

Meme İnfiltratif Duktal Karsinomlarında Nükleer Morfometri ile Histomorfolojik Parametrelerin Karşılaştırılması‡

Levent YILDIZ*, Sancar BARIŞ**, Oğuz AYDIN***, Mehmet KEFELİ***

- ✓ Bu çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD 1999-2003 yılları arası arşivleri taranarak tespit edilen 30 infiltratif duktal karsinom olgusunda tümör hücrelerinin nükleer morfometrik özellikleri görüntü analiz sistemi ile değerlendirilerek konvansiyonel histopatolojik derece, nükleer derece, tübül formasyonu ve mitoz sıklığı ile ilişkisi araştırıldı. Konvansiyonel metod ve morfometrik veriler arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu durum subjektif derecelendirme yöntemi ile ortaya konulan konvansiyonel derecenin morfometrik yöntem ile örtüşmediğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: İnfiltratif duktal karsinom, morfometri, görüntü analizi, nükleer derece

- ✓ **Comparison of Nuclear Morphometry and Histopathological parameters of the Infiltrative Ductal Carcinomas of the Breast**

In this study, in 30 infiltrative ductal carcinoma cases, which were obtained from the archives of Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ondokuz Mayıs University, between years 1999 and 2003, nuclear morphometrical features of tumor cells are evaluated by image analysis system and its relationship with conventional histopathological grade, nuclear grade, tubule formation and mitotic rate is searched. There was no significant difference between nuclear morphometrical data and conventional method. This situation shows that subjective grading method not overlap with morphometrical method.

Key words: Infiltrative ductal carcinoma, morphometry, image analysis, nuclear grade

GİRİŞ

Meme kanserlerinde histolojik derece önemli bir prognostik faktördür. Tedavi seçiminde ve hastalığın seyrini öngörmeye önemli bir yeri vardır^(1,2). Histolojik derecelendirme subjektif olarak yapılır. Görüntü analiz sistemleri tümör hücre çekirdeklerinin çap, çevre, alan gibi özelliklerinin objektif olarak hesaplanmasına olanak verir. Bu çalışmanın

amacı meme infiltratif duktal karsinomlarında tümör hücrelerinin nükleer morfometrik özelliklerini görüntü analiz sistemi ile değerlendirerek bu sonuçların Bloom-Richardson derecelendirme sistemini oluşturan nükleer derece, tübül formasyonu, mitoz sıklığı ve toplam skor ile ilişkisini ve subjektif derecelendirmelerin objektif değerler ile ne derecede örtüşüklerinin araştırılmasıdır.

‡ Çalışma, XVIII. Ulusal Patoloji Sempozyumu, (Çeşme-Altinyunus, - 07-11 Mayıs 2006) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

* Doç.Dr., **Prof.Dr., ***Yrd.Doç.Dr., Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

GEREÇ VE YÖNTEM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD 1999–2003 yılları arası arşivleri taranarak seçilen 30 infiltratif duktal karsinom olgusu çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan olguların tümüne ait cerrahi örnekler tamponlanmış nötral formalinde tespit edilmiş modifiye radikal mastektomi materyallerine aitti. Olgulara ait kesitler yeniden gözden geçirilerek tümör içerenler belirlendi ve modifiye Bloom-Richardson derecelendirme metoduna göre derecelendirildi. Olguların modifiye Bloom-Richardson derecesi ve bunun alt parametreleri olan tübül formasyonu, nükleer derece ve mitoz sıklığına ait skorları kaydedildi (Tablo I). Tümör derecesini iyi temsil ettiği düşünülen bloklar seçilerek 2–4 µm'lik kesitler alındı. Nükleer morfometrik çalışmada kullanılmak üzere hazırlanan bu kesitlere, nükleer kontrastı artırmak amacıyla Feulgen metodu ile nükleer boyama yapıldı⁽³⁾. Feulgen metodu için; hidrate edilen kesitler oda ısısındaki 1N'lık HCl'den geçirildi. Bunu 60 santigrat derecede ve oda ısısındaki 10'ar dakikalık HCl (1N) aşamaları takip etti. Distile su ile yıkanan kesitler 50 dakika Schiff solüsyonunda bekletildi. Metod, bir dakikalık bir adet ve ikişer dakikalık iki adet toplam üç sülfid S yıkamasından geçirilerek tamamlandı. Distile su ile yıkanan ve karşıt boyama yapılmayan kesitler sentetik resin ile kapatıldı.

