

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
Московский НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
ИМЕНИ П. А. ГЕРЦЕНА
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ**

125284 Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3

**МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ТЕНАСЦИНА
В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЯХ**

Пособие для врачей

Москва 2008

УДК 616-006.6-076.5

ББК 55,6

3 13

Завалишина Л.Э., Петров А.Н., Андреева Ю.Ю., Батева М.В., Франк Г.А.
Метод количественной оценки тенасцина в злокачественных эпителиальных новообразованиях.

М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий». - 2008 - 20 с
ISBN 5-85502-088-6

В пособии показана возможность использования тенасцина в качестве маркера метастатического потенциала эпителиальных опухолей. Подробно описана автоматизированный метод количественной оценки экспрессии тенасцина в гистологических препаратах опухолей. Приведены примеры применения предложенного метода при изучении плоскоклеточного, аденогенного и переходного-клеточного рака некоторых локализаций. Полученные результаты должны учитываться для прогнозирования течения болезни у конкретного больного и выработки адекватного метода терапии.

Пособие предназначено для врачей-онкологов, патологоанатомов, научных работников онкологических учреждений.

Учреждение-разработчик: ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»

Авторы: д.б.н. Л.Э. Завалишина, к.м.н. А.Н. Петров, к.м.н. Ю.Ю. Андреева, М.В. Батева, член-корр. РАМН проф. Г.А. Франк.

Издается по решению ученого совета и редакционно-издательского совета ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий».

Ответственный за издание: профессор В. В. Старицкий

ISBN 5-85502-088-6

© Коллектив авторов, 2008 г.
© ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена
Росмедтехнологий», Москва, 2008 г.

Все права авторов защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современной онкологии является изучение свойств опухолей, которыми определяется ее метастатический и инвазивный потенциал. Плохой прогноз заболевания связан с биологической агрессивностью опухолей, одной из составляющих которой является способность к инвазии и метастазированию. Данные современной теоретической онкологии свидетельствуют о том, что инфильтративный рост опухолей и процесс их метастазирования осуществляются за счет последовательного взаимодействия различных биологических механизмов [9]. Среди последних большое значение придается изменениям в структуре белков межклеточного матрикса опухоли, вследствие чего ее клетки утрачивают адгезивные свойства, и приобретают способность к миграции и имплантации на отдалении. В строении различных опухолей выявлено замещение белков зрелой соединительной ткани (ламинина, коллагенов и фибронектина) на секретлируемый антиадгезивный гликопротеид тенасцин, способствующий миграции клеток и образованию метастазов. Поэтому изучение интенсивности экспрессии тенасцина может дать дополнительные данные для определения индивидуального прогноза течения заболевания.

ТЕНАСЦИН И ЕГО РОЛЬ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Тенасцин представляет собой гликопротеид с молекулярной массой 1,900 кД, имеющий гексамерную структуру с 6 субъединицами, прикрепленными к центральному домену. Молекула тенасцина имеет сложную структуру, поскольку на одной из ее терминалей располагаются лиганды, препятствующие адгезии клеточных мембран, а на другой локализуются белки, обеспечивающие образование межклеточных контактов [4,9,10]. Тенасцин представлен тремя вариантами — С, R, X. Он модулирует пролиферацию клеток, их миграцию, адгезию, супрессию иммунного ответа. Экспрессию тенасцина регулируют ростовые факторы и цитокины.

Впервые тенасцин С был описан как мезенхимальный антиген внеклеточного матрикса глиом, а и при последующих исследованиях глиом было показано, что его интенсивная экспрессия коррелирует с опухолевой стадией, что служит индикатором плохого прогноза [5], а также с пролиферацией и ангиогенезом в астроцитомах [7]. При раке прямой кишки была прослежена закономерность в увеличении количества тенасцина С при переходе от аденомы к карциноме, но при этом пациенты с тенасцин-положительной инвазивной карциномой имели боль-

шую выживаемость, чем при тенасцин-негативной [6]. Увеличение экспрессии тенасцина С, описанное при раке молочной железы, коррелировало со стадией опухоли [6]. В ряде работ показано, что количество фибронектина и тенасцина значительно увеличивается при карциноме *in situ* по сравнению с их количеством в нормальном эпителии гортани. Это увеличение происходит по всей строме опухоли, но особенно заметно на инвазивном фронте [4]. Аналогичные результаты получены и при исследовании высокодифференцированных эндометриом [8]. Та же тенденция прослеживается и в шейке матки при переходе от нормы к CIN I, к карциноме *in situ* и к инвазивной карциноме [4]. Изучение экспрессии тенасцина С при инвазивной карциноме мочевого пузыря показало, что увеличение его экспрессии в строме позитивно коррелирует со степенью дифференцировки и клинической стадией и может являться независимым прогностическим фактором [2, 6]. Интересно отметить, что в ряде исследований авторы отмечают наибольшую экспрессию тенасцина С в области инвазии опухоли, что может объяснять механизмы инвазии и метастазирования [2, 6]. На основании полученных данных ряд авторов предлагают использовать антитела к этому гликопротеиду для таргетной терапии некоторых опухолей мозга и такие испытания уже ведутся [8].

Определение тенасцина в качестве одного из показателей инвазивного потенциала опухолей, требует объективного метода оценки интенсивности его экспрессии, поскольку визуальная качественная или полуколичественная оценка связана с квалификацией исследователя и может быть ошибочной. Поэтому в отделении патологической анатомии МНИОИ им. П.А. Герцена был разработан метод количественной оценки тенасцина на оцифрованных изображениях микропрепаратов опухоли [1].

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Количественная оценка тенасцина основана на иммуногистохимической реакции с антителами к тенасцину.

Микропрепараты с иммуногистохимической реакцией имеют следующие особенности:

1. Белок экспрессируется в ткани неравномерно и может выходить за цитоплазматическую мембрану продуцирующих его клеток.
2. Микропрепараты отличаются исключительной гетерогенностью по оптической плотности внутри отдельных элементов, т.е. являются «объектами с нечеткими границами между элементами», что

создает большие проблемы при искусственном разграничении этих элементов.

з. При проведении иммуногистохимической реакции не происходит количественной окраски белка, т.е. интенсивность окраски не отражает однозначно количество экспрессировавшегося белка и, следовательно, необходимо учитывать элементы даже с минимальной окраской, незначительно отличающейся от фоновой. Докраска препарата гематоксилином, необходимая для определения его гистологической структуры, так же может повлиять на оценку пероксидазной реакции. При таких свойствах окраски достоверно можно определить только площадь участков ткани, в которых находится белок, но не его количественное содержание.

Эти особенности исследуемых микропрепаратов опухолей не позволяют напрямую определять их количественные характеристики с помощью специализированных программ анализа изображений (типа Leica QWIN, KS и т.д.), которые корректно работают только с изображениями объектов с четкими границами между элементами и гомогенными (внутри границ) элементами.

Поэтому для определения площади структур, содержащих тенасцин, необходимо исходное изображение микропрепарата привести к виду, пригодному для анализа.

С нашей точки зрения, следует четко разделять «обработку изображения» или приведение изображения к виду, пригодному для анализа с использованием специализированных программ, и «анализ изображения», т.е. извлечение количественной информации, содержащейся в изображении.

Наиболее простой метод выделения интересующих компонентов изображения - обводка вручную - при оценке иммуногистохимической реакции исключительно трудоемок и недостаточно точен из-за нечеткости границ между элементами, их протяженности и сложной формы.

Использование метода выделения окрашенных тканей с предварительной конвертацией в серое изображение и последующей бинаризацией по пороговому значению интенсивности окраски не позволяет корректно, без больших потерь, выделить значимые структуры препарата.

Нами предложен метод обработки изображений микропрепаратов, учитывающий отмеченные выше особенности микропрепаратов и позволяющий выделять структуры, экспрессирующие и/или содержащие тенасцин, требующий минимальной ручной коррекции.

Материал фиксируется 10% раствором формалина в течение 24 ч и заливается в парафин. Иммуногистохимические исследования проводятся на срезах толщиной 5 мкм с использованием антител к тенасцину (DAKO CytoMation) и детектирующей системы EnVision. Реакция проводится в стандартных условиях в иммуногистостейнере Avtostainer DAKO. Полученные препараты докрашиваются гематоксилином.

Для получения цветного изображения используется световой микроскоп LEICA DMRB, сопряженный с телекамерой ProgRes 3012 и компьютером.

Изображения захватываются при увеличении $100\times$, что соответствует размеру поля зрения $1,28\times 0,98$ мм при разрешении 1440×1100 пикселей (Эти параметры зависят от конкретной конфигурации оборудования.) С каждого микропрепарата следует захватывать по 3 наиболее репрезентативных поля зрения. Захват изображений проводится с одинаковыми настройками микроскопа, телекамеры и балансировки белого цвета, что позволяет проводить последующее сравнение изображений.

Цветовые и контрастные расхождения между компьютерным изображением и визуальной картиной участка микропрепарата минимальны (рис. 1).

Перед определением площадей, занимаемыми элементами изображения, необходимо искусственно провести между ними четкие границы. Для этого используют инструменты программы Adobe Photoshop 7,0 с последующей ручной корректировкой. Изображение открывается в программе Adobe Photoshop и дублируется в дополнительный слой. Все дальнейшие процедуры проводятся на дополнительных слоях. Результаты каждого шага обработки сохраняются в своем слое, что позволяет вносить корректировку в сложных случаях.

Исходное изображение (слой «Background») (рис. 2а) служит для визуальной оценки правильности последующей разметки препарата.

Последовательные шаги обработки изображения (названия инструментов приведены для англоязычной версии программы):

1. Регулируем яркостно-контрастные параметры, с помощью инструментов Images\Ajust\Levels и Images\Ajust\Curves, визуализируя слабую реакцию и, по возможности, удаляя фон (рис. 2б).
2. Сдвигаем цвета изображения с помощью инструмента Images\Ajust\HUE\Saturation, изменяя параметр HUE на $+84^\circ$. После этого цвет реакции вместо коричневого становится зеленым, синий цвет окрашенных гематоксилином ядер - пурпурным. Эта про-

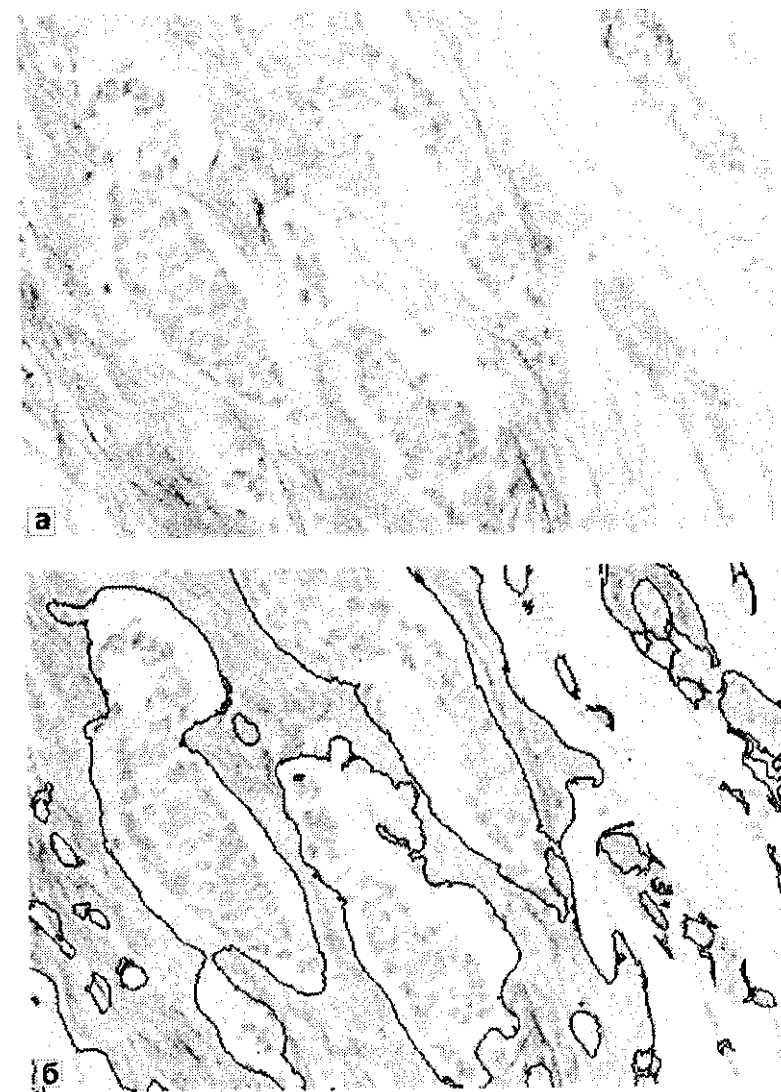


Рис. 1. Протоковый рак молочной железы, иммуногистохимическая реакция с антителами к тенасцину.

