

УДК 616-006.66+611.69

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СТЕПЕНИ УПОРЯДОЧЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ИНФИЛЬТРИРУЮЩЕМ ПРОТОВОКОВОМ ТИПЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кометова В.В., Хайруллин Р.М.

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск, e-mail: vladastasiatema@mail.ru

Авторы изучали гистологические препараты от 69 пациенток с инфильтрирующим протоковым раком молочной железы. Качественный и количественный компьютерный анализ показал значительную неравномерность распределения тканевых компонентов и структур, составляющих опухолевую ткань не только в отдельных случаях наблюдения, но также и в различных микроскопических полях зрения одного и того же гистологического препарата. Для адекватного отражения вариабельности неравномерного распределения и степени упорядоченности эпителиальных и стромальных компонентов опухолевой ткани были использованы стандартные статистические показатели изменчивости переменных. Авторы обнаружили, что наиболее информативным и объективным параметром является индивидуальный коэффициент вариации числа раковых структур и долей паренхиматозного или стромального компонента в некотором оптимальном числе анализируемых полей зрения гистологического микропрепарата одной и той же пациентки. Доверительные интервалы исследованных параметров не перекрываются. Полученные результаты показывают, что они являются высоконадёжными параметрами для прогнозирования пятилетней выживаемости пациенток с инфильтрирующим протоковым раком молочной железы.

Ключевые слова: прогноз рака молочной железы, структура опухолевой ткани, морфометрия

THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INDIVIDUAL PARAMETERS OF THE DEGREE OF THE TUMOR TISSUE STRUCTURAL COMPONENTS ORDERING OF THE INFILTRATING DUCTAL TYPE BREAST CANCER

Kometova V.V., Khayrullin R.M.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: vladastasiatema@mail.ru

The authors studied the histological preparations of 69 patients with infiltrating ductal breast cancer. Qualitative and quantitative computer analysis revealed a significant uneven distribution of tissue components and structures that make up the tumor tissue is not only the differently case of observations, but also in different microscopic fields of view of the same histological preparations. For the adequately reflect of the variability of uneven distribution and the degree of ordering of the epithelial and stromal components of the tumor tissue were used standard statistical indicators of variability of variables. The authors found that the most informative and objective parameter is the individual coefficient of variation in the number of cancer structures and the proportion of parenchymal or stromal component in some optimal number of analyzed microscopic fields of view of the one histological preparation of the same patient. Confidence intervals of the study parameters do not overlap. The results obtained show that they are high reliable parameters for predicting five-year survival rate of patients with infiltrating ductal type of breast cancer.

Keywords: breast cancer prognosis, tumor tissue structure, morphometry

Рак молочной железы (РМЖ) по своим клиническим, морфологическим и молекулярно-генетическим параметрам является гетерогенным заболеванием [6]. В структуре онкологической заболеваемости женского населения РФ РМЖ занимает I место. РМЖ является наиболее распространенной формой рака у женщин с ежегодной заболеваемостью 109,8 на 100000 лиц. Он также является второй ведущей причиной онкологической смертности. С конца 1980-х годов число смертей, связанных с РМЖ, значительно сократилось, отчасти в связи с улучшением диагностики и профилактики, а отчасти улучшения его системной терапии. С широким внедрением программ скрининга частоты обнаружения инвазивных и неинвазивных поражений РМЖ сместился сегодня в сторону меньших опухолей. РМЖ имеет множество подтипов различающихся

клиническими исходами. Многие из этих различий связаны с неоднородностью, которая существует на молекулярном уровне, и, как следствие, открытие и развитие его молекулярных маркеров в последнее время занимают центральное место. Несмотря на это, патоморфологическая верификация РМЖ составляет 95,6%, в пределах одного и того же гистологического варианта, одинаковой стадии процесса его прогноз может существенно варьироваться.

Было предложено множество морфологических параметров для их учёта в плане прогноза и риска развития рецидивов [3]. Однако интерпретация их достаточно сложна. В патоморфологии удачным способом улучшения информативности является унификация результатов с использованием количественных методов исследования [1]. Особый интерес в прогностическом пла-

