

# ОПЫТ ПИЛОТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОМОРФОЛОГИИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ КАПИЛЛЯРОВ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО ДАННЫМ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ, ОКРАШЕННЫХ МАРКЕРОМ D2-40

УДК 611.423—006—092:616.44.001.6—006

Поступила 31.08.2011 г.



М.В. Спринджук, младший научный сотрудник;  
А.П. Кончиц, к.б.н., инженер-программист, математик

Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**Цель исследования** — изучение закономерностей роста и развития сети лимфатических сосудов папиллярных опухолей щитовидной железы на основании результатов обработки изображений патогистологических препаратов.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были микропрепараты ( $n=40$ ), окрашенные маркером D2-40, которые приготовлены из хирургически удаленных опухолей (папиллярного рака щитовидной железы) пациентов с диагнозом sporadic thyroid carcinoma. Образцы опухолей хранили в замороженном виде. Большинство пациентов имели женский пол (82,5%), возраст варьировал от 9 до 18 лет. Средний размер опухоли составил 10 мм. Использовали специально разработанное программное обеспечение, которое обрабатывало изображения и вычисляло 5 параметров: относительную площадь, занимаемую сосудами; однородность распределения сети в пространстве; относительную долю мелких объектов сосудов (шума); относительную долю крупных сосудов; среднее значение цветности выделяемых сосудов.

**Результаты.** Обнаружена зависимость между инфильтративным ростом папиллярных карцином щитовидной железы и относительной площадью капиллярного лимфатического русла, измеренной на цифровых изображениях (корреляция Пирсона — 0,32; значение двустороннего теста — 0,43;  $p<0,05$ ).

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

## English

## The experience of pilot studies of lymph capillaries pathomorphology of thyroid papillary carcinoma according to the data from the images stained by D2-40 marker

M.V. Sprindzhuk, Junior Research Worker;  
A.P. Konchitz, PhD, Programmer Engineer, Mathematician

Joint Institute of Information Technique Problems of Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

**The aim of the work** is to study the growth and development regularities of lymph vascular bed of thyroid papillary carcinomas according to the results of image processing of pathohistological specimens.

**Materials and methods.** The objects of the research were microslides ( $n=40$ ) stained by D2-40 marker, prepared from surgically removed tumours (thyroid papillary carcinoma) of patients with sporadic thyroid carcinoma. The tumour specimens were stored frozen. The majority of patients were female (82.5%), age varying from 9 to 18 years. An average tumour size was 10 mm. There was used special software that processed images and calculated 5 parameters: relative area of vessels; relative fraction of small objects of vessels (noise); relative fraction of great vessels; average colority of distinguished vessels.

**Results.** There was revealed the relationship between the infiltration growth of thyroid papillary carcinomas and the relative area of capillary lymph bed measured on digital images (Pearson correlation — 0.32; 2-tailed — 0.43;  $p<0.05$ ).

**Key words:** angiogenesis, lymphangiogenesis, thyroid carcinoma, tumours, carcinoma, density of micro-vessels, image processing, software.

Для контактов: Спринджук Матвей Владимирович, тел. раб. 8 58-375(17)237-53-01, тел. моб. +3 75-29-567-10-73; 51  
e-mail: sprindzhuk@yahoo.com.

Патологическая анатомия и гистология щитовидной железы изучаются со времен изобретения средств и инструментов, предназначенных для этих целей. Наиболее ранние источники литературы, являющиеся фундаментом современных теоретических знаний, опубликованы А.Е. Hertzler в 1936 г. [1] и J.L. De Courcy, C.B. De Courcy в 1949 г. [2].

Папиллярный рак — самая распространенная дифференцированная злокачественная опухоль щитовидной железы. Заболевание у женщин и мужчин встречается в соотношении 3:1. Папиллярный рак щитовидной железы замечен во всех возрастных группах, с пиком заболеваемости в третьем и четвертом десятилетиях.

Опухоль имеет тенденцию к внутрижелезистому распространению, метастазированию в шейные лимфатические узлы и местной инвазии, но демонстрирует меньше склонности к гематогенному распространению, чем фолликулярные карциномы (рис. 1). Отдаленные метастазы редки и встречаются, как правило, поздно. Прогноз для папиллярного рака щитовидной железы в общем считают благоприятным, однако он зависит от нескольких факторов риска, таких как возраст пациента, стадии распространения, и гистологического дифференцирования. Летальность — очень низкая (менее 6,5% по данным исследования отдаленных результатов лечения). К факторам риска развития папиллярного рака относят предшествующее воздействие на организм атомной радиации, генетические заболевания и узловую (нодулярную) болезнь щитовидной железы [3].

Рост опухоли, ее системное воздействие на страдающий организм (хозяина) при условии несовершенства защитных сил в конечном итоге приводят к гибели организма.

Изучение ангиогенеза и лимфангиогенеза как мишеней лекарственных средств актуально в связи с тем, что одна из основных современных гипотез канцерогенеза построена на факте о ведущей роли сосудистой сети в обеспечении опухоли питательными вещества-

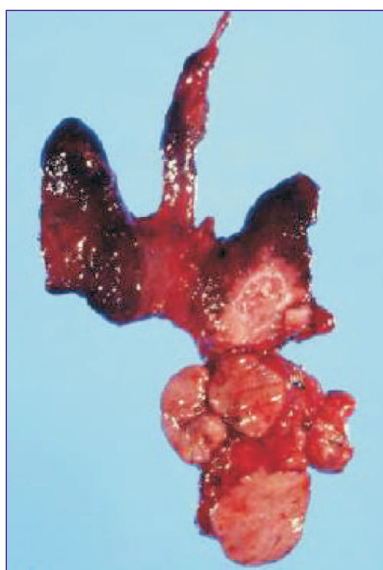


Рис. 1. Препарат папиллярного рака щитовидной железы, наблюдается вовлечение окружающих лимфоузлов [3]

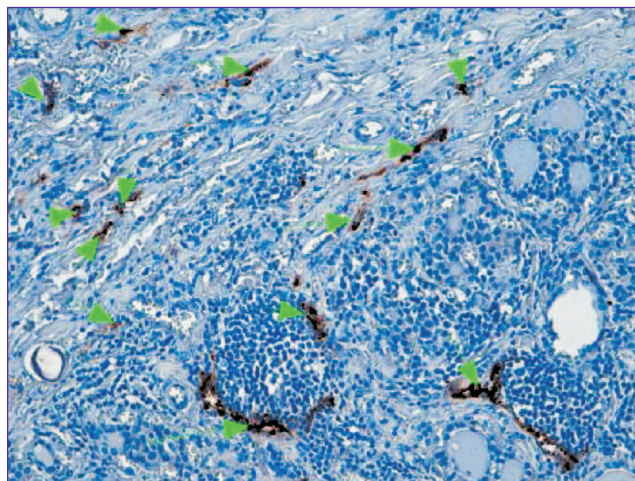


Рис. 2. Изображение патогистологического препарата папиллярного рака щитовидной железы после обработки компьютерной программой. Зелеными стрелками отмечены лимфатические капилляры, подсвеченные компьютерной программой черным цветом; х200

ми. Заметим при этом, что канцерогенез — комплексный многогранный механизм, воздействие на который и составляет сущность лечения.

Маркер D2-40 реагирует с О-связанным сиалогликопротеином, найденным на лимфатическом эндотелии, эмбриональном яичке и на поверхности тестикулярных гермином. Он может также служить селективным маркером лимфатического эндотелия в нормальных и патологических сосудистых тканях. Клон D2-40 показал окрашивание в эндотелии лимфангиом, тогда как гемангиомы, клубочковые опухоли, ангиолипомы, гнойные гранулемы и сосудистые пороки развития не демонстрировали окрашивания этим маркером. D2-40 также прокрашивает эндотелий саркомы Капоши и субпопуляции ангиосарком и кроме того является специфическим маркером для диагностики злокачественной мезотелиомы (рис. 2) [4].

**Материалы и методы.** Исследование выполнялось на материалах Онкологического диспансера г. Минска в течение 13 месяцев с 2009 по 2010 гг.

