



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56182 (13) C2

(51) 7 G01N33/48, A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЗЛОЯКІСНИХ ТА ДОБРОЯКІСНИХ ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У МОЛОЧНІЙ ЗАЛОЗІ

1

2

(21) 99031467

(22) 17 03 1999

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. №5, 2003 р.

(72) Ганіна Калерія Павлівна, Бородай Наталія Володимирівна, Петунін Юрій Іванович, Ключин Дмитрій Анатолієвич

(73) Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України

(56) JP A 10185911 140798

EP A1 0196673 08 10 86

Клиническая лабораторная диагностика - 1997, №10 - С 34-35

(57) Спосіб диференційної діагностики злоякісних та доброякісних проліферативних процесів в молочній залозі, який відрізняється тим, що в обстежуваного хворого беруть зскрібки букального

епітелію, досліджують сканограми інтерфазних ядер і за морфометричними, денситометричними та текстурними показниками вказаних ядер обчислюють міру близькості між сукупностями показників сканограм ядер епітеліоцитів хворого та сканограм ядер двох еталонів, одержаних від пацієнтів із злоякісними та доброякісними проліферативними процесами відповідно, та якщо міра близькості з одним із еталонів становить не менше 0,95, ставлять діагноз, відповідний еталону.

Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що застосовують ядра епітеліоцитів шипуватого прошарку букального епітелію.

Спосіб за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що в разі, якщо міра близькості становить менше 0,95, повторюють операції, описані в п. 1 або 2.

Винахід належить до медицини, а саме до онкології, і може бути використаний в лікувальних закладах для диференційної діагностики між раком і доброякісними проліферативними процесами в молочній залозі у жінок.

Для диференційної діагностики раку молочної залози в клінічній практиці в нашій країні, країнах СНД та Західної Європи використовують такі дослідження: клінічне обстеження, мамографія, ультразвукове дослідження, тонкогільчаста аспіраційна біопсія. Але кожний з цих методів має цілий ряд недоліків. Так, результати клінічного обстеження залежать від розмірів пухлини та її гістологічного типу, діагностичні помилки при мамографії і ультразвукових дослідженнях значною мірою залежать від віку пацієнта, кваліфікації лікаря, типу та розмірів пухлини, а іноді і від самої технології. Метод аспіраційної біопсії теж має ряд недоліків, головним з яких є ризик розповсюдження пухлинних клітин по каналу, де проходила голка, та неможливість багаторазових повторень цього аналізу.

Останнім часом в онкології знайшов широке застосування метод комп'ютерної мікротелефотометрії (Г.Г. Автандилов, Л.В. Червоная,

Е.П. Симакина. Компьютерное микротелефотометрическое исследование дисплазий и аденокарциномы толстой кишки у больных хроническим неспецифическим колитом // Клиническая лабораторная диагностика -1997 -№10 -С 34-35), який використовують при розв'язуванні диференційно-діагностичних задач в патології, діагностичній патологічній анатомії і цитології. Він заснований на поєднанні морфометричних і денситометричних способів аналізу гістологічних зрізів пухлин. Зрізи завтовшки 5мм після депарфінації офарбовують по Фельгену, а потім в автоматичному режимі на аналізаторі отримують дані про периметри, найбільші діаметри, площі, два фактори форми (еліпс/круг та периметр/площа), яскравість і оптичну щільність ядер клітин - лімфоцитів стромы, епітеліальних і ракових клітин. В рамках цього методу показано, що найбільшою діагностичною цінністю відрізняються параметри, які характеризують площу і форму ядер та їх оптичну щільність. Установлена залежність ступеню дисплазії та ступеню малигнізації від зміни цих показників. Недолік цього методу полягає в тому, що в ньому не використовують тексту-

(13) C2

(11) 56182

(19) UA

рні показники, які є найбільш інформативними показниками при диференційній діагностиці між раком і доброякісними проліферативними процесами.

Указаного недоліку позбавлений відомий метод автоматизованої діагностики і класифікації раку молочної залози на основі аналізу імпульсів текстури хроматину, запропонований дослідниками Антверпенського університету, Бельгія (B Weyn, G Wouwer, A Daele, P Scheunders, D Dirk, E Marck, W Jacob. Automated breast tumor diagnosis and grading based on wavelet chromatin texture description // Cytometry - 1998 -33 - PP 32-40), який ми обрали прототипом. Метод ґрунтується на застосуванні способу обробки зображень ядер клітин із використанням перетворень зображень за допомогою високо- та низькочастотних фільтрів і вимірювання енергії імпульсів (wavelet), що характеризують текстуру зображень поряд із традиційними показниками суміжності, морфологічними та денситометричними показниками. У цьому способі показники імпульсу використані для багатомасштабного аналізу зображень з метою виділення параметрів для опису текстури хроматина при цитологічній діагностиці і класифікації інвазивного раку молочної залози, їх значення оцінювали шляхом порівняння характеристик суміжності, денситометричних і морфометричних параметрів в автоматизованій схемі класифікації К-найближчого сусіди (Knn), заснованої на світлових мікроскопічних зображеннях ізольованого ядра тканини, укладеної в парафін. Це дозволило провести багатобічне цитологічне ретроспективне дослідження, практичне значення якого дуже високе. Результати свідчать, що показники імпульсу дають рівень розпізнавання, що є близьким до рівня, характерного для денситометричних параметрів і ознак суміжності. Більш того, оскільки імпульс показав високу додаткову цінність в комплексі з іншими текстурними групами, набір показників дозволив здійснити дуже обґрунтований опис з більш високим рівнем розпізнавання, ніж раніше (76% для індивідуальних ядер, 100% для популяцій ядер, узятих в одного пацієнта). Морфометричні показники працюють прше і тільки трохи збільшують точність класифікації. Похибки сегментації зображення, що потребують контролю від оператора, та існування невеликої кількості помилково-негативних діагнозів обмежують практичне використання цього способу.

Отже, спосіб-прототип, як і інші відомі способи діагностики раку, є інвазивним і не достатньо точним.

Задача запропонованого винаходу полягає в створенні неінвазивного способу комп'ютерної диференційної діагностики між раком і доброякісними проліферативними процесами в молочної залози. Задача вирішується дослідженням ядер клітин букального епітелію і застосуванням для диференційної діагностики спеціальних алгоритмів геометричної та статистичної теорії розпізнавання образів, обчислюючи міру близькості між конкретними даними хворого і навчаючими вибірками.

Суть винаходу полягає в диференційній діагностиці між раком та доброякісними проліферативними процесами в молочної залози за допомогою

цитоспектрофотометричного аналізу ДНК на основі комплексу морфометричних, денситометричних і текстурних показників інтерфазних ядер клітин букального епітелію із застосуванням спеціальних алгоритмів геометричної та статистичної теорії розпізнавання образів та обчислення міри близькості між конкретними даними хворого і навчаючими вибірками.

У хворих із шиповатого про шарку сплизували оболонки порожнини рота робили зшкребки, мазки висушували при кімнатній температурі і фіксували протягом 30хв у суміші Нікіфорова. На мазках проводили реакцію Фельгена, застосовуючи холодний гідроліз у 5 н НСІ протягом 15хв при 21-22°C.

Оптичну щільність ядер реєстрували на цитоспектрофотометрі МЦФУ-2МТ (ЛОМО, Росія) методом сканування при довжині хвилі 575нм, діаметрі зонду 0,05мм і кроці сканування 0,5мм. У кожному препараті досліджували 20 ядер. Вміст ДНК-фуксина в ядрах, виражене в умовних одиницях, визначали як добуток середньої оптичної щільності на площу ядра. Сканограма (цифровий портрет клітини) являє собою матрицю

$$R = r_{ij}^{j=1,n}_{i=1,m}, \text{ де } r_{ij} - \text{значення поточної оптичної}$$

щільності хроматина інтер фазного ядра клітини, виражене в умовних одиницях,  $n, m$  - кількість точок сканограм по вертикалі і горизонталі відповідно,  $i, j$  - номери рядка і стовпчика матриці  $R$  відповідно.

Для кожної сканограми використовують морфо- і денситометричні показники, що характеризують структурні і текстурні особливості хроматину: площа ядра, площа конденсованого хроматину, площа деконденсованого хроматину, площа сильно деконденсованого хроматину, питома площа конденсованого хроматину, питома площа деконденсованого хроматину, інтегральна оптична щільність, середня оптична щільність, усереднена сума перепадів, загальний показник кластерності, дисперсійний коефіцієнт, показник варіації перепадів, показник рельєфності, текстурний коефіцієнт, коефіцієнт взаєморозташування. Отримані сканограми ядер клітин далі піддають статистичному аналізу за допомогою міри близькості. Остання характеризує схожість двох генеральних сукупностей на підставі двох вибірок, отриманих із цих генеральних сукупностей (одна вибірка береться з першої генеральної сукупності, а інша - із другої).

З метою забезпечення точності досліджень побудовано критерій, що складається з квадратичного і порядкового критеріїв.

1. Формують дві пари навчаючих вибірок  $A$  і  $B$  з однаковими обсягами і обсягом  $A$ , удвічі меншим, ніж обсяг  $B$ . Першу пару використовують для побудови  $A$ -фільтра, а другу -  $B$ -фільтра. Навчальну вибірку  $A$  складають з показників від пацієнтів із злоякісними новоутвореннями, а вибірку  $B$  - із показників від пацієнтів із доброякісними процесами. Сканограма "проходить через фільтр", якщо її показники задовольняють нерівностям, що відповідають цьому фільтру. 2. Проводять процес фільтрації сканограм обстежуваного пацієнта через  $A$ -фільтр і  $B$ -фільтр. Висновок приймають в тому випадку, коли один із критеріїв (квадратичний або

порядковий) підтверджує його, а другий йому не суперечить, у протилежному випадку не приймають ніякого рішення (непевна відповідь, або неприйняття рішення)

Запропонований комп'ютерний спосіб застосовували для диференційної діагностики між раком молочної залози і фіброаденоматозом у 103 пацієнтів з верифікованими діагнозами. Після першого аналізу інтерфазних ядер епітеліоцитів шиповатого прошарку букального епітелію у пацієнтів із раком молочної залози діагноз підтвердився в 94% випадків, помилковий діагноз був поставлений у 6% випадків, неприйняття рішення не виникало. Неприйняття рішення - це ситуація, при якій квадратичний і порядковий критерії дають суперечливі діагнози. Для пацієнтів із фіброаденомато-

зом можливість помилкового діагнозу склала 0%, діагноз підтвердився в 57% випадків, а неприйняття рішення виникло в 43% випадків. Неприйняття рішення можна цілком виключити за допомогою аналізу додаткової серії зшкребків букального епітелію обстежуваного пацієнта. При цьому можливість помилкового діагнозу незначно збільшується, а відсоток правильних діагнозів досягає 91%.

При наявності цитоспектрофотометра, або іншої відповідної апаратури, запропонований винахід дає можливість з великою точністю здійснювати диференційну діагностику між раком молочної залози і фіброаденоматозом, а також скринінг. При цьому використовуються недорогі вітчизняні реактиви, а процес діагностування не займає багато часу.