

QUANTITATIVE MORPHOLOGY OF SPONTANEOUS FELINE MAMMARY GLAND TUMOURS

Radostin Simeonov, Ivelina Grozeva

Department of General and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, e-mail: rsimeonov@uni-sz.bg

Abstract

The use of computer morphometric analysis in pathology has a number of advantages. The research is carried out according to certain protocols, which leads to the standardization of the obtained results. In this way, differences between objects that cannot be detected with the naked eye can be determined. The aim of the present study was to perform a morphometric analysis of spontaneous feline mammary gland tumours in the cat. The results of our study show that the parameters mean nuclear area, mean nuclear perimeter, mean nuclear diameter and nuclear roundness can be used as an additional diagnostic method to differentiate benign from malignant mammary tumours in the cat.

Keywords: *feline mammary gland tumours, quantitative morphology*

Резюме

Използването на компютърен морфометричен анализ в патологията има редица предимства. Изследването става по определени протоколи, което води до стандартизация на получените резултати. По този начин могат да се откриват разлики между обектите, които не могат да бъдат доловени с просто око. Целта на настоящето проучване бе да се направи морфометричен анализ на спонтанни мамарни неоплазии при котката. Резултатите от нашето изследване показват, че показателите средна площ на ядрото, среден периметър на ядрото, среден диаметър на ядрото и закръгленост на ядрото могат да бъдат използвани като допълнителен диагностичен метод за отиференциране на доброкачествените от злокачествените неоплазии на млечната жлеза при котката.

Ключови думи: *тумори на млечната жлеза при котката, количествена морфология*

Въведение

Напоследък, в медицината се наблюдава значителен прогрес в развитието на онкологията. Това се свързва с въвеждането на имунохистохимията, флоу-цитометрията, молекулярната диагностика и компютърния анализ (Gil et al., 1986; Gil and Barda, 1994; Roels et al., 1998; Namislawsky et al., 2004; Wolfe et al., 2004). Интересно направление в онкологията е компютърната морфометрия (Marchevsky et al., 1987; Автандилов, 1996; Автандилов, 2002; Kavantzias et al., 2002; Caruntu, 2003; Wolfe et al., 2004). При този метод микроскопска камера, свързана към светлинния микроскоп заснема находката, която впоследствие се обработва софтуерно (Meijer et al., 1997; Andrews and Malarkey, 2001; Автандилов, 2002). Изследваните морфометрични показатели могат да бъдат разделени на прости параметри (площ, диаметър, периметър), показатели определящи формата на обекта (фактор за симетрия и изпъкналост), двуфазови показатели (ядрено-цитоплазмено съотношение и ексцентричност) и параметри определящи структурата на обектите. Счита се, че компютърната морфометрия е обективен диагностичