

УДК: 616-091.0

В.А. Кушнарев, А.Г. Кудайбергенова
**ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ОЦЕНКИ ИНДЕКСА Ki67
В ИНВАЗИВНЫХ КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ ТИПОВ ПРОГРАММНОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ЦИФРОВОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЙ**
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

V.A. Kushnarev, A.G. Kudaibergenova
**REPRODUCIBILITY OF Ki67 INDEX ASSESSMENT
IN INVASIVE BREAST CARCINOMAS USING DIFFERENT TYPES
OF DIGITAL IMAGE ANALYSIS SOFTWARE**
NMRC of Oncology named after N.N. Petrov, St. Petersburg, Russian Federation

Резюме. Воспроизводимость оценки иммуногистохимических маркеров является общеизвестной проблемой. Она приобретает особенную остроту при различной оценке иммуногистохимических показателей в связи с выбором терапии в зависимости от их интерпретации. В этой связи цифровой анализ изображений позволяет стандартизировать оценку иммуногистохимических маркеров и повысить межисследовательскую и межлабораторную воспроизводимость. Стандартизация оценки индекса K67 необходима в клинической практике. **Цель.** Проанализировать воспроизводимость алгоритмов оценки индекса пролиферативной активности Ki67 на основе программного обеспечения NuclearQuant (3D Histech) и QuPath. **Материал и методы.** 100 инвазивных карцином молочной железы вне зависимости от статуса экспрессии HER2, ER, PR со степенью гистологической злокачественности G2-G3 подвергался стандартному морфологическому исследованию, сканированию и цифровому анализу индекса пролиферативной активности Ki67. **Результаты.** Мы продемонстрировали, что алгоритмы анализа индекса пролиферативной активности Ki67 с помощью разных программных продуктов QuPath и NuclearQuant (3D Histech) воспроизводимы между собой. Воспроизводимость между модулями анализа программа была высокой (ICC 0,93), а скорость анализа достоверно выше у модуля QuPath. **Выводы.** Использование методов цифрового анализа изображений на основе свободно распространяемого программного обеспечения позволяет повысить воспроизводимость индекса пролиферативной активности Ki67.

Ключевые слова: Ki67, карцинома, рак, цифровой анализ, QuPath, молочная железа

Abstract. The reproducibility of assessing immunohistochemical markers is a well-known problem. Especially burning this problem becomes when assessing immunohistochemical biomarkers using different methods and interpreting the results in connection with the choice of therapy. Digital image analysis allows to standardize the assessment of immunohistochemical biomarkers and to increase inter-research and inter-laboratory reproducibility. Standardization of the K67 index is necessary for clinical practice. **Objective.** To analyze the reproducibility of the algorithms for evaluating the Ki67 index of proliferative activity based on NuclearQuant software (3D Histech) and QuPath. **Material and methods.** 100 invasive breast carcinomas, regardless of the expression status of HER2, ER, PR with the degree of histological malignancy G2-G3, were subjected to standard morphological examination, scanning and digital analysis of the proliferative activity (Ki67 index). **Results.** We have demonstrated that the algorithms for analyzing the index of Ki67 using different software applications, such as QuPath and NuclearQuant (3D Histech), were reproducible among themselves. The reproducibility between the analysis modules of the program was high (ICC 0.93), and the analysis speed was significantly higher for the QuPath module. **Conclusion.** The use of digital image analysis methods based on free software products allows increasing the reproducibility of this biomarker.

Keywords: Ki67, carcinoma, cancer, digital image analysis, QuPath, breast cancer

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Кушнарев Владимир Андреевич
kushnarevvladimir1@gmail.com

Contact details of the corresponding author:

Vladimir A. Kushnarev
kushnarevvladimir1@gmail.com

Дата поступления 21.12.2018

Received 21.12.2018

Образец цитирования:

Кушнарев В.А., Кудайбергенова А.Г. Воспроизводимость оценки индекса Ki67 в инвазивных карциномах молочной железы с использованием разных типов программного обеспечения для цифрового анализа изображений. Вестник уральской медицинской академической науки, 2018. – Том 15. – № 6. – С. 854–859. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-6-854-859.