Morfometrik çalışma için ışık mikroskopunun (Zeiss, Axiophot, Germany) immersiyon (X1000) büyütmesinde nükleer örtüşme ve artefaktların en az olduğu alana ait görüntüler dijital video kamera (Insight Diagnostic Instrument, USA) ile bilgisayara aktarıldı ve görüntü analiz programı morfometri yazılımı (Samba Technologies 2005, morphometry analysis, France) ile değerlendirildi. Her olguda dijitalize edilen görüntü üzerinde minimum 30 çekirdek morfometrik incelemeye alındı. Her bir çekirdek için alan (mikronkare), çevre (mikron), form faktör, maksimum ve minimum çap (mikron) hesaplandı. Her olgu için ortalama çekirdek alanı, ortalama çekirdek çevresi, ortalama form faktör ve bunların standart sapmaları, alan değişkenliği, çevre

Tablo I. Olguların Modifiye Bloom-Richardson Derecesi ve Bunun Alt Parametrelerine Ait Skorları.

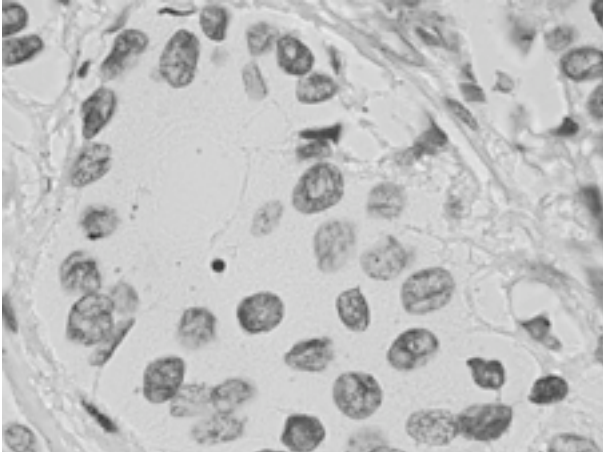
Olgu	Tübül formasyonu	Nükleer derece	Mitoz sıklığı	Toplam skor
1	1	2	1	4
2	1	2	1	4
3	1	1	2	4
4	1	2	1	4
5	1	2	1	4
6	2	2	1	5
7	1	2	1	4
8	1	2	1	4
9	1	2	1	4
10	2	3	1	6
11	3	2	1	6
12	2	3	1	6
13	2	2	2	6
14	2	3	1	6
15	2	3	1	6
16	2	3	1	6
17	2	3	1	6
18	3	2	1	6
19	1	2	3	6
20	3	2	3	8
21	3	3	2	8
22	2	3	3	8
23	3	3	3	9
24	3	3	3	9
25	3	3	3	9
26	3	32	8	
27	3	3	3	9
28	3	3	3	9
29	3	3	3	9
30	3	3	2	8

değişkenliği ve form faktör değişkenliği gibi veriler, aralarındaki farkın anlamlılığı açısından modifiye Bloom-Richardson derecesi ve bunun alt parametreleri olan tübül formasyonu, nükleer derece ve mitoz sıklığı ile karşılaştırıldı.

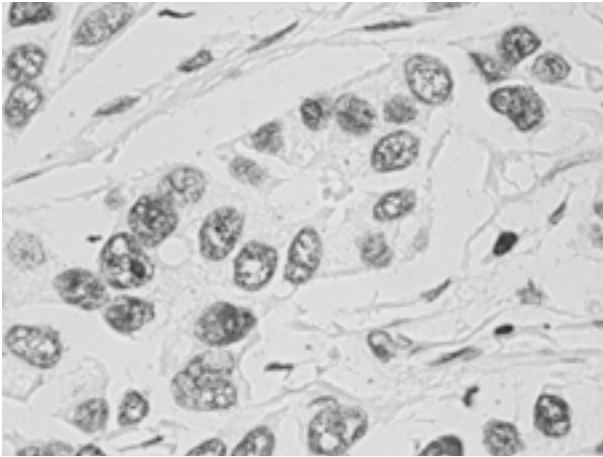
İstatistiksel incelemede tanımlayıcı istatistikler ve student-t testi kullanıldı.

BULGULAR

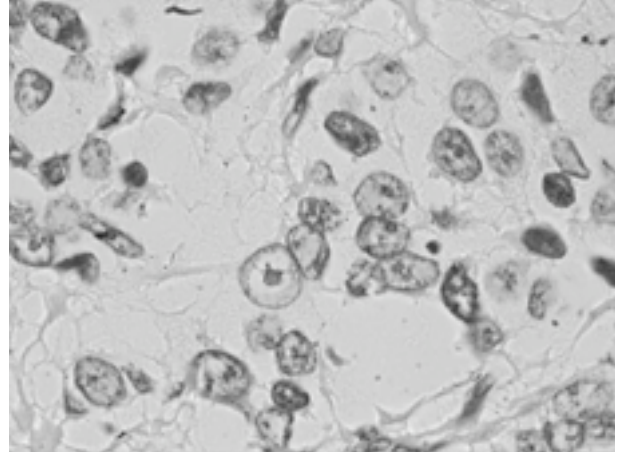
Çalışmaya alınan olguların tamamı kadındı ve yaş ortalaması $47,77 \pm 12,22$ idi. Çalışmaya alınan 30 olgunun 9'u modifiye Bloom-Richardson derece I, 10'u derece II ve 11'i derece III'dü (Resim 1-3). Derece I grubunda nükleer çevre ortalaması $26,51 \pm 5,88$, alan ortalaması $29,56 \pm 9,39$, maksimum çap orta-



Resim 1. Derece I tümörde nükleer morfoloji (Feulgen, X1000).



