

مطالعه فراکتالی بر روی حاشیه هسته سلول‌های سرطانی در سیتولوژی ادرار

دکتر بهروز ایلخانی‌زاده^۱، دکتر شهرام شهابی^۲، دکتر غلامرضا بهجتی^۳، دکتر فرحناز نوروزی‌نیا^۴، دکتر حمیدرضا فرخ اسلاملو^۵، دکتر زهیر محمدحسن^۶

تاریخ دریافت ۸۷/۰۳/۸، تاریخ پذیرش ۸۷/۱۲/۱۴

چکیده

پیش زمینه و هدف: سرطان مشکل جدی جوامع بشری است و در این مورد نیز تشخیص زودرس اهمیت خاص خود را دارد. اندازه گیری بُعد فراکتالی حاشیه هسته سلول‌های سرطانی می‌تواند در روش‌های خودکار تشخیص سرطان بکار رود.

مواد و روش کار: ۴۱ مورد سیتولوژی مثبت و ۳۳ مورد منفی بصورت تصادفی انتخاب شدند. تصاویر دیجیتالی با استفاده از عدسی شیئی 100X میکروسکوپ نوری و هد ویدیویی دیجیتال تهیه شد. پس از آماده سازی تصاویر هسته سلول‌ها (Preprocessing)، اندازه گیری ابعاد فراکتالی حاشیه آن‌ها توسط نرم افزار انجام شد.

یافته‌ها: میانگین بُعد فراکتالی حاشیه هسته سلول‌های اپی تلبالی در سیتولوژی ادرار، در موارد مثبت (سرطانی) و منفی (سالم)، دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود. انتخاب Cut off point مناسب ($1/732 \pm 0/06$) در این مطالعه، قادر است سلول‌های اپی تلبالی بدخیم و سالم را از هم تفکیک کند.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس معیارهای صحت تشخیصی (حساسیت و اختصاصیت) و پیش بینی احتمال بیماری (ارزش پیش بینی کنندگی مثبت و منفی برای پاسخ‌های آزمون) و ارزش‌های درست‌نمایی مثبت و منفی برای نتایج تست، استفاده از اندازه گیری بُعد فراکتالی حاشیه هسته سلول‌های سرطانی در گسترش رسوب ادراری، می‌تواند به‌عنوان یک Feature Extraction، در حوزه خودکار سازی تشخیص سرطان و طراحی دستگاه غربالگر، بکار رود.

کلید واژه‌ها: خودکار سازی تشخیص سرطان، ماشین‌های غربالگر تشخیص سرطان، بُعد فراکتالی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیستم، شماره دوم، ص ۱۱۰-۱۰۴، تابستان ۱۳۸۸

آدرس مکاتبه: ارومیه، بلوار ارشاد، بیمارستان امام خمینی، بخش پاتولوژی، تلفن: ۴-۳۴۶۹۹۳۱-۴۴۱، تلفن همراه: ۰۹۱۴۳۴۱۹۱۹۴

Email: ilkhanib@gmail.com

مقدمه

قضاوت عینی (objective) با استفاده از مقادیر کمی می‌باشند، اطلاق می‌شود (۱).

به‌طور کلی برای خودکار سازی تشخیص سرطان از تصاویر هیستوپاتولوژیک و یا سیتولوژیک استفاده می‌شود. سه مرحله مهم در این روند قابل ذکر است (نمودار ۱).

شیوع سرطان در سطح جهان و کشور ما به نحوی است که از هر دو نفر مرد و از هر سه نفر زن یک نفر آن‌ها در نقطه‌ای از طول عمر خود، به سرطان مبتلا می‌شوند. خودکار سازی تشخیص سرطان، به ابزارهای تشخیص کامپیوتری که قادر به

^۱ دانشیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ استادیار ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۳ دستیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۴ استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۵ استادیار بهداشت مادر و کودک، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۶ استاد ایمونولوژی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

فرآیند جایگزینی ابزار غربالگر به جای انسان غربالگر، وجود دارد (۴).

هدف از این مطالعه، امکان سنجی و تعیین معیاری کاربردی، و قابل استفاده توسط نرم‌افزار، برای غربالگری سرطان دستگاه ادراری، با روش‌های کمی و عینی ریاضی، در گسترش‌های رسوب ادراری است.

استفاده از تعیین بُعد فراکتالی هسته می‌تواند در تفکیک سلول‌های اپی‌تلیال بدخیم در سیتولوژی ادرار، به نحوی معتبر (Valid) و قابل تکرار (Reproducible) و با ارزش درست نمایی بالا بکار رود.

بعد فراکتالی، طبق تعریف یک شکل هندسی است که می‌توان آن را به دفعات متعدد (و به لحاظ تئوریک نامحدود) به قسمت‌هایی تقسیم کرد که هر کدام از آن‌ها عبارت از یک نسخه کوچک شده، از شکل اولیه هستند.

یک شکل فراکتالی، یک شیء هندسی است که واجد خصوصیات زیر است (شکل ۱).

خودسان (Self-similar) است و از آنجایی که این اشکال در تمام بزرگ‌نمائی‌ها، به یکدیگر شبیه‌اند، به‌طور تئوریک، آن‌ها بی‌نهایت پیچیده تلقی می‌شوند (شکل ۲).

الف - فرآیند آماده سازی اولیه

ب - استخراج خاصیت مورد نظر

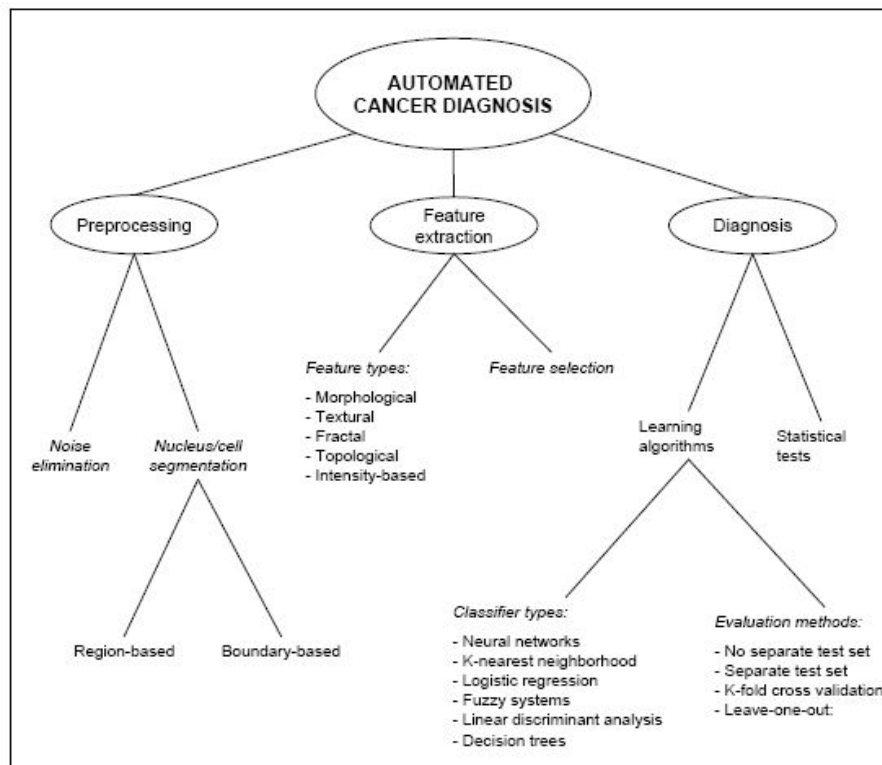
ج - تفکیک بین ساختمان‌های نرمال از بدخیم

در روش‌های مرسوم تشخیص سرطان، قضاوت تشخیصی براساس یافته‌های هیستولوژیک مشخص می‌گردد. که مستلزم بیوپسی است. در مقایسه، بررسی‌های سیتولوژیک، از سهولت بیشتر و هزینه کمتری برخوردارند، که از جمله، می‌توان به سیتولوژی ادرار اشاره کرد (۲).

با پیشرفت‌هایی که در عرصه رایانه، نرم افزارها، الکترونیک و به‌طور کلی مهندسی پزشکی صورت گرفته است، استفاده از ماشین‌های غربالگر، همانند آنچه که در سیستم‌های غربالگر پاپ اسمیر (papnet) یا دستگاه‌های هماتولوژی، مورد استفاده است، در حال گسترش می‌باشد.

یافتن معیارهای تشخیصی سیتولوژیک، قابل استفاده توسط نرم‌افزار نیازمند بررسی است تا معیارهای کیفی و حداکثر نیمه کمی هیستوپاتولوژیک و سیتولوژیک را تبدیل به قضاوت ریاضی‌وار کمی کند (۳).

کارهای پژوهشی برای دستیابی به نرم افزارهای غربالگر سرطان انجام شده است که حاکی از چالش‌های مهمی است که در



Overview of the computational steps in automated cancer diagnosis

نمودار (۱): نمای کلی مراحل رایانه‌ای خودکارسازی تشخیص سرطان

به لحاظ Grade نیز، یک مورد Grade I، ۱۲ مورد Grade II-III و یک مورد Grade IV برطبق سیستم Ash و ۱۸ مورد Grade II، ۸ مورد Grade III بر طبق سیستم ISUP/WHO بودند.

از بین ۲۰۰ مورد گزارش سیتولوژی منفی، ۳۳ مورد، به صورت تصادفی انتخاب شدند.

این لامها با روش پاپانیکولا رنگ آمیزی شده بودند. از لامهای هر بیمار با میکروسکوپ نوری (Olympus-B-H-2) و با عدسی شیئی 100X، تعداد پنج سلول اپی تلیال به تصادف انتخاب و توسط دوربین دیجیتال (مدل BMZ-04-DZ محصول شرکت مهندسی Behinco ایران)، تصویربرداری شد (شکل ۳).

تصاویر دیجیتالی هر سلول در محیط فتوشاپ هفت، به صورت یکنواخت و سیاه رنگ (شکل ۳) درآمده و به این ترتیب آماده‌اند تا در مرحله بعدی جهت تعیین ضریب فراکتالی وارد نرم‌افزار Benoit 1.3 (Tru Soft International inc. USA) شوند.

در این مرحله فایل‌های به دست آمده $[5 \times (33+41)]$ که هر پنج فایل آن مربوط به یک بیمار بود، رمزگذاری^۴ شد و جهت اندازه‌گیری بعد فراکتالی توسط روش شمارش چهار ضلعی‌ها (Box counting) وارد نرم افزار Benoit 1.3 گردید (بدون این که موارد مثبت یا منفی مشخص باشد) (شکل ۵ و ۶).

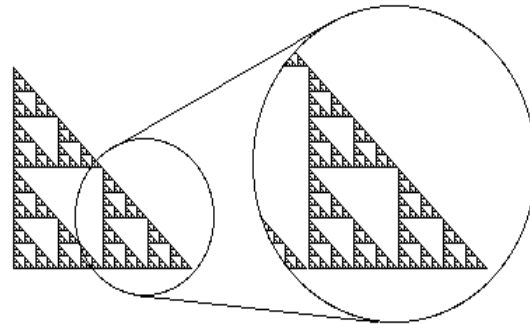
میانگین ابعاد فراکتالی حاشیه هسته‌ها گرفته شد و نتایج، جهت آنالیز آماری وارد نرم افزار SPSS 14 شد.

به دلیل این که توزیع داده‌های، ابعاد فراکتالی حاشیه هسته در هر دو مورد مثبت و منفی، تا حدود زیادی توزیع طبیعی داشت از روش‌های پارامتری برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

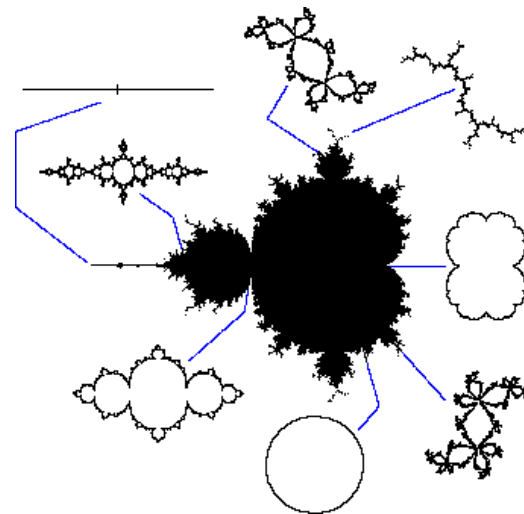
و به دلیل این که تعداد داده‌ها در هر دو گروه از ۳۰ بیشتر بود، از روش پارامتری آماره Z استفاده شد (میانگین بعد فراکتالی هسته سلول‌های سالم ۱/۷۲۰، میانگین بعد فراکتالی هسته سلول‌های سرطانی ۱/۷۵۰).

با توجه به نتیجه این آزمون و اختلاف بارز مقدار محاسبه شده آماره Z (۱۷/۰۵۸) از مقدار بحرانی (۱/۹۶)، با اطمینان ۰/۹۵ می‌توان فرض صفر را رد کرد و پذیرفت که اختلاف بین دو میانگین، واقعی است و ناشی از تصادف نمی‌باشد.

از رسم منحنی ROC برای به دست آوردن Cut off مناسب استفاده شد (نمودار ۲). برای سطح زیر منحنی ۰/۹۲، p-value=0.000 شد که قابل قبول می‌باشد. مقدار ۰/۹ به معنای آن است که در ۹۰٪ موارد، این تست قادر است موارد مثبت را از منفی تفکیک نماید.



شکل شماره (۱): نمایی از الگوهای خودسان



شکل (۲): نمونه یک شکل فراکتالی

مواد و روش کار

هدف از این تحقیق، معرفی یک روش جدید برای تفکیک سلول‌های اپی تلیال بدخیم از سالم در سیتولوژی ادرار و سنجش توانایی نتایج است. در منابع علمی از این سلسله از تحقیقات تحت عنوان ارزیابی فرآیندها^۱ و مقایسه روش‌ها^۲ یاد شده است (۱۱).

لام‌های سیتولوژی ادرار بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی در فاصله زمانی ابتدای سال ۱۳۸۲ تا ماه چهارم سال ۱۳۸۶ مورد بررسی قرار گرفت. از ۷۱ مورد گزارش سیتولوژی مثبت، تعداد ۴۱ مورد که دارای گزارش پاتولوژی مثبت از نظر بدخیمی سرطان مثانه بودند انتخاب شد.

دامنه^۳ سنی بیماران برای مردان از ۳۶ تا ۸۳ سال با میانه ۷۰ سال و برای زنان از ۱۸ تا ۸۱ سال با میانه ۶۸/۵ سال بود.

¹ Process research

² Method comparisons

³ Range

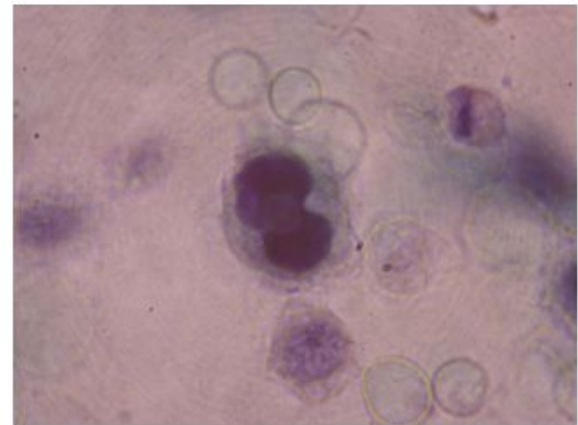
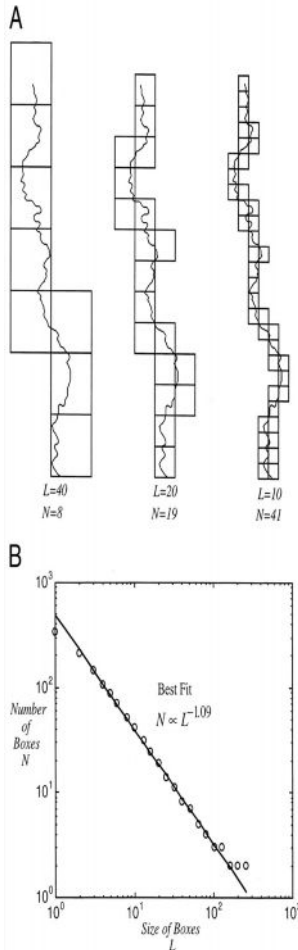
⁴ Coded

بین ۰/۹ و ۰/۷ خوب و سطح زیر ۰/۷ ضعیف محسوب می‌شود با بررسی نقاط مختلف Cut off. عدد ۱/۷۳۲ به‌عنوان Cut off point بهینه انتخاب شد و مقادیر شاخص‌های معیار طبق جدول ۱ بدست آمد.

به لحاظ درجه صحت تست، سطح بیشتر از ۰/۹ عالی، سطح ما بنابراین نتایج سطح زیر منحنی ROC در ناحیه Excellent واقع می‌شود.

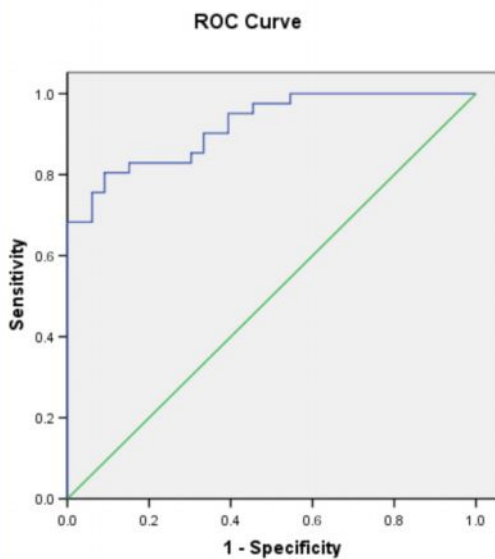
جدول شماره (۱)

| | | |
|---------------------------|------|---------------------------|
| Sensitivity | ۸۲/۹ | حساسیت |
| Specificity | ۸۴/۸ | اختصاصیت |
| Positive Predictive value | ۸۷/۱ | ارزش پیش بینی کنندگی مثبت |
| Negative Predictive value | ۸۰ | ارزش پیش بینی کنندگی منفی |
| Positive LikeLihood ratio | ۵/۴۵ | ارزش درست نمایی مثبت |
| LikeLihood ratio Negative | ۰/۲ | ارزش درست نمایی منفی |



شکل (۳): تصویر یک سلول اپی تلیالی سرطانی که با میکروسکوپ و عدسی شیئی 100X (روغنی) تهیه شده است

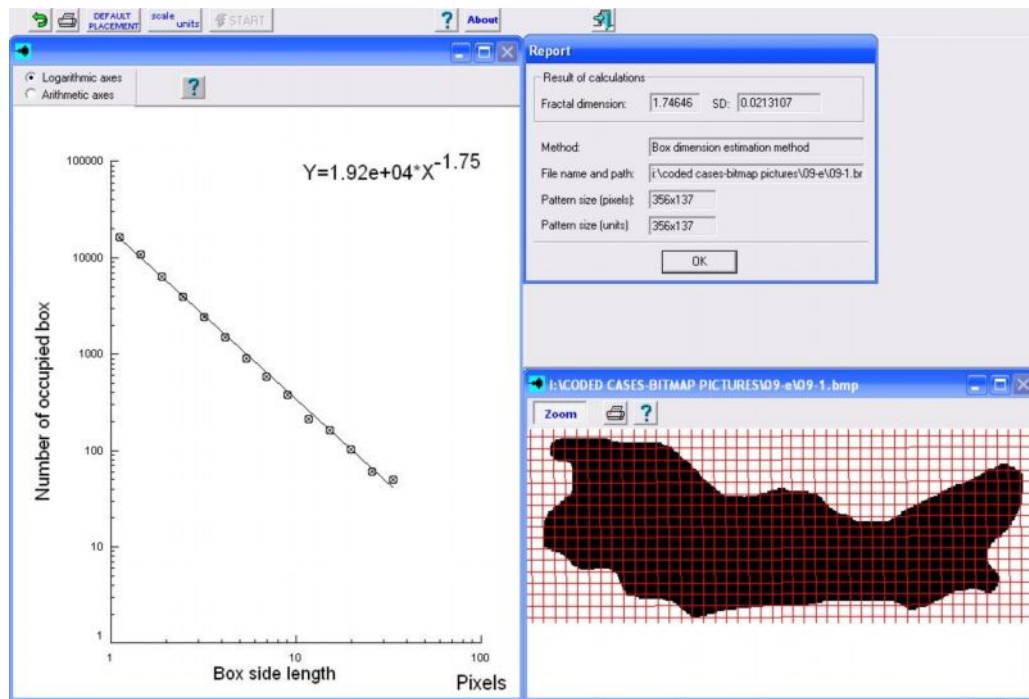
شکل (۵): نمایی از کاربرد روش شمارش چهار ضلعی‌ها که نشان



نمودار (۲): منحنی ROC



شکل (۴): نمایی از شکل هسته آماده سازی شده (Preprocessed) در محیط فتو شاپ ۷



شکل (۶): نمونه‌ای از خروجی نرم افزار BENOIT 1.3

Naeim F و همکاران به بررسی ویژگی‌های الگوهای فضایی در مغز استخوان و مکانیسم‌های موجد آن‌ها پرداختند. سه پارامتر مختلف اما به لحاظ ساختمانی مرتبط را اندازه گیری کردند: (A) مساحت سلولی، (B) مساحت هسته و (C) تعداد سلول‌ها (Y).

در مطالعه محقق و همکاران با بررسی ۳۱ لام مغز استخوان سالم با تعیین ضریب فراکتالی نتیجه گرفتند که مغز استخوان از الگوی فراکتالی تبعیت نموده است.

Dey P. و همکاران، با اندازه‌گیری بُعد فراکتالی اسمیرهای سیتولوژی پستان به روش شمارش چهار ضلعی‌ها^۱، توسط یک سایتومتر تصویری و استفاده از نرم‌افزار به این نتیجه رسیدند که اختلاف معنی‌داری در بُعد فراکتالی سلول‌های خوش خیم و بدخیم، وجود دارد (۸).

Ohri S. و همکاران با اندازه‌گیری بُعد فراکتالی سلول‌های خوش خیم و بدخیم اسمیرهای سیتولوژی پستان و ضایعات گردن رحم، به کمک یک سایتومتر تصویری و نرم‌افزار، وجود اختلاف معنی‌دار در بُعد فراکتالی این دو گروه سلول را مشخص کردند و این روش را یک ابزار کمی سودمند در تفکیک سلول‌های خوش خیم و بدخیم معرفی نمودند (۹).

در تحقیق Simon S. Cross بر روی پولیپ‌های کولورکتال، میانگین بُعد فراکتالی بدست آمده برای الگوهای شاخه شاخه

بحث

مفهوم هندسه فراکتالی توسط ریاضی دانی به نام Benoit Mandelbrot و براساس کارهای انجام شده توسط افرادی مانند پوانکاره، کانتور، سرپینسکی و دیگران، فرمول بندی و به نحو جامعی در یک کتاب در سال ۱۹۸۲ بیان شد که تأثیر قابل ملاحظه‌ای در ریاضیات محض و کاربردی از جمله علوم پزشکی به‌جا گذاشت. می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

- ۱- بیولوژی مولکولی
 - ۲- پاتولوژی تومورها
 - ۳- پاتولوژی استخوان
 - ۴- پاتولوژی عروق
 - ۵- نوروپاتولوژی
 - ۶- مدل سازی فرایندهای زیست شناختی با استفاده از فراکتال‌ها
 - ۷- سایر کاربردها: هندسه زخم‌های قرنیه ناشی از هرپس سیمپلکس، تفکیک مناطق هتروکروماتین و اوکروماتین در هسته سلول‌ها (۵).
- James W. Baish و همکاران به ارائه روش‌های پایه‌ای هندسه فراکتالی، مزایا و محدودیت‌های آن‌ها در تحقیقات سرطانی پرداختند (۶).

¹box counting

می توان در انتخاب نقطه مناسبی که حدود مورد نظر از حساسیت و یا اختصاصیت را فراهم نماید، تصمیم گرفت.

نتیجه گیری

در این مطالعه سطح زیر منحنی ROC مقدار، 0.92 با $(p\text{-value}=0.000)$ بدست آمد که چون از 0.9 بالاتر است، در محدوده excellent قرار می گیرد (۱۱).

از نظر شاخص های Diagnostic accuracy، یعنی حساسیت و اختصاصیت، به ترتیب مقادیر $82/9$ و $84/8$ بدست آمد که از 0.8 بالاتر هستند و قابل قبول می باشند.

فاصله اطمینان 95% برای برآورد Cut off point پیشنهادی یعنی $1/732$ ، $0.06 \pm$ تعیین شد.

به عنوان نتیجه نهایی اندازه گیری بُعد فراکتالی حاشیه هسته سلول های اپی تلیالی در سیتولوژی ادرار بیماران مشکوک به سرطان دستگاه ادراری، می تواند تا حد قابل قبولی، موجب تفکیک سلول های بدخیم از سالم گردد و در این خصوص در نظر داشتن عدد $1/732 \pm 0.06$ می تواند راهنمایی مناسب در انتخاب Cut off point باشد.

پیشنهاد

نتایج این مطالعه، جایگاه اندازه گیری بُعد فراکتالی حاشیه هسته سلول های اپی تلیالی را در سیتولوژی ادرار بیماران مشکوک به سرطان دستگاه ادراری، به عنوان یک Feature type در مقوله Feature extraction در کلاس Automated cancer diagnosis قرار می دهد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات مشابه پیشنهاد می شود با مقیاس های وسیع تر اندازه گیری بُعد فراکتالی حاشیه هسته سلول های اپی تلیالی، برای افتراق بین حالات بدخیم از سالم در سیتولوژی ادرار صورت گیرد تا در مرحله انتخاب خاصیت مورد مطالعه برای طراحی دستگاه های خودکار غربالگر، بکار رود.

شونده پولیپها که دارای درجاتی از خودسانی می باشند، اختلاف آماری معنی داری از خود نشان داد (۵).

Dey P و همکاران ابعاد فراکتالی غدد آندومتر در هیپرپلازی ساده، آتیپیکال کمپلکس و کارسینوم آندومتر را بدست آوردند (۱۰).

