

p53-at és Ki67-et expresszálo daganatsejtek számlálása manuális és morfometriai módszerekkel. Összehasonlító tanulmány

Mezei Tibor, Gurzu Simona, Horváth Emőke, Pávai Zoltán, Jung János
Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Patológia Tanszék

Cuantificarea manuală și prin metode morfometrice digitale a celulelor tumorale care exprima p53 și Ki67. Studiu comparativ

În prognosticul cancerului colorectal raportul celulelor p53 și Ki67 pozitive joacă un rol important. În lucrarea noastră am numărat prin diferite metode morfometrice (manuală și asistată de calculator) numărul celulelor p53 și Ki67 pozitive, evidențiate prin metode imunohistochimice. Conform rezultatelor obținute, nu există diferențe statistice semnificative între metoda manuală și cea asistată de calculator. Am găsit diferențe notabile în cazul imaginilor pregătite necorespunzător. În concluzie, putem afirma că metoda morfometrică digitală (asistată de calculator) poate fi folosită cu rezultate bune; rezultatele obținute prin această metodă nu diferă semnificativ de rezultatele obținute prin metoda manuală; pe de altă parte, prin folosirea metodei digitale, se obține o importantă economie de timp.

Quantifying p53 and Ki67 positive cells using manual and digital morphometry analysis. Comparative study

In the prognosis of colorectal cancer the number of p53 and Ki67 positive cells play an important role. In our study we measured the number of immunohistochemically marked p53 and Ki67 positive cells using classical (analogue) and computer assisted (digital) morphometry methods. According to the obtained results there was no statistically significant difference between the two methods. We noticed important differences in the case of poorly prepared pictures. As a conclusion we may say that the computer assisted method yields good results and that the values obtained with it does not differ significantly from the classic method. On the other hand important amount of time can be saved using the digital method.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (1): 38-42

www.emeogysz.ro

A különböző tumor markereket (p53, Ki67) expresszálo daganatos sejtek viszonylagos számának vizsgálata és ismerete, a daganat jellegének a jellemzésén túl, alkalmas a betegség alakulásának a követésére a későbbiekben vett minták által és hozzásegít a megfelelő kezelés kiválasztásához, valamint a kórjóslat megfogalmazásához [1, 2]. Immunohisztokémiai módszerrel azok a daganatos sejtek, amelyek p53-at és Ki67-et expresszálnak, megkülönböztethetővé válnak környezetüktől, így számlálásra alkalmasak lesznek. Hagyományosan a számlálást a patológus végzi és százalékban adja meg a pozitív sejtek számát. Ilyenkor helyesebb, ha a pozitív sejtek számának a felbecsléséről beszélünk.

Célkitűzésünk egy olyan módszer kidolgozása és tesztelése volt, amellyel digitális képfeldolgozás módszerének segítségével megszámoljuk a p53-at és Ki67-et expresszálo daganatos sejteket. Egy ilyen módszer kidolgozásával elkerülhető lenne a hagyományos módszerrel járó szubjektivizmus.

p53

A TP53 gén a 17p13.1 kromoszómán helyezkedik el. Az általa kódolt fehérje (p53 transzkripció faktor) egy 51-53 kd molekulású, minden sejtben jelenlevő foszfoprotein, amely a magban expresszáldik. Számos rosszindulatú daganatban figyelték meg ennek a génnek az inaktíválódását szomatikus mutáció vagy allélvesztés által. Több mint 14000 ilyen mutációt írtak eddig le. A p53 fehérje egy latens transzkripció faktor, amely válaszként aktiválódik számos, a sejtet érő, fizikai és kémiai stresszhatásra. Ezen hatások következtében szerepe van a sejtproliferáció szabályozásában, a genetikai integritás megőrzésében és a sejt túlélésében. Hatásai közt említendő: apoptózis beindítása, sejtosztódás ellenőrzése a sejtciklus szabályozása által, DNS replicatio

