

AUTOMATIZIRANA KVANTIFIKACIJA

IMUNOHISTOKEMIJSKIH BOJENJA – METODE

Automatska analiza mikroskopske slike uz pomoć računala je jednostavna i učinkovita metoda kvantifikacije imunohistokemijskih bojenja, posebno kada je cilj usporedba karakteristika bojenja između većih skupina uzoraka uz matematičku objektivnost. Bazira se na sposobnosti da se izdvoji neka struktura od njene podloge na temelju razlike u boji. Nakon identifikacije boje računalo selektira područja slike koja sadrže tu boju i označava ih kao pozitivne točke (piksele), koji se dalje procesuiraju usporedbom njihovog međusobnog rasporeda, a njihove skupine stvaraju pozitivne objekte.

Nakon detekcije računalo nam daje informacije o broju, veličini i obliku detektiranih objekata te intenzitetu bojenja tih objekata, koji je u korelaciji s koncentracijom antigena u obojenim strukturama.

Sustav za automatiziranu kvantifikaciju se sastoji od mikroskopa na koji je montirana digitalna kamera i motorizirani stolić kojim se upravlja putem računalne aplikacije za detekciju i kvantifikaciju, s mogućnošću skeniranja dijela ili cijelog preparata upotrebom različitih objektiv.

Sustav omogućuje skeniranje preparata na manjem ili većem povećanju, ovisno o dostupnom vremenu i razini detalja koji su nam potrebni za uspješnu detekciju ciljanih struktura. Nakon što skeniramo cijeli ili određeni dio preparata na 20x povećanju, odaberemo područja koja ćemo analizirati na 200x ili 100x povećanju i pokrenemo analizu. Prije skeniranja i analize važno je standardizirati i koristiti konstantna podešenja kamere, mikroskopa i konstantnu jačinu, boju i homogenost svjetlosnog polja koje detektira kamera.

Tijekom analize digitalnih fotografija detektirani su objekti na osnovi boje (valne dužine, intenziteta i zasićenosti), grupiranja i morfoloških osobina (homogenost, veličina i oblik) označeni bojama, što nam omogućuje praćenje i korekciju primjenjenih algoritama. U tu svrhu je stvorena skupina algoritama za detekciju, koji definiraju specifične uvjete detekcije za različite objekte od interesa i različita imunohistokemijska bojenja.

Tijekom procesa detekcije program automatski mjeri detektirane objekte (broj, površina, intenzitet boje, itd.) i izračunava zadane parametre (ukupna i srednja površina, ukupni i srednji intenzitet itd.) Sustav se kalibrira određivanjem veličine točke (piksel) za pojedini objektiv (0,33 μm za 20x objektiv).

Moguća su tri načina kvantifikacije:

- određivanje broja različito obojenih objekata
- određivanje srednjeg intenziteta boje ($j/\mu\text{m}^2$)
- semikvantitativno mjerenje intenziteta boje (0,1+,2+,3+)

Kvantificirati se mogu različiti obojeni objekti, najčešće su to jezgre, membrane i citoplazma.

Kvantifikacija na računalu se odvija u dvije faze:

Detekcija - na temelju tona, zasićenosti i intenziteta boje (Hue Saturation Intensity sustav).