مقایسه بین نتایج اندازه گیری بُعد فراکتالی حاصل از این مطالعه و سایر پژوهش ها، به ویژه در زمینه پاتولوژی نشان می دهد که محققان مختلف هر یک بُعد فراکتالی را در ساختار به خصوصی، اندازه گیری نموده اند، که از میان آن ها می توان به حاشیه غدد، محیط و مساحت جزائر کلاژنی و یا سلول های منفرد و الگوهای شاخه شاخه شونده در ساختمان های پولیپی اشاره کرد. اهمیت این موضوع در این است که هنگام تفسیر اعداد مربوط به ابعاد فراکتالی در پژوهش های مختلف، عدم توجه به ساختار خاصی که بُعد فراکتالی آن اندازه گیری شده است، می تواند منجر به نتایج به ظاهر متضادی گردد.

اندازه گیری بعد فراکتالی باید هدفمند و دارای پایه علمی باشد و در مرحله feature extraction جزء بافتی انتخاب شده برای اندازه گیری بعد فراکتالی براساس مستندات علمی انتخاب گردد، همانند انتخاب حاشیه هسته در سیتولوژی ادرار که نامنظم بودن آن در تشخیص بدخیمی به طور کیفی مورد استفاده قرار می گیرد. حال با در نظر داشتن این نکته، به جمع بندی نتایج تحقیق کنونی می پردازیم.

انتخاب مقدار بُعد فراکتالی $1/732$ به عنوان نقطه cut off، برای حاشیه هسته سلول های اپی تلیالی در گسترش های رسوب ادراری، با توجه به این که مقادیر شاخص های معیار، همگی در محدوده قابل قبولی واقع می شوند، انتخابی مناسب است.

در مواردی که هدف غربالگری و از دست ندادن بیماران است، نقطه cut off باید به نحوی باشد که حداکثر حساسیت ممکن فراهم گردد. در مقابل در مواردی که هدف تحکیم و تأیید یک تشخیص و رد افراد سالم باشد، انتخاب cut off به نحوی است که حداکثر اختصاصیت به دست آید. بنابراین برحسب نیاز بالینی

References:

1. Demir C, Yener B. Automated cancer diagnosis based on histopathological images: a systematic survey. Rensselaer Polytechnic Institute. Tech Rep 2005:1-16.
2. McKee G. Urinary tract cytology. In: W Gray, Editor. Diagnostic cytopathology. 2nd Ed. Churchill: Livingstone; 2003. P. 471-95.
3. Rosai J. Special techniques in surgical pathology. In: Rosai J, Editor. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th Ed. St Louis: CV Mosby; 2004. P. 42-3.
4. Edward M, Messing MD. Urothelial tumors of the bladder. In: Campbell-walsh urology. 9th Ed. New York: WB Saunders; 2007. P.2407-46.

5. Cross S. Fractals in pathology. *J Pathol* 1997; 182: 1-8.
6. Baish JW, Rakesh KJ. Fractals and cancer. *Perspect Cancer Res* 2000; 60: 3683- 8.
7. Naeim F, Moatamed F, Sahimi M. Morphogenesis of the bone marrow: fractal structures and diffusion limited growth. *Blood* 1996; 87: 5027-31.
8. Dey P, Mohanti SK. Fractal dimensions of breast lesions on cytology smears. *Diagnostic Cytopathol* 2003; 29(2):85-6.
9. Ohri S, Dey N R. Fractal dimension in aspiration cytology smears of breast and cervical lesions. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26(2):109-12.
10. Dey P, Rajesh I. Fractal dimension in endometrial carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26(2):113-6.
11. Rohan J, Mark S, Jeffery J, Daniel F. Post-analysis: medical decision-making. In: Macpherson RA, Pincus MR, Editors. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 21st Ed. New York: WB Saunders; 2007. P.68-75.