

© С.Х.Аль-Шукри, М.Г.Рыбакова, И.А.Корнеев, Г.М.Нутфулина, Е.С.Завьялова, 2007
УДК 616.62-006.6-073.96

*С.Х. Аль-Шукри, М.Г. Рыбакова, И.А. Корнеев, Г.М. Нутфулина,
Е.С. Завьялова*

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПЬЮТЕРНОГО КАРИОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕХОДНО-КЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

S.Kh. Al-Shukri, M.G. Rybakova, I.A. Korneev, G.M. Nutfulina, E.S. Zaviyalova

USE OF A COMPUTED KARYOMETRIC ANALYSIS FOR STUDYING TRANSITIONAL CELL CARCINOMAS OF THE URINARY BLADDER

Кафедры урологии и патологической анатомии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: Изучить кариометрические особенности клеток переходно-клеточных карцином мочевого пузыря, сопоставить их с клиническими данными, глубиной инвазии и степенью дифференцировки рака. **ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ.** Ретроспективно изучены материалы клинического обследования 12 больных переходно-клеточным раком мочевого пузыря. Глубина инвазии рака Tis, Ta, T1, T2, T3 и Tx была выявлена в 1(7%), 4(29%), 1(7%), 1(7%), 1(7%) и 6(43%), а степень дифференцировки G1, G2 и G3 – в 8(57%), 4(29%) и 2(14%) препаратах соответственно. В послеоперационном периоде рецидивы были выявлены у 6(50%) человек, средняя продолжительность безрецидивного промежутка составила 4±1 мес. 3(25%) пациентов умерли от прогрессирования рака. При увеличении 250х изображение 10 полей зрения опухолевой ткани было подвергнуто компьютерной обработке при помощи программы «ВидеоТест Морфо 4.0», рассчитаны 162 признака клеточных ядер. **РЕЗУЛЬТАТЫ:** Кариометрические показатели были связаны с полом ($p=0,05$) и возрастом больных ($p=0,004$), размерами ($p=0,009$), множественностью ($p=0,013$), глубиной инвазии ($r=0,73$; $p=0,04$) и степенью дифференцировки ($p=0,011$) новообразований. Выживаемость больных без прогрессирования рака оказалась связана с 92 морфометрическими параметрами ($p<0,05$). Ни один из исследованных признаков не указывал на рецидивирующее течение заболевания. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Кариометрические особенности клеток переходно-клеточных карцином мочевого пузыря соответствуют клинической картине заболевания и морфологическим особенностям опухолей, а также указывают на вероятность прогрессирования рака после хирургического лечения.

Ключевые слова: переходно-клеточная карцинома мочевого пузыря, кариометрия, прогноз.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study karyometric features of the cells of transitional cell carcinomas of the urinary bladder, to compare them with clinical data, invasion depth and the degree of cancer differentiation. **PATIENTS AND METHODS.** Materials of clinical examinations of 12 patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder were studied retrospectively. The carcinoma invasion depth Tis, Ta, T1, T2, T3 and Tx was detected in 1(7%), 4 (29%), 1(7%), 1(7%), 1(7%) and 6(43%), the differentiation degree G1, G2 and G3 – in 8(57%), 4(29%) and 2(14%) preparations respectively. In the postoperative period recurrences were noted in 6(50%) patients, the average duration of the recurrence-free period was 4±1 month. 3(25%) patients died of cancer progression. Under 250x magnification the picture of 10 fields of vision of the tumor tissue were processed with a computer using the program "Video Test Morpho 4.0", 162 signs of cell nuclei were calculated. **RESULTS.** Karyometric indices were associated with the gender ($p=0.05$) and age of the patients ($p=.004$), sizes ($p=0.009$), multiplicity ($p=0.013$), invasion depth ($r=0.73$; $p=0.04$) and differentiation degree ($p=0.011$) of the neoplasms. Survival of the patients without progressing carcinomas proved to be associated with 92 morphometrical parameters ($p<0.05$). None of the signs studied pointed to the recurrent course of the disease. **CONCLUSION.** Karyometric features of the cells of the transitional cell carcinomas of the urinary bladder correspond to the clinical picture of the disease and morphometrical features of the tumors, and also point to the probability of progressing carcinoma after surgical treatment.

Key words: transitional cell carcinoma of the urinary bladder, karyometry, prognosis.

ВВЕДЕНИЕ

Переходно-клеточные карциномы мочевого пузыря составляют 3-6% от всех новообразований человека и в структуре онкологической заболеваемости занимают 11-е место с частотой 10 – 15 случаев на 100 000 человек в год [1]. Число больных первично диагностированным раком мочево-

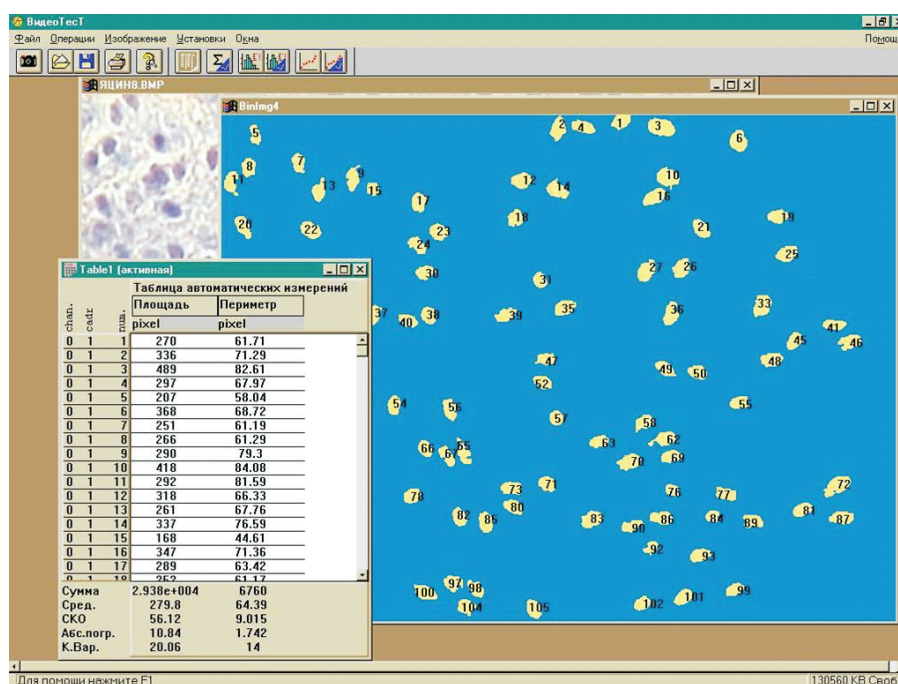
го пузыря непрерывно возрастает, что, по-видимому, обусловлено увеличением экспозиции к канцерогенным веществам и улучшением диагностики ранних стадий болезни [2]. В настоящее время установлено, что отдаленные результаты лечения больных, принадлежащих к одним и тем же классификационным подгруппам и получавших одина-

ковое лечение, существенно различаются. Очевидно, что термин «карцинома мочевого пузыря» объединяет группу разнородных по своей биологической активности опухолей, а современная классификация по системе TNM и G, предложенная Международным Противораковым Союзом, не позволяет полноценно прогнозировать их биологическое поведение [3]. В связи с этим многие исследовательские группы занимаются поиском дополнительных прогностических факторов, позволяющих уточнить злокачественный потенциал новообразований и выбрать адекватный метод лечения. Одним из направлений этих исследований является компьютерная морфометрия, которая позволяет получить представление о пролиферативной активности опухоли на основании количественной оценки параметров ядер опухолевых клеток. В отечественной литературе нами не обнаружено подобных работ, а единичные зарубежные публикации на эту тему противоречивы и опираются на методики, не получившие широкого распространения в России [4,5,6]. Целью настоящего исследования явилось изучение карцином мочевого пузыря при помощи компьютерной морфометрии, а также сопоставление полученных данных с гистологическими и клиническими характеристиками рака.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективно изучены материалы клинического обследования 12 больных переходно-клеточным раком мочевого пузыря, в связи с которым им было проведено 14 трансуретральных резекций (7 (50%) – первичных и 7 (50%) – по поводу рецидивов) в клинике урологии СПбГМУ им.акад. И.П. Павлова в 1995–2001 гг. Соотношение мужчин и женщин составило 5:1, средний возраст пациентов – 61 ± 3 год. В 6 (43%) случаях опухоли были одиночные, в 8 (57%) – множественные, их размеры варьировали от 1 до 4,5 см и в среднем составили $2 \pm 0,4$ см, у 9 (64%) больных карциномы располагались в области мочепузырного треугольника.

Операционный материал был подвергнут обзорному гистологическому анализу на срезах тол-



Микрофото, увеличение $\times 250$. Переходно-клеточный рак мочевого пузыря, окраска гематоксилином и эозином. В рабочем окне программы «ВидеоТест Морфо» определяются выделенные ядра опухолевых клеток.

щиной 5–7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином при увеличении $40\times$. Глубина инвазии рака Tis, Ta, T1, T2, T3 и Tx была выявлена в 1 (7%), 4 (29%), 1 (7%), 1 (7%), 1 (7%) и 6 (43%), а степень дифференцировки G1, G2 и G3 – в 8 (57%), 4 (29%) и 2 (14%) препаратах соответственно.

После операции больные находились под регулярным диспансерным наблюдением в течение 60–99 мес. (в среднем – 75 ± 3 мес.), рецидивы были выявлены у 6 (50%) человек, средняя продолжительность безрецидивного промежутка составила 4 ± 1 мес. 3 (25%) пациента умерли от интоксикации на фоне множественного метастазирования рака.

Методика морфометрического анализа

При увеличении $250\times$ изображение 10 полей зрения опухолевой ткани в приготовленных по стандартной методике и окрашенных гематоксилином и эозином срезах толщиной 5–7 мкм через видеокамеру было трансформировано в цифровой формат и далее подвергнуто компьютерной обработке при помощи программы «ВидеоТест Морфо 4.0» (см. фото). При этом были контрастированы границы клеточных ядер и для каждого из них рассчитаны 18 параметров (площадь, периметр, длина, ширина, средняя хорда, округлость, удлиненность, проекция ядра на оси X и Y мерной шкалы поля зрения, средний габарит, фактор круга, фактор эллипса, эквивалентный диаметр, максимальная и минимальная оси эллипса, а также минимальный, средний и максимальный диаметры Фере), ха-

рактизирующих форму и размер ядра. Для каждого параметра ядер в поле зрения были рассчитаны показатели распределения: среднее, минимальное и максимальное значения, коэффициент вариации, стандартное отклонение, сумма, медиана, геометрическое и гармоническое средние значения. Таким образом в каждом поле зрения были рассчитаны значения 162 признаков клеточных ядер. Достоверность связей между клиническими и морфометрическими параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона, критерия Стьюдента, рангового критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе полученных данных были выявлены закономерности строения ядер опухолевых клеток, соответствующие значениям клинических и морфологических признаков.

Более крупные ядра переходно-клеточных карцином были обнаружены у мужчин ($r=0,53$; $p=0,05$). У пациентов старшего возраста ядра имели более округлую форму ($r=0,71$; $p=0,004$), меньшую длину ($p=0,58$; $r=0,029$), периметр ($r=0,56$; $p=0,038$), а также размеры максимальной оси эллипса ($r=0,55$; $p=0,041$) и габариты ($r=0,54$; $p=0,045$).

Выявлены различия размеров и формы ядер в зависимости клинических характеристик новообразований. Так, для опухолей больших размеров были характерными большая площадь ($r=0,67$; $p=0,024$), минимальный диаметр Фере ($r=0,68$; $p=0,022$), минимальная средняя ось эллипса ($r=0,73$; $p=0,01$), ширина ($r=0,74$; $p=0,009$), средняя хорда ($r=0,67$; $p=0,023$), эквивалентный диаметр ($r=0,68$; $p=0,017$), фактор эллипса ($r=0,65$; $p=0,032$) и габарит ядра ($r=0,61$; $p=0,046$). Большие значения площади ($t=2,33$; $p=0,038$), периметра ($t=2,68$; $p=0,02$), длины ($t=2,58$; $p=0,024$), габарита ($t=2,51$; $p=0,027$), максимального и среднего диаметров Фере ($t=2,54$; $p=0,027$ и $t=2,68$; $p=0,02$ соответственно), максимальной средней оси эллипса ($t=2,52$; $p=0,027$), проекции ядра на ось X и Y ($t=2,24$; $p=0,045$ и $t=2,89$; $p=0,013$ соответственно), эквивалентного диаметра ($t=2,21$; $p=0,047$) были обнаружены в множественных опухолях. Для ядер карцином, расположенных на задней стенке мочевого пузыря, были характерными эллипсоидная форма ($t=2,95$; $p=0,012$) и меньшая округлость ($t=2,2$; $p=0,048$).

Обнаружены различия строения ядер переходно-клеточных карцином с различной глубиной инвазии и степенью дифференцировки. Вростанию в стенку мочевого пузыря соответствовало увеличение минимального значения средней величины хорды ядра ($r=0,73$; $p=0,04$), а нарастанию анапла-

зии – увеличение степени эллипсоидности ядер ($t=3,31$; $p=0,011$) и большей неоднородности (SD) этого показателя ($t=3,3$; $p=0,011$).

92 морфометрических параметра оказались достоверно связанными с выживаемостью больных от опухолевой прогрессии ($p<0,05$), при этом большим размерам ядер соответствовала меньшая продолжительность жизни после оперативного лечения. Ни один из исследованных признаков не указывал на рецидивирующее течение заболевания ($p=n.s.$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в процессе деления клеток меняется размер и форма ядер. Кроме того, известно, что новообразования, в которых находится большое число делящихся клеток, являются быстро растущими и быстро прогрессирующими. В связи с этим для оценки агрессивности опухоли предлагали определять число митозов и рассчитывать величину митотического индекса [7]. Широкому применению этой методики препятствовала низкая воспроизводимость полученных результатов, обусловленная невысокой точностью измерений и субъективизмом оценки. Используемая в нашей работе методика компьютерной морфометрии дает возможность преодолеть эти недостатки и предоставить точную объективную характеристику большого числа ядер опухолевых клеток [8].

Для понимания закономерности изменений формы и размеров ядер опухолевых клеток у пациентов мужчин и женщин разного возраста требуется продолжение исследований. Известно, что карциномы мочевого пузыря встречаются у мужчин чаще, чем у женщин, что, возможно, обусловлено различиями содержания половых гормонов. Гормональный статус человека претерпевает существенные изменения с возрастом. Не исключено, что гормональная чувствительность клеток уротелия проявляется и на светооптическом уровне в виде особенностей клеточного строения и формы ядер.

Выявленные в нашей работе особенности изменения клеточных ядер переходно-клеточных карцином, сопровождающие увеличение глубины инвазии и утрату дифференцировки, подтверждают представление о более агрессивном поведении новообразований с большим числом делящихся клеток различной формы и размеров.

Наибольший интерес представляют морфометрические особенности опухолей мочевого пузыря, связанные с выживаемостью больных в послеоперационном периоде. Принимая во внимание большое число признаков, которые, с одной стороны,

оказались тесно связаны с прогрессированием рака, а, с другой стороны, не зависели от традиционных классификационных характеристик – глубины инвазии и степени дифференцировки, на основании полученных данных можно предположить независимое прогностическое значение морфометрических параметров клеточных ядер. Продолжение работ в этом направлении может позволить уточнить факторы, дополняющие прогностическое значение существующих в настоящее время классификационных категорий – pT и G. К аналогичному выводу пришли и другие исследователи, проводившие изыскания в этой области [9–12].

Авторы выражают глубокую благодарность к.м.н. В.В.Козлову за помощь в статистической обработке результатов обследования больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обнаруженные в нашей работе закономерности изменений формы и размеров ядер опухолевых клеток позволяют подтвердить высокую информативность компьютерной морфометрии и рекомендовать продолжение исследований для уточнения ее прогностической ценности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Матвеев БП, ред. *Клиническая онкоурология*. Вердана, М; 2003
2. Plesko I, Obsitnikova A, Cuninkova M et al. Increasing occurrence of urological cancers. *Neoplasma* 2004; 51: 248-254
3. Аль-Шукри СХ, Ткачук ВН. *Опухоли мочеполовых органов*. СПб: Питер; 2000
4. Aoyama T, Fujikawa K, Sasaki M. Prognostic criteria in patients with renal pelvic and ureteral cancers—clinical value of volume weighted mean nuclear volume. *Hinyokika Kyo* 1996; 42(11): 841-845
5. Van der Poel HG, Van Cauberg RD, Boon ME et al. Kariometry in recurrent superficial transitory cell tumors of the bladder. *Urol Res* 1992; 20(5): 375-381
6. Ramos D, Ruiz A, Morell L et al. Prognostic value of morphometry in low grade papillary urothelial bladder neoplasms. *Anal Quant Cytol Histol* 2004; 26(5): 285-294
7. Lipponen PK, Kosma VM, Collan Y et al. Potential of nuclear morphometry and volume-corrected mitotic index in grading transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol* 1990; 17(4): 333-337
8. Wojcik EM, Miller MC, O'Dowd GJ, Veltri RW. Value of computer-assisted quantitative nuclear grading in differentiation of normal urothelial cell from low and high grade transitional cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20(1): 69-76
9. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhainen K et al. Prediction of superficial bladder cancer by nuclear image analysis. *Eur J Cancer* 1992; 29A(1): 61-65
10. Fukuzawa S, Hashimura T, Sasaki M et al. Nuclear morphometry for improved prediction of the prognosis of human bladder carcinoma. *Cancer* 1995; 76(10): 1790-1796
11. Pich A, Chiusa L, Comino A, Navone R. Cell proliferation indices, morphometry and DNA flow cytometry provide objective criteria for distinguishing low and high grade bladder carcinomas. *Virchows Arch* 1994; 424(2): 143-148
12. Yang QB, Xia YZ, Wang ZY et al. Morphometric diagnosis of bladder tumor. *Oncology* 1991; 48(3): 188-193

Поступила в редакцию 26.02.2007 г.

Принята в печать 07.06.2007 г.