

М.В. Спринджук, А.П. Кончиц, Н. И. Дащинская

Коррелятивный анализ плотности лимфатических капилляров и параметров, полученных при анатомическом и гистологическом исследовании образцов папиллярного рака щитовидной железы

*Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук
Беларуси, г. Минск, Беларусь*

Ключевые слова: ангиогенез, лимфангиогенез, рак щитовидной железы, опухоли, карцинома, плотность микрососудов, обработка изображений, программное обеспечение

Исследование сосредоточено на коррелятивном (параметрическом и непараметрическом, с одно - и двусторонним критерием) анализе плотности лимфатических микрососудов, которая определялась с помощью оригинального пакета программ, и спектра патологических данных, полученных при обследовании образцов папиллярного рака щитовидной железы. Данные были трансформированы в числовые и представлены как номинальные и масштабные. Авторы нашли слабую корреляцию различного статистического значения в парах величин плотности лимфатических капилляров и наличия папиллярной архитектоники, а также смешанной структуры, стадии опухоли T3bN1bM0 (+), T1bN1aM0 (-), редкой (рыхлой) и лимфоцитарной инфильтрации (+), узловой лимфоцитарной инфильтрации (-), и подкапсулярной инвазии в правой доле щитовидной железы (-).

Введение

Лимфангиогенез в щитовидной железе относительно неглубоко рассматривается в литературе, в отличие от феномена васкуляризации опухолей в других органах [1-3]. Развитие и роль лимфатических сосудов в развитии злокачественных опухолей недавно стали объектом исследования нескольких групп исследователей. Прогресс области гистопатологии щитовидной железы тесно связан с недавними открытиями новых иммунохимических маркеров, среди них D2-40, антитело к подопланину. Автоматизированный диагноз как ключевой метод так называемой "цифровой патологии" расширяет границы своего применения, начиная с первых сообщений в 1980-ых [4].

По сравнению с опухолями другой локализации, рак щитовидной железы в детском возрасте встречается редко. Белоруссия, Россия и Украина известны как страны, где рак щитовидной железы имеет самый высокий уровень заболеваемости [5-9]. Главная вероятная причина для этого факта – взрыв ядерной электростанции, который случился 26 апреля 1986 года..

Материалы и методы

Критерии включения пациентов в исследование, были следующие (см. также рис. 1-5):

- 1) Дети были рождены позднее 1987;
- 2) Все имели диагноз рака щитовидной железы;
- 3) Возраст варьировал от 10 до 18 лет;
- 4) У всех пациентов не было никакой явной врожденной болезни и значительных сопутствующих патологий развития.

Основная идея нашего исследования состояла в том, чтобы проверить гипотезу, коррелирует ли плотность лимфатических капилляров (ПЛК), вычисленная, используя программное обеспечение для обработки изображений, со следующими параметрами (см. рис. 1-11):

- 1) возрастом пациентов;
- 2) размерами опухоли;
- 3) инфильтративным и экспансивным ростом;
- 4) папиллярной, фолликулярной, и смешанной архитектоникой;
- 5) экстракапсулярным распространением опухоли;
- 6) лимфцитарной инфильтрацией (рыхлой, диффузной и нодулярной);
- 7) специальным типом опухоли;
- 8) стадиями TNM классификации;
- 9) размерами лимфатических узлов;
- 10) общим числом метастазов.

Программное обеспечение было написано на языке программирования Delphi (то есть, фактически, объектно-ориентированном языке Паскаль) для операционной системы Windows. Ключевая функция программного обеспечения – вычисление покрашенной коричневым цветом области гистологического изображения. Изображения были получены при помощи микроскопа "Leica DMD 108" с операционной системой Linux. Снимки были получены вручную, без сканера, 10 "горячих точек" (области максимальной васкуляризации, выбраны по оценочному решению одного Патолога) от каждого отдельного слайда образца опухоли. Все изображения были сохранены в формате jpeg, а затем конвертированы в формат tiff, приемлемый для программного обеспечения.

Программное обеспечение произвело список числовых величин ПЛК, который был импортирован в пакет программ Open Office Calc, и затем средние арифметические значения для серии изображений от одного пациента были вычислены полуавтоматически. Данные, полученные от образцов опухолей, записывались в таблицу Excel.

Интересуемые ряды данных были адаптированы для программы SPSS 17, которой были затем посчитаны корреляционные пары Пирсона и Спирмана с одно- и двусторонним критерием (см. рис. 6-11).

Обсуждение

Значительное количество исследований показало, что корреляция встречалась между различной степенью иммунореактивности D2-40, ПЛК и статусом лимфатических узлов

у больных, страдающих опухолями легких [10-13], желудка [14], шейки матки [15-17], матки [18], полости рта [19] и кожи [20-24]. Известны единичные сообщения относительно оценки ПЛК в тканях щитовидной железы [25-29]

Результаты Wang и др. [30] (2007) показали, что D2-40 часто повышено продуцируется в папиллярном раке щитовидной железы по сравнению с тканями нормальной щитовидной железы и фолликулярных опухолей. [30].

В мире не накоплен достаточный опыт применения программного обеспечения для подсчета ПЛК, чтобы можно было сделать достоверные выводы. Ранее предполагалось, что ограничение компьютер-ассистированной методики – проблема возможности регистрации покрашенных участков не только в сосудах, но и в строме опухоли [31]. Choi и колл. (2005) выполнили сравнение визуального и компьютер-ассистированного метода подсчета ПЛК на примере исследования рака молочной железы. Они использовали автоматизированный сканирующий микроскоп и автоматизированный анализ изображений, таким образом, идентифицировали покрашенные иммунореактивом структуры, подобные по форме кольцу, и выполняли подсчет сосудов. Однако, только визуальные данные средних значений ПЛК, окрашенных D2-40, показали коррелятивную связь со статусом лимфоузлов и экспрессией ФРЭС (фактора роста эндотелия сосудов) [31]. Напротив, нашим инструментом для вычислений ПЛК была только одна программа. Заметим, что в зависимости от цвета фона изображений, программа окрашивала кроме самих сосудов еще и участки стромального компонента, причем на синем фоне выделялись преимущественно сосуды, а на желтоватом регистрировалось больше покрашенных участков, которые подсвечивались программой черным цветом (см. рис. 12, 13). Вероятно, что цвет фона обуславливается камерой микроскопа и освещением. Тем не менее, по изображениям было четко видно, что где визуализировалось больше сосудов, там наблюдалась большая площадь, подсвеченная черным цветом после обработки изображений программой.

Выводы, заключение и будущая работа

Обнаружена слабая корреляционная закономерность между величиной ПЛК и папиллярной архитектоникой образцов папиллярного рака щитовидной железы (Коэффициент корреляции Пирсона, $KП=0,326$), смешанным строением ($KП=0,314$) и стадией T3bN1bM0 ($KП=0,315$). Такое заключение основывается на полученных коэффициентах Пирсона с двусторонним критерием и значением p на уровне 0,05. При исследовании корреляции Пирсона с односторонним критерием мы обнаружили дополнительную отрицательную корреляцию ПЛК с субкапсулярным прорастанием в правую долю щитовидной железы ($KП=-0,264$, p на уровне 0,05).

Применение непараметрической корреляции Спирмана с односторонним критерием выявило корреляцию между величиной плотности лимфатических капилляров и смешанным строением (Коэффициент корреляции Спирмана, $KС=0,295$), стадией T3bN1bM0 ($KС=0,325$) и рыхлой, редкой лимфоцитарной инфильтрацией ($KС=0,255$), а также отрицательную – с субкапсулярным прорастанием в правую долю щитовидной железы ($KС=-0,273$), стадией T1bN1aM0 ($-0,210$, p на уровне 0,05) и узловой лимфоцитарной инфильтрацией ($KС=-0,256$, p на уровне 0,05).

Применение непараметрической корреляции Спирмана с двусторонним критерием показало только, опять же сравнительно незначительную,

корреляцию между величиной ПЛК и T3bN1bM0 ($KC=0,325$, p на уровне 0,05). Однако, так как таких опухолей было всего 8, делать вывод о наличии достоверных закономерностей не представляется возможным. Таким образом, при использовании параметрической (Пирсона) и непараметрической корреляции (Спирмана) мы получили разные данные, что может указывать на относительно слабые коррелятивные связи изучаемых параметров. Считается, что коэффициент Пирсона применяется для нормального распределения, в других случаях рекомендуют применять коэффициент Спирмана [32]. Интересно, что как и в начальном исследовании 18 пациентов (еще неопубликованные данные), в данном исследовании 43 пациентов мы не наблюдали корреляции между ПЛК и возрастом пациентов, общим количеством метастазов и лимфатических узлов. Такой вывод свидетельствует о том, что на основании величин плотности лимфатических капилляров, нельзя судить о вероятности и количестве метастазов. Тем не менее, опухоли с папиллярной архитектурой и смешанного строения могут стать объектами более глубокого изучения лимфоангиогенеза, так как по данным только изображений объяснить причину большего количества лимфатических капилляров в таких образованиях практически невозможно. Вероятно, активность лимфоангиогенеза в таких тканях можно определить биохимическими методами, измеряя, например, уровень ФРЭС-С.

Однако, мы обнаружили статистически значимую корреляцию между общим числом метастазов и размером опухоли, перитиреоидным экстракапсулярным распространением, солидной структурой и общим числом лимфатических узлов (см. рис. 6).

В дальнейшем, мы планируем провести исследование 100 пациентов, получив по 300 изображений с каждого слайда опухоли и параметры, отличные от плотности лимфатических капилляров.

Будущие исследования должны сравнить различные методы для исследования ПЛК, включая различные пакеты программ для гистоморфометрии и обработки изображений.

Роль морфологии лимфоангиогенеза в диагностике рака щитовидной железы остается неясной, по литературным данным создается впечатление, что в мире не накоплено достаточно опыта диагностики и лечения этой патологии, чтобы можно было создать единые рекомендации-протоколы на основе принципов доказательной медицины. Для решения этой глобальной проблемы диагностики и лечения редких болезней существенную помощь может оказать создание бесплатно доступной единой базы данных изображений опухолей и историй болезни таких пациентов. Такая информационная среда облегчит выполнение мета анализа научной информации и создаст информационную основу для формирования четких единых критериев диагностики, что окажет позитивное влияние на терапию изучаемых болезней.

Программное обеспечение, принцип которого заключается в распознавании общего и различного на изображениях опухолевых тканей [33-36], может в недалеком будущем стать инструментом для принятия клинических диагностических решений, подобно тому, как оно уже сегодня применяется в радиологии.

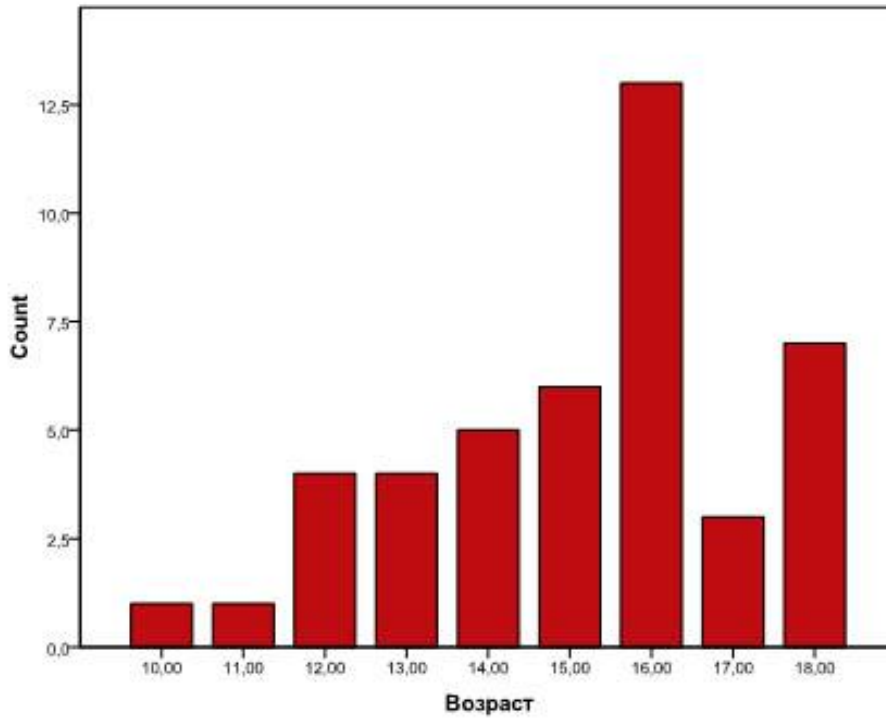


Рис. 1. Гистограмма возраста 43 пациентов.

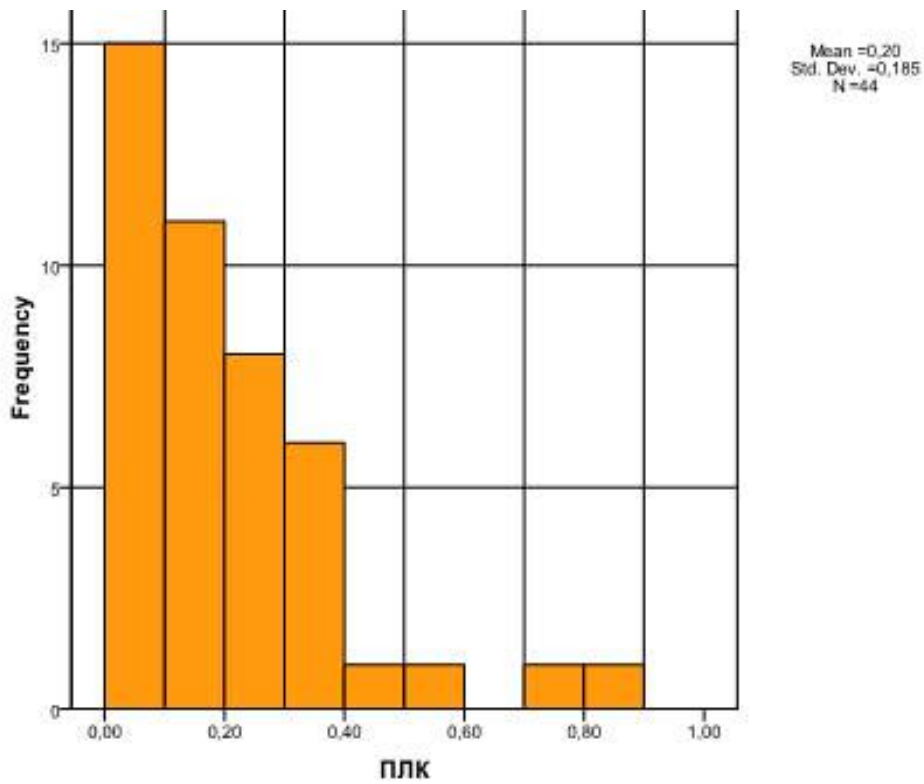


Рис. 2. Гистограмма значений плотности лимфатических капилляров (на рисунке ПЛК).

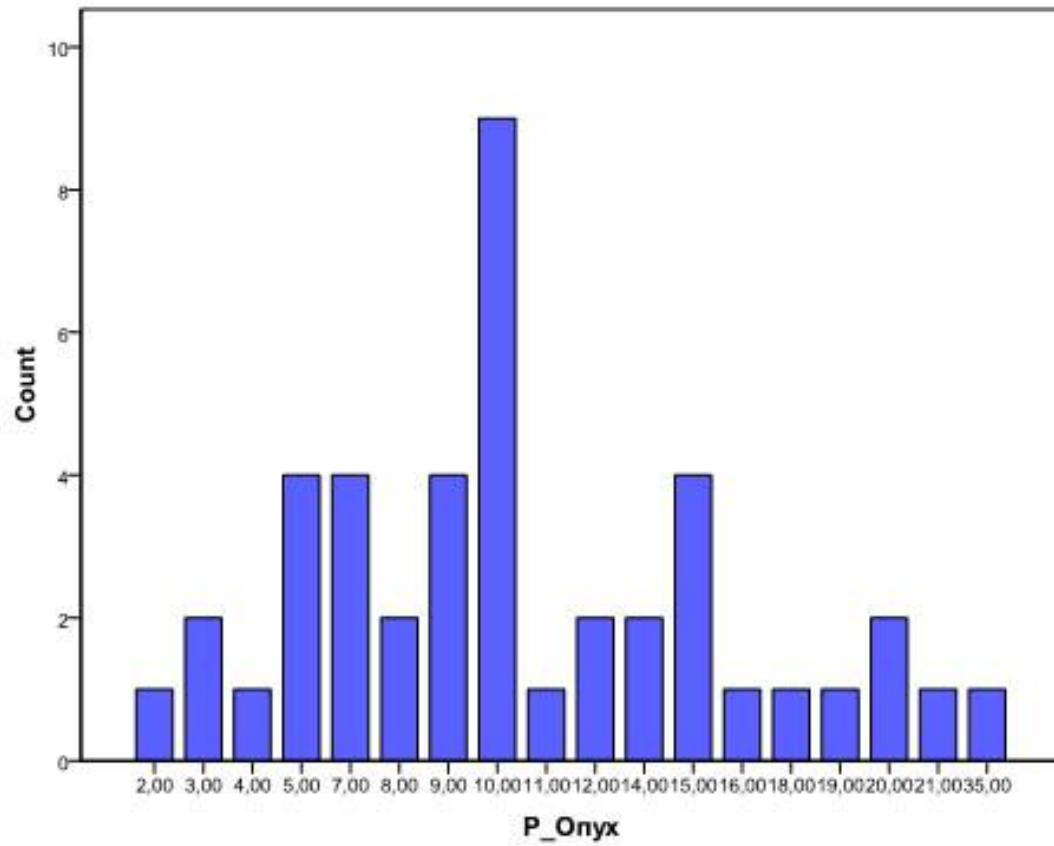


Рис. 3. График распределения размеров опухолей (в мм).

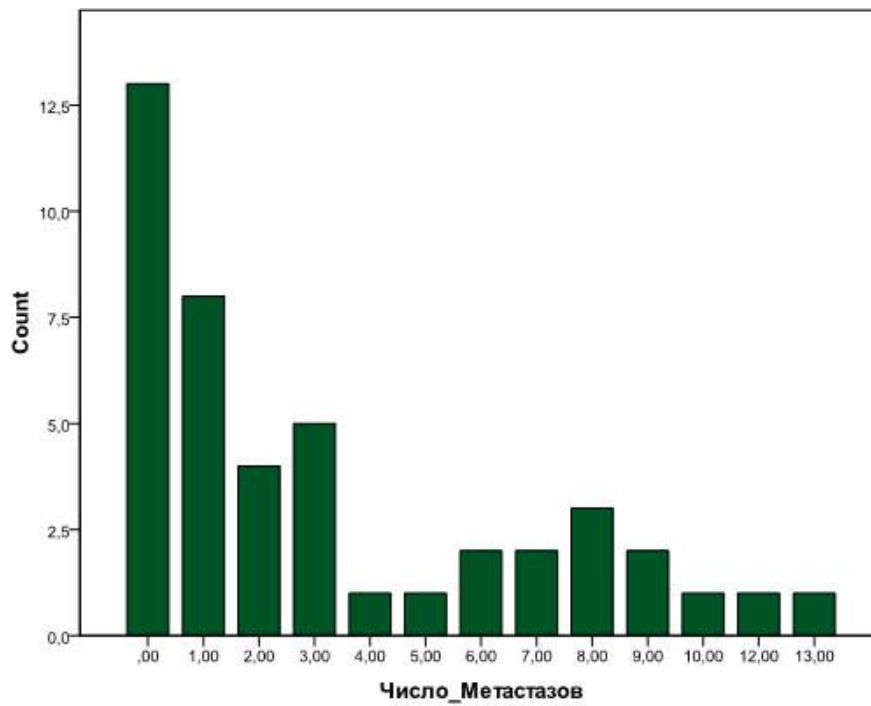


Рис. 4. График-гистограмма абсолютного числа метастазов.

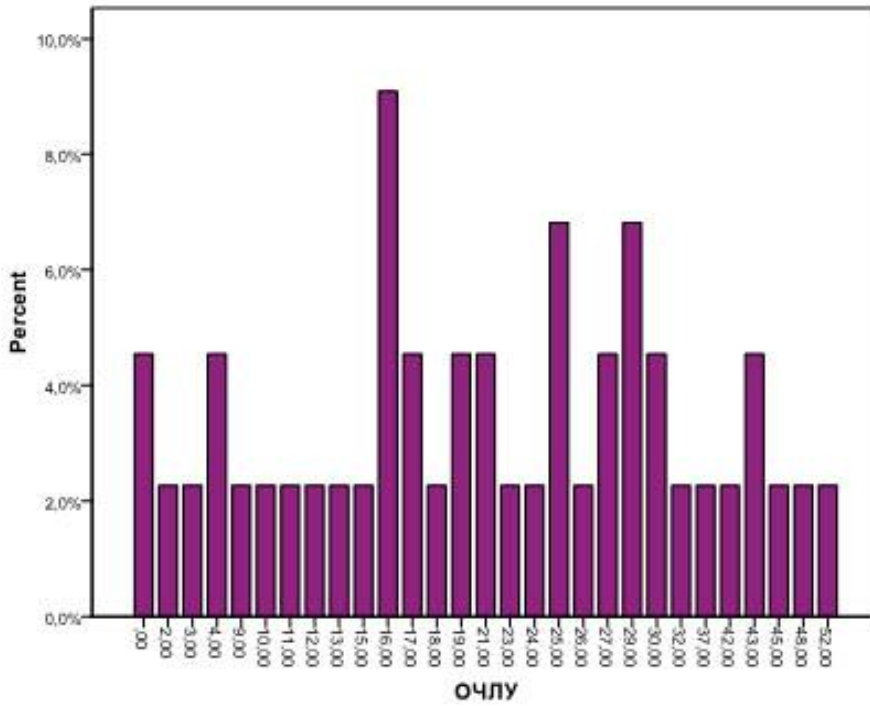
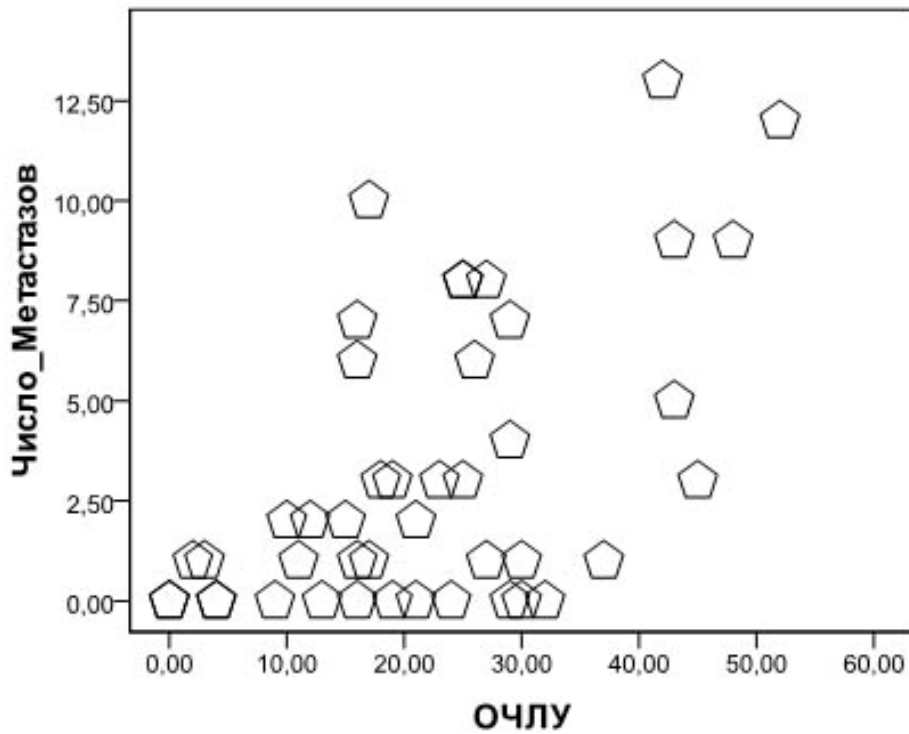


Рис. 5. Процентный график-гистограмма общего числа лимфатических узлов (ОЧЛУ).



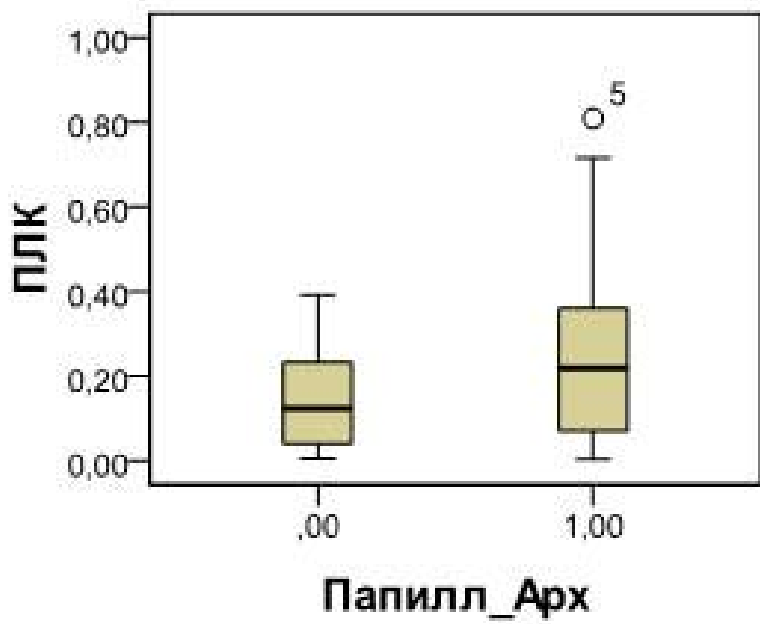


Рис. 7. Границы ПЛК при наличии (1) и отсутствии (0) папиллярной архитектоники опухоли.

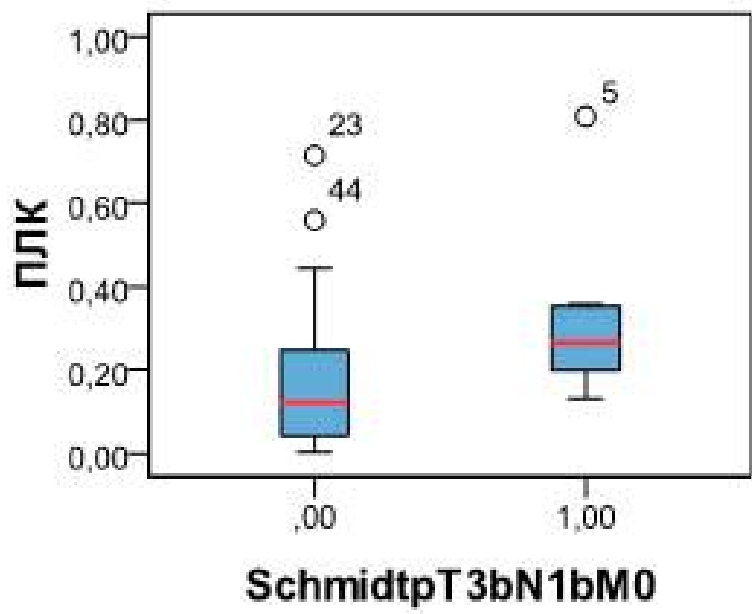


Рис. 8. Границы ПЛК при наличии (1) и отсутствии (0) опухолевой стадии TNM3bN1bM0 (Smidt – имя патолога-коллораборатора).

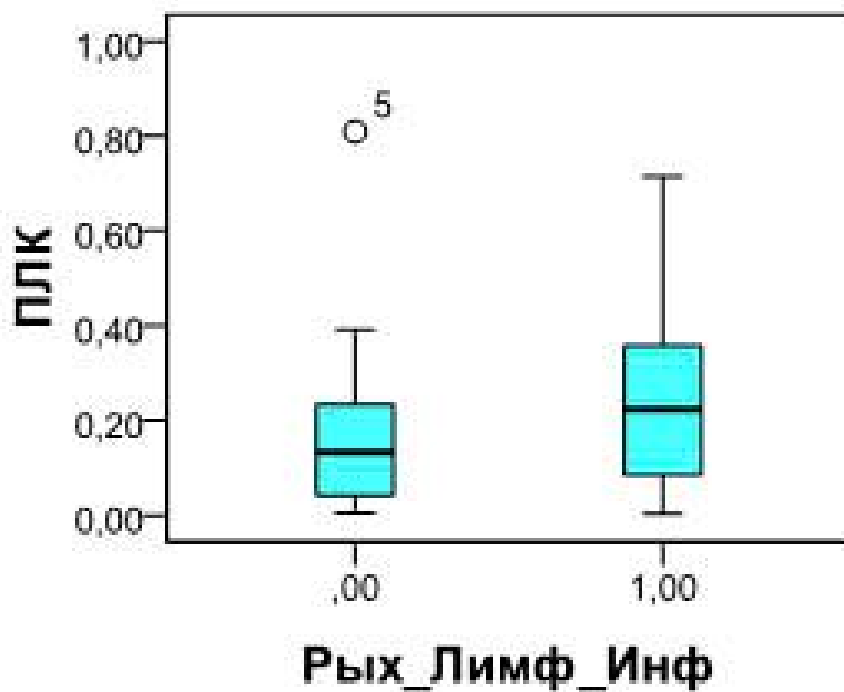


Рис. 9. Границы ПЛК при наличии (1) и отсутствии (0) рыхлой, редкой лимфатической инфильтрации опухоли.

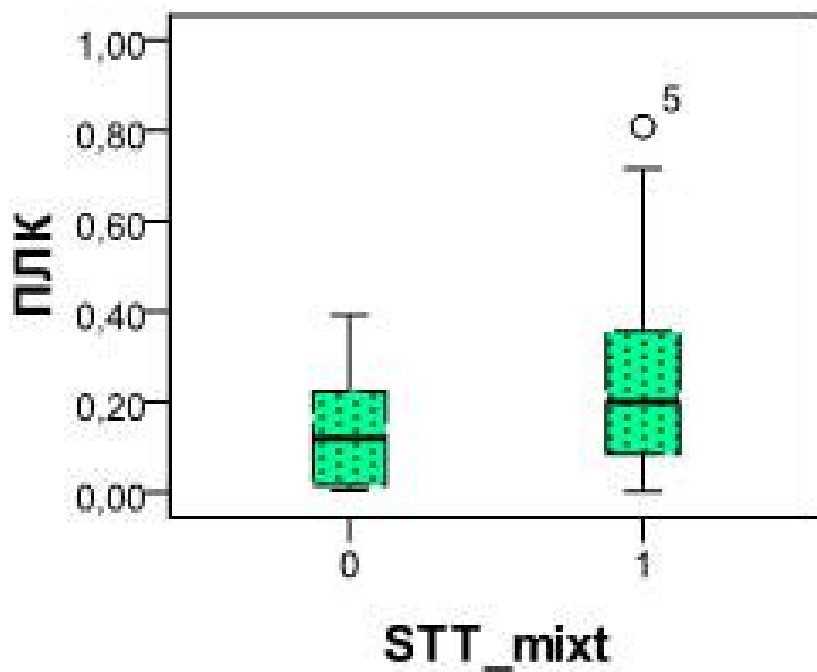


Рис. 10. Границы ПЛК при наличии (1) и отсутствии (0) смешанной структуры опухоли (Special tumor type mixt = STT_mixt).

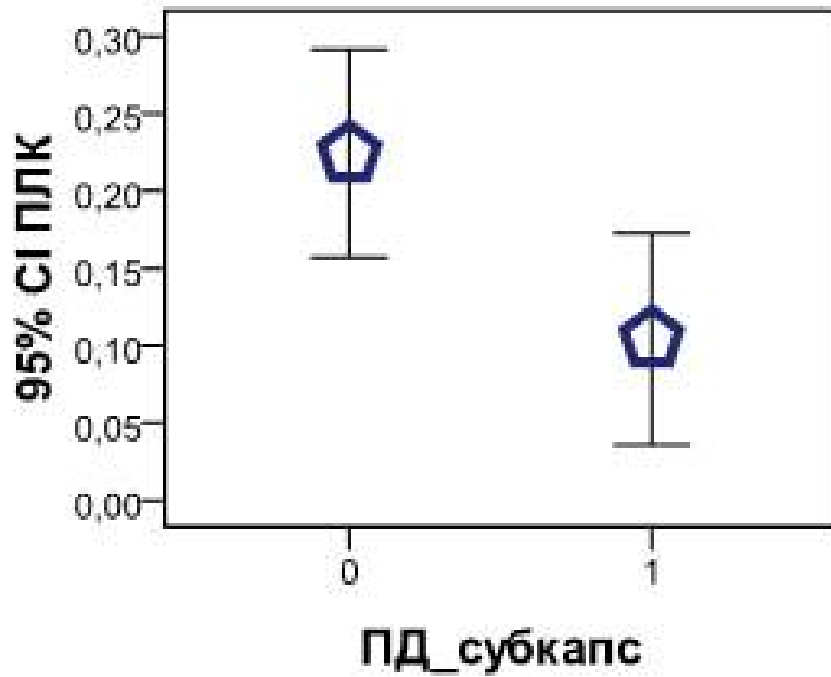


Рис. 11. Границы ПЛК при наличии (1) и отсутствии (0) субкапсулярного распространения опухоли в правую долю железы (ПД_субкапс).

