

Биотехнические системы автоматизированной микроскопии цитологических препаратов

Аннотация

Представлен краткий обзор истории развития комплексов автоматизированной микроскопии. Рассмотрены вопросы методологии их проектирования и результаты выполненных в МГТУ им. Н.Э. Баумана работ в данном направлении. Представлен подход к расчету размера выборки клеток, позволяющий учитывать характеристики качества работы алгоритмов анализа изображений, а также особенности распределения клеток по поверхности препарата. Обозначены ключевые направления развития автоматизированной микроскопии.

Краткий обзор истории развития автоматизированной микроскопии

Работы по повышению достоверности и автоматизации микроскопического анализа биомедицинских препаратов имеют более чем полувековую историю. Исследования ученых и инженеров были направлены как на автоматизацию рутинных операций регистрации изображений препаратов, так и на создание методов и алгоритмов анализа и интерпретации изображений. В настоящее время по особенностям аппаратной реализации выделяют комплексы, построенные на основе традиционных оптических микроскопов, оснащенных комплектами автоматизации, в том числе интегрированных в общий внешний корпус, и сканеры биомедицинских препаратов (СБП), содержащие часть компонентов, присущих микроскопам, но не предназначенные для визуального просмотра препарата и ручного управления. На основе обоих вариантов аппаратных платформ автоматизации создаются специализированные комплексы, реализующие ту или иную автоматизированную методику анализа препаратов, как правило, цитологических, в силу принципиальной возможности их анализа в автоматизированном, а зачастую и в автоматическом режимах. Эти комплексы будем в дальнейшем называть аппаратно-программными комплексами автоматизированной микроскопии (АПКМ) цитологических препаратов (ЦП).

Одним из первых примеров автоматизации микроскопического анализа является комплекс «Quantimet 720», представленный в 1971 году [1]. Он нашел применение в ряде научных приложений, связанных с микроскопическим анализом препаратов. В это же время разрабатываются такие комплексы, как «LARC» («Corning Inc.», 1974 г.), «Hematrak» («Geometric Data Corporation», 1976 г.), «diff3» («Perkin-Elmer», «Coulter Biomedical Research Inc.», 1977 г.), «ADC 500» («Abbott», 1977 г.), «Microx» («Omron Tateisi Electronics», 1981 г.), «Hitachi 8200» («Hitachi», 1982 г.) и др., большинство из которых предназначалось для автоматизированного анализа мазков крови [2], [3].

Одновременно с этим создавались алгоритмы анализа изображений клеток и были разработаны первые методики применения автоматизированной микроскопии для исследования мазков крови [4]–[6]. В публикуемых обзорах и сравнительных исследованиях главным образом точности подсчета лейкоцитарной формулы отмечалось, что в целом результаты применения АПКМ являются удовлетворительными, хотя и уступающими развивающимся проточным цитоанализаторам [7]. К современным АПКМ, реализующим автоматизированную методику анализа мазков крови, относятся «DiffMaster Octavia» («Cella Vision»), «Мекос-Ц2, Ц3» (ЗАО «Мекос»), АПК «Гранат-Гемо» (МГТУ им. Н.Э. Баумана), АПК «Атлант-гемо» (МИФИ), «Vision Nema®» («West Medica») и ряд других.

Новое рождение автоматизированная микроскопия пережила с появлением возможностей передачи изображения на расстояние и дальнейшим развитием аппаратного и программного обеспечения. В 1994 году на основе оптического микроскопа была создана система «BLISS» («Vacus Laboratories»), позволяющая регистрировать в автоматическом

режиме поверхность препарата, формировать виртуальный слайд и передавать его по сети с возможностью просмотра в режиме телеконференции. В настоящее время большинство крупных производителей микроскопов имеют в своем арсенале подобные аппаратные платформы автоматизации.

