

ISSN 2225-6016

# ВЕСТНИК

*Смоленской государственной  
медицинской академии*

*Том 19, №2*

2020



УДК 616-091.0

14.01.12 Онкология

DOI: 10.37903/vsgma.2020:2.15

**ЦИФРОВОЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНА И ПРОГЕСТЕРОНА (ER, PR) В ИНВАЗИВНЫХ КАРЦИНОМАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ЦЕЛЫХ СРЕЗАХ****© Кушнарев В.А.<sup>1</sup>, Смирнова В.О.<sup>1</sup>, Чирский В.С.<sup>2</sup>, Тимофеев И.В.<sup>2</sup>, Артемьева А.С.<sup>1</sup>, Кудайбергенова А.Г.<sup>1</sup>, Криворотко П.В.<sup>1</sup>, Семиглазова Т.Ю.<sup>1</sup>, Семиглазов В.Ф.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный,

ул. Ленинградская, 68

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, 194044, Санкт-Петербург,

ул. Академика Лебедева, 6

*Резюме***Цель.** Изучение алгоритма цифрового анализа изображений для оценки рецепторов эстрогенов и прогестеронов на отсканированных целых срезах карцином молочной железы.**Методика.** С помощью сканера гистологических препаратов Panoramic III выполнены электронные копии иммуногистохимических микропрепаратов рецепторов эстрогенов и прогестеронов от 116 случаев инвазивных неспецифицированных карцином молочной железы, G2-G3, HER2 отрицательных, pT1-2N0-1a. Полученные цифровые изображения были загружены в свободно распространяемую программу Qupath. С помощью модуля Pixel Classifier был создан алгоритм автоматического обнаружения опухолевых клеток и подсчета с помощью инструмента Cell Positive Detection. Полученные данные сравнивались с данными визуального ретроспективного анализа.**Результаты.** Высокий уровень согласия между визуальным и цифровым методом анализа наблюдался для рецепторов эстрогенов (ICC 0,82) и прогестеронов (ICC 0,72) выше уровня 40% позитивно окрашенных опухолевых клеток. В 19% случаев (22/116), была отмечена низкая воспроизводимость для рецепторов эстрогенов (ICC 0,59), прогестеронов (ICC 0,38) с границей ниже 40% позитивно окрашенных опухолевых клеток по результатам визуальной оценки.**Заключение.** Анализ экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестеронов карцином молочной железы рекомендуется проводить с применением цифрового анализа изображений при визуальной оценке ниже 40% позитивно окрашенных опухолевых клеток, как метод повышения воспроизводимости оценки между лабораториями.**Ключевые слова:** цифровой анализ изображений, карцинома, молочная железа, рецепторы эстрогена, рецепторы прогестерона**DIGITAL AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE EXPRESSION OF ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS (ER, PR) FOR INVASIVE BREAST CARCINOMAS IN WHOLE SECTIONS****Kushnarev V.A.<sup>1</sup>, Smirnova V.O.<sup>1</sup>, Chirsky V.S.<sup>2</sup>, Timofeev I.V.<sup>2</sup>, Artemyeva A.S.<sup>1</sup>, Kudaibergenova A.G.<sup>1</sup>, Krivorotko P.V.<sup>1</sup>, Semiglazova T.Yu.<sup>1</sup>, Semiglazov V.F.<sup>1</sup>**<sup>1</sup>National Medical Research Center of Oncology na N.N. Petrov, 68, Leningradskaya St., 197758, Pesochny vil.,

St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Military Medical Academy named after S.M. Kirova, 6, Academic Lebedev St., 194044, St. Petersburg, Russia*Резюме***Objective.** We explore digital image analysis algorithms for evaluating estrogen and progesterone receptors on scanned whole sections of breast carcinomas.**Methods.** Immunohistochemical slides of estrogen and progesterone receptors from 116 cases of invasive non-specific breast carcinomas, G2-G3, HER2 negative, pT1-2N0-1a, were scanned on a Panoramic III histological scanner and the digital images obtained were downloaded to the free software Qupath. Using the Pixel Classifier module, an algorithm for automatic detection of tumor cells was created. Positive cell

detection tool was used for counting tumor cells. The data obtained were compared with the data of visual retrospective analysis.

**Results.** A high level of agreement between visual and digital analysis was observed for estrogen receptors (ICC 0,82) and progesterone receptors (ICC 0,72) above 40% of positively stained tumor cells. In 19% of cases (22/116), low reproducibility was noted for estrogen receptors (ICC 0,59), progesterone receptors (ICC 0,38), with a border below 40% of positively stained tumor cells according to the results of visual assessment.

**Conclusion.** Detection of the expression of estrogen and progesterone receptor in breast carcinomas is recommended using digital image analysis with a visual assessment below 40% of positively stained tumor cells as a more reproducible method between laboratories.

*Keywords:* digital image analysis, carcinoma, mammary gland, estrogen receptors, progesterone receptors

## Введение

Иммуногистохимический анализ, включающий в себя определение статуса экспрессии рецепторов стероидных гормонов, в частности эстрогена (ER), прогестерона (PR) должен проводиться для всех случаев инвазивной карциномы молочной железы. Этот тест обеспечивает прогностическую и предиктивную информацию, являясь наиболее важным биологическим маркером терапевтического ответа на эндокринную терапию.

Основными методами интерпретации количественных результатов в оценке рецепторов эстрогена и прогестерона служат три основных метода учета экспрессии ядерных маркеров. H-score, позволяющий оценивать интенсивность окрашивания клеток с учетом их процентного количества в препарате, A-score (Allred) – отражает суммарно процент окрашенных клеток в рамках 6 выделенных групп, и доля позитивно окрашенных опухолевых клеток (ПОК) – оценивает долю клеток с окрашиванием, вне зависимости от степени интенсивности. Для каждой шкалы разработаны пороги для определения позитивных и негативных ER/PR рецепторов в опухолевой ткани, на основании которой принимается решение о назначении гормональной терапии. Таким образом, более 1% ПОК рассматривается как позитивная экспрессия стероидных гормонов, а менее 1% – негативная [5]. Руководство ASCO/CAP рекомендует оценивать результат экспрессии ER/PR негативным по системе A-score, если общее число баллов 2 и менее (табл. 1).

Таблица 1. A-score для оценки экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона (ER, PR)

Балл по % позитивно окрашенных опухолевых клеток	% позитивно окрашенных опухолевых клеток	Интенсивность окрашивания	Балл по интенсивности окрашивания
0	0	Окраски нет	0
1	<1	Слабая	1
2	1-10	Промежуточная	2
3	11-33	Сильная	3
4	34-66		
5	≥67		

Кроме того, данные по оценке рецепторов стероидных гормонов входят в состав суррогатной молекулярной классификации инвазивных карцином молочной железы совместно с индексом пролиферативной активности Ki67, формируя прогностические группы [11]. Оценка иммуногистохимических маркеров ER/PR патологом является вариабельной и требует стандартизации для повышения межисследовательской и межлабораторной воспроизводимости [8, 10].

Метод цифрового анализа изображений позволяет улучшить воспроизводимость и точность оценки иммуногистохимических маркеров. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) [5] рекомендуют оценивать экспрессию ядерных маркеров в процентах ПОК с помощью программного обеспечения. Существуют как коммерческие программные продукты для анализа изображений, так и свободно распространяемые [2]. Для исследования воспроизводимости оценки экспрессии стероидных гормонов (ER/PR) было выбрано свободно распространяемое программное обеспечение QuPath. В работе изучена воспроизводимость оценки процента позитивно окрашенных ядер опухолевых клеток карцином

молочной железы между программным обеспечением и визуальным методом оценки экспрессии ER/PR.

### Методика

Для исследования отобраны микропрепараты 116 случаев инвазивных неспецифицированных карцином молочной железы, средней и высокой степени гистологической злокачественности (G2-G3), с негативной HER2 – экспрессией, разных патоморфологических стадий (pT1-2N0-1a). Материал был ретроспективно проанализирован экспертом патоморфологом по всем параметрам, оценка ядерной экспрессии рецепторов ER, PR в процентах позитивно окрашенных клеток визуальным методом по системе A-score в светлом поле. Для автоматического подсчета позитивно окрашенных клеток были выполнены электронные копии (сканы) микропрепаратов с помощью сканера гистологических препаратов Panogamic 250 компании 3D Histech. Полученные сканы проанализированы программным обеспечением для цифрового анализа изображений QuPath (сборка milestone 4) с применением нейросетевого алгоритма Pixel Classifier при помощи модуля расчета Positive cell detection (PCD) для ER/PR в зонах опухоли на всей площади отсканированного изображения (рис.).

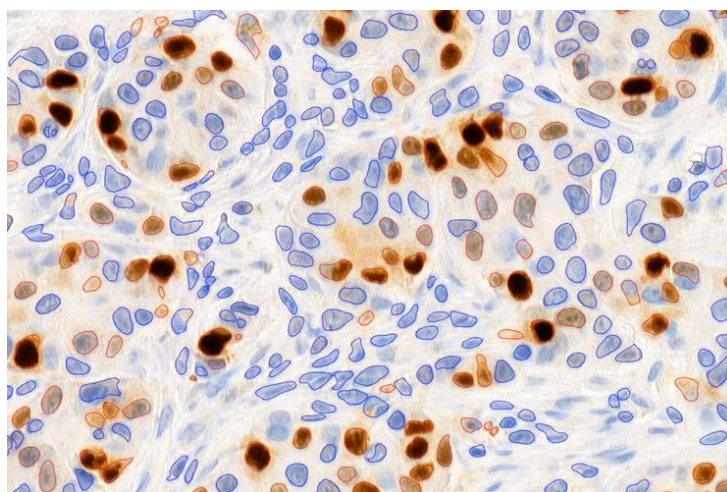


Рис. Электронная копия микропрепарата рака молочной железы, иммуногистохимическая окраска с ER (рецепторы эстрогена),  $\times 300$ . Контуры ядер позитивно окрашенных клеток очерчены красным цветом, ядра, где отсутствует окрашивание – синим цветом

Патоморфолог ввел в нейросетевой алгоритм аннотации для обучения: «опухоль», «строма» и «артефакт». Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения R studio, с применением Wilcoxon signed rank test, корреляции Spearman и внутриклассового коэффициента корреляции (ICC).

Цель исследования – изучение алгоритма цифрового анализа изображений для оценки рецепторов эстрогенов и прогестеронов на отсканированных целых срезах карцином молочной железы.

### Результаты исследования

Анализ данных воспроизводимости по всей выборке для модуля PCD и визуальной оценки патоморфолога показал отсутствие различий, ER ( $p=0,5$ ), PR ( $p=0,2$ ). Мы сравнили ICC PCD/патоморфолог – 0,81 CI 95%, [0,71; 0,9] для ER, для PR – 0,74 CI 95%, [0,65; 0,79]. Коэффициент корреляции Spearman PCD / патоморфолог 0,89,  $p < 0,001$  для ER, 0,77,  $p < 0,001$  для PR (табл. 2).

Таблица 2. Оценка экспрессии рецепторов эстрогенов/прогестерона (ER/PR)

Параметр анализа	ER: PCD/Патоморфолог	PR: PCD/Патоморфолог
Внутриклассовый коэффициент корреляции (ICC)	0,81	0,74
r, Spearman	0,89	0,77

Однако, при подгрупповом анализе существует группа с низкой воспроизводимостью как для ER, так и для PR (табл. 3). Значения ПОК ниже 40% имеют низкий коэффициент ICC между ретроспективной оценкой патоморфолога и цифровым анализом изображений. Для ER ICC - 0,59 CI 95%, [0,48; 0,64], для PR – 0,38 CI 95%, [0,34; 0,45]. Коэффициент корреляции Spearman для PCD / патоморфолог 0,56,  $p < 0,001$  для ER, PR – 0,46,  $p < 0,001$ .

Таблица 3. Оценка экспрессии рецепторов ER/PR до 40% позитивно окрашенных клеток

Параметр анализа	ER: PCD/Патоморфолог	PR: PCD/Патоморфолог
ICC	0,59	0,38
r, Spearman	0,56	0,46

Значения выше 40% позитивно окрашенных опухолевых клеток показали высокий уровень воспроизводимости для ER и PR (табл. 4).

Таблица 4. Оценка экспрессии рецепторов ER/PR выше 40% позитивно окрашенных клеток

Параметр анализа	ER: PCD/Патоморфолог	PR: PCD/Патоморфолог
ICC	0,82	0,72
r, Spearman	0,88	0,76

Из 116 проанализированных микропрепаратов карцином молочной железы 19% (22/116) имели значение ER/PR ниже 40%, причем более низкие значения ПОК были в группе рецепторов прогестерона. Процент ложно позитивных карцином по данным визуального анализа составил 4% по ER и 11% по PR. Кроме того, значения ICC и коэффициента корреляции Spearman существенно ниже для группы рецепторов прогестерона.

## Обсуждение результатов исследования

Позитивный статус экспрессии рецепторов ER/PR в опухоли имеет прямую корреляцию с ответом на гормональную терапию. Стандартизированное определение процента позитивно окрашенных клеток в гистологическом препарате во всех лабораториях необходимо для точного выделения групп прогноза и ответа на терапию, так как высокий процент экспрессии рецепторов ER и PR связан с лучшим ответом на гормональную терапию [3]. Известно, что визуальная оценка экспрессии рецепторов ER и PR в процентах окрашенных опухолевых клеток и их интенсивности переменна, что отражается в низкой межисследовательской и внутри исследовательской воспроизводимости. В обзорной статье Noordhoek [7] сделан акцент, что корреляция между исходом и уровнем экспрессии ER/PR выше при количественной оценке, но существует высокая межисследовательская переменность этой оценки. Кроме того, необходимо учитывать, что в некоторых клинических ситуациях граница для назначения неадекватной эндокринной терапии может быть выше, чем при адекватной терапии [12].

Интервал количественной экспрессии иммуногистохимических маркеров в пределах которой статистические методы показывают неудовлетворительные параметры воспроизводимости между патологами или методами анализа определяется понятием серой зоны. Клиническое значение этой зоны остается неясным с точки зрения выбора тактики терапии и прогноза. Интересно, что при использовании шкалы Allred промежуточные значения экспрессии ER и PR в 1% или менее позитивных опухолевых клеток и интенсивностью окраски 2 или 3 балла будут иметь общий балл 3 или 4, что будет рассматриваться как позитивный результат. Некоторые исследователи [7] выделяют границы экспрессии для ER/PR до 10% позитивно окрашенных клеток как негативные, а выше 10% как позитивные.

Ряд исследований показал, что количественная экспрессия внутри серой зоны ER/PR имеет прогностическое и предиктивное значение. Так Raglav [9] установил, уровень экспрессии ER/PR от 1 до 5% не имеет разницы в общей и безрецидивной выживаемости, а роль эндокринной терапии для этой группы требует исследований. Группа карцином молочной железы с уровнем экспрессии ER/PR выше 5% более благоприятна с точки зрения выживаемости. Публикация Arima [1] показала, что экспрессия рецепторов прогестеронов меньше 20% рассматривается как

неблагоприятный прогностический маркер, и данная группа пациентов может получить преимущество от химиотерапии.

Внедрение количественной оценки, вместо традиционной принятой полуколичественной системы оценки в баллах (Allred) является критическим этапом в применении метода. Nassar [6] показала на выборке из 260 карцином молочной железы возможность применения алгоритмов цифрового анализа изображений в оценке экспрессии ER/PR. Однако, площадь анализа была ограничена аннотациями, которые размечал патоморфолог. Нейросетевой анализ с вовлечением скана полного среза микропрепарата является альтернативой, которая повышает воспроизводимость количественной оценки экспрессии ER/PR между лабораториями, а также молекулярно-генетическими панелями, такими как Oncotype DX и MammaPrint [4]. В настоящее время возникает ситуация, когда оценка серой зоны экспрессии суррогатных иммуногистохимических биомаркеров ER/PR/HER2/Ki67, используемых для карцином молочной железы через применение алгоритмов цифрового анализа изображений становится обязательной. Это связано с низкой воспроизводимостью данных биомаркеров между лабораториями.

## Заключение

Несмотря на высокий уровень воспроизводимости между визуальным и цифровым анализом изображений при оценке экспрессии ER/PR обнаружено, что в 19% случаев (22/116), была низкая воспроизводимость в подгруппе с уровнем экспрессии ER/PR до 40% по результатам визуальной оценки. Применение цифрового анализа экспрессии ER/PR в данной группе карцином эффективный способ повышения точности и воспроизводимости оценки уровня экспрессии.

Использование цифрового анализа изображений в группе карцином с экспрессией ER/PR выше 40% сравнимо с визуальной оценкой. Клиническое значение серой зоны экспрессии ER/PR должно быть валидировано в клинических исследованиях.

## Литература (references)

1. Arima N., Nishimura R., Osako T. Ki-67 index value and progesterone receptor status can predict prognosis and suitable treatment in node-negative breast cancer patients with estrogen receptor-positive and HER2-negative tumors // *Oncology Letters*. – 2019. – N17(1). – P. 616-622.
2. Colomer R., Aranda-López I., Albanell J. Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology // *Clinical and Translational Oncology*. 2018. – N20(7). – P. 815-826.
3. Cruz-Roa A., Gilmore H., Basavanthally A. High-throughput adaptive sampling for whole-slide histopathology image analysis (HASHI) via convolutional neural networks: Application to invasive breast cancer detection // *PLoS One*. – 2018. – N13(5). – P. 1-23.
4. Dodson A, Parry S, Ibrahim M, et al. Breast cancer biomarkers in clinical testing: analysis of a UK national external quality assessment scheme for immunocytochemistry and in situ hybridisation database containing results from 199 300 patients // *The Journal of Pathology Clinical Research*. – 2018. – N4(4). – P. 262-273.
5. Hammond MEH., Hayes D.F., Dowsett M. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – N28(16). – P. 2784-2795.
6. Nassar A., Cohen C., Agersborg S.S. A New Immunohistochemical ER/PR Image Analysis System: A Multisite Performance Study // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2011. – N19(3). – P.195-202.
7. Noordhoek, I., de Groot, A.F., Cohen D. Higher ER load is not associated with better outcome in stage 1-3 breast cancer: a descriptive overview of quantitative HR analysis in operable breast cancer // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2019. – N176. – P. 27-36.
8. Penault-Llorca F., Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update // *Pathology*. – 2017. – N49(2). – P. 166-171.
9. Raghav KPS., Hernandez-Aya L.F., Lei X. Impact of low estrogen/progesterone receptor expression on survival outcomes in breast cancers previously classified as triple negative breast cancers // *Cancer*. – 2012. – N118(6). – P. 1498-1506.
10. Reisenbichler E.S., Lester S.C., Richardson A.L. Interobserver concordance in implementing the 2010 ASCO/CAP recommendations for reporting er in breast carcinomas: A demonstration of the difficulties of

- consistently reporting low levels of er expression by manual quantification // American Journal of Clinical Pathology. – 2013. – N140(4). – P. 487-494.
11. Stålhammar G., Fuentes Martinez N., Lippert M. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer // Modern Pathology. – 2016. – N29(4). – P. 318-329.
12. Stein R., Dunn J., Bartlett J., Campbell A. OPTIMA prelim: a randomised feasibility study of personalised care in the treatment of women with early breast cancer // Health Technology Assessment. – 2016. – N20(10). – P. 1-202.

### **Информация об авторах**

*Кушнарёв Владимир Андреевич* – врач-патологоанатом, аспирант НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России, E-mail: kushnarevvladimir1@gmail.com

*Смирнова Виктория Олеговна* – врач-патологоанатом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. E-mail: bashlyk\_viktoriya@mail.ru

*Чирский Вадим Семенович* – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (ВМедА). E-mail: v\_chirsky@mail.ru

*Тимофеев Игорь Владимирович* – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова (ВМедА). E-mail: igortimofeev58@gmail.ru

*Артемяева Анна Сергеевна* – кандидат медицинских наук, заведующий научной лабораторией морфологии опухолей «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. E-mail: oinochoya@gmail.com

*Кудайбергенова Асель Галимовна* – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научной лаборатории морфологии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. E-mail: asel1972@mail.ru

*Криворотко Петр Владимирович* – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник научного отделения опухолей молочной железы НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. E-mail: dr.krivorotko@mail.ru

*Семиглазова Татьяна Юрьевна* – доктор медицинских наук заведующий отделом, ведущий научный сотрудник научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. E-mail: tsemiglazova@mail.ru

*Семиглазов Владимир Федорович* – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий научным отделом опухолей репродуктивной системы НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. E-mail: ssemiglazov@mail.ru