а - исходное изображение. $\times 400$

б - границы участков изображения с реакцией к тенасцину, полученные автоматизированным методом. Для лучшей визуализации границы подчеркнуты. $\times 400$

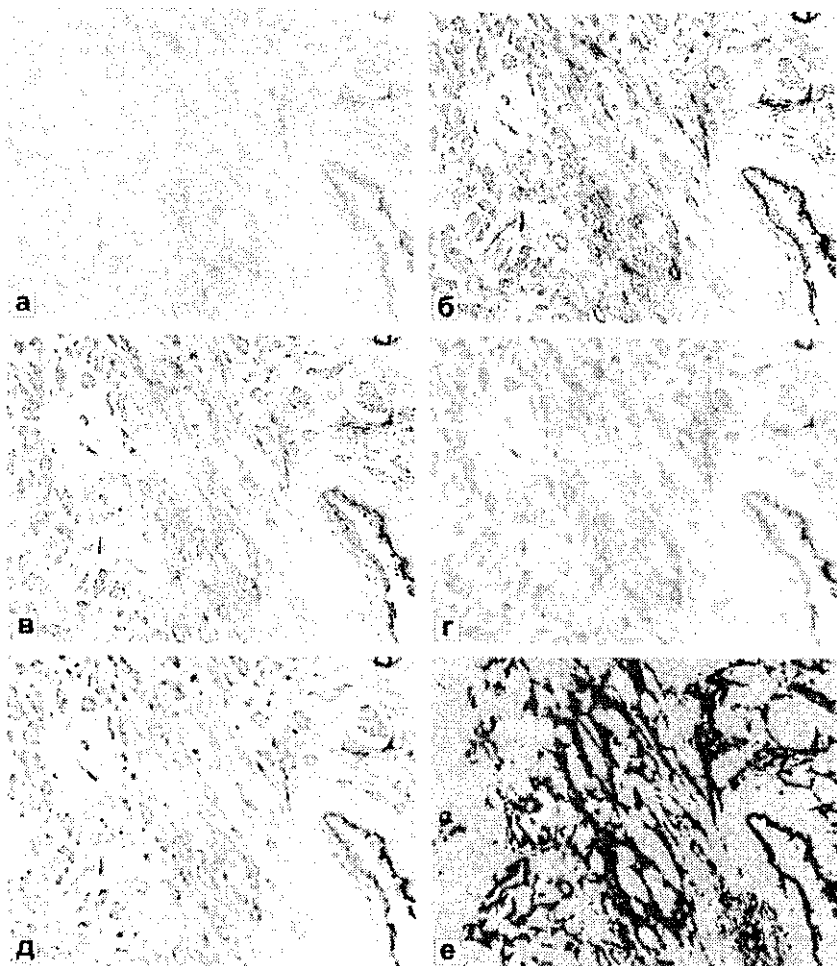


Рис. 2. Протоковый раж молочной железы, иммуногистохимическая реакция антителами к тенасцину. Последовательность выделения участков, содержащих тенасцин. xКЮ (объяснение в тексте).

цедура повышает цветовой контраст изображения, облегчая визуальное выделение участков со слабой окраской белка (рис. 2в).

3. Размываем изображение с помощью инструмента `Filters\Blur\Gaussian blur` для усреднения яркостных параметров соседних пикселей изображения, чтобы участки ткани, содержащие тенасцин, оказались более равномерно окрашены. В данной работе мы использовали размытие с радиусом 4,9 пиксела, как обеспечивающее достаточную равномерность окраски структур и, в то же время, существенно не увеличивающее их площадь (рис. 2г).

4. Поскольку инструмент `Filters\Blur\Gaussian blur`, примененный на предыдущем этапе, не только усредняет окраску структур, содержащих белок, но и размывает их границы, фактически делая их еще более нечеткими, чем в исходном изображении, применяем `Filters\Sharpen\Unsharp mask` с радиусом примерно в два раза больше, чем использовавшийся в `Filters\Blur\Gaussian blur`, что позволяет получить на изображении более четкую границу между участками с/без реакции (интенсивность использования инструментов зависит от качества гистологического препарата и размера изображения в пикселях, т.е. фактически требует индивидуального подбора) (рис. 2д).

5. Инструментом `Lasso` выделяем несколько участков изображения без реакции и с помощью `Select/Similar` выделяем все подобные участки изображения.

6. Инструментом `Magic Wand` в режиме «continuous» добавляем к существующему выделению не попавшие в него элементы (например, плотно прокрашенные ядра клеток). Чувствительность (диапазон значений пикселей относительно точки выделения) инструмента подбирается под конкретное изображение. В результате на изображении оказываются выделенными все участки/структуры, не содержащие тенасцин.