és reparatio modulálása. A p53 fehérje felfogható mint egy „vészfék”, amely megállítja a genetikai állományában sérült sejt proliferációját, amelyet különböző hatások váltottak ki. Tágabb értelemben a p53 fehérje összehangolja a sejtet érő külső és belső jeleket, szabályozva a sejt differenciálódását, fejlődését és halálát. A p53 mutációk az összes daganattípusok 40-45%-ában mutathatók ki, ami az egyik leggyakoribb genetikai elváltozássá teszi. Normálisan működő sejtekben a p53 nem-mutált „vad”-fehérje (wild-type) rövid féleletideje és gyors lebomlása miatt, immunohisztokémiai módszerekkel nem mutatható ki. Abban az esetben, ha mutációt szenved (illetve az őt kódoló gén szenved mutációt), nagy mennyiségben felhalmozódik a sejtben és megfelelő antitesttel jelölve immunohisztokémiai módszerekkel kimutathatóvá válik. A kóros p53 termékének egyidejű jelenléte meggátolja a normális „vad” gén termékének a funkcióját. A működészavar következtében a sejt ciklus felgyorsul, a tumor genetikailag instabillá válik és az apoptózis gátolt lesz. A megváltozott p53 gén onkogénként működve potenciálja a többi onkogén hatását. A kóros p53 funkció általában terápia rezisztenciával jár [8, 9].

Ki67

A Ki67 olyan nukleáris protein, amely csakis az osztódó sejtekben jelenik meg. A fehérjét kódoló gén a 10q25-qter kromoszómán található. Feltételezik, hogy ez a fehérje (3256 aminosav, 358 kd) szükséges a sejtproliferáció fenntartásához. A sejtben belül a magban, a G1 sejtosztódási fázisban a sejt magvacskakörül (perinucleolarisan) helyezkedik el. Mitozis alatt minden kromoszómán jelen van. A sejtek Ki67 antitestel történő vizsgálata tehát afelől nyújt információt, hogy egy adott daganatban milyen arányban találhatók osztódásban lévő sejtek. Jelenléte jól korrelál a tumor grade-el és rossz prognózist jelent [8, 9].



Anyag és módszer

Vizsgálatunkhoz 10 vastagbél carcinoma daganatszövetéből vett paraffinba ágyazott mintáit használtuk fel. Az ebből készült metszetekből egyrészt a kóros p53 fehérje felhalmozódását mutattuk ki a p53 antitesttel (IgG2b kappa izotípus, DO-7 klónjával, amely egyaránt kimutatja a nem mutált / wild type/ és a mutációt szenvedett p53-at); másrészt a Ki67 antitesttel (IgG, kappa izotípus) mutattuk ki az osztódásban levő sejteket. A reakcióterméket DAB kromogénnel vizualizáltuk, amely sötétbarnára színezi a reakcióterméket. Így összesen 20 lemezt vizsgáltunk.

Az immunhisztokémiaiilag megjelölt metszetekről egy Nikon Eclipse E800 mikroszkóphoz csatolt Nikon DN100 CCD kamera segítségével digitális fényképeket készítettünk. A képeket a kamera vezérlőegysége (Camera Control Unit) segítségével CF (Compact Flash) adathordozóra vettük fel, tárolás és a személyi számítógépre való átvitel céljából. Ezt követően a fényképeket alávettük a későbbiekben ismerttetett képfeldolgozási eljárásoknak. A digitális képfeldolgozást a NIH-ben (National Institutes of Health, AEÁ) Wayne Rasban által kifejlesztett ImageJ nevű programmal végeztük [10]. A képek digitális feldolgozását egy Sony Vaio VGN A-150 hordozható számítógépen (Intel Pentium Centrino 1,6 Ghz, 512Mb RAM) végeztük, amelyen Windows XP (SP2) operációs rendszer futott.

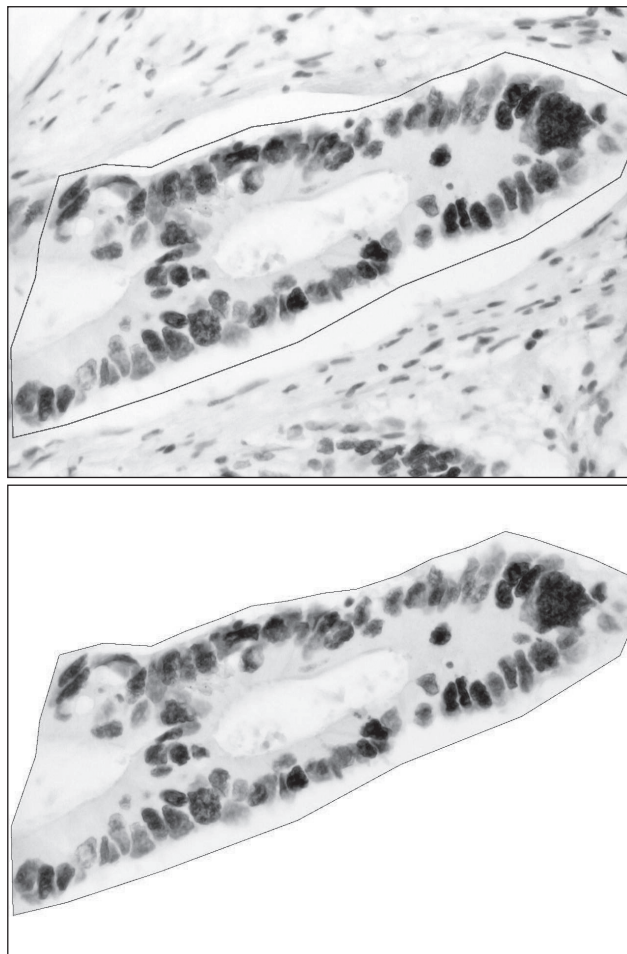
Minden lemezről egyenként 5 felvételt készítettünk 20-as objektívvel, megfelelően kiválasztott látóterekről (ez összesen 100 fényképet eredményezett). Alkalmasnak azokat a látótereket tartottuk, amelyeknél jól kivehető sejtcsoportok és szövetstruktúrák látszottak. Pozitívnak azokat a daganat sejteket tekintettük amelyek magja sötétbarna volt, negatívnak pedig azokat, amelyek sejtmagja kékes árnyalatú volt. A metszetekről készült digitális képek számos plusz információt tartalmaztak, amelyek zavaró hatással lettek volna az elemzések során. Ezen zavaró elemeket a hagyományos, valamint a morfolometriás elemzést megelőzően kivágtuk a képekről, úgy, hogy megjelöltük azokat a területeket, amelyeket a továbbiakban vizsgálni szándékoztunk (a program Polygon tool eszközének segítségével) és kivágtuk az ezen területeken kívül eső részeket (Edit > Clear outside parancsal) (lásd 1. ábra). Az így előkészített 100 digitális képet a továbbiakban három módszerrel elemeztük: hagyományos, hagyományosan + számítógéppel és digitális morfolometriával.

Hagyományos módszer

Ez a módszer gyakorlatilag azonos azzal, amit a digitális morfolometriai módszerek hiányában a kórszövettanászok használnak a sejtek számlálására. Ebben az esetben a sejtek számlálása az okulárral látott mezőben direkt megfigyelés által történik. A sejtek legjobban a 20-as objektívvel vizsgálhatók. Az így kapott eredmény inkább a sejtek számának a becslése, éppen ezért nemritkán %-ban fejezik ki a kapott eredményeket. Ennek a módszernek a segítségével egy eset vizsgálata meghaladhatja az 1 órát.