Resim 2. Derece II tümörde nükleer morfoloji (Feulgen, X1000).



Resim 3. Derece III tümörde nükleer morfoloji (Feulgen, X1000).

laması $8,26 \pm 1,47$, form faktör ortalaması $2,18 \pm 0,49$, çevre değişkenliği ortalaması $0,31 \pm 0,05$, alan değişkenliği ortalaması $0,50 \pm 0,10$ olarak bulundu. Bu değerler derece II grubundaki olgularda sırası ile $24,28 \pm 3,53$, $26,14 \pm 7,72$, $7,79 \pm 0,82$, $2,03 \pm 0,21$, $0,33 \pm 0,07$, $0,52 \pm 0,11$ olarak saptandı. Bu değerler derece III grubundaki olgularda sırası ile $29,07 \pm 5,48$, $34,69 \pm 11$, $8,86 \pm 1,16$, $2,26 \pm 0,5$, $0,40 \pm 0,09$, $0,58 \pm 0,06$ olarak saptandı. Sonuçlar Tablo II'de özetlenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler sonucu verilerimizin normal dağılıma uyduğu saptandı ve student-t testi yapıldı. Konvansiyonel histopatolojik dereceye göre tüm gruplar karşılaştırıldığında hiçbir nükleer morfometrik ölçütün Bloom Ricardson ve bunun alt grupları ile anlamlı fark taşımadığı bulundu ($p > 0,05$).

TARTIŞMA

Meme karsinomlarında tümör derecesi, boyut ve histolojik tip ile birlikte bir diğer prognostik göstergedir. Bin dokuzyüzlü yılların başından bu yana kullanılagelen derece-

Tablo II. Derece I, II ve III gruplarındaki olgularda nükleer morfometrik ölçüm sonuçları (Ortalama \pm SD).

Bloom-Richardson Derecesi	Nükleer alan	Nükleer çevre	Maksimum çap	Form faktör	Çevre değişkenliği	Alan değişkenliği
I (n:9)	$29,56 \pm 9,39$	$26,51 \pm 5,88$	$8,26 \pm 1,47$	$2,18 \pm 0,49$	$0,31 \pm 0,05$	$0,50 \pm 0,10$
II (n:10)	$26,14 \pm 7,72$	$24,28 \pm 3,53$	$7,79 \pm 0,82$	$2,03 \pm 0,21$	$0,33 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,11$
III (n:11)	$34,69 \pm 11$	$29,07 \pm 5,48$	$8,86 \pm 1,16$	$2,26 \pm 0,50$	$0,40 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,06$

leme metodları çeşitli değişim ve gelişimlerden geçmiştir^(4,5). Günümüzde yaygın kullanım alanı bulan modifiye Bloom-Richardson metodu yapısal ve hücresel özellikleri bir arada değerlendirilerek toplam bir skor üzerinden tümör farklanmasını ifade etmeye çalışır. Tümör hücre çekirdeklerinin çap, çevre, alan gibi ölçülerek ifade edilen özelliklerinin objektif olarak hesaplanmasına olanak veren görüntü analiz sistemleri, subjektif derecelendirmelerin objektif değerler ile ne derecede örtüşüklerinin değerlendirilmesinde standardı oluşturan ve karşılaştırmalar yapmaya olanak veren yöntemler olarak kullanılabilir. Çalışmamızda istatistik anlam taşımamakla birlikte derece III tümörlerde alan, çevre, maksimum çap gibi nükleer morfometrik ölçütlerin derece I ve II tümörlere göre göre yüksek değerler taşımakta olduğu saptandı. Olgu sayısındaki sınırlılığın istatistiksel anlam farkının ortaya çıkmasında engel oluşturduğu düşünüldü.

Dey ve ark. çeşitli nükleer parametrelerin ölçülmesinde hızlı ve başarılı bir teknik olarak tanımladıkları otomatize sitometrik yöntemlerin benign lezyonlar ile derece I, ve derece I ile derece II ve III tümörleri ayırmakta etkin olduklarını bildirmişlerdir. Bu yöntem ile tanımlanan nükleer parametrelerin gelecekte, sitolojik materyalden yapılacak otomatize tanı ve dereceleme uygulamalarına yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir⁽⁶⁾.