7. Инструментом `Select\Grow` «обжимаем» участки с реакцией. В результате этого выделяются все прилежащие к существующему выделению пиксели с чувствительностью, установленной на предыдущем шаге. Этот шаг необходим из-за того, что участки изображения с интенсивной реакцией после применения `Filters\Blur\Gaussian blur` могут занимать значительно большую площадь, чем соответствующие исходные структуры.

Однако, при этом могут быть потеряны выделенные части структур со слабой реакцией.

8. Инвертируем выделение (Select/Invers). Выделенными оказываются структуры, содержащие тенасцин.

9. Контролируем точность выделения на исходном изображении. (Слой Background). Если на 7 этапе было потеряно выделение части интересующих структур, инструментом Magic Wand (чувствительность в 2 - 3 раза ниже, чем на этапе 6) с отключенным режимом «continuous» добавляем к существующему выделению утерянные элементы.

10. Сохраняем окончательное выделение в а-канале.

11. Создаем пустой слой. Инструментом Edit\Fill закрашиваем выделение красным цветом. Инвертируем выделение (Select\Invers) и инструментом Edit/Fill закрашиваем его голубым цветом, (рис. 2e)

Таким образом, получается изображение, где все структуры, содержащие тенасцин, закрашены красным цветом, не содержащие - голубым; при этом отсутствует оптическая гетерогенность внутри соответствующих областей изображения. Граница между структурами четкая, структуры однозначно определяются программами анализа изображений.

Правильность выделения компонентов изображения проверяется визуально по исходному изображению при изменении в панели «Layers» прозрачности (Opacity) рабочего слоя либо после добавления выделения из а-канала (рис. 16).

Результирующий файл содержит всю информацию о процессе обработки изображения, что позволяет оперативно возвращаться к любому этапу для эффективной корректировки.

Затем определяется площадь структур, содержащих тенасцин с помощью программы Leica QWIN 5501W.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Количественная оценка тенасцина проводилась нами в карциномах различного гистогенеза и локализации: аденокарцинома молочной железы, переходно-клеточный рак мочевого пузыря, плоскоклеточный рак легкого. Для всех указанных локализаций были получены сходные результаты.

Материалом для исследования послужили 27 случаев протокового рака молочной железы, разделенных на 4 группы по наличию или отсутствию метастазов и интенсивности экспрессии онкопротеина с-erbB-2 (HER-2/neu), являющегося для рака молочной железы фактором плохого прогноза (табл. 1); 32 образца опухолей мочевого пузыря, разделенных на группы по клинической стадии и наличию или отсутствию метастазов; 12 случаев плоскоклеточного рака легкого с наличием или отсутствием метастазов в регионарных лимфатических узлах.

Таблица 1

Распределение опухолей молочной железы в зависимости от метастазов в лимфатических узлах и интенсивности экспрессии онкопротеина HER-2/neu

Группа	Количество опухолей с метастазами в лимфатических узлах	Количество опухолей без метастазов в лимфатических узлах	Реакция с антителами к HER-2/neu
1-я	5		3+
2-я	4		0
3-я		9	3+
4-я		9	0

В результате проведенных исследований были получены следующие данные (табл. 2)

Таблица 2

Площади полей зрения, занятые структурами, содержащими тенасцин в протоковом раке молочной железы

1-я группа (n=5)	2-я группа (n=4)	3-я группа (n=9)	4-я группа (n=9)
66,178	59,034	6,193	0,739
69,087	6,365	8,843	13,15
55,604	68,825	16,834	29,155
34,347	26,537	20,694	3,934
24,925		31,836	11,409
		31,422	0,92
		10,171	26,256
		44,414	26,506
		10,223	26,077
Среднее значение			
50,082	40,19	20,07	15,34

В опухолях молочных желез 1-й и 2-й групп отмечается существенно большая площадь структур, содержащих тенасцин, независимо от экспрессии HER-2/neu.

В группах без метастазов структуры, содержащие тенасцин, занимают меньшую площадь. При этом в 3-й и 4-й группах отмечены случаи, в которых площадь структур, содержащих тенасцин, превышает среднее значение для группы в 1.5-2 раза. Возможно, что метастатический потенциал этих опухолей просто не успел реализоваться ко времени проведения данного исследования.