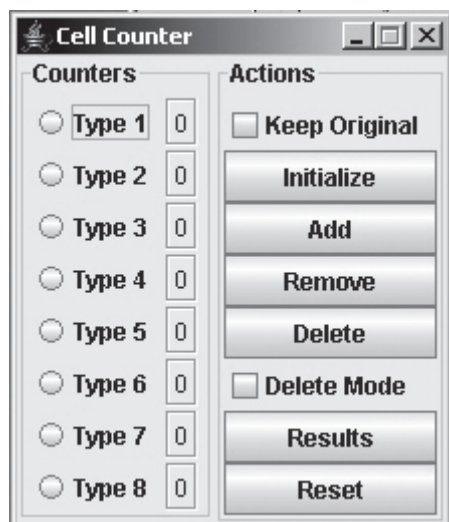
Hagyományos módszer számítógéppel

Ebben a módszerben az ImageJ CellCounter részprog-



1. ábra. A digitális képek az elemzésnek alávett terület megjelölése és azon kívül eső terület kivágása után

ram (plugin) felhasználásával manuálisan számoltuk meg a pozitív, illetve a negatív sejteket. A CellCounter plugin a Plugins > Cellcounter menüpontjában található. Erre kattintva megjelenik egy külön ablakban egy vezérlőtálca (lásd 2. ábra), ami az alábbi két részre van osztva: jobb oldalon vannak a plugin működését vezérlő menüpontok, a bal oldalon a különböző sejtípusok megjelölésére használható számlálók. Alapértelmezetten 8 számláló (Type1-Type8) van megjelenítve, de az Add menüponttal tetszőleges számú számlálót lehet létrehozni. Vizsgálatunk során 2 sejtípust számoltunk, így a baloldali számlálók közül csupán a Type1 és a Type2-t használtuk. A sejtek kézi számlálása az alábbiak szerint történik. Megnyitjuk a vizsgálni kívánt metszetet, majd a CellCounter plugin „Initialize” menüpontjára kattintva létrejön egy új ablak amely a megnyitott képünket tartalmazza és bezáródik az az ablak, amelyben eredeti képünk volt (a Keep original kapcsoló bekapcsolásával az eredeti képet tartalmazó ablak is nyitva marad). A sejtek számlálása előtt tetszőlegesen leszögeztük, hogy Type1-el jelöljük a pozitív (barna) sejteket és Type2-vel a negatív (kék) sejteket. Ezután kezdődik a sejtek számlálása, oly módon, hogy Type1-re kattintunk a CellCounter baloldali mezőjében, ezt követően a metszetről készített fényképen végig kattintjuk az összes pozitív sejtet. A kattintások során



2. ábra. Az ImageJ "Cell Counter" nevű részprogramjának kezelői felülete

megfigyelhető, hogy a Cellcounter Type1 számláló minden kattintás után 1-el nő. Ezután következik a negatív sejtek számlálása. Ezelőtt azonban a számlálót át kell kapcsolnunk a Type2-re. Az előbbihez hasonló módon végig kattintunk a p53- sejteken, itt is megfigyelhető, hogy a Type2 számláló minden egyes kattintás során eggyel nő. Mindkét esetben a kattintások helyén megjelenik egy pont és a számláló típusának a száma (Type1 esetében 1, a Type2 esetében 2). Ezáltal vizuálisan is nyomon követhetjük a megszámlolt sejteket, elkerülve így, hogy kétszer számoljuk meg ugyanazt a sejtet. A sejtszámlálás befejezte után a Cellcounter „Results” menüpontjára kattintva megjelenik egy új ablakban táblázat formájában a Type1 és a Type2 kettő számlálók értékei, melyeket minden egyes kép vizsgálata után lejegyeztünk. A 110 digitális kép elemzése során, a képek felében kaptunk egy Type1 és Type2 értéket, ahol Type1 jelentette a p53+, Type2 a p53- sejteket; míg a képek másik felében hasonló módon megszámláltuk a Ki67+ és Ki67- sejteket. Az így kapott eredményeket egy táblázatba foglaltuk, amelynek négy oszlopa volt: a lemez száma, digitális kép neve, pozitív sejtek száma, negatív sejtek száma. Ezzel a módszerrel, egy eset vizsgálata átlagosan 40 percet vett igénybe.

Digitális morfometria módszer

Az előbbieken bemutatott, számítógépet használó ugyan, de alapelveiben hagyományos, kézi számlálás mellett egy általunk kifejlesztett második módszert is alkalmaztunk. Ebben az esetben a cél az volt, hogy a sejtek számlálását a számítógép végezze el, külső beavatkozás nélkül. Természetesen a sejtek felismerését megelőzően meg kellett „tanítanunk” a számítógépet, hogy minél pontosabban felismerje a pozitív, illetve negatív sejteket. Ez a „tanítás” két szakaszt foglalt magába: az egyik során a digitális képeket előkészítettük oly módon, hogy a számolni kívánt sejtek jól elkülönüljenek egymástól és környezetüktől; a másodikban történt a tulajdonképpeni sejtszámlálás és az eredmények összesítése.

Az első szakaszban színes vázkép (Color thresholding) elkészítését végeztük el minden esetben, ami által elkülö-

nültek a pozitív (barna) és a negatív (kék) sejtmagok. Ezen művelet 200 részképet eredményezett (100 pozitív sejtek, 100 negatív sejtek). Az ily módon szétválasztott pozitív/negatív sejtek megszámlálására egy több lépéses makrót (futtatható parancssor készlet) készítettünk, ami által lehetővé vált a képenkénti <1 mp elemzési és sejtszámlálási idő. Így a 220 digitális képet <200 mp alatt elemeztük ezzel a módszerrel.

A futtatható parancssor az alábbi képeket módosító parancsokat tartalmazta (ebben a sorrendben); zárójelben rövid leírás olvasható mindegyikről, illetve az angol szakirodalomban használatos elnevezés:

Vázkép („Threshold”, a színes képpontokat fekete pontokká alakítja, megadott határértékek közt);

Lyukak töltése („Fill Holes”, az esetleges hibákból adódó fehér lyukak kitöltése);

Hízlalás („Dilate”, az alakzatokat, körvonalait mentén, néhány pixellel növeli);

Fogyasztás („Erode”, az alakzatokat, körvonalait mentén, néhány pixellel csökkenti);

Kontúrkeresés („Watershed”, az egymást esetlegesen fedő alakzatok közé egy választvonalat iktat);

Szűrési elemzés („Analyze Particles...”, „size=70-5000 circularity=0.00-1.00 display include record”, a korábbi parancsok által előkészített alakzatokat /amelyek tulajdonképpen a sejtmagoknak felelnek meg/ a megadott kritériumoknak megfelelően számlálja);

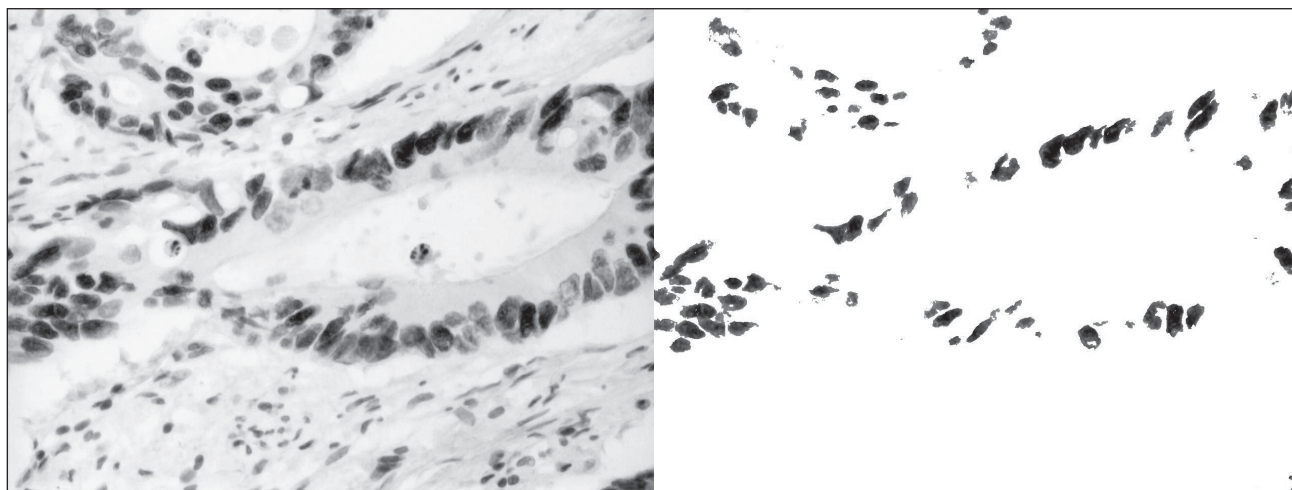
Eredmények megjelenítése („Results”).

Ezen lépések és hatásai végigkövethetők a 3. és 4. ábrán.

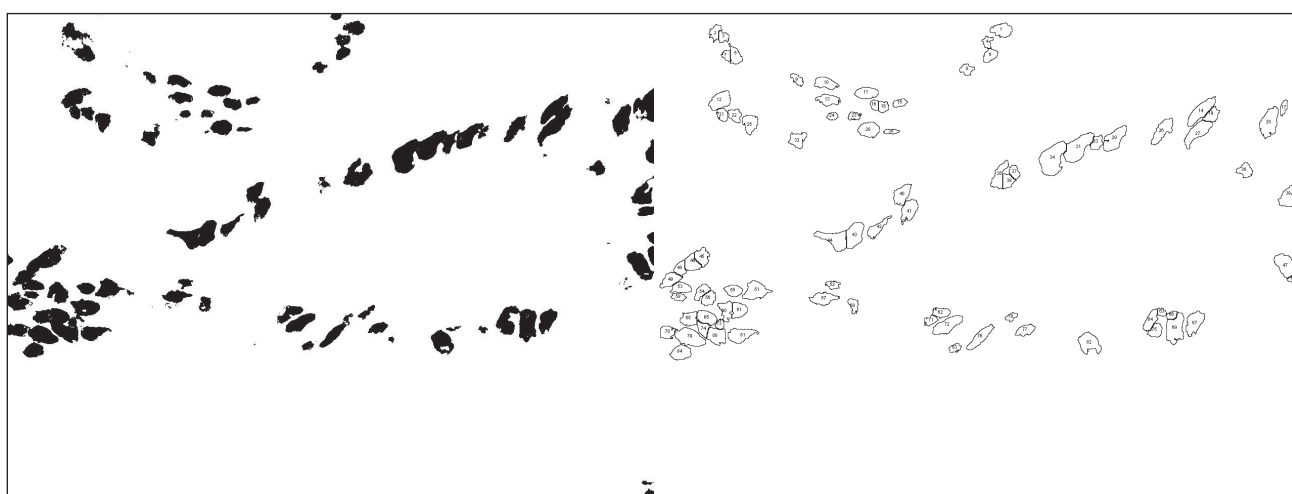
A sejtek számlálása, eredmények elmentését a parancssor utolsó eleme tartalmazza, ami során a számítógép az eredményeket egy táblázatba írja, amely utólag bármilyen táblázatkezelő programmal megnyitható. A parancssort egy adott mappára lehet futtatni és az összes ott található kép elemzése után jeleníti meg az eredményeket. Az alábbi adatokat mentette a táblázatba: kép neve, alakzat területe, alakjellemzője (circularity) és koordinátája. A 200 részképen való futtatás során hozzávetőlegesen összesen 18200 alakzatot (sejtmagot) számoltunk meg.

Eredmények

A fentiekben bemutatott módszerek alkalmazásával 3 adatcsoport született, az alkalmazott módszertől függően. Az első (továbbiakban A csoport) tartalmazta a hagyományos módszerrel, a második a hagyományos módszerrel, de számítógép segítségével (továbbiakban B csoport) és a harmadik a digitális morfometria segítségével (továbbiakban C csoport) számolt eredményeket. Minden csoport tartalmazta az adott módszerrel számolt pozitív sejtek számárányát (ezt a $[(\text{pozitív sejtek száma} \times 100) / (\text{pozitív} + \text{negatív sejtek száma})]$ képlet alapján számoltuk). A számadatokat az 1. táblázat tartalmazza, az 5. ábrán látható a B és C csoport értékei közti különbségek grafikus ábrázolása. Ebből látható a két módszerrel kapott eredmények közti eltérés %-ban kifejezve (például az első 3 lemez esetében az eltérés a két