1. Korak je definiranje pragova detekcije u HSI sustavu, koji se primjenjuju na mikroskopsku sliku, a predstavljaju granicu osobina boje pozitivnih objekata i negativne pozadine. Rezultat primjene pragova detekcije su pozitivni i negativni pixeli, pritom pozitivni pixeli predstavljaju detektirane objekte. Definirani pragovi detekcije moraju biti postavljeni dovoljno široko kako bi obuhvatili sve strukture od interesa a istovremeno dovoljno striktno da isključe pozadinsko bojenje. Stoga je potrebno pronaći balans između specifičnosti i osjetljivosti detekcije za svaku strukturu, što čini ovaj korak kritičnim u detekcijskom algoritmu. Uspješnost detekcije, brzina kvantifikacije i točnost rezultata za pojedine stanične strukture je različita, ovisno o njihovoj kompleksnosti. Detekcija membrana je kompliciranija od detekcije jezgri ili citoplazme zbog manje vjerojatnosti da se kompleksna biološka struktura poput membrane uspješno izolira iz okoline kao zaseban objekt. Osim kompleksnosti objekata, na uspješnost detekcije velik utjecaj ima priprema i kvaliteta preparata, jer se javljaju varijacije u boji i kontrastu između različitih preparata koje mijenjaju pragove detekcije (osjetljivost i specifičnost algoritma) za različite strukture, najčešće su razlike u debljini preparata i intenzitetu pozadinske boje.
2. korak je filtriranje pozitivnih pixela dobivenih primjenom pragova. Kod detekcije pozitivnih pixela upotrebom HSI pragova često dolazi do fragmentiranja objekata, što dovodi do pogrešnih rezultata, posebno glede ukupnog broja i srednje površine objekata. Stoga se primjenjuju algoritmi za filtriranje, kojima je cilj u što većoj mjeri ukloniti manje artefakte i defragmentirati veće objekte. Uspješnost filtriranja ovisi o prostornom rasporedu detektiranih struktura, odnosno homogenosti njihove raspodjele u vidnom polju, a posebno o uspješnosti prvog koraka.

3. korak je analiza oblika i veličine objekata dobivenih nakon primjene pragova(1) i filtriranja(2). Odbacuju se svi detektirani objekti koji su izvan granica definiranih kriterija. Najčešći kriteriji su površina, opseg, promjer, izduženost i cirkularnost objekata.

Objekti koji zadovolje uvjete detekcije se obilježavaju na fotografiji vidnog polja u obliku koji računalu omogućuje automatsku morfometriju i kvantifikaciju, a istovremeno i kontrolu kvalitete algoritama.

Identificirani izvori varijabilnosti kod automatizirane detekcije su razlike u:

1. definiranju granica ciljanih struktura i pozadine.
2. Intenzitetu i pozadinskoj obojenosti pojedinih preparata.
3. Definiranju pragova detekcije ciljanih struktura.
4. Podešenjima mikroskopa i izvora svjetlosti.

Odgovor su mjere za sprječavanje varijabilnosti u detekciji:

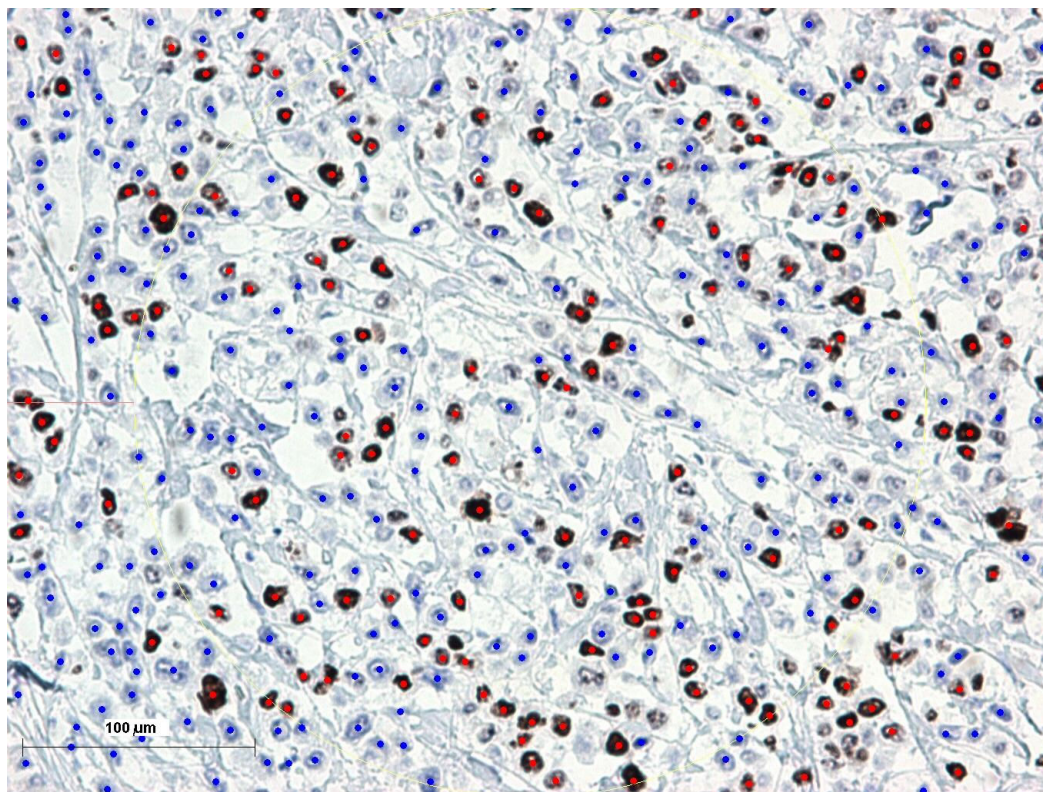
1. kod neadekvatne detekcije granica struktura one se kontroliraju i korigiraju ili se definiraju manualno.
2. Algoritmi se testiraju na velikom broju preparata kako bi se adaptirali na različite razine pozadinske obojenosti.
3. Definirani pragovi detekcije nakon što su postavljeni više se ne mijenjaju pa su objektivna mjera za sve testirane uzorke.
4. Podešenja optičkih karakteristika mikroskopa i njegovog izvora svjetlosti (voltaža lampe, filteri, kondenzor, fokus...) su kontrolirana i konstantna.