Критерии включения пациентов в исследование были следующие:

- 1) больные дети были рождены позднее 1987 г. (по замыслу исследования, после аварии на ЧАЭС);
- 2) все пациенты имели диагноз спорадического папиллярного рака щитовидной железы (на основе тонкоигльной биопсии и обследования удаленной опухоли);
- 3) возраст исследуемых — 9—18 лет;
- 4) у всех больных не было признаков явной врожденной болезни и значительной сопутствующей патологии.

Программное обеспечение было написано на Delphi (т.е. фактически объектно-ориентированном языке Pascal) для операционной системы Windows. Ключевая функция программного обеспечения — вычисление прокрашенной коричневым цветом области гистологического изображения. Изображения были получены при помощи микроскопа Leica DMD 108 с операционной системой Linux. Вручную, без сканера, сделаны

150 снимков, которые в основном визуально соответствовали области максимальной васкуляризации и были выбраны по зрительному оценочному решению одного исследователя как квадрат при увеличении 40, а затем сняты при увеличении 200. Все изображения были сохранены в формате tiff, приемлемом для программного обеспечения.

С помощью программного обеспечения выбран список числовых величин, который был импортирован в таблицу Excel. Интересуемые ряды данных адаптированы для программ SPSS 17, STATA 9.1, NCSS2007&GESS2006, DeltaGraph, SAS JMP, которыми затем посчитаны корреляционные пары Пирсона с двусторонним критерием (тестом) и выполнен дисперсионный анализ (one-way ANOVA) для зависимых параметров — чисел, полученных путем обработки изображений, и ряда клиничко-патоморфологических признаков: инфильтративный рост, экспансивный рост, подкапсулярный рост, тиреоидит Хашимото, папиллярная архитектура, фолликулярная архитектура, солидная архитектура, высококлеточный рак.

Метод применяемого выделения (компьютерной сегментации) лимфатических сосудов с целью их дальнейшего количественного оценивания основан на анализе цветового пространства гистологического изображения. Процедура выделения и анализа состоит из следующих этапов.

1. Преобразование цветовых компонент R-, G-, B-пикселей исходного изображения, представленного в цветовом пространстве RGB, в соответствующие цветовые компоненты в цветовом пространстве HSL (Hue — цветность, Saturation — насыщенность, Luminosity — освещенность). Преобразование реализовано на основе известных аналитических выражений, отображающих R-, G-, B-компоненты в H-, S-, L-компоненты. В результате выполнения преобразования каждый пиксель изображения характеризуется тремя численными значениями — H, S и L [5, 6].

2. Выделение пикселей изображения, представляющих сосуды. Пиксель изображения считается принадлежащим сосуду, если его цветовые компоненты удовлетворяют следующему условию:  $H < 0,12$  и  $L < 0,7$ .

3. Удаление «шумовых» компонент изображения, к которым относятся объекты с площадью менее 7 пикселей.

4. Анализ полученного в результате выполнения данной процедуры бинарного изображения лимфатической сети, который заключается в подсчете параметров, описывающих относительную площадь, занимаемую сосудами, однородность распределения сети в пространстве и относительную долю крупных сосудов.

5. Анализ полученного в результате выделения сосудов бинарного изображения лимфатической сети, который состоит в подсчете параметров, описывающих следующие свойства сети:

1) относительную площадь, занимаемую сосудами — S (ОПЗС). Общая сумма пикселей сосудов делится на совокупное количество пикселей изображения. В тексте статьи ПЛК и ОПЛС (относительная площадь лимфатических сосудов) — синонимы ОПЗС;

2) однородность (homogeneity, Hm) распределения сети в пространстве. Все изображение разбивается на 100x100 одинаковых фрагментов, затем определяется степень равномерности распределения выделенных пикселей по этим фрагментам. В данном случае определяется энтропия  $H = -\sum P_i \cdot \ln(P_i)$ , где  $P_i$  — частота (вероятность) попадания пикселя в i-й фрагмент. Величина изменяется от 0 (все в одном фрагменте) до 1 (равномерное распределение по всем фрагментам, пронормирована);

3) относительную долю мелких объектов сосудов (шума) — Ns (ОДМОС). На бинарном изображении удаляются граничные пиксели (в анализе изображений это называется эрозия), затем находится отношение площади сосудов нового изображения к площади сосудов исходного изображения. Величина изменяется от 0 (все сосуды мелкие, несоединяющиеся) до 1 (гистологическое изображение не содержит шум);

4) относительную долю крупных сосудов — Ns1 (ОДКС). На бинарном изображении многократно (6 раз) удаляются граничные пиксели. Находится отношение площади сосудов нового изображения к площади сосудов исходного изображения. Величина изменяется от 0 до 1 — крупные сосуды;

5) дополнительно (по исходному изображению) определяется среднее значение цветности выделяемых сосудов (СЗЦВС) (рис. 3, 4).

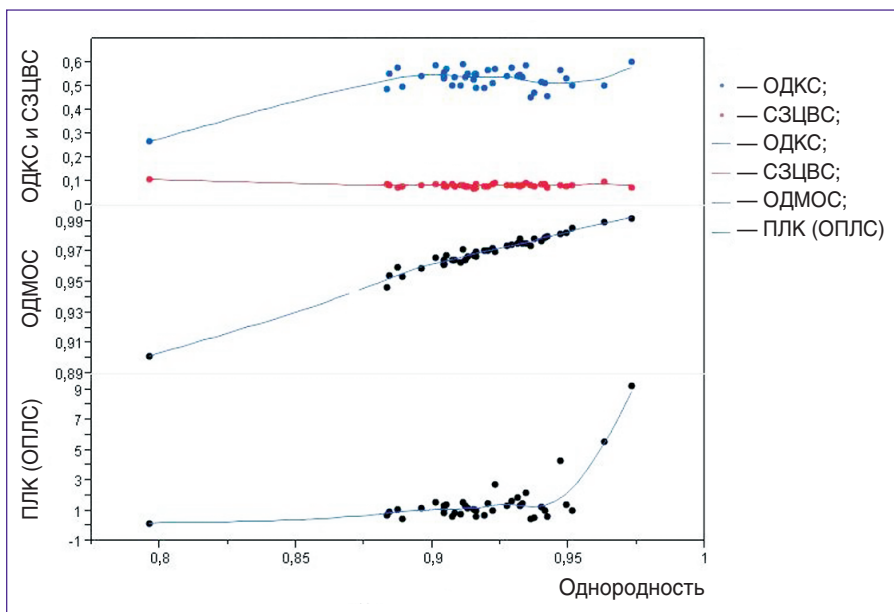
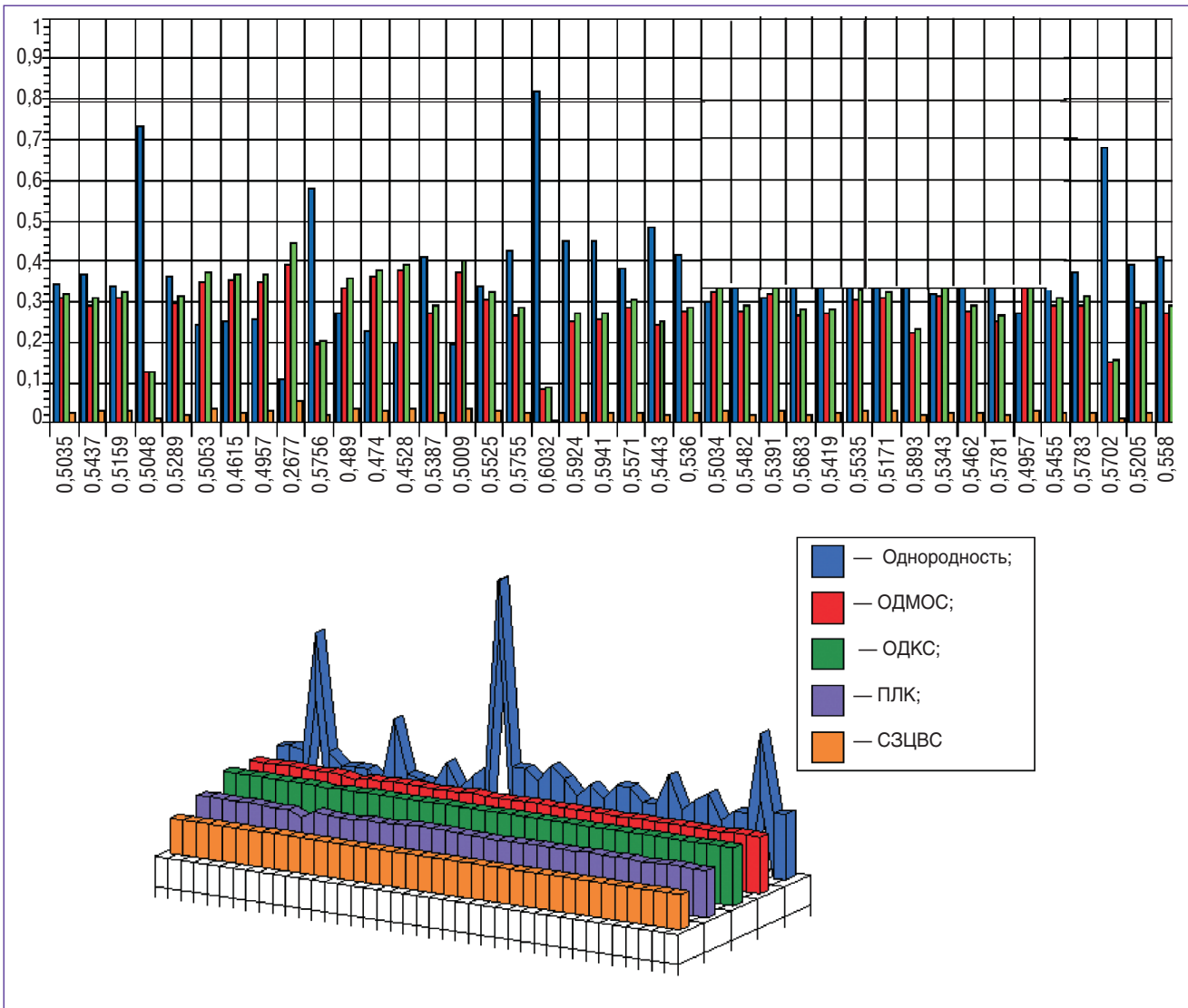


Рис. 3. Графики, демонстрирующие общее сравнение и взаимосвязи численных значений параметров изображений



**Рис. 4.** Графики, иллюстрирующие сравнение значений параметров изображений 40 опухолевых образцов: по оси x распределены значения относительной площади, занимаемой сосудами, по оси y — доли единицы; однородность — наиболее вариативный параметр

**Результаты.** Наше исследование было сфокусировано не на всестороннем анализе патоморфологии рака щитовидной железы, о которой немало написано [7—16], а на выявлении возможностей обработки изображений для изучения сети лимфатических капилляров. Мы под инфильтративным ростом понимаем диффузное распространение опухоли путем проникновения в окружающие ткани через стадию образования скоплений клеток-инфильтратов. Единственным клиничко-морфологическим показателем, который четко и статистически значимо ассоциировался с числовыми значениями параметров, полученных после обработки изображений опухолей, был инфильтративный рост опухоли (рис. 5, 6). Наблюдалась корреляция Пирсона относительной площади лимфатических микрососудов с этим параметром ( $\chi_2=032$ ); значение двустороннего теста равно 0,43 ( $p<0,05$ ). Результаты вычислений дисперсионного анализа параметров, по-

лученных при обработке изображений как зависимых и патоморфологических признаков как независимых, подтвердили закономерность, выявленную при анализе корреляционного матрикса Пирсона. Аналогичного исследования на группе пациентов с такими характеристиками (рис. 7, 8) никогда ранее не проводилось, и в литературе, касающейся компьютер-ассистированного изучения препаратов лимфангиогенеза, таких данных нет [17—26]. Опыт подобного исследования ангиогенеза имеется для органов, отличных от щитовидной железы [27—32].