3. ábra. A digitális morfometria módszer első lépése: a pozitív sejtmagok „leválasztása” (jobb) az eredeti képről (bal)



4. ábra. A digitális morfometria módszer utolsó lépesei: a fekete-fehér vázképen (bal) futtatott részecske számlálás a körvonalak kijelzésével (jobb)

módszer között 5% alatt van), bár ebből az ábrából elsőre nem tűnik ki, de a továbbiakban ismertetett statisztikai elemzés bizonyította, hogy ezen különbségek statisztikailag nem szignifikánsak

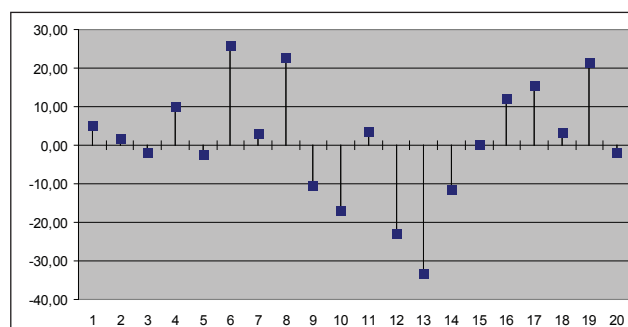
A statisztikai feldolgozásnál csupán a B és C csoportok eredményeit vettük figyelembe, mert ezen módszerek kizárólag ugyanazt a látóteret vették figyelembe, így a legalkalmasabbak az összehasonlításra.

A két módszerrel kapott értékek páronkénti eltérése (B csoport – C csoport) normál eloszlást mutatott (Shapiro-test: $p=0,3952$). A két mérésből származó értékek különbségének várható értéke nem különbözött szignifikánsan a 0-tól (one sample t-test: $p=0,884$). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a manuális és a digitális morfometriai módszerrel mért értékek között nincs statisztikailag szignifikáns különbség.

A különböző módszerekkel kapott értékeket vizsgálva megnéztük azokat a metszeteket, illetve digitális fényképeket, ahol nagy eltérés volt a 3 módszerrel mért értékek között. Nagy eltérésnek a 25%-nál nagyobb különbséget tekintettük. Ezek a lemezek a következők voltak: 6, 13 (1. táblázatban kiemelve félkövér betűkkel). Ezen lemezekről

készült digitális képeket elemezve látható volt, hogy nagyon kis kontraszt volt a pozitív és a negatív sejtmagok közt, amit továbbá rontott a képek igen sötét háttére. Ezen nem kívánt elváltozások a fényképek készítése során keletkeztek. A módszerek közti nagy eltérést valószínűleg ezen elváltozások okozták.

A teljesség kedvéért megnéztünk olyan metszetekről készült fényképeket, ahol minimális (2% alatt) eltérés volt a



5. ábra. A B és C csoportok értékei közötti különbségek, %-ban kifejezve. A kis négyzetek jelölik az értékeket, az ordinátán levő számok jelölik a lemezek számát.

1. táblázat. A pozitív sejtek számaránya a három módszernek megfelelően (%-ban kifejezve). Látható, hogy a hagyományos módszer esetén gyakran egy intervallum van megadva, kihangsúlyozva a módszer szubjektivitását.

Lemez	Hagyományos módszer (A)	Hagyományos számítógéppel (B)	Digitális morfometria (C)
1	25-50	57, 19	52, 14
2	>50	70, 25	68, 69
3	<25	48, 50	50, 42
4	>50	71, 08	61, 10
5	25-50	51, 83	54, 47
6	<5	59, 80	33, 93
7	>50	56, 11	53, 07
8	<25	32, 45	9, 79
9	>50	48, 55	59, 09
10	>50	54, 73	71, 64
11	25-50	35, 34	31, 83
12	>50	74, 74	97, 62
13	<25	34, 72	67, 95
14	>50	61, 16	72, 62
15	25-50	48, 95	48, 81
16	<25	48, 88	36, 73
17	25-50	52, 30	36, 62
18	<5	32, 13	28, 77
19	<25	47, 16	25, 80
20	<25	20, 85	22, 68

különböző módszerek által kapott értékek közt (2, 15 lemezek, **1. táblázatban** dőlt betűvel kiemelve). Ebben az esetben megfigyelhető volt a fényképek jó kontrasztja és világos háttere.