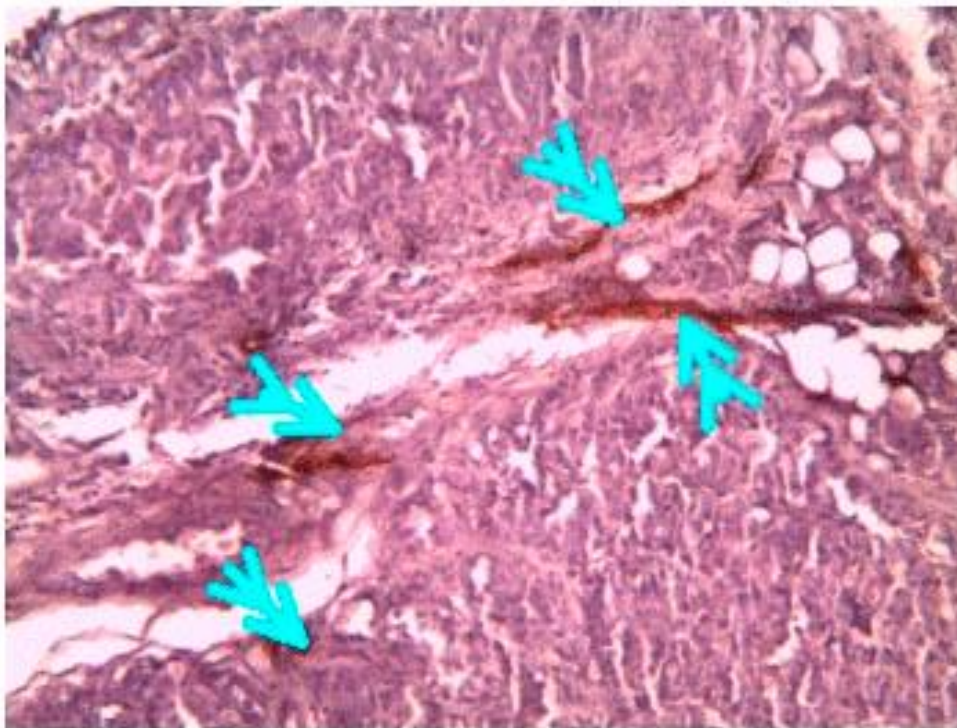


Рис. 12. Папиллярный рак щитовидной железы. Окраска D2-40. Изображение до обработки. Стрелками указаны сосуды.

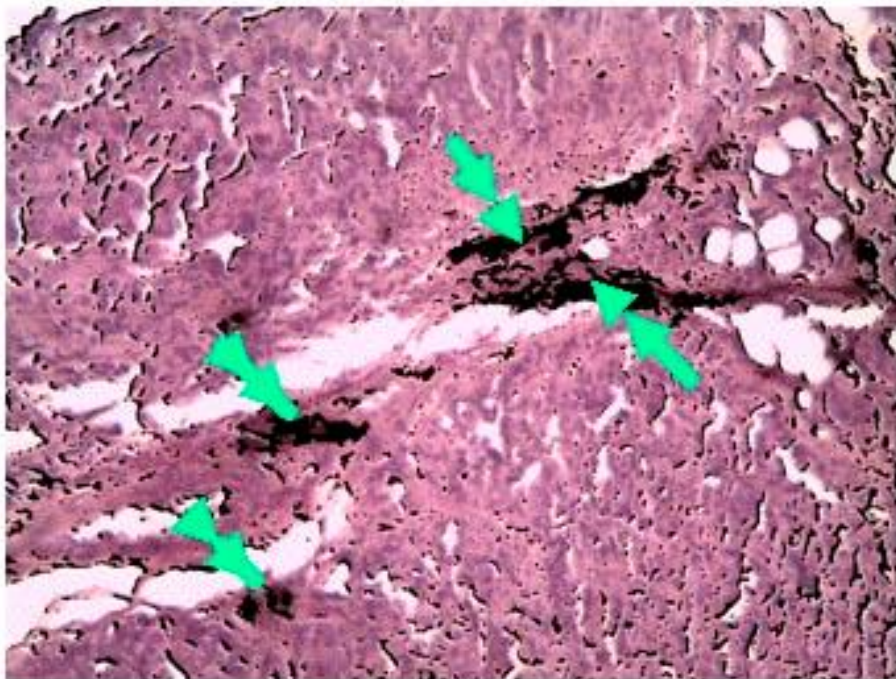


Рис. 13. Папиллярный рак щитовидной железы. Окраска D2-40. Изображение обработано программой А.П. Кончица, зелеными стрелками помечены сосуды, окрашенные в черный цвет, количество которых подсчитывается как число пикселей.

Литература

1. Epidemiology and specificity of the clinical course of thyroid carcinoma before and after the Chernobyl accident // Vestn Khir Im I I Grek, 169, № 1, P. 68–72.
2. UN Conference "The Project Chernobyl. Life under conditions of radiation after the Chernobyl accident: treatment of patients with thyroid carcinoma in the era of reforms of public health service" // Vestn Khir Im I I Grek, 169, № 1, P. 132–4.
3. Agaimy, A. Lymphatics and D2-40/podoplanin expression in gastrointestinal stromal tumours of the stomach with and without lymph node metastasis: an immunohistochemical study with special reference to the Carney triad / A. Agaimy, J. A. Carney // J Clin Pathol, 63, № 3, P. 229–34.
4. Akslen, L. A. Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance / L. A. Akslen, V. A. Livolsi // Hum Pathol. 2000, 31, № 4, P. 439–42.
5. Baldi, A. Definition of an automated Content-Based Image Retrieval (CBIR) system for the comparison of dermoscopic images of pigmented skin lesions / A. Baldi [et al.] // Biomed Eng Online. 2009, 8, №, P. 18.
6. Bellin, C. Selective D2-40 lymphatic endothelium immunoreactivity in developing human fetal skin appendages / C. Bellin [et al.] // Lymphology. 2009, 42, № 2, P. 61–5.
7. Dorileo, E. A. Color image processing and content-based image retrieval techniques for the analysis of dermatological lesions / E. A. Dorileo [et al.] // Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2008, №, P. 1230–3.

8. Dumoff, K. L. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix / K. L. Dumoff [et al.] // *Mod Pathol*. 2005, 18, № 1, P. 97–104.
9. Francis, Z. Angiogenesis and thyroid cancer / Z. Francis [et al.] // *Presse Med*. 2009, 38, № 11, P. 1641–6.
10. Harris, M. *Medical and health science statistics made easy* / M. Harris, G. Taylor. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett Publishers, 2009.
11. Ishida, M. Immunohistochemical demonstration of D2-40 in basal cell carcinomas of the skin / M. Ishida, R. Kushima, H. Okabe // *J Cutan Pathol*. 2008, 35, № 10, P. 926–30.
12. Iwakiri, S. D2-40-positive lymphatic vessel density is a poor prognostic factor in squamous cell carcinoma of the lung / S. Iwakiri [et al.] // *Ann Surg Oncol*. 2009, 16, № 6, P. 1678–85.
13. Kadota, K. The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer / K. Kadota [et al.] // *Lung Cancer*, №.
14. Kambouchner, M. Intralobular pulmonary lymphatic distribution in normal human lung using D2-40 antipodoplanin immunostaining / M. Kambouchner, J. F. Bernaudin // *J Histochem Cytochem*. 2009, 57, № 7, P. 643–8.
15. Katenkamp, D. Morphology and histochemistry of medullary thyroid carcinomas (author's transl) / D. Katenkamp, D. Stiller // *Zentralbl Allg Pathol*. 1974, 118, № 6, P. 519–32.
16. Kim, S. Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice / S. Kim [et al.] // *Clin Cancer Res*. 2006, 12, № 2, P. 600–7.
17. Koperek, O. Molecular characterization of the desmoplastic tumor stroma in medullary thyroid carcinoma / O. Koperek [et al.] // *Int J Oncol*. 2007, 31, № 1, P. 59–67.
18. Longatto-Filho, A. Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix / A. Longatto-Filho [et al.] // *Gynecol Oncol*. 2007, 107, № 1, P. 45–51.
19. Mahalingam, M. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing primary skin adnexal carcinomas from metastatic adenocarcinoma to skin: an immunohistochemical reappraisal using cytokeratin 15, nestin, p63, D2-40, and calretinin / M. Mahalingam [et al.] // *Mod Pathol*. 23, № 5, P. 713–9.
20. Mehm, W. J. Potential applications for digital image processing at the Armed Forces Institute of Pathology / W. J. Mehm, J. C. Splitstoser, R. L. Becker Jr. // *Aviat Space Environ Med*. 1988, 59, № 10, P. 981–5.
21. Mehta, N. Content based sub-image retrieval system for high resolution pathology images using salient interest points / N. Mehta, R. S. Alomari, V. Chaudhary // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009, №, P. 3719–22.
22. Mitchell, J. C. Angiogenesis in benign and malignant thyroid disease / J. C. Mitchell, S. Parangi // *Thyroid*. 2005, 15, № 6, P. 494–510.
23. Miyakuni, Y. Lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is a predictor of nodal metastasis in endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus / Y. Miyakuni [et al.] // *Pathol Int*. 2008, 58, № 8, P. 471–6.
24. Ohno, F. Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin

- antibody: an analysis in comparison with angiogenesis / F. Ohno [et al.] // *J Oral Pathol Med.* 2007, 36, № 5, P. 281–9.
25. Paradela, S. Mucinous carcinoma of the skin: evaluation of lymphatic invasion with D2-40 / S. Paradela [et al.] // *Am J Dermatopathol.* 2008, 30, № 5, P. 504–8.
 26. Plaza, J. A. Value of p63 and podoplanin (D2-40) immunoreactivity in the distinction between primary cutaneous tumors and adenocarcinomas metastatic to the skin: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 79 cases / J. A. Plaza [et al.] // *J Cutan Pathol.* 37, № 4, P. 403–10.
 27. Quellec, G. Wavelet optimization for content-based image retrieval in medical databases / G. Quellec [et al.] // *Med Image Anal.* 14, № 2, P. 227–41.
 28. Ramsden, J. D. Angiogenesis in the thyroid gland / J. D. Ramsden // *J Endocrinol.* 2000, 166, № 3, P. 475–80.
 29. Sekitani, Y. Evaluation of 137cs Body Burden in Inhabitants of Bryansk Oblast, Russian Federation, Where a High Incidence of Thyroid Cancer Was Observed after the Accident at the Chernobyl Nuclear Power Plant / Y. Sekitani [et al.] // *Radiat Prot Dosimetry.* 2010.
 30. Stabenow, E. Angiogenesis as an indicator of metastatic potential in papillary thyroid carcinoma / E. Stabenow [et al.] // *Clinics (Sao Paulo).* 2005, 60, № 3, P. 233–40.
 31. Takahashi, M. The FOXE1 locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl / M. Takahashi [et al.] // *Hum Mol Genet.* 2010.
 32. Takanami, I. Lymphatic microvessel density using D2-40 is associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer / I. Takanami // *Oncol Rep.* 2006, 15, № 2, P. 437–42.
 33. Urabe, A. Grading system of lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is useful for the prediction of nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix / A. Urabe [et al.] // *Histopathology.* 2006, 49, № 5, P. 493–7.
 34. Van der Auwera, I. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours / I. Van der Auwera [et al.] // *Br J Cancer.* 2006, 95, № 12, P. 1611–25.
 35. Wang, S. L. Expression of D2-40 in adjunct diagnosis of papillary thyroid carcinoma / S. L. Wang [et al.] // *APMIS.* 2007, 115, № 8, P. 906–10.
 36. Zvonova, I. Validation of 131I ecological transfer models and thyroid dose assessments using Chernobyl fallout data from the Plavsk district, Russia / I. Zvonova [et al.] // *J Environ Radioact.* 101, № 1, P. 8–15.