**Заключение.** Обнаружена зависимость между инфильтративным ростом папиллярных карцином щитовидной железы и относительной площадью капиллярного лимфатического русла, измеренной на цифровых изображениях. Очевидные ограничения данного исследования: а) малое количество пациентов; б) применение только одной компьютерной программы для

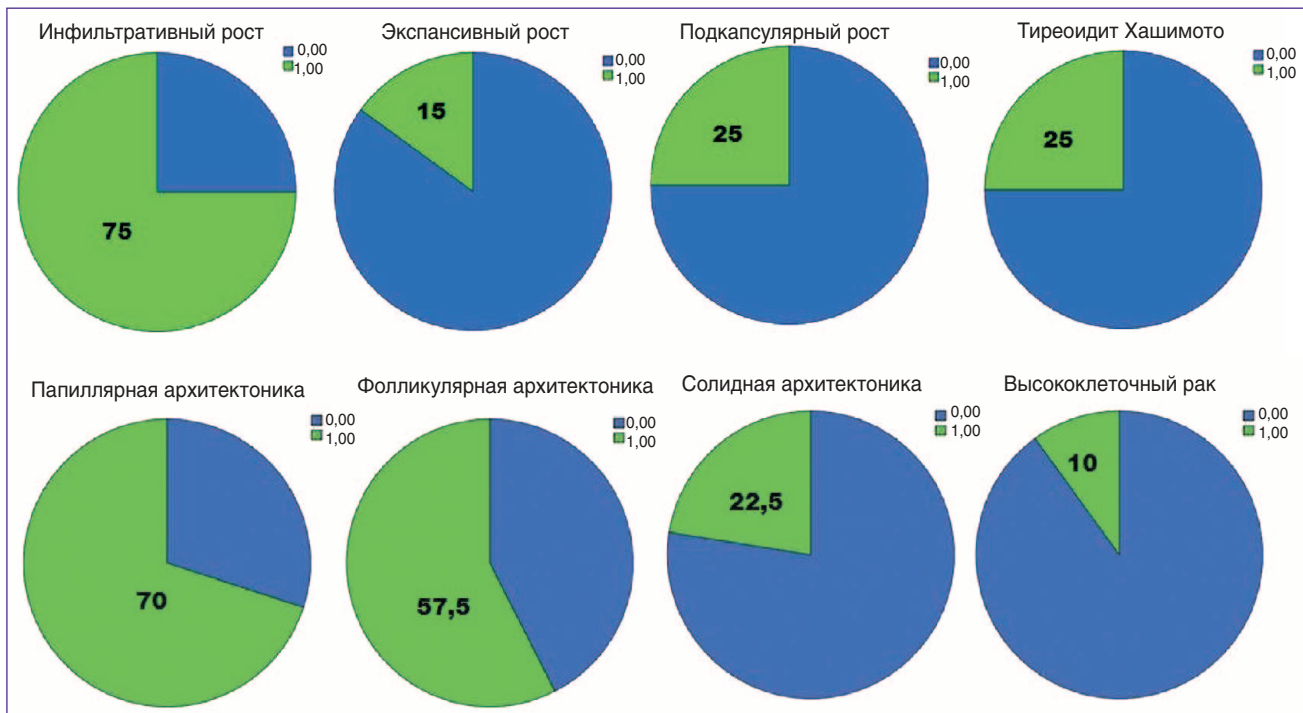


Рис. 5. Визуализированные патоморфологические данные исследуемых опухолей

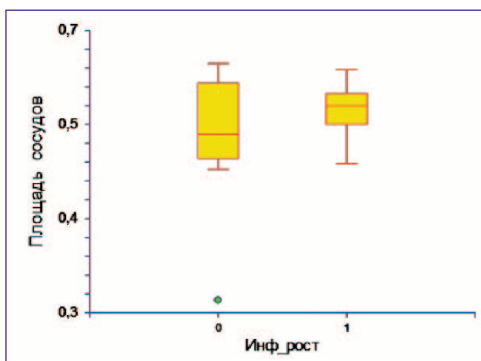


Рис. 6. Пределы значений площади сосудов при наличии (1) и отсутствии (0) инфильтративного роста опухоли. Инфильтративный рост ассоциируется с большими значениями площади сосудов

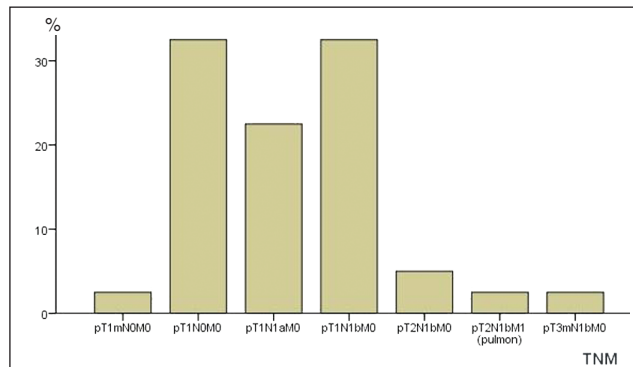


Рис. 8. TNM-распределение изучаемых опухолевых препаратов

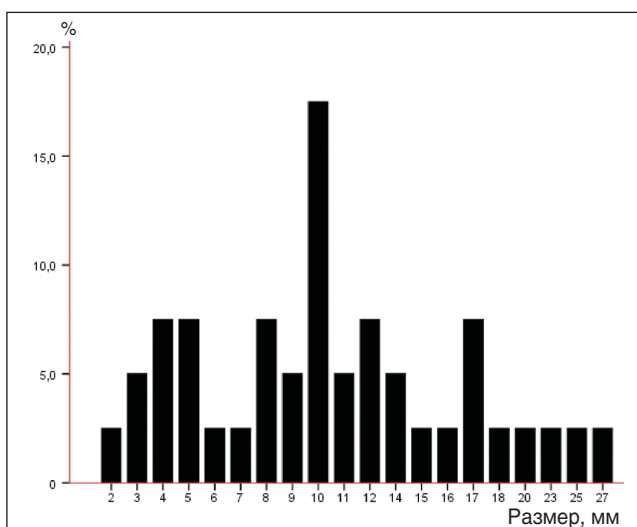


Рис. 7. Распределение опухолей по размеру

обработки изображений и неиспользование градикулы-сетки Chalkley; в) неоднородность пациентов; г) применение только одного иммунохимического маркера; д) использование неавтоматизированного субъективного выбора зон съемки изображений. Однако эти проблемы преодолимы при осуществлении широкомасштабного исследования.

Работа выполнена в рамках проектов CRDF-4028 и МНТЦ-1682.

**Литература**

- Hertzler A.E. Surgical pathology of the thyroid gland [print]. Philadelphia: J.B. Lippincott Co.; 1936.
- De Courcy J.L., De Courcy C.B. Pathology and surgery of thyroid disease [print]. Springfield, IL: C.C. Thomas; 1949.