Megbeszélés

A p53 gén mutációja gyakran mutatható ki colorectalis carcinomában és összefüggést mutattak ki a betegség lefolyása és a mutációt szenvedett sejtek száma között [6, 7]. A mutációt hordozó daganatos sejtek százalékos arányának prognosztikai jelentősége van, ezért ezen arány pontos ismerete hozzásegít a betegek különböző kórjóslatú csoportokba való besorolásához. Bemutatott módszerünkkel egy olyan megoldás kifejlesztését céloztuk meg, amellyel lehetőség van adott tumormarkerekkel megjelölt daganatos sejtek pontos mennyiségének a meghatározására. Módszerünkben digitális morfometriát alkalmaztunk, amelyekhez hasonlókat már korábbi vizsgálatok során is alkalmaztak [3, 4, 5]. Módszerünk kidolgozásakor arra is törekedtünk, hogy minél kevesebb pontban legyen szükség a felhasználó beavatkozására a sejtek számlálása során, ugyanakkor minimálisra csökkentsük a lehetséges hibaforrásokat. A tesztek hitelessé tétele érdekében a számolt sejteket 2 hagyományos módszerrel is megszámláltuk és a kapott eredmények igazolták, hogy a digitális morfometriával kapott eredmények nem különböznek szignifikánsan a hagyományosan kapott eredményektől.

Következtetések

Vizsgálataink során és a kapott eredmények értékelése után az alábbi következtetéseket vontuk le.

Megfelelően készített és előkészített fényképek esetén a digitális morfometria *alkalmas* az immunohisztokémiai módszerrel kimutatott pozitív/negatív (p53, Ki67) sejtek számlálására, sőt ezen túlmenően, lényeges időmegtakarítás érhető el vele. *Nincs szignifikáns különbség* a manuális és a digitális morfometriai módszerekkel kapott eredmények között. Különös gondot kell fordítani a digitális képek *elkészítésére*, ugyanis a képek nem megfelelő minősége (gyenge kontraszt, sötét színárnyalatok) lényegesen befolyásolja a kapott eredményeket.

Fontosnak tartjuk továbbá a digitális morfometriai (és képfeldolgozási) módszerek elterjesztését és alkalmazását a patológiai gyakorlatban.

Irodalom

1. Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. - *Surfing the p53 network*, Nature 2000, 408: 307-10.
2. Hainaut P., Hollstein M. - *p53 and human cancer: the first ten thousand mutations*, Adv Cancer Res 2000, 77:82-13.
3. Kara S., Okandan M., Sener F., Yildirim M. - *Imaging system for visualization and numerical analysis of cancer at stomach and skin tissues*, J Med Syst 2005, 29(2): 179-85.
4. Leong F. J., Leong A. S. - *Digital imaging in pathology: theoretical and practical considerations, and applications*, Pathology 2005, 36(3): 234-41.
5. Yearsly K. H., Nadasdy T., Nadasdy G. - *Using computerized image analysis to quantify CD68 positive macrophage cell populations in biopsies taken from transplanted kidneys*, Media Cybernetics Application Note 2004.
6. Hilska M., Collan Y. U., O Laine V. J. et al. - *The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer*. Dis Colon Rectum. 2005 Dec;48(12):2197-208
7. Galizia G., Lieto E., Ferraraccio F. et al - *Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas*. Clin Cancer Res. 2004 May 15;10(10):3490-9
8. Allegra C. J., Paik S., Colangelo L. H. et al. - *Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study*. J Clin Oncol. 2003 Jan 15;21(2):241-50.
9. De Jong K. P., Stillema R., Karrenbeld A. et al. - *Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors*. Hepatology. 1998 Oct;28(4):971-9.
10. ***<http://rsb.info.nih.gov/ij>