Kao kod svake automatske analize, operater mora evaluirati dobivene rezultate, stoga mora razumjeti sve postupke koje je računalo izvršilo, testirati ih i intervenirati ako neki parametri nisu adekvatni.

Izračunavanje rezultata – izračunavanje udjela različitih objekata u pojedinom vidnom polju – određivanje njihovog broja, ukupnog i srednjeg intenziteta, površine, opsega, promjera, itd. te srednja vrijednost svih vidnih polja jednog preparata. Za ovu fazu se kreiraju formule za izračunavanje rezultata, zasebno za svako

bojenje, budući da različiti rezultati zahtijevaju različit način obrade (u nekom tabličnom kalkulatoru, npr. MS Excell).

Na taj način je prijenos rezultata između programa automatiziran, kao i sve matematičke operacije, npr. izračunavanje postotka pozitiviteta, srednje površine stanica itd, što ubrzava rad i smanjuje mogućnost pogreške.



Primjer automatske kvantifikacije nuklearnog imunohistokemijskog bojenja (ki-67): crvene točke označavaju pozitivne jezgre a plave negativne jezgre, rezultat su primjene algoritma za detekciju jezgri, nakon čega im računalo odredi broj (rezultat je 153 negativne i 113 pozitivnih jezgri, analiza je trajala 2 sekunde).

Kvantifikacija membranskog bojenja

Koristi se semikvantitativno mjerenje intenziteta obojenja membrana. Određuje se omjer površina membrana određenog intenziteta obojenja (1+,2+ i 3+) u odnosu na ukupnu površinu.