Poulin ve ark. farklı patolojik derecelerden 54 meme karsinomunda yaptıkları çalışmada, nükleer alan profiline sadece patolojik nükleer derece ile değil, tübül formasyonu, mitotik derece ve toplam histopatolojik derece ile de güçlü korelasyon gösterdiğini bulmuşlar ve nükleer morfometrinin standardizasyon ve tekrarlanabilirliği arttıracığını bildirmişlerdir⁽⁷⁾. Bizim çalışmamızda ise böylesine güçlü bir paralellik saptanamamıştır. Yine Tuzek ve ark. 67 meme karsinomunda histolojik derecelendirmede kullanılan görsel tanı kriterleri ile görüntü analizinde elde ettikleri sonuçları kıyaslamışlar ve

görüntü analizinde elde ettikleri sonuçlar ile nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuşlardır. Benzer ilişki tübül formasyonunda gözlenmemiştir⁽⁸⁾.

Kronqvist ve ark. çalışmalarında, geliştirdikleri morfometrik dereceleme sisteminin kötü prognozlu hasta grubunu tanımlamada etkin olduğunu ve kendi materyallerinde tanımladıkları morfometrik derece III olguların meme kanserinden ölüm riskinin 5.4 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir⁽⁹⁾.

Tan ve ark. ise 64 duktal karsinoma in situ olgusunda, nükleer çap ve alan ile tümör boyutu, nükleer derece, nekroz, hücre polarizasyonu ve yapısal histolojik paternleri karşılaştırmışlar ve güçlü korelasyon gösterdiklerini bulmuşlardır. Özellikle komedo paternde nükleer alan ve çapın diğer histolojik paternlere göre yüksek olduğunu göstermişlerdir ve noninvaziv tümörlerde de nükleer derecenin diğer histopatolojik parametrelerle korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır⁽¹⁰⁾.

SONUÇ

Yapısal ve sitolojik özellikleri bir arada değerlendiren Bloom-Richardson metodunda, nükleer dereceleme morfometrik yöntemler kullanılarak değerlendirilebilir. Bu, derecelendirme metodunun gücünü arttırarak nesnelleşmesini sağlayabilir. Bununla birlikte nesnel olmak iddiası ile ortaya çıkan dijitalize morfometrik sistemlerin de yöntemsel problemleri vardır. Bunların başında çekirdek örtüşmelerinin ölçüm işlemini olumsuz etkilemesi ve yeterli karşıtlık ortaya koyamayan çekirdek boyaları gelir. Bu sorunların bulunmadığı alanlardan yapılan "yönlenmiş seçimler" kolaylıkla bir örnekleme hatasına neden olabilir. Yeterince ince kesit almaya olanak sağlayan gömme ortamları, dokulardan hazırlanacak hücre ya da çekirdek süspansiyonlarının kullanılması, nükleer içeriğe yönelik özelleşmiş boyalar ve ölçüme alınacak çekirdeklerin sayısının arttırılması ile bu handikapların üstesinden gelinebilir.

Geliş Tarihi : 02.07.2007

Yayına kabul tarihi : 30.10.2007

Yazışma adresi :

Doç.Dr. Levent YILDIZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

55139 Kurupelit, SAMSUN

Tel. : 0362 312 19 19 / 2440 / 3232

Faks : 0362 457 60 41

e-posta: leventy@omu.edu.tr

KAYNAKLAR

1. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51: 195-208.
2. Roberti NE. The role of histologic grading in the prognosis of patients with carcinoma of the breast. *Cancer* 1997; 80: 1708-1716.
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. *Cellular Pathology Technique*. 4th ed. London, Butterworth & Co, 1985; 183-187.
4. Tavassoli F. *Pathology of the Breast*. 2th ed. New York, McGraw-Hill, 1999; 46-50. 5. Sloane JP, Trott PA, Lakhani SR. *Biopsy Pathology of the Breast*. 2th ed. London, Arnold, 2001; 216-220.
6. Dey P, Ghoshal S, Pattari SK. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 483-485.
7. Poulin N, Frost A, Carraro A, et al. Risk biomarker assessment for breast cancer progression: replication precision of nuclear morphometry. *Anal Cel Path* 2003; 25: 129-138.
8. Tuzcek HV, Fritz P, Schwarzmann P, et al. Breast carcinoma. Correlations between visual diagnostic criteria for histologic grading and features of image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1996; 18: 481-493.
9. Kronqvist P, Kuopio T, Jalava P, et al. Morphometrical malignancy grading is a valuable prognostic factor in invasive ductal breast cancer. *Br J Can* 2002; 87: 1275-1280.
10. Tan PH, Goh BB, Chiang G, et al. Correlation of nuclear morphometry with pathologic parameters in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol* 2001; 14: 937-941.