3. *Kini S.R.* Thyroid cytopathology [print]: an atlas and text. 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
4. *Tanda F., Massarelli G., Bosincu L., Cossu A.* Angiosarcoma of the thyroid: a light, electron microscopic and histoimmunological study. *Hum Pathol* 1988 Jun; 19(6): 742—745.
5. <http://ru.wikipedia.org/wiki/HSL>.
6. *Гонсалес Р., Вудс Р.* Цифровая обработка изображений. М: Техносфера; 2005.
7. *Abrosimov A.* Thyroid cancer with cribriform-morular structures: the problems of morphology and classification. *Arkh Patol* 2008 Mar—Apr; 70(2): 18—21.
8. *Kroll T.G.* Molecular rearrangements and morphology in thyroid cancer. *Am J Pathol* 2002 Jun; 160(6): 1941—1944.
9. *Schroder S., Baisch H., Rehpenning W., Muller-Gartner H.W., Schulz-Bischof K., Sablotny B. et al.* Morphology and prognosis of follicular thyroid cancer — a clinicopathologic and DNA cytometric study of 95 tumors. *Langenbecks Arch Chir.* 1987; 370(1): 3—24.
10. *Meng W., Lorenz G.* Morphology and clinical picture of thyroid cancer. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 1983; 77(15): 635—638.
11. *Fagin J.A., Mitsiades N.* Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008 Dec; 22(6): 955—969.
12. *Reiners C., Demidchik Y.E.* Differentiated thyroid cancer in childhood: pathology, diagnosis, therapy. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003 Dec; 1(Suppl 2): 230—235.
13. *Asa S.L.* The pathology of thyroid cancer. *Cancer Treat Res* 2004; 122: 23—67.
14. *Squartini F., Di Coscio G.C.* Pathology and morphological diagnosis of thyroid cancer: current aspects, results and problems. *Minerva Med* 1986 Nov 17; 77(44): 2045—2048.
15. *Barney P.L.* Pathology of thyroid cancer: summary and update. *Laryngoscope* 1984 Apr; 94(4): 525—527.
16. *Farooki M.A.* Epidemiology and pathology of cancer of the thyroid. 2. Discussion. *Int Surg* 1969 Apr; 51(4): 317—333.
17. *de la Torre N.G., Buley I., Wass J.A., Turner H.E.* Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer* 2006 Sep; 13(3): 931—944.
18. *Liang Q.C., Wei Q.Y., Fan S.Q.* Expression of VEGF-C and angiogenesis, and lymphangiogenesis in papillary thyroid carcinoma. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006 Jun; 31(3): 414—419.
19. *Furtado G.C., Marinkovic T., Martin A.P., Garin A., Hoch B., Hubner W. et al.* Lymphotoxin beta receptor signaling is required for inflammatory lymphangiogenesis in the thyroid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Mar 20; 104(12): 5026—5031.
20. *Deng H.J., Huang X.C., Han S.L., Ding G.P.* Relationship between micro-lymphatic vessel density and lymphatic metastasis in follicular thyroid carcinoma. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2009 Jun; 25(6): 519—521.
21. *Garcia E.A., Simoes K., Wakamatsu A., Ressio R.A., Alves V.A., Longatto-Filho A. et al.* Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol* 2005 Jun; 21(2): 101—107.
22. *Giorgadze T.A., Baloch Z.W., Pasha T., Zhang P.J., Livolsi V.A.* Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesions of thyroid. *Mod Pathol* 2005 Nov; 18(11): 1424—1431.
23. *Hall F.T., Freeman J.L., Asa S.L., Jackson D.G., Beasley N.J.* Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003 Jul; 129(7): 716—719.
24. *Harin Cheong H.K., Hyung Kyung Kim Ji, Yoon Bae, Dong Eun Song, Min Sun Cho, Sun Hee Sung, Woon Sup, Han Heasoo Koo.* Microvessel and lymphatic vessel density and VEGFR-3 Expression of papillary thyroid carcinoma with comparative analysis of clinicopathological characteristics. *The Korean Journal of Pathology* 2010; 44(3): 243—251.
25. *Lin X., Zhu B., Liu Y., Silverman J.F.* Follicular thyroid carcinoma invades venous rather than lymphatic vessels. *Diagn Pathol* 2003; 5: 8.
26. *Van der Auwera I., Cao Y., Tille J.C., Pepper M.S., Jackson D.G., Fox S.B. et al.* First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006 Dec 18; 95(12): 1611—1625.
27. *Cao Y.* Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis? *Lymphat Res Biol* 2008; 6(3—4): 145—148.
28. *Gao Y., Zhong W.X., Mu D.B., Yuan Y.P., Zhang Y.H., Yu J.M. et al.* Distributions of angiogenesis and lymphangiogenesis in gastrointestinal intramucosal tumors. *Ann Surg Oncol* 2008 Apr; 15(4): 1117—1123.
29. *Sipos B., Klapper W., Kruse M.L., Kalthoff H., Kerjaszki D., Kloppel G.* Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors. *Am J Pathol* 2004 Oct; 165(4): 1187—1197.
30. *Jain R.K.* Angiogenesis and lymphangiogenesis in tumors: insights from intravital microscopy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 239—248.
31. *Reis-Filho J.S., Schmitt F.C.* Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? *Microsc Res Tech* 2003 Feb 1; 60(2): 171—180.
32. *Mattila M.M., Ruohola J.K., Karpanen T., Jackson D.G., Alitalo K., Harkonen P.L.* VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer* 2002 Apr 20; 98(6): 946—951.