не представляет степень упорядоченности структур и компонентов опухолевой ткани. Опыт морфологического исследования микропрепаратов разных гистологических вариантов РМЖ демонстрирует значительную степень неравномерности распределения тканевых компонентов и структур, составляющих опухолевую ткань не только от случая наблюдения, но и в разных полях зрения у одной и той же пациентки [7]. Так, например, число раковых структур от наблюдения к наблюдению может варьироваться в десятки раз. Установлено, что не только морфология опухолевой ткани, но и её радиочувствительность определяется характером межтканевой интеграции компонентов и структур, которая может быть изучена с помощью анализа паренхиматозно-стромальных взаимоотношений. Используемый при этом комплекс морфометрических параметров для корреляционного анализа взаимосвязей способен привлечь широкий спектр показателей для усиления и углубления информативности исследования одного и того же участка ткани. Например, согласно данным некоторых авторов, построенное на указанных принципах сравнительное исследование тканей молочной железы больных РМЖ до и после лучевой терапии позволило прийти к заключению о том, что повреждающее опухоль лучевое воздействие приводит к заметным нарушениям и изменениям паренхиматозно-стромальных взаимоотношений не только в опухоли, но и в окружающих тканях [2]. При этом стабильность количественных показателей после проведённой радиотерапии, как и определённая сохранность количественного баланса показателей при сравнении опухоли и окружающих её тканей свидетельствуют о широких компенсаторных возможностях опухоли в условиях местного и общего гомеостаза даже при повреждении опухоли. Отсутствие каких-либо закономерностей указанной выше гетерогенности распределения и упорядоченности тканевых структур приводит к заключению о необходимости поиска показателей, которые могли бы адекватно отражать эту гетерогенность и одновременно быть достаточно информативными. В количественных морфометрических исследованиях такой группой показателей являются показатели вариативности переменных, и к ним относятся абсолютная разность экстремумов (максимум и минимум значений), относительный показатель размаха (относительная разность лимитов), среднее квадратичное отклонение и, наконец, коэффициент вариации (CV) [1].

Целью настоящего исследования явилось обнаружение закономерностей распределения структурных элементов опухолевой

паренхимы и стромы при инфильтрирующем протоковом типе РМЖ для прогноза заболевания.

Материал и методы исследования

Материалом для исследования послужили 69 биоптатов опухолевой ткани пациенток с РМЖ в возрасте $59,3 \pm 8,8$ лет, находившихся на лечении в ГУЗ «Ульяновский областной клинический онкологический диспансер» с 2004 по 2006 г. На все исследования было получено разрешение этической комиссии ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет». Исследования проводились с соблюдением законодательства РФ, этических норм и принципов Декларации Хельсинки (1964) со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериалах, полученных от людей, а также международным руководством для биомедицинских исследований с вовлечением человека (International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects) Совета международных организаций медицинских наук (CIOMS). Все первичные данные пациенток были обезличены в соответствии с требованиями п. 3 ст. 6 действующего Федерального закона РФ 152-ФЗ «О персональных данных». Для морфометрического анализа проводили фотографирование микроскопических препаратов с помощью цифровой фотокамеры при разрешении 96 пикселей на дюйм. В каждом из 69 случаев наблюдения препараты фотографировались в 30 полях зрения с помощью окуляра 10х/0,25, объектива 10х/0,65. Полученные файлы сохранялись в формате *.JPG. Всего получено 2070 фотографий. В каждом из 69 случаев на 30-ти полученных цифровых изображениях производили количественный морфометрический анализ с помощью специализированной компьютерной программы Image Tool 3.0 (USA). В единичном поле зрения определяли количество раковых структур, долю площади паренхиматозного компонента железы. Соответствующий анализ показателей вариативности был произведен для количественных значений величин, полученных в проанализированных нами 30 полях зрения препарата каждой пациентки, т.е. число наблюдений равнялось 30. Таким образом, для каждой пациентки нами были получены значения показателей вариативности, отражающие распределение и степень упорядоченности тканевых структур и элементов, которые статистически нами анализировались как исходные индивидуальные значения переменной величины. Ноттингемский прогностический индекс (далее – НПИ) рассчитывали по формуле: $НПИ = G + L + (S \cdot 0,2)$, в которой G – степень злокачественности, L – количество поражённых метастазами лимфоузлов, S – максимальный размер опухолевого узла с точностью до миллиметра [5]. Для оценки суммарного балла злокачественности (далее – СБЗ) использовали следующие критерии [4]: степень дифференцировки – от 1 до 4 баллов; клеточный полиморфизм – от 1 до 3 баллов; митотическую активность – от 1 до 3 баллов; характер инвазивного роста – от 1 до 4 баллов; наличие опухолевых эмболов в сосудах стромы – от 1 до 3 баллов; клеточную реакцию в строме опухоли – от 1 до 3 баллов. СБЗ определяли как простую сумму баллов критериев. Полученные данные обрабатывались с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2003 и Statistica for Windows 8.0. (StatSoft Inc., USA).

Достоверность результатов оценивалась при помощи критериев Стьюдента. Для анализа статистической значимости различий групп наблюдений числом более двух использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием Бонферрони.

Результаты исследования и их обсуждение

Предварительный дисперсионный однофакторный анализ ANOVA по критерию пятилетней выживаемости продемонстрировал отсутствие значимых различий в группе наблюдений умерших пациенток в зависимости от длительности их жизни после установленного диагноза РМЖ. Критические

статистически значимые различия были получены нами только при разделении по критерию пятилетней выживаемости в бинарной шкале «жива по настоящее время (условное значение 0)» – «умерла спустя 1–5 лет после установления диагноза (условное значение 1)». В соответствии с целью и задачами настоящего исследования и выявлением прогностического значения количественных показателей, в том числе показателей, характеризующих степень упорядоченности (или иначе гетерогенности) структуры тканевых компонентов опухолевой ткани, нами были определены их значения для указанных выше двух групп больных.

Таблица 1

Средние значения и доверительные интервалы индивидуальных показателей вариабельности числа раковых структур, определённых в 30 полях зрения для каждой пациентки (случая наблюдения)*

Наименование параметра вариабельности	Прогностическая группа	$M \pm m$	95 %-й доверительный интервал	Уровень значимости различий
Абсолютная разность экстремумов	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$44 \pm 4,47$	35–53	$p < 0,02$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$72 \pm 13,7$	43–100	
Относительная разность экстремумов	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$1,47 \pm 0,15$	1,17–1,77	$p < 0,02$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$2,39 \pm 0,46$	1,44–3,34	
Среднее квадратичное отклонение	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$9,57 \pm 1,14$	9,6–14,2	$p < 0,009$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$12,2 \pm 4,18$	12,2–29,6	
Коэффициент вариации (CV)	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$14,5 \pm 1,02$	12,5–16,6	$p < 0,0001$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$23,8 \pm 2,49$	18,6–29,0	

Примечание: * – полученный для характеристики каждой пациентки статистический показатель вариабельности (для $n = 30$ полей зрения) соответствующей переменной рассматривался как самостоятельный индивидуальный параметр.

Исследование показало, что во всех группах исследованных случаев инфильтрирующего протокового типа РМЖ стромальный компонент опухоли составляет $65,3 \pm 0,48\%$, а на паренхиму приходится $34,7 \pm 0,48\%$ всего объёма новообразования. Значения долей паренхиматозного и стромального компонентов варьируются в широких пределах от 7,24 до 92,76%, соответственно. Доля паренхиматозного компонента была статистически значимо ниже стромального. Строма опухолей большей частью была построена из зрелых коллагеновых волокон, хорошо прокрашивающихся пикрофуксином, чаще отмечались зоны незрелой соединительной ткани, зоны отё-

ка стромального компонента, выраженный миксоматоз. Паренхима опухоли была представлена железистыми и солидными структурами, а также изолированными клетками в различном их соотношении.

Главным морфологическим признаком, обращающим на себя внимание, были гетерогенность и неупорядоченность расположения раковых комплексов в строме. Их количество варьировалось в широких пределах, от 8 до 898 структур в одном поле зрения площадью $0,152 \text{ мм}^2$. Как видно из табл. 1, из всех анализируемых индивидуальных показателей вариабельности наибольший уровень значимости различий был получен для коэффициента вариации числа рако-

вых структур в полях зрения. Он составил $14,5 \pm 1,02$ для пациенток с длительностью выживания свыше 5 лет и $23,8 \pm 2,49$ для пациенток, умерших в течение 5 лет после установления диагноза РМЖ ($p < 0,0001$). Наименьшая статистическая значимость различий отмечалась для абсолютной и относительной разности экстремумов (см. табл. 1). Таким образом, наиболее информативным и объективным со статистической точки зрения параметром, характеризующим степень упорядоченности и распределения тканевых элементов в опухолевой ткани протокового

типа РМЖ, является индивидуальный коэффициент вариаций числа раковых структур в 30 полях зрения. Другими объективными показателями, характеризующими гетерогенность опухолевой ткани протокового типа РМЖ, являются индивидуальные показатели вариабельности доли паренхиматозного компонента для 30 полей зрения. Из табл. 2 следует, что 95%-е доверительные интервалы значений этих показателей не перекрываются и могут служить надежными параметрами для прогнозирования срока выживаемости минимум в 5 лет.