For citation:

Kushnarev V.A., Kudaibergenova A.G. Reproducibility of Ki67 index assessment in invasive breast carcinomas using different types of digital image analysis software. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2018, Vol. 15, no. 6, pp. 854–859. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-6-854-859 (In Russ).

Актуальность

Иммуногистохимический анализ, включающий в себя определение статуса опухоли на рецепторы стероидных гормонов, в частности эстрогена (ER), прогестерона (PR), мембранного рецептора эпидермального фактора роста (HER2) и индекса пролиферативной активности (ИПА) Ki67 должен проводиться для всех случаев инвазивной карциномы молочной железы. Этот тест обеспечивает прогностическую и предиктивную информацию и является наиболее важным биологическим маркером терапевтического ответа на гормональную и химиотерапию при раке молочной железы [1].

Оценка индекса пролиферативной активности Ki67 является вариабельной между исследователями и характеризуется низкой воспроизводимостью, что подтверждено в многочисленных исследованиях [2]. Метод цифрового анализа изображений позволяет улучшить воспроизводимость [3] и точность оценки индекса, что создает предпосылки для персонализации терапии.

Основными ограничениями для широкого использования методов цифрового анализа изображений принято считать их труднодоступность из-за дороговизны оборудования (сканеры гистологических препаратов и программное обеспечение) и высокую трудозатратность, однако, в связи с бурным развитием технологий, эти два мнения в настоящее время не выдерживают критики. Существуют так называемые свободно распространяемые модули для оценки морфологических и иммуногистохимических параметров, в частности, индекса ядерной экспрессии в опухолях, например, на платформе ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), ImmunoRatio (<http://jvsmicroscope.uta.fi/immunoratio>) или Cytomine (<https://cytomine.coop>) которые позволяют улучшить качество исследований и повысить воспроизводимость оценки количественных иммуногистохимических параметров в трансляцион-

ных исследованиях. Эти платформы ориентированы либо на традиционный захват снимков изображений и их анализ или загрузку файлов на облачный сервис с последующим анализом, однако с увеличением количества и доступности высокопроизводительных систем сканирования гистологических препаратов размер анализируемых файлов и время на обработку увеличивается, что требует новые алгоритмы для анализа больших объемов данных [2].

В рутинной работе морфологические лаборатории зачастую пренебрегают возможностями современных технологий, полагая, что визуальная оценка индекса пролиферации является достаточной, но современные системы анализа изображений, в противоположность традиционным, позволяют с минимальными затратами на оборудование и временными потерями осуществлять высоковоспроизводимый анализ изображений.

Целью исследования было выяснение воспроизводимости между различными модулями расчета, для исследования нами было выбрано коммерческое программное обеспечение NuclearQuant от 3D Histech (https://www.3dhitech.com/nuclearquant_module) и свободно распространяемое программное обеспечение QuPath (<https://qupath.github.io>). Обе программы имеют возможность работы с отсканированными гистологическими препаратами и имеют модули для расчета иммуногистохимических маркеров в выбранных зонах по локализациям экспрессии: ядро, мембрана и цитоплазма с возможностью учета интенсивности.

Мы изучили воспроизводимость модулей анализа в оценке индекса пролиферативной активности Ki67 и скорость анализа в инвазивных карциномах молочной железы с помощью программного обеспечения QuPath и NuclearQuant для цифрового анализа изображений.

Материал и методы

Материал 100 инвазивных карцином молочной железы вне зависимости от статуса экспрессии HER2, ER, PR со степенью гистологической злокачественности G2-G3 подвергался стандартному морфологическому исследованию.

Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности Ki67 (клон MIB-1, Dako) проведено при помощи автоматического стейнера BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, США). Препараты были ретроспективно проанализированы несколькими экспертами патоморфологами для оценки индекса пролиферативной активности Ki67 (ИПА).

После этого гистологические стекла были отсканированы с помощью сканера Panogamic Flash II (3D Histech) и полученные цифровые копии микропрепаратов проанализированы коммерческим программным обеспечением для цифрового анализа изображений QuantCell (3D Histech) при помощи модуля расчета NuclearQuant (NQ) в зонах опухоли, площадью не менее 2 мм². Далее цифровые копии были загружены в QuPath и эти же зоны были проанализированы на модуле Positive Cell Detection (PCD). Также нами было учтено время с момента запуска анализа размеченных зон до получения результата, с учетом выполнения расчетов на процессоре Intel i3-8100, его частоты 3,6 ГГц и оперативной памяти DDR3,8 Гб. Морфологические параметры и критерии иммуногистохимической оценки, заданные в модулях расчета, показаны в таблице 1. Остальные параметры модулей оставались стандартными, без изменений.

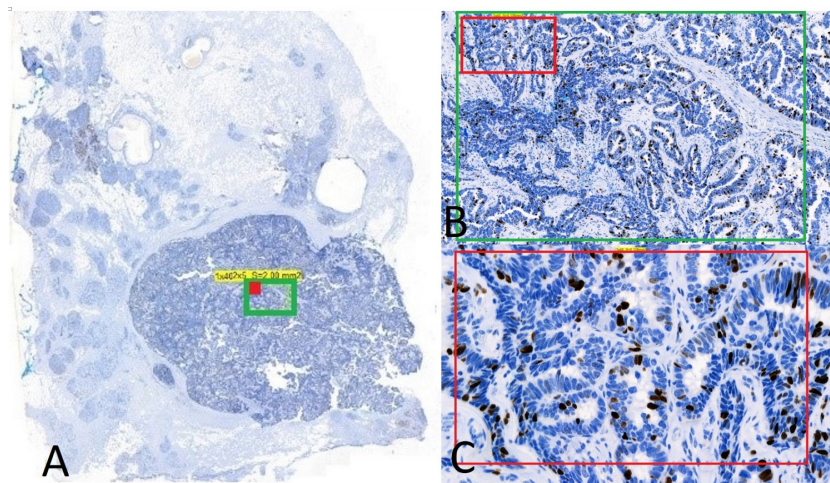


Рис. 1 Отсканированный микропрепарат инвазивной карциномы молочной железы с примером размеченной зоны для анализа индекса пролиферативной активности Ki67;

А. Иммуногистохимическое окрашивание Ki67, $\times 2$; В. Иммуногистохимическое окрашивание Ki67, $\times 10$; С. Иммуногистохимическое окрашивание Ki67, $\times 40$; Зеленый квадрат обозначает площадь 2 мм², красный квадрат обозначает площадь 0,128 мм²

Fig. 1 Example of scanned microscopic slide of invasive breast carcinoma with annotation for analysis of the Ki67 index;

A. Immunohistochemical staining Ki67, $\times 2$; B. Immunohistochemical staining Ki67, $\times 10$; C. Immunohistochemical staining Ki67, $\times 40$; the green square is 2 мм², the red square is 0.128 мм²

Таблица 1
Параметры модулей расчета
Table 1
Parameters of software modules

Параметры модулей/ Parameters of software	Радиус ядра, мкм/ Radius of nuclei, μm	Площадь ядра, мкм ² / Square of nuclei, μm^2	Сигма, мкм/ Sigma, μm	Границы клеток, с учетом ядра клетки, мкм/ Cells borders, μm	Границы параметров интенсивности 3,3'-диаминобензидина/ 3,3'-Diaminobenzidine borders of intensity
NQ	от 3 до 15	до 400	не примени- мо/ NA	не примени- мо/ NA	22
PCD, score compartment of Nucleus: DAB OD max	до 15	от 10 до 400	3	до 20 мкм	0,2

Разметка зон опухоли на цифровой копии препарата с иммуногистохимическим окрашиванием Ki67 производилась независимым патоморфологом на площади не менее 2 мм² (см. рис. 1) с помощью инструмента для создания аннотаций, который доступен на обоих модулях PCD и NQ.

Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения R studio, с применением Wilcoxon signed rank test, корреляции Spearman и внутриклассового коэффициента корреляции (ICC).

Результаты

При анализе данных ИПА модули PCD и NQ достоверно не отличались ($p=0,1$).

На рис. 2 показано, что модули анализа NQ и PCD значимо не различаются, хотя медианы распределения между патологом и цифровыми методами анализа не совпадают.

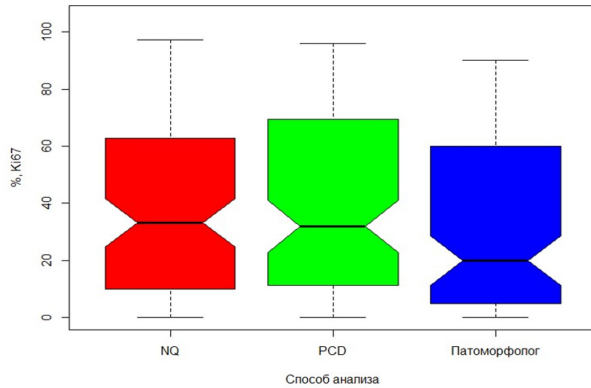


Рис. 2 Распределение ИПА Ki67 между модулем анализа NQ (NuclearQuant), PCD (Positive Cell Detection) и патоморфологом

Fig. 2 Ki67 distribution between NQ (NuclearQuant), PCD (Positive Cell Detection) analysis module and pathologist

Таблица 2

Результаты оценки воспроизводимости между модулями анализа Nuclear Quant (NQ), Positive Cell Detection (PCD) и патоморфологом

Table 2

Results of reproducibility assessment between the Nuclear Quant (NQ), Positive Cell Detection (PCD) analysis modules and the pathologist

Параметр анализа/Statistic parametrs	PCD/NQ	PCD/Патоморфолог/ PCD/ Pathologist
ICC	0,93	0,87
r, Spearman	0,91	0,94

Анализ данных модуля PCD и визуальной оценки патоморфолога достоверно показал отсутствие различий ($p=0,5$). Мы сравнили ICC модулей PCD/NQ — 0,93 CI 95%, [0,87; 0,96] и PCD/патоморфолог — 0,87 CI 95%, [0,75; 0,92], что свидетельствует о высокой степени воспроизводимости оценки индекса пролиферативной активности между модулями анализа и более низкий показатель (ICC 0,87, доверительный интервал 0,75), между морфологами и модулем анализа свидетельствует о том, что визуальная оценка применима, но недостаточно воспроизводима.

Коэффициент корреляции Spearman 0,91, $p<0,001$ для PCD/NQ, и 0,94, $p<0,001$ PCD /патоморфолог (таблица 2) подтверждает наши данные о наличии высокой связи визуальной оценки врачей и цифровых методов оценки индекса Ki67.

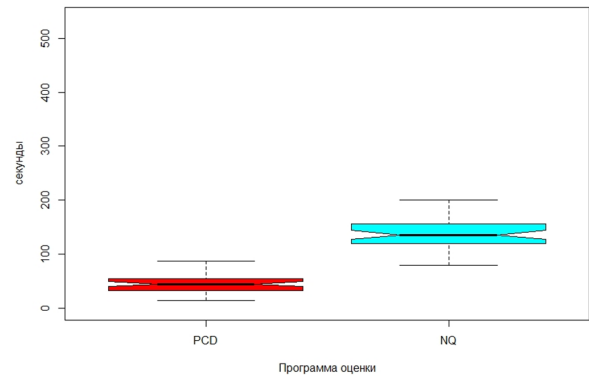


Рис. 3 Время анализа для модулей PCD(Positive Cell Detection) и NQ (Nuclear Quant)

Fig. 3 Time of analysis for PCD (Positive Cell Detection) and NQ (Nuclear Quant)

Время, затраченное на анализ размеченных зон для всех случаев, отражено в рис. 3. В среднем модуль PCD затрачивал на анализ около минуты, а модуль NQ — около 3 минут, скорость анализа зависела от площади аннотации, клеточности опухоли и системных характеристик компьютера, на котором выполнялись исследования. Разница в анализе на 1 случай между модулем PCD (Positive Cell Detection) и NQ (Nuclear Quant) отличается более чем в 3 раза, где PCD показывает лучшие результаты, выполняя анализ размеченных зон достоверно быстрее ($p<0,001$).

Выводы

Высокое качество гистологической техники лаборатории является залогом успешной работы врач-морфолога. Невозможно оценивать сканы гистологических препаратов с различными артефактами преаналитического и аналитического этапов. Нарушения или недостатки гистологической техники являются одним из главных препятствий для адекватного использования цифровых технологий в морфологии. Использование методов цифровой патологии, в частности применение алгоритма анализа иммуногистохимических биомаркеров, является методом стандартизации и уменьшения вариабельности количественной пролиферативной активности (индекса Ki67). Выбор зоны для подсчета может включать в себя как оценку всего препарата [4, 5], так и оценку зон интереса. В случае использования методов автоматического анализа изображений выбор зоны интереса (хот-спот или на весь препарат) не имеет значения [6]. Недавняя наша работа [7] показала, что неудовлетворительная степень воспроизводимости между патологами (исследовалась визуальная оценка) в случае анализа индекса пролиферативной активности Ki67 наблюдается в серой зоне от 10 до 35%. (ICC 0,47)

Внедрение в клиническую практику методов анализа изображений, а не визуальной оценки, позволя-

ет исследовать индекс пролиферативной активности Ki67 в рутине и проводить этот анализ на высоковоспроизводимом уровне. Значения ИПА Ki67, полученные с применением модулей расчета, использующих различные алгоритмы Positive CellDetection (QuPath) и NuclearQuant (3D Histech), показали достаточную связь между модулями, а значения индекса пролифе-

ративной активности были воспроизводимы с высокими значениями ICC 0.93. Скорость анализа была достаточно быстрой при оценке обоими видами программного обеспечения, но достоверно быстрее в модуле QuPath, и мы считаем, что оба модуля могут служить инструментом для повышения воспроизводимости индекса пролиферативной активности Ki67.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C: St. Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care* 2017. No. 12. pp. 101-106. doi: 10.1159/000475698
2. Christgen, M., von Ahsen, S., Christgen, H., Länger, F. and Kreipe, H. (2015). The region-of-interest size impacts on Ki67 quantification by computer-assisted image analysis in breast cancer. *Human Pathology*, No. 46 (9), pp. 1341-1349.
3. Focke, C., Bürger, H., van Diest, P., Finsterbusch, K., Gläser, D., Korsching, E., Decker, T., Anders, M., Bollmann, R., Eiting, F., Friedrich, K., Habeck, J., Haroske, G., Hinrichs, B., Behrens, A., Krause, U., Lang, U., Lorenzen, J., Minew, N., Mlynek-Kersjes, M., Nenning, H., Packeisen, J., Poche-de Vos, F., Reyher-Klein, S., Rothacker, D., Schultz, M., Sturm, U., Tawfik, M., Berghäuser, K., Böcker, W., Cserni, G., Habedank, S., Lax, S., Moinfar, F., Regitnig, P., Reiner-Concin, A., Rüschoff, J., Varga, Z. and Woziwodski, J. (2017). Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. *European Journal of Cancer*, vol. 84, pp. 219-227.
4. Bankhead P, Loughrey M.B., Fernández J.A., et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878. Published 2017 Dec 4. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
5. Leung, Samuel C.Y. et al. "Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration" *NPJ breast cancer*. Vol. 2 16014. 18 May. 2016, doi:10.1038/npjbcancer.2016.14
6. Thakur S.S., Li H., Chan A.M.Y., et al. The use of automated Ki67 analysis to predict Oncotype DX risk-of-recurrence categories in early-stage breast cancer. *PLoS One*. 2018;13(1):e0188983. Published 2018 Jan 5. doi:10.1371/journal.pone.0188983
7. Кушнарев В.А., Артемьева Е.С., Кудайбергенова А.Г.. Сравнение цифрового и визуального методов для оценки индекса Ki-67 в инвазивных карциномах молочной железы. *Архив патологии*. 2018. – № 80 (2). – С. 38-42. 10.17116/patol201880238-42

REFERENCES

1. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C: St. Gallen/Vienna 2017: A Brief Summary of the Consensus Discussion about Escalation and De-Escalation of Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care* 2017. No. 12. pp. 101-106. doi: 10.1159/000475698
2. Christgen, M., von Ahsen, S., Christgen, H., Länger, F. and Kreipe, H. (2015). The region-of-interest size impacts on Ki67 quantification by computer-assisted image analysis in breast cancer. *Human Pathology*, No. 46 (9), pp. 1341-1349.
3. Focke, C., Bürger, H., van Diest, P., Finsterbusch, K., Gläser, D., Korsching, E., Decker, T., Anders, M., Bollmann, R., Eiting, F., Friedrich, K., Habeck, J., Haroske, G., Hinrichs, B., Behrens, A., Krause, U., Lang, U., Lorenzen, J., Minew, N., Mlynek-Kersjes, M., Nenning, H., Packeisen, J., Poche-de Vos, F., Reyher-Klein, S., Rothacker, D., Schultz, M., Sturm, U., Tawfik, M., Berghäuser, K., Böcker, W., Cserni, G., Habedank, S., Lax, S., Moinfar, F., Regitnig, P., Reiner-Concin, A., Rüschoff, J., Varga, Z. and Woziwodski, J. (2017). Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. *European Journal of Cancer*, vol. 84, pp. 219-227.
4. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878. Published 2017 Dec 4. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
5. Leung, Samuel C Y et al. "Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration" *NPJ breast cancer*. Vol. 2 16014. 18 May. 2016, doi:10.1038/npjbcancer.2016.14
6. Thakur SS, Li H, Chan AMY, et al. The use of automated Ki67 analysis to predict Oncotype DX risk-of-recurrence categories in early-stage breast cancer. *PLoS One*. 2018;13(1):e0188983. Published 2018 Jan 5. doi:10.1371/journal.pone.0188983
7. Kushnarev V.A., Artemyeva E.S., Kudaibergenova A.G. . Comparison of digital and visual methods for assessing Ki-67 index in invasive breast carcinomas. *Archive of pathology*. 2018. No. 80 (2). pp. 38-42. 10.17116 patol201880238-42 (in Russ)

Авторы:

Кушнарев Владимир Андреевич

Аспирант научной лаборатории морфологии опухолей

orcid.org/0000-0003-4608-9349kushnarevvladimir1@gmail.com

Кудайбергенова Асель Галимовна

Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научной лаборатории морфологии опухолей

<http://orcid.org/0000-0001-7797-088X>asel1972@mail.ru

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Петрова

197758, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Authors:

Vladimir A. Kushnarev

PhD student in the Scientific Laboratory of Tumor Morphology

orcid.org/0000-0003-4608-9349kushnarevvladimir1@gmail.com

Assel G. Kудaybergenova

Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Scientific Laboratory of Tumor Morphology

<http://orcid.org/0000-0001-7797-088X>asel1972@mail.ru

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia

Leningradskaya Str. 68, Pesochny, St. Petersburg, Russian Federation, 197758