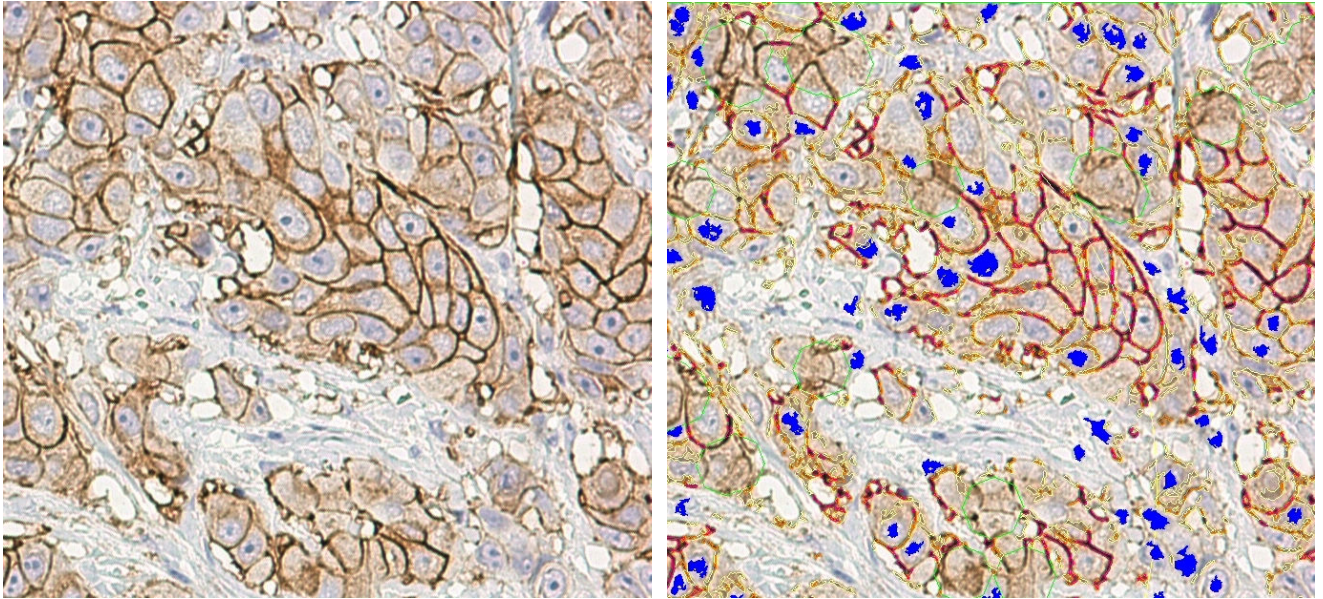
Udio površine obojenih membrana u površini presjeka tumora, pomnožen faktorom srednje površine stanica(ukupna površina/broj stanica) je proporcionalan s udjelom pozitivnih stanica u ukupnom broju tumorskih stanica, (korelacije $\approx 95\%$).

(1) Detekcija membrana:

Detekcija se odvija u više vidnih polja srednjeg povećanja mikroskopa (100x), posebno za svaki stupanj intenziteta boje (1+,2+ i 3+), koji su definirani rasponom inteziteta, odnosno svojim svijetlim i tamnim „cut-offom“.

Rezultat se prikazuje kao udio površine obojenih membrana u ukupnoj površini detektiranih tumorskih stanica za svako vidno polje, a konačan rezultat kao srednja vrijednost.

Ključni parametri za objektivnu procjenu obojenosti membrana su konstantnost i homogenost izvora svjetlosti i optičkih elemenata mikroskopa, uz konstantne kriterije za usporedbu intenziteta boje, dobiveni su rezultati posljedica odabira vidnog polja (preparata i područja mjerenja) i kvalitete bojenja. Stoga je uz analizu više vidnih polja i konstantne uvjete bojenja moguće dobiti objektivne rezultate.



Detekcija membranskog bojenja (HER-2)

semikvantitativno

Žuto – membrane 1+

Smeđe – membrane 2+

Crveno – membrane 3+

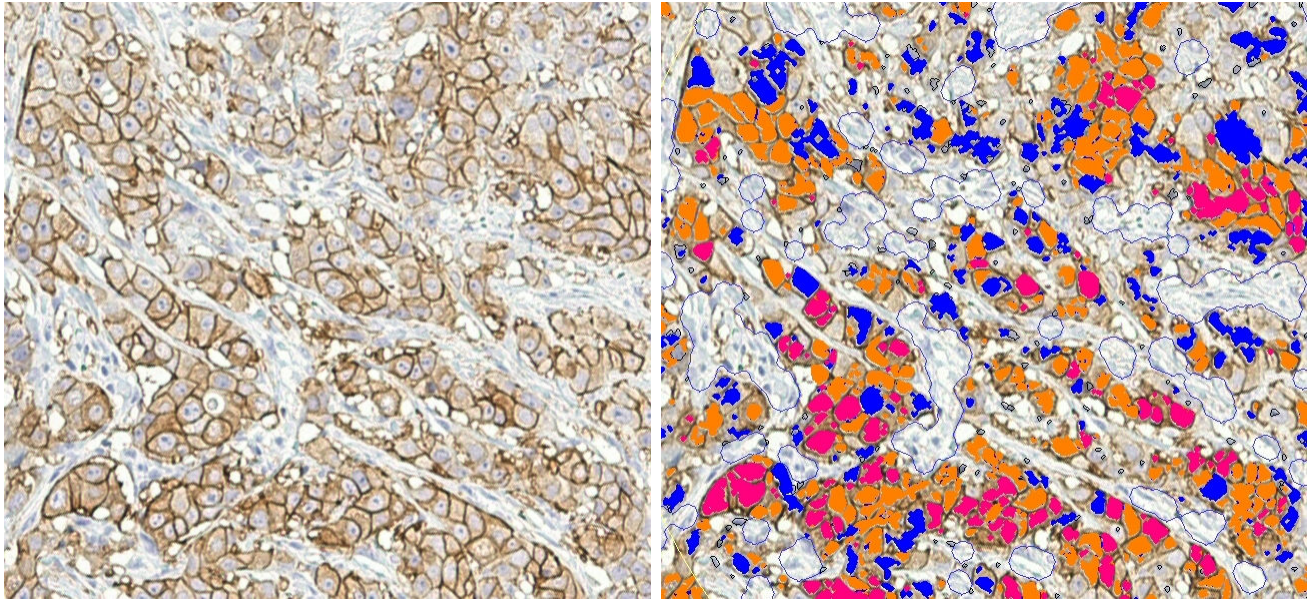
(2) Kvantifikacija stanica kontinuirano obojenih membrana:

Detekcija kontinuirano obojenih membrana s obzirom na intenzitet obojenja – mjeri se udio stanica s kontinuirano obojenom membranom (u 3 stupnja intenziteta) u odnosu na ukupan broj stanica.

Rezultat se prikazuje kao udio 0, 1+, 2+ i 3+ stanica u ukupnoj količini detektiranih stanica za svako vidno polje, a konačan rezultat kao srednja vrijednost rezultata svih vidnih polja.

Sve stanice s kontinuirano i približno kontinuirano obojenom membranom se otkrivaju na principu inverzne detekcije, broje se za svaki intenzitet posebno, a ukupan broj stanica je određen ukupnim brojem jezgara. Za detekciju se koristi objektiv srednjeg povećanja (10x), detekcija je brza i obuhvaća veću površinu preparata, uz veću preciznost u odnosu na metodu s direktnom detekcijom membrana.

Kombinacijom dviju metoda možemo odrediti broj stanica s kontinuirano i diskontinuirano obojenim membranama.



Detekcija kontinuiranog membranskog bojenja (HER-2)
Semikvantitativno

Bez boje – stanice s diskontinuirano 1+ obojenom ili neobojenom membranom (0)

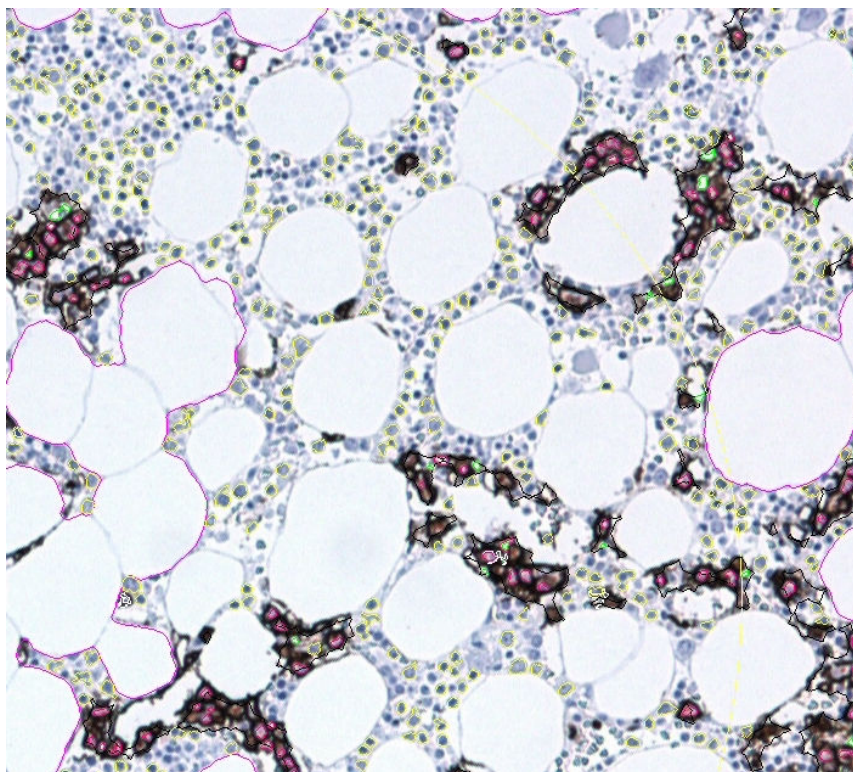
Plavo – stanice s kontinuirano obojenom membranom 1+

