de referință pentru gradarea leziunilor. Considerăm că parametrii aleși, anume aria celulară, aria nucleară, raportul nucleu-citoplasmatic, diametrul echivalent și factorul de formă, sunt relevanți pentru caracterizarea în detaliu a celulelor normale, benigne și maligne, oferind criterii cuantificabile care pot susține o diferențiere a patologiei benigne de cea malignă în diagnosticul citologic.

CONCLUZII

Morfometria computerizată constituie un instrument modern de cercetare cu aplicabilitate în patologia mamară. Investigarea comparativă a trăsăturilor morfometrice specifice celulelor normale, celulelor corespunzătoare leziunilor benigne și, respectiv, maligne oferă patologului un punct de vedere obiectiv, care poate crește acuratețea diagnosticului. Evaluarea parametrilor morfometrici diametru echivalent și factor de formă rafinează caracterizarea bazată exclusiv pe aria celulară și nucleară.

BIBLIOGRAFIE

1. Tossi P, Cottier H. What's new in quantitative pathology? *Path Res Pract.* 1989; 184(6): 652-655.
2. Căruntu ID. *Morfometrie computerizată microscopică în histologie și histopatologie.* Iași: editura Gr. T. Popa, 2003.
3. Shapiro LG, Stockman GC. *Computer Vision,* New Jersey: Prentice Hall, 2001.
4. Pratt WK. *Digital Image Processing,* 3rd, New York; John Wiley & Sons, 2001.
5. Alvira M, Shireman PK, Minarcik JR. *Digital Imaging in Pathology.* ASCP National Meeting, Workshop 9674, San Diego, California, 2000.
6. Rajesh L, Saha M, Radhika S, Das Radotra B, Rajwanshi A. Morphometric image analysis of follicular lesions of the thyroid. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004; 26(2): 117-120.
7. Wang SL, Wu MT, Yang SF, Chan HM, Chai CY. Computerized nuclear morphometry in thyroid follicular neoplasms. *Pathol Int.* 2005; 55(11): 703-706.
8. Eynard HG, Soria EA, Cuestas E, Rovasio RA, Eynard AR. Assessment of colorectal cancer prognosis through nuclear morphometry. *J Surg Res.* 2009; 154(2): 345-348.
9. Politi EN, Lazaris AC, Kavantzias N, Koutselini H. Comparison between morphometry and immunostaining of malignant cells in non-small cell lung cancer. *Anal Quant Cytol Histol.* 2003; 25(3): 169-176.
10. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Yazawa T, Shimoyamada H, Tajiri M, Ogawa N, Masuda M, Kitamura H. Morphometric profiling of lung cancers-its association with clinicopathologic, biologic, and molecular genetic features. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34(2): 243-255.
11. Kontron Elektronik GmbH. *Imaging System Zeiss KS400.* Munchen, <http://www.kontron.com>, 2002
12. Malberger E, Gutterman E, Bartfeld E, Zajicek G. Cellular changes in the mammary gland epithelium during the menstrual cycle. A computer image analysis study. *Acta Cytol.* 1987; 31(3): 305-308.
13. Spina D, Disanto A, Luzi P, Tosi P, Gallorini M, Mouthon AM, Kraft R, Cottier H. Novel, contrast gradient-oriented, automated chromatin texture analysis. I. Feasibility study on nuclei from benign and malignant breast epithelial cell lines in fine needle aspirates. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1992; 62(2): 119-124.
14. Herrera-Espiñeira C, Marcos-Muñoz C, Esquivias J. Automated segmentation of cell nuclei in fine needle aspirates of the breast. *Anal Quant Cytol Histol.* 1998; 20(1): 29-35.
15. Dey P, Ghoshal S, Pattari SK. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000; 22(6): 483-485.
16. Rajesh L, Dey P, Joshi K. Automated image morphometry of lobular breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2002; 24(2): 81-84.

17. Nijhawan R, Rajwanshi A. Cytomorphologic and morphometric limitations of the assessment of atypia in fibroadenoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol.* 2005; 27(5): 273-276.
18. Kalhan S, Dubey S, Sharma S, Dudani S, Dixit M. Significance of nuclear morphometry in cytological aspirates of breast masses. *J Cytol.* 2010; 27(1): 16–21.
19. Ozkara SK, Ustün MO, Paksoy N. The gray zone in breast fine needle aspiration cytology. How to report on it? *Acta Cytol.* 2002; 46(3): 513-518.
20. Elzagheid A, Collan Y. Fine needle aspiration biopsy of the breast. Value of nuclear morphometry after different sampling methods. *Anal Quant Cytol Histol.* 2003; 25(2): 73-80.
21. Elzagheid A, Kuopio T, Korhonen AM, Collan Y. Apocrine change in fine-needle aspiration biopsy: nuclear morphometry and DNA image cytometry. *APMIS.* 2003; 111(9): 898-904.
22. Ohri S, Dey P, Nijhawan R. Fractal dimension in aspiration cytology smears of breast and cervical lesions. *Anal Quant Cytol Histol.* 2004; 26(2): 109-112.
23. Lim CN, Ho BC, Bay BH, Yip G, Tan PH. Nuclear morphometry in columnar cell lesions of the breast: is it useful? *J Clin Pathol.* 2006; 59(12): 1283-1286.
24. Axelrod DE, Miller NA, Lickley HL, Qian J, Christens-Barry WA, Yuan Y, Fu Y, Chapman JA. Effect of quantitative nuclear image features on recurrence of ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast. *Cancer Inform.* 2008; 6: 99-109.
25. El Sharkawy SL, Farrag AR. Mean nuclear area and metallothionein expression in ductal breast tumors: correlation with estrogen receptor status. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008; 16(2): 108-112.
26. Serrano D, Gandini S, Mariani L, Bonanni B, Santinelli A, Guerrieri-Gonzaga A, Pelosi G, Cassano E, Montironi R, Decensi A. Computer-assisted image analysis of breast fine needle aspiration in a randomized chemoprevention trial of fenretinide vs. placebo in HRT users. *Breast.* 2008; 17(1): 91-97.
27. Hamilton PW, Allen DC. Morphometry in histopathology. *J Pathol.* 1995; 175(4): 369-374.
28. Baak JP. Artificial intelligence systems (expert systems) as diagnostic consultants for the cytologic and histologic diagnosis of cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1988; 114(3): 325-334.
29. Chmelar J, Sandvik K. A comparison of wet and dry autogeneous grinding. *Mineral Processing on the Verge of the 21st Century*, 2000, Balkema, Antalya, Turkey, 35-39.
30. Malkusch W. Fundamentals and problem-solving sequences of quantitative image analysis. *Lab Focus.* 2000; 4.
31. Carl Zeiss Vision GmbH. *Imaging Components and Systems.* Halbergmoos, <http://www.zeiss.de/Imaging>, 2002
32. Caruntu ID. Highly effective techniques in computerized dental tissue morphometry. *J Cell Mol Med.* 2002; 6(4): 631-642.
33. Caruntu ID, Scutariu MM, Dobrescu G. Computerized morphometric discrimination between normal and tumoral cells in oral smears. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(1): 160-168.
34. Caruntu ID, Covic A. Renal corpuscle morphometry with increased reliability and high level of automation. *Pathol Res Pract.* 2007; 203(1): 9-20.