Таблица 2

Средние значения и доверительные интервалы индивидуальных показателей вариабельности доли паренхимы опухолевой ткани, определённой в 30 полях зрения для каждой пациентки (случая наблюдения)*

Наименование параметра вариабельности	Прогностическая группа	$M \pm m$	95%-й доверительный интервал	Уровень значимости различий
Абсолютная разность экстремумов	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$9,03 \pm 0,74$	7,54–10,53	$p < 0,000001$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$18,8 \pm 2,13$	14,4–23,2	
Относительная разность экстремумов	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$0,30 \pm 0,025$	0,25–0,35	$p < 0,000001$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$0,63 \pm 0,071$	0,48–0,77	
Среднее квадратичное отклонение	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$2,59 \pm 0,20$	2,19–2,99	$p < 0,000001$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$5,50 \pm 0,64$	4,16–6,73	
Коэффициент вариации (CV)	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$9,34 \pm 0,76$	7,8–10,9	$p < 0,000003$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$14,07 \pm 1,84$	14,1–21,7	

Примечание: * – полученный для характеристики каждой пациентки статистический показатель вариабельности (для $n = 30$ полей зрения) соответствующей переменной рассматривался как отдельный индивидуальный параметр.

Для дополнительного подтверждения объективности обнаруженных закономерностей нами дополнительно была проанализирована закономерность вариабельности известных и широко апробированных интегральных морфологических прогностических индексов НПИ и СБЗ в исследованных двух группах пациенток. Как видно из данных, представленных в табл. 3, их статистические различия также оказались высокосignификантными ($p < 0,0005$).

Гистопатологические особенности РМЖ являются основой для патоморфологического заключения, в ней, как правило, содержится вся необходимая информация для принятия решений в отношении прогноза и лечения. Большинство случаев РМЖ возникает из ацинарно-протоковых единиц, а гистоморфологические разли-

чия рассматриваются как проявление различных молекулярных профилей опухоли. Преобладающим типом инфильтрирующего типа РМЖ является протоковая карцинома. Отсюда следует, что исследование морфометрических параметров протоковой карциномы с помощью современных компьютерных программ для прогноза и уточнения тактики лечения является насущной задачей современной патоморфологии. Содержательная сторона предлагаемых авторами критериев во многом зависит от квалификации и стиля изложения заключения врача-морфолога, зачастую содержит большой объем специальной морфологической информации, трудной для восприятия и обобщения врачом-клиницистом в решении вопросов лечебной тактики [3]. В последние годы предпринимаются ин-

тенсивные попытки создания оптимальных шкал патоморфологической оценки РМЖ для улучшения диагностики. Однако методологические подходы, реализуемые в них, основываются на стандартных статистиче-

ских средних значениях переменных или, чаще всего, частот. Толкование таких данных вызывает большую сложность и не лишено абстрактности в отношении конкретного пациента.

Таблица 3

Средние значения и доверительные интервалы индивидуальных показателей варибельности интегральных морфологических прогностических индексов для каждой пациентки (случая наблюдения)*

Наименование параметра варибельности	Прогностическая группа	$M \pm m$	95%-й доверительный интервал	Уровень значимости различий
НПИ	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$3,77 \pm 0,12$	3,53–4,01	$p < 0,0005$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$4,61 \pm 0,22$	4,15–5,07	
СБЗ	Выживаемость свыше 5 лет $n = 46$	$13,9 \pm 0,33$	13,2–14,6	$p < 0,0005$
	Выживаемость менее 5 лет $n = 23$	$15,8 \pm 0,34$	15,1–16,5	

Примечание: * – полученный для характеристики каждой пациентки статистический показатель варибельности соответствующей переменной рассматривался как отдельный индивидуальный параметр.

Согласно полученным нами результатам в целом, наиболее объективным индивидуальным показателем прогнозирования пятилетней выживаемости для пациенток с протоковым вариантом РМЖ, следует считать коэффициент вариации долей паренхиматозного (равным образом стромального) компонентов и числа раковых структур для анализируемого числа полей зрения (в нашем случае для 30 полей зрения). Иными словами для пациенток с протоковым типом РМЖ, имеющим индивидуальный CV числа раковых структур в пределах не более 17% для 30 полей зрения микропрепарата, с 95%-й вероятностью следует прогнозировать пятилетнюю выживаемость. В случаях с индивидуальным CV более 19% прогноз пятилетней выживаемости неблагоприятен.