Smeđe – stanice s kontinuirano obojenom membranom 2+

Crveno – stanice s kontinuirano obojenom membranom 3+

CD-138 (detekcija membranskog bojenja)

Određivanje broja stanica obojenih i neobojenih membrana. Pozitivne se stanice detektiraju u dvije faze, kao stanice s kontinuirano obojenom membranom visokog intenziteta obojenja (inverznom detekcijom) i stanice s diskontinuiranom membranom niskog intenziteta obojenja (inverznom i direktnom detekcijom). Detektiraju se u području preparata u kojem su pronađene pozitivne stanice. Ukupan broj CD-138 pozitivnih stanica se dobije zbrajanjem ta dva broja, a broj negativnih stanica se odredi prema broju detektiranih jezgara izvan područja pozitivnih stanica.



Detekcija membranskog bojenja (CD-138)

Žuto – jezgre negativnih stanica

Crno – područje pozitivnih stanica

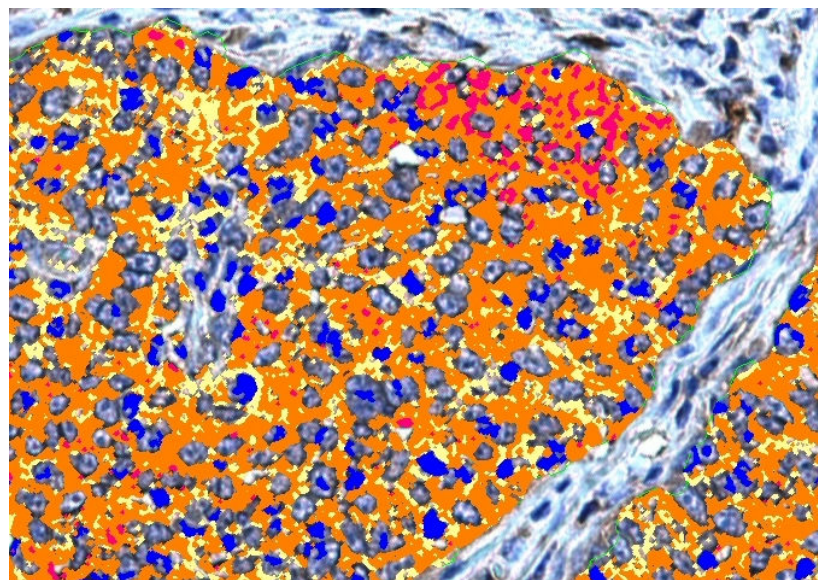
Crveno, zeleno – jezgre pozitivnih stanica

COX-2 (kvantifikacija citoplazmatskog bojenja)

Semikvantitativno mjerenje intenziteta obojenja citoplazme, u više vidnih polja mjeri se površina obojenih područja citoplazme koja odgovaraju određenom intenzitetu boje (0, +1, +2, +3). Rezultat je izražen kao udio površine citoplazme određenog intenziteta u odnosu na ukupnu površinu citoplazme u jednom vidnom polju, odnosno srednja vrijednost dobivenih rezultata iz svih vidnih polja.

Detekcija citoplazmatskog bojenja je relativno jednostavna, kategorije intenziteta su definirane kao i u prethodnim metodama najsvjetlijim i najtamnijim cut-offom za svaku kategoriju intenziteta, kalibriranim prema poznatim rezultatima.

Ovim načinom mjerenja izbjegava se subjektivnost u procjeni, a rezultati ovise isključivo o odabiru područja mjerenja i kvaliteti preparata.



Detekcija citoplazmatskog bojenja (COX-2), semikvantitativno

Plavo – jezgre

Žuto – citoplazma 1+

Smeđe – citoplazma 2+

Crveno – citoplazma 3+