

УДК 616.37-006.6-091.8:57.08:004

А.В. Євсєєв*Кафедра патологічної анатомії і судової медицини (зав. – проф. В.О. Туманський)
Запорізький державний медичний університет*

КОМП'ЮТЕРНО-МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА КЛІТИН ПРОТОКОВОЇ АДЕНОКАРЦИНОМИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме. У роботі з використанням методу прямої комп'ютерної морфометрії визначені планіметричні та денситометричні параметри клітин протокової аденокарциноми підшлункової залози. Показані вірогідні відмінності між площею, периметром, коефіцієнтом форми й оптичною щільністю злоякісних клітин та їх ядер у різних компартментах пухлини. Визначена відсутність кореляційного зв'язку між більшістю морфометричних параметрів в усіх досліджуваних структурах протокового раку. За допомогою варіаційного аналізу охарактеризовані кількісні морфометричні параметри клітинного і ядерного поліморфізму та показані їх відмінності у різних компартментах пухлини.

Ключові слова: рак підшлункової залози, морфометрія.

Протокова аденокарцинома (ПА) є найбільш розповсюдженою злоякісною пухлиною підшлункової залози (ПЗ). На її частку припадає 85-90% всіх панкреатичних пухлин [1]. Рак ПЗ є смертельним захворюванням, яке характеризується відсутністю ранніх симптомів і пізньою діагностикою. Показники захворюваності і летальності практично ідентичні, оскільки коефіцієнт виживаємості у ПА вкрай низький. Мікроскопічно ПА ПЗ характеризуються добре розвиненими залозистими структурами, які тією чи іншою мірою нагадують нормальні панкреатичні протоки, оточені характерною рясною десмопластичною стромою, яка є постійною ознакою цих пухлин [2]. Морфологічна діагностика ускладнюється тим, що деколи пухлинні дуктулоподібні залози виглядають настільки високодиференційованими, що їх важко відрізнити від непухлинних протоків, а багата десмопластична строма імітує поширені вогнища фіброзу при хронічному панкреатиті [3].

У доступній літературі є поодинокі відомості щодо морфометричних характеристик ПА ПЗ [4, 5]. Водночас, визначення планіметричних та денситометричних параметрів злоякісних клітин ПА ПЗ може бути корисним під час біопсійної діагностики раку протокового генезу, особливо у невеликих за розмірами трепанобіоптатах ПЗ.

Мета дослідження: З'ясування комп'ютерно-морфометричних параметрів злоякісних клітин протокової аденокарциноми підшлункової залози.

Матеріал і методи. Дослідження проведене

на післяопераційному матеріалі 80 пацієнтів віком від 51 до 68 років, яким була виконана панкреатодуоденальна резекція з наступною патогістологічною верифікацією діагнозу ПА ПЗ. Шматочки пухлинної тканини фіксували в 10% нейтральному забуферному формаліні і заливали в парафін. Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином, за Ван Гізон і методом Массон-триколон за загальноприйнятими методиками. Обчислення кількісних параметрів і денситометричних характеристик злоякісних клітин ПА ПЗ проводили методом прямої комп'ютерної морфометрії на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення KS 200 (Kontron Elektronik, Німеччина), інтегрованої з мікроскопом AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Німеччина) із вбудованою відеокамерою DXC-151A (Sony, Японія). Аналіз зображення проводився в автоматичному режимі за допомогою пакета прикладних програм KS 200. Досліджувані клітини характеризували з використанням наступних морфометричних параметрів: площа (AREA), периметр (PERIM) та коефіцієнт форми (FCIRCLE). Значення останнього дорівнює "1" для ідеально круглих об'єктів і наближається до "0" для максимально витягнутих. Поряд з обчисленими геометричними характеристиками додатково визначали денситометричні показники, що характеризували оптичну щільність клітин та їх ядер (MEAND). Всі зазначені характеристики обчислювали в автоматичному режимі, що дозволило отримати об'єктивну характеристику будь-якого досліджуваного структурного елеме-

нта. Контурне виділення клітин та ядер проводили за допомогою графічного планшету HyperPen 12000U (Aiptek International GmbH, Німеччина), що дозволило значно підвищити точність вимірювань. Для обчислення морфометричних параметрів у кожному випадку використовували не менше 20 полів зору мікроскопа при збільшенні $\times 200$ (сумарно досліджували 1000 клітин в 1 зрізі).