Еще более точным прогностическим показателем выживаемости для данного гистологического варианта РМЖ является индивидуальный CV долей паренхимы. Пациентки с CV не более 11% имеют 95%-ю статистическую вероятность прожить 5 лет и более, а с индивидуальным CV более 14% – требуют особой тактики лечения и наблюдения. Как видно из результатов исследования, доверительные интервалы исследуемых параметров не перекрываются. Однако крайние максимальные значения первой группы пациенток с выживаемостью 5 лет и более и минимальные значения второй

группы пациенток с выживаемостью менее 5 лет имеют промежуточный интервал в несколько единиц значений, которые также могут иметь место. Мы полагаем, что пациентки, имеющие такие промежуточные варианты значений, находятся в зоне риска прогрессирования заболевания, либо представляют собой группу с сомнительным прогнозом выживаемости. Выявление пациенток с такими промежуточными значениями индивидуального CV исследуемых параметров могут составить цель отдельного исследования.

Обобщая результаты проведенного исследования, следует сделать вывод, что инфильтрирующий протоковый вариант РМЖ характеризуется статистически значимыми различиями в степени упорядоченности раковых структур опухолевой ткани, варибельности соотношений эпителиального и стромального тканевых компонентов, которые могут быть высоконадёжными параметрами для прогнозирования пятилетней выживаемости пациенток с инфильтрирующим протоковым РМЖ.

Авторы заявляют об отсутствии каких бы то ни было конфликтов интересов с кем бы то ни было в отношении идеи, планирования, выполнения и опубликования результатов настоящего исследования и их последующего использования в коммерческих или иных целях.

Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Дубенская Л.И. О значении стабильности ряда морфофункциональных параметров тканей рака молочной железы после лучевой терапии // Математическая морфология: электронный математический и медико-биологический журнал. – 1996. – Том 1. – № 1. – С. 98.
3. Завьялова М.В. Особенности течения рака молочной железы в зависимости от морфологического варианта опухоли и фоновых диспластических процессов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2004. – 20 с.
4. Занкин В.В. Гистологическая степень злокачественности эпителиальных опухолей как фактор прогноза их рецидивирования и метастазирования после радикального лечения (взгляд патоморфолога на клинические проблемы) / В.В. Занкин, В.В. Кометова, М.М. Лазаревский // Высокотехнологичные методы диагностики и лечения в онкологии. Модниковские чтения: материалы VI Российской научно-практической конференции. – Ульяновск, 2009. – С. 48–50.
5. Филатов А.В. Определение степени злокачественности рака молочной железы // Архив патологии. – 2009. – №1. – С. 53–57.
6. Diaz-Cano S.J. Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliably Application of Molecular Marker Design // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13. – P. 1951–2011.
7. Hasebe T., Mukai K., Tsuda H., Ochiai A. New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: clinicopathological significance of fibrotic focus // Pathol. Int. – 2000. – Vol. 50. – № 4. – P. 263–272.

References

1. Avtandilov G.G. Medicinskaja morfometrija. Rukovodstvo. M.: «Medicina», 1990. 384p.
2. Dubenskaja L.I. O znachenii stabilnosti rjada morfofunkcionalnyh parametrov tkanej raka molochnoj zhelezy posle luchevoj terapii// Matematicheskaja morfologija: jelektronnyj

matematicheskij i mediko-biologicheskij zhurnal. 1996. Tom 1. no. 1. pp. 98.

3. Zavjalova M.V. Osobennosti techenija raka molochnoj zhelezy v zavisimosti ot morfologicheskogo varianta opuholi i fonovyh displasticheskix processov. Avtoref. diss. na soisk. uch. st. kand. med. nauk. Tomsk, 2004. 20 p.

4. Zankin V.V. Gistologicheskaja stepen zlokachestvennosti jepitelialnyh opuholej kak faktor prognoza ih recidivirovanija i metastazirovanija posle radikalnogo lechenija (vzgljad patomorfologa na klinicheskie problemy)/ V.V. Zankin, V.V. Kometova, M.M. Lazarevskij // Materialy VI Rossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Vysokotehnologichnye metody diagnostiki i lechenija v onkologii. Modnikovskie chtenija». Uljanovsk, 2009. pp. 48–50.

5. Filatov A.V. Opredelenie stepeni zlokachestvennosti raka molochnoj zhelezy // Arhiv patologii. 2009. no. 1. pp. 53–57.

6. Diaz-Cano S.J. Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliably Application of Molecular Marker Design// Int. J. Mol. Sci. 2012. Vol. 13. pp. 1951–2011.

7. Hasebe T., Mukai K., Tsuda H., Ochiai A. New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: clinicopathological significance of fibrotic focus // Pathol. Int. 2000. Vol. 50. no. 4. pp. 263–272.

Рецензенты:

Ильина Н.А., д.б.н., профессор, первый проректор, проректор по научной работе ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова» Министерства образования и науки РФ, г. Ульяновск;

Музурова Л.В., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 06.09.2012.