Результаты количественного определения тенасцина в уротелн-алы-юй карциноме мочевого пузыря представлены в табл. 3.

Таблица 3

Площади полей зрения (%), занятые структурами, содержащими тенасцин в уротелиальной карциноме мочевого пузыря

1-я группа (n=12)	2-я группа (n=6)	3-я группа (n=7)	4-я группа (n=7)
T2b N0	T2b N+	T3a N0	T3a N+
0,738	69,087	31,422	26,185
3,943	34,180	6,193	34,25
11,508	68,263	8,843	68,895
0,734	48,174	10,171	40,783
25,137	55,137	0,872	59,634
15,38	24,113	4,365	24,139
2,593		44,414	55,604
8,236			
24Д67			
12,7			
0,92			
29,155			
Среднее значение			
11,27	49,83	15,17	44,21

В группах опухолей с наличием метастазов отмечается значительно большая площадь структур, содержащих тенасцин (в 3-4 раза) по сравнению с группами без метастазов. При этом в группах с отсутствием метастазов также выявлены образцы, в которых площадь структур, содержащих тенасцин, превышает среднее значение в 2 - 2.5 раза.

Результаты исследования тенасцина в плоскоклеточном раке легкого в группах с метастазами и без метастазов приведены в табл. 4.

Таблица 4

Площади полей зрения (%), занятые структурами, содержащими тенасцин в плоскоклеточном раке легкого

Группа с метастазами (n=7)	Группа без метастазов (n=5)
47,664	27,548
39,231	13,014
57,703	32,423
63,584	30,186
28,04	49,151
41,351	
62,696	
Среднее значение:	
48,6	30,5

Для этой локализации рака также обнаружено, что в группе с наличием метастазов отмечается увеличение площади структур, содержащих тенасцин более чем в 1,5 раза, а в группе опухолей без метастазов встречаются случаи с увеличенным содержанием тенасцина по сравнению со средними значениями.

Таким образом, с использованием предложенного автоматизированного метода, было выявлено, что в группах с наличием метастазов

независимо от локализации рака и его гистологического типа (аденогенный, плоскоклеточный, переходно-клеточный) выявлено значительное увеличение площади структур, содержащих тенасцин, а в группах без метастазов обнаружены образцы с экспрессией тенасцина значительно превышающий средний уровень, что может указывать на более высокий метастатический потенциал этих опухолей. Применение предложенного метода дает важную информацию о биологической агрессивности отдельной опухоли, дополняет другие клинико-морфологические показатели и результаты, полученные с его помощью должны учитываться для определения индивидуального прогноза и выбора адекватного лечения. Метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть рекомендован для использования в крупных онкологических учреждениях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завалишина Л.Э., Петров А.Н., Андреева Ю.Ю. // Архив патологии.- 2005.-№6. -с.21-24.
2. Brunner A., Vaverl C, Tzankov A et al //J.Clin Pathol. - 2004. - Vol. 57(9) - p. 927-931.
3. Coogan C.L., Estrada C.R., KapurS. etal. // Urology- 2004.- Apr.-Vol.63.- N4.R786-90.
4. Chiquet-Ehrismann R., Kalla P., Pearson C.A. // Cancer Res. - 1989.- Vol. 49.- P. 4322-4325.
5. Herold-Mendle C, Mueller MM., Bonsanto MM. et al // Int. Cancer. - 2002. - Vol.98. - P.362369
6. Ioachim E., Michael M., Stavropoulos N.E. et al. // BJU Int. - 2005. - Vol.95(4) - P.655-659.
7. Kim С.Л., Bak K.H., Kim Y.S. et al. // Surg neurol. - 2000. - Vol.54. - P.235-240.
8. KorshunovA., Golanov A., Timirgaz V. //J Neurol Sci. - 2000. - Vol.177. - P.72-82.
9. LevineA.L., SchmidekH.H. Molecular genetics of nervous system tumors.- New-York, Wiley-Liss., 1993.
10. Lightner V.A., Erickson H.P. // I. Cell Science.- 1990.- Vol. 95.- P. 263-277.
11. San Miguel Fraile P., Anton Badiola L Ortiz ReyJ.A. et al // Actas Urol Esp.- 2003.- Sep.-Vol.27.-N8.-P.587-93.
12. WangC, LiuX., WangL., etal // Zhonghua Bmg Li Xue Za Zhi. -2000.- Feb.-Vol.29.-N1.-P.20-3.