Отримані кількісні результати обробляли методом варіаційного статистичного аналізу середніх величин на персональному комп'ютері з використанням програмного пакету STATISTICA 6.0 for Windows (StatSoft Inc., США; № ліцензії AXXR712D833214FAN5) з подальшим аналізом отриманих даних. Обчислювалася середня арифметична величина (M), стандартне відхилення (σ) і коефіцієнт варіабельності (CV). Вірогідність відмінностей порівнюваних величин визначалася за допомогою критерію Стьюдента (T). Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$. Проводився також кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r). Значення коефіцієнта кореляції Пірсона від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак; значення r від 0,3 до 0,69 підтверджувало середній ступінь сполучення ознак; значення r від 0,7 і вище свідчило про наявність сильного зв'язку між ознаками, що вивчаються.

Результати дослідження та їх обговорення.

Проведене патоморфологічне дослідження показало, що для ПА ПЗ характерний патогістологічний паттерн, який складається з рясної десмопластичної строми та кількох гістоархітектонічних компартментів: зляжисних дуктулоподібних, залозистих, тубулярних, папілярних і гратчастих структур; плоскоклітинних, веретенклітинних або анапластичних солідних пластів, гнізд і вогнищ пухлинних клітин. У дослідженому матеріалі в ПА найчастіше визначається дуктулярний і гландулярний компартменти у великій кількості десмопластичної строми, рідше – солідні пласти пухлинних клітин, що не утворюють залозистих структур.

Кількісні параметри зляжисних клітин ПА ПЗ, отримані в результаті комп'ютерно-морфометричного і статистичного аналізу, відображені в таблиці 1.

Як видно з таблиці 1, найбільші розміри (AREA та PERIM) мають клітини гландулярного, а найменші – дуктулярного компартменту протокового раку. Ці показники статистично вірогідно відрізняються від таких у солідних пластах зляжисної пухлини. Також клітини залозистих структур

мають вірогідно найнижчий коефіцієнт форми FCIRCLE, що свідчить про більш подовжену форму цих клітин порівняно з клітинами солідних і дуктулоподібних структур. Вірогідних відмінностей значень оптичної щільності MEAND клітин різних пухлинних компартментів ПА ПЗ не відзначено.

Аналогічна закономірність відмінностей морфометричних параметрів спостерігається також в ядрах пухлинних клітин різних структур ПА ПЗ. Вірогідно найменші розміри мають ядра клітин зляжисних дуктулоподібних структур, оточених рясною десмопластичною стромою, а вірогідно найнижчий показник FCIRCLE є характерним для ядер клітин залозистих структур. Планиметричні параметри ядер клітин інших компартментів пухлини вірогідних відмінностей між собою не мають. Водночас, денситометричні показники MEAND ядер зляжисних клітин вірогідно відрізняються в усіх пухлинних структурах. Так, найвищу оптичну щільність мають ядра клітин гландулярного, а найнижчу – дуктулярного компартменту ПА ПЗ.

При проведенні кореляційного аналізу визначено, що у дуктулоподібних структурах існує прямий слабкий зв'язок між площею й оптичною щільністю клітин (коефіцієнт кореляції Пірсона $r=0,17$) та між площею і коефіцієнтом форми ядер ($r=0,29$), зворотній слабкий зв'язок між площею і коефіцієнтом форми клітин ($r=-0,27$) та між оптичною щільністю і коефіцієнтом форми ядер ($r=-0,10$). У залозистих структурах визначено прямий слабкий зв'язок між оптичною щільністю і коефіцієнтом форми клітин ($r=0,23$), між площею і оптичною щільністю клітин ($r=0,10$) та їх ядер ($r=0,15$), а також зворотній середньої сили зв'язок між площею та коефіцієнтом форми ядер ($r=0,31$). У клітинах солідних структур відзначено прямий слабкий зв'язок між площею й оптичною щільністю клітин ($r=0,12$) та їх ядер ($r=0,24$), а також зворотній слабкий зв'язок між оптичною щільністю та коефіцієнтом форми ядер ($r=0,15$). Кореляційний зв'язок між іншими морфометричними параметрами в усіх досліджуваних компартментах зляжисних пухлин відсутній (коефіцієнт кореляції Пірсона $r < 0,1$).

Відомо, що однією з найголовніших патогістологічних характеристик будь-якої зляжисної пухлини є клітинна атипія, яка характеризується наявністю клітинного і ядерного поліморфізму. Нами проведено варіаційний аналіз морфометричних параметрів зляжисних клітин і їх ядер у різних структурах ПА ПЗ, результати якого наведені в таблиці 2.

Таблиця 1

Кількісні морфометричні показники клітин різних компартментів протокової аденокарциноми підшлункової залози (M±σ)

		Площа (AREA), мкм ²	Периметр (PERIM), мкм	Коефіцієнт форми (FCIRCLE)	Оптична щільність (MEAND), у.о.
Дуктулоподібні структури	клітини	155,13±60,79 *†	53,95±12,96 *†	0,73±0,11 *†	179,86±5,92
	ядра	56,19±15,75 *†	31,93±5,06 *†	0,76±0,13	164,72±7,07 *†
Залозисті структури	клітини	328,16±96,56 †	84,80±15,70 †	0,65±0,13 †	178,70±5,95
	ядра	79,02±25,96	39,70±9,60 †	0,72±0,16 †	172,65±5,72 †
Солідні структури	клітини	294,76±111,42	75,99±17,00	0,70±0,12	180,00±10,04
	ядра	74,01±24,03	36,02±7,58	0,79±0,13	169,87±6,24

Примітки: * Результати вірогідності (p<0,05) порівняно з показниками клітин залозистих структур;

† Результати вірогідності (p<0,05) порівняно з показниками клітин солідних структур.

Таблиця 2

Коефіцієнти варіабельності (CV) морфометричних показників клітин різних компартментів протокової аденокарциноми підшлункової залози (%)

		Площа (AREA)	Периметр (PERIM)	Коефіцієнт форми (FCIRCLE)	Оптична щільність (MEAND)
Дуктулоподібні структури	клітини	39,18	24,02	14,70	3,29
	ядра	28,03	15,85	16,55	4,29
Залозисті структури	клітини	29,42	18,51	20,59	3,33
	ядра	32,86	24,18	21,72	3,31
Солідні структури	клітини	37,80	22,37	17,61	5,58
	ядра	32,46	21,05	16,47	3,67

Клітинний і ядерний поліморфізм злоякісної пухлини може бути охарактеризований за кількома параметрами: варіабельністю розмірів, форми та оптичної щільності ракових клітин та їх ядер. Як видно з таблиці 2, найбільший коефіцієнт варіабельності CV розмірів (за показниками AREA та PERIM) відзначається у клітинах злоякісних дуктулоподібних структур, тобто для них є характерним найбільший ступінь клітинного поліморфізму. В той же час, саме ці клітини мають найнижчий показник варіабельності форми, тобто дуктулярний компартмент складається з найбільш монорфних клітин порівняно з іншими гістоархітектонічними структурами. Навпаки, для клітин гландулярного компартмента характерний найнижчий CV розмірів, але водночас атипові залози побудовані з найбільш поліморфних за формою клітин. Ядерний поліморфізм є більш виразним у залозистих і солідних структурах пухлини, ніж у клітинах злоякісних дуктулоподібних структур ПА ПЗ, при цьому варіабельність форми ядер є більш притаманною саме залозистому компартмента при практично однакових більш низьких показниках CVFCIRCLE ядер клітин дуктулярного і солідного компартментів ПА. Варіабельність оптичної щільності, тобто наявність одночасно гіпер-, нормо- та гіпохромії цитоплазми і ка-

ріоплазми клітин у межах одного гістоархітектонічного компартменту, є незначною, показники CVMEAND як пухлинних клітин, так і їх ядер, коливаються у межах кількох відсотків.

Висновки. 1. Протокова аденокарцинома підшлункової залози гістоархітектонічно складається з кількох компартментів, для кожного з яких характерні вірогідно різні морфометричні параметри клітин і ядер. 2. Найбільші розміри мають клітини гландулярного, а найменші – дуктулярного компартмента (площа 328,16±96,56 та 155,13±60,79 мкм² відповідно, периметр 84,80±15,70 та 53,95±12,96 мкм відповідно, p<0,05). Клітини залозистих структур мають більш подовжену форму порівняно з клітинами інших компартментів (коефіцієнт форми 0,65±0,13, p<0,05). Відмінності планіметричних показників ядер клітин різних структур аналогічні таким у клітинах в цілому. 3. Денситометричні показники оптичної щільності ядер злоякісних клітин вірогідно вирізняються в усіх пухлинних структурах. Найвищу оптичну щільність мають ядра клітин гландулярного, а найнижчу – дуктулярного компартмента (172,65±5,72 та 164,72±7,07 умовних одиниць відповідно, p<0,05). Оптична щільність клітин у цілому вірогідно не вирізняється у різних пухлинних компар-

тментах. 4. Кореляційний аналіз показав відсутність зв'язків між більшістю морфометричних параметрів в усіх досліджуваних структурах протокового раку. Найвищим показником кореляції є зворотній середньої сили зв'язок між площею та коефіцієнтом форми ядер клітин залозистого компартменту пухлини ($r=-0,31$). 5. Варіаційний аналіз виявив кількісні морфометричні характеристики клітинної і ядерної атипії у різних компартментах пухлини. Так, найбільший ступінь клітинного поліморфізму характерний для злоякісних дуктулоподібних структур (CVAREA=39,18%, CVPERIM=24,02%), ядерного

– для залозистого компонента (CVAREA=32,86%, CVPERIM=24,18%, CVFCIRCLE=21,72%). Варіабельність оптичної щільності як клітин, так і їх ядер у межах одного гістоархітектонічного компартмента, є незначною.

Перспективи подальших досліджень. Проведення порівняльний статистичний аналіз морфометричних параметрів злоякісних структур раку ПЗ протокового генезу та тубулярних і тубуло-острівцевих комплексів при хронічному панкреатиті з тяжким фіброзом стромы для поліпшення диференційної патоморфологічної діагностики між цими захворюваннями.

Список використаної літератури

1. *Tumours of the exocrine pancreas / Klöppel G., Hruban R.H., Longnecker D.S. [et al.] // In: World Health Organization Classification of Tumours-Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System / S. Hamilton, L.A. Aaltonen (eds.). – Lyon: IARC Press, 2000. – P. 219-305.*
2. *Pancreatic Cancer / J.P. Neoptolemos, R. Urrutia, J.L. Abbruzzese, M.W. Büchler (eds.). – Springer Science+Business Media, LLC, 2010. – 1390 p.*
3. *Brimienė V. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: a prospective study of 156 patients / V. Brimienė, G. Brimas, K. Strupas // Medicina (Kaunas). – 2011. – Vol. 47, № 3. – P. 154-162.*
4. *Morphometrical differences between resectable and non-resectable pancreatic cancer: a fractal analysis / C. Vasilescu, D.E. Giza, P. Petrisor [et al.] // Hepato-Gastroenterology. – 2012. – Vol. 59. – P. 284-288.*
5. *Morphometry and prognosis in cancer of the pancreatic head / A.R. Weger, J. Lindholm, K. Glaser [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 1992. – Vol. 188. – P. 764-769.*

КОМПЬЮТЕРНО-МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК ПРОТОКОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. В работе с использованием метода прямой компьютерной морфометрии определены планиметрические и денситометрические показатели клеток протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Показаны достоверные отличия между площадью, периметром, коэффициентом формы и оптической плотностью злокачественных клеток и их ядер в разных компартментах опухоли. Определено отсутствие корреляционной связи между большинством морфометрических показателей во всех исследуемых структурах протокового рака. С помощью вариационного анализа охарактеризованы количественные морфометрические параметры клеточного и ядерного полиморфизма и показаны их отличия в разных компартментах опухоли.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, морфометрия.

COMPUTER-MORPHOMETRIC DESCRIPTION OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA CELLS

Abstract. Planimetric and densitometric characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma cells were detected in work using direct computer morphometry method. Significant differences between area, perimeter, coefficient of shape and optical dimension of malignant cells and their nuclei in different tumor compartments were shown. Absence of correlation between most morphometric measures in all researched structures of ductal carcinoma was defined. Quantitative morphometric parameters of cell and nuclear polymorphism were characterized and their differences in different tumor compartments were shown using variation analysis.

Key words: pancreatic cancer, morphometry.

Zaporizhzhya State Medical University (Zaporizhzhya)

Надійшла 17.10.2014 р.

Рецензент – проф. Давиденко І.С. (Чернівці)