В 1999 году был разработан первый высокоскоростной сканер высокого разрешения для формирования цифрового (виртуального) слайда, впоследствии производимый компанией «InterScope Technologies». В настоящее время на рынке присутствует значительное число разных моделей СБП, отличающихся количеством загружаемых препаратов, скоростью сканирования, поддерживаемыми специальными функциями (см., например, [8]). Оснащение ряда образцов СБП специализированным программным обеспечением для анализа регистрируемых изображений привело к созданию и официальному признанию комплексов-ассистентов цитолога, автоматизирующих ряд рутинных операций цитологического скрининга заболеваний шейки матки: «BD FocalPoint™ GS Imaging System» («BD»), «ThinPrep® Imaging System» («Hologic»).

Эффект от применения разных аппаратных платформ автоматизации был продемонстрирован в первую очередь при решении задач, не связанных с реализацией автоматизированных методик анализа препаратов: в образовании, при проведении телеконференций патологов и для получения «второго мнения» [9]. Использование патологами виртуальных слайдов вместо традиционной микроскопии препаратов в настоящее время получило признание для решения задач первичной диагностики [10].

Несмотря на значительное развитие аппаратного и программного обеспечения, существующие АПКМ имеют ограниченное применение и автоматизируют главным образом ряд операций анализа клеток периферической крови в мазках, скрининга заболеваний шейки матки, используются в научных исследованиях. В ряде работ отмечается, что рутинное применение АПКМ зачастую приводит к возникновению проблем с качеством регистрируемых изображений [11], а также к снижению чувствительности скрининга по сравнению с традиционным визуальным анализом [12]; отмечается существенный недостаток средств анализа регистрируемых изображений, пригодных для применения в рутинной практике [13].

Работы МГТУ им. Н.Э. Баумана в области создания АПКМ

Вопросы методологии проектирования АПКМ частично освещены в научно-технической литературе. В работе [] выделены этапы преобразования информации в ходе лабораторного исследования: технический, биологический и нозологический. В работах И.Н. Спиридонова показано, что проектирование систем анализа медицинских изображений необходимо выполнять на техническом, структурном и семантическом уровнях [15]. Общие подходы к проектированию медицинских систем и комплексов, в том числе АПКМ, даются в теории биотехнических систем (БТС).

Отличительными особенностями автоматизированного микроскопического анализа ЦП являются наличие функции

оценки качества препарата, постановка задачи классификации отдельных клеток и препарата в целом с целью формирования цитологического заключения [16]. Обобщенная функциональная схема биотехнической системы автоматизированной микроскопии цитологических препаратов (БТС АМК ЦП) представлена на рис. 1. Модули, решающие задачи технического, биологического и нозологического уровней, формируют АПКМ ЦП.

На кафедре биомедицинских технических систем МГТУ им. Н.Э. Баумана работы по автоматизации анализа биомедицинских препаратов начались с 1990-х годов с создания лазерного анализатора крови, обеспечивающего построение пространственно-частотного спектра участков мазка крови, оценку качества мазка и усредненных морфологических характеристик клеток [17].

Одновременно с этим шли работы по автоматизации традиционной микроскопии, и в 2006 году был создан АПК «Гранат-Гемо», предназначенный для автоматизированного анализа мазков крови. За последние 10 лет были проведены работы по созданию линейки универсальных устройств автоматизации, присоединяемых к штатным предметным столам микроскопов разных производителей без их демонтажа [18], выполнены оптимизация параметров алгоритма автофокусировки [19], проектирование комплекса телемикроскопии, представляющего возможность удаленного управления процессом сканирования с трансляцией изображения препарата [20].

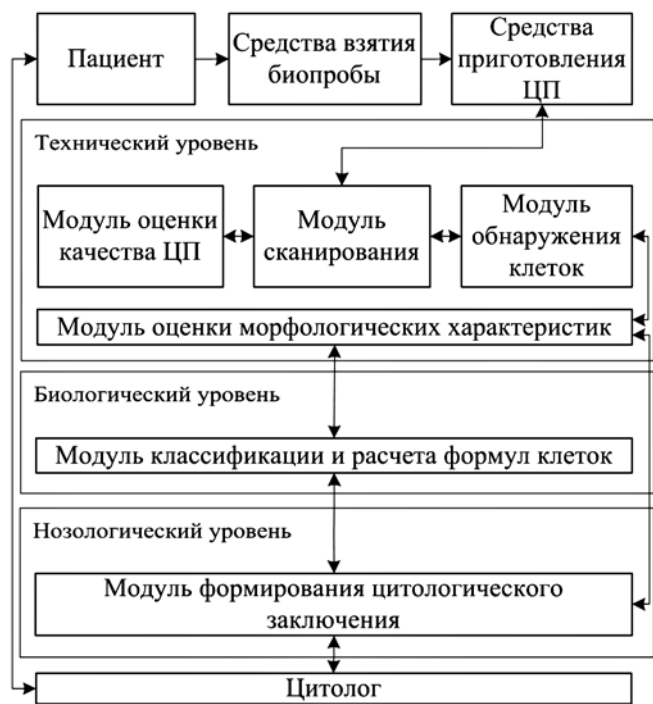


Рис. 1. Обобщенная функциональная схема БТС автоматизированной микроскопии цитологических препаратов

В ходе апробации созданных в МГТУ им. Н.Э. Баумана АПКМ ЦП были сформированы количественные критерии дифференциальной цитологической диагностики и автоматизировано решение таких задач, как скрининг анемии по мазкам крови, включая оценку качества мазка и поиска области монослоя клеток [21], иммунохимические исследования ЦП при раке молочной железы (РМЖ) [22], [23], определение степени дифференцировки инвазивного РМЖ неспецифического типа [24] и морфологическое подтверждение рака почки [25] по ЦП, окрашенным на области ядрышкового организатора, а также ряд других.

Текущими задачами развития АПКМ являются: решение вопросов их метрологического обеспечения и автоматической проверки качества анализируемого препарата, создание интегрированных систем поддержки принятия решений

врача с учетом результатов микроскопического анализа, развитие и внедрение комплексов для телемикроскопии.

Особенности сбора выборки клеток в АПКМ

Число клеток в ЦП является важнейшим показателем его пригодности для исследования. Размер выборки анализируемых клеток определяет статистическую погрешность результатов анализа, которая может достигать существенных значений. Первая и, по-видимому, единственная попытка построения математической модели для расчета размера выборки была предпринята в 1980-е годы в цикле работ, посвященном задаче цитологического скрининга заболеваний шейки матки (см., например, [26]), где было показано, что размер выборки в зависимости от исходных данных должен составлять от нескольких тысяч до нескольких десятков тысяч клеток. Полученные результаты, в силу использованной постановки задачи, неприменимы напрямую для расчета размера выборки в широком спектре задач дифференциальной цитологической диагностики.

В предположении, что цитологическое заключение представляет собой результат решения задачи бинарной классификации, в которой используется вектор признаков, подчиняющийся многомерному нормальному распределению, зависящие от размера выборки N корреляционные матрицы признаков распознаваемых классов C_1 и C_2 при заданных уровнях ошибок цитологического заключения 1-го (α) и 2-го (β) рода должны удовлетворять условию

$$\Delta^T (C_1 + C_2)^{-1} \Delta \geq z_\alpha \sqrt{\Delta^T (C_1 + C_2)^{-1} C_1 (C_1 + C_2)^{-1} \Delta} + z_\beta \sqrt{\Delta^T (C_1 + C_2)^{-1} C_2 (C_1 + C_2)^{-1} \Delta}, \quad (1)$$

где Δ – вектор разностей средних значений векторов признаков распознаваемых классов.

Соотношение (1) позволяет определить размер выборки клеток для решения диагностической задачи с учетом качества работы алгоритмов анализа изображений. Так, при использовании в качестве вектора признаков формулы клеток (т. е. долей клеток разных классов) размер выборки связан как с α и β и биологической вариацией, так и с вероятностями ложного обнаружения, пропуска клеток и их ошибочной классификации, учитываемых в C_1 и C_2 .

Важным вопросом является способ сбора выборки клеток в ЦП. Анализ ЦП, как правило, выполняется по участкам препарата (полям зрения), в которых схожие клетки зачастую группируются вместе, что приводит к дополнительному росту статистической погрешности результатов анализа. Можно показать, что исходная корреляционная матрица для долей клеток увеличивается при этом в $[1 + (N-1)\bar{\rho}]$ раз по сравнению со случаем сбора простой случайной выборки, когда клетки отбираются в случайном порядке, где $\bar{\rho}$ – средний коэффициент корреляции классов двух клеток в выборке (в поле зрения). Использование предложенного подхода позволяет выбрать наилучший способ сбора выборки клеток с учетом характеристик алгоритма анализа изображений и характера расположения клеток в препарате.

Заключение

Аппаратно-программные комплексы автоматизированной микроскопии цитологических препаратов имеют к настоящему времени более чем 50-летнюю историю развития, которая с появлением первых коммерческих образцов сканеров и автоматизированных микроскопов в 1990-х годах приобрела характер улучшения потребительских характеристик и расширения сфер применения. В целом к настоящему времени доказана целесообразность применения АПКМ в медицинской практике, решены вопросы создания их аппаратного обеспечения. Между тем технология использования цифровых изображений биомедицинских препаратов находится сейчас все еще на ранней стадии принятия ее медицинским сообществом, а сфера практического применения АПКМ, реализующих автомати-

зированные методики анализа биомедицинских препаратов, существенно ограничена.

Развитие рынка телемедицинских услуг стимулирует разработку и внедрение новых автоматизированных методик анализа биомедицинских препаратов и выводит на передний план вопросы качества анализируемых препаратов, включая формирование требований к сбору выборки клеток; метрологического обеспечения комплексов телемикроскопии; создания единого информационного пространства в данной области.

Список литературы:

1. Fisher C. The new Quantimet 720 // *The Microscope*. 1971. Vol. 19. PP. 1-20.
2. Preston K., Duff M.J.B. Modern cellular automata: Theory and applications. – New York and London: Plenum press, 1984. 340 p.
3. Bradbury S. Commercial image analyzers and the characterization of microscopical images // *Journal of Microscopy*. 1983. Vol. 131. № 2. PP. 203-210.
4. Лурье О.Б., Быков Р.Е., Попечителев Е.П. Цвет как критерий при автоматизации определения лейкоцитарной формулы крови // Труды СЗПИ. 1968. Вып. 3. С. 24-28.
5. Bacus J.W., Belanger M.G., Aggarwal R.K., Trobaugh F.E. Image processing for automated erythrocyte classification // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1976. Vol. 24. PP. 195-201.
6. Green J.E. A practical application of computer pattern recognition research: The Abbott ADC-500 differential classifier // *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979. Vol. 27. № 1. PP. 160-173.
7. Wienders J.P.M., Beunis M.H., van Wersch J.W.J. A comparison of the screening ability of two automated leukocyte differential counters // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. 1986. Vol. 24. PP. 471-480.
8. Farahani N., Parwani A., Pantanowitz L. Whole slide imaging in pathology: Advantages, limitations, and emerging perspectives // *Pathology and Laboratory Medicine International*. 2015. Vol. 7. PP. 23-33.
9. Pantanowitz L. et al. Review of the current state of whole slide imaging in pathology // *J. Pathol. Inform*. 2011. Vol. 2. № 1. PP. 1-36.
10. Boyce B.F. An update on the validation of whole slide imaging systems following FDA approval of a system for a routine pathology diagnostic service in the United States // *Biotechnic & Histochemistry*. 2017. Vol. 92. № 6. PP. 381-389.
11. Ghaznavi F. et al. Digital imaging in pathology: Whole-slide imaging and beyond // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2013. Vol. 8. PP. 331-359.
12. Kitchener H.C. et al. Automation-assisted versus manual reading of cervical cytology (MAVARIC): A randomized controlled trial // *Lancet Oncol*. 2011. Vol. 12. № 1. PP. 56-64.
13. Feldman M.D. Whole slide imaging in pathology: What is holding us back? // *Pathology and Laboratory Medicine International*. 2015. Vol. 7. PP. 35-38.
14. Buttner J. Laboratory findings: Structure, validity and significance for medical cognitive processes // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. 1991. Vol. 29. PP. 507-519.
15. Спиридонов И.Н., Аполлонова И.А., Сафонова Л.П. Основные принципы создания лазерных анализаторов медицинских сложноструктурированных изображений // *Конверсия*. 1997. № 10. С. 55-57.
16. Samorodov A.V. Building intelligent systems for the analysis of microscopic images in medicine and biology // *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2013. Vol. 23. № 4. PP. 508-511.
17. Safonova L.P., Samorodov A.V., Spiridonov I.N. Quantitative estimation of poikilocytosis by the coherent optical method // *Proceedings of SPIE*. 2000. Vol. 3923. PP. 170-174.
18. Самородов А.В., Косоруков А.Е., Самородова О.А., Добролюбова Д.А., Войнова Н.А. Автоматизация оптического микроскопа с использованием штатного предметного стола // *Инженерный вестник (электронный научно-технический журнал)*. 2016. № 5. С. 508-515 / <http://engsi.ru/doc/842850.html>.
19. Артюхова О.А., Самородов А.В. Сравнительное исследование характеристик резкости микроскопических изображений медико-биологических препаратов // *Медицинская техника*. 2011. № 1. С. 15-22.
20. Агапова Е.А., Добролюбова Д.А., Самородов А.В. Телемедицинская система для удаленных online-консультаций в области микроскопии биомедицинских препаратов // *Биотехносфера*. 2016. № 6. С. 2-7.
21. Самородов А.В., Фролова А.В., Семкина Е.Л., Спиридонов И.Н. Автоматизация морфометрического анализа клеток крови в мазках // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004. № 9. С. 43b-43.
22. Dobrolyubova D.A., Kravtsova T.A., Samorodova O.A., Samorodov A.V., Slavnova E.N., Volchenko N.N. Automatic image analysis algorithm for quantitative assessment of breast cancer estrogen receptor status in immunocytochemistry // *Pattern Recognition and Image Analysis*. 2016. Vol. 26. № 3. PP. 552-557.
23. Parpulov D., Samorodov A., Makhov D., Slavnova E., Volchenko N., Iglovikov V. Convolutional neural network application for cells segmentation in immunocytochemical study / *Proceedings of the 2018 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology (USBEREIT 2018)*. 2018. PP. 87-90.
24. Волченко Н.Н., Спиридонов И.Н., Славнова Е.Н., Самородов А.В., Полянская М.Г., Борисова О.В. Компьютерный анализ текстуры изображений ядер в определении степени дифференцировки инвазивного протокового рака молочной железы // *Российский онкологический журнал*. 2008. № 1. С. 13-18.
25. Волченко Н.Н., Мельникова В.Ю., Спиридонов И.Н., Самородов А.В., Славнова Е.Н. Значение аргентофильных белков областей ядрышковых организаторов в цитологической диагностике рака почки // *Российский онкологический журнал*. 2007. № 5. С. 37-39.
26. Castleman K.R., Price K.H., White B.S. Effect of random abnormal cell proportion on specimen classifier performance // *Cytometry*. 1993. Vol. 14. PP. 1-8.

Андрей Владимирович Самородов,
канд. техн. наук, доцент,
зав. кафедрой «Биомедицинские
технические системы» (БМТ-1),
ФГБОУ ВО «МГТУ им. Н.Э. Баумана
(национальный исследовательский университет)»,
г. Москва,
e-mail: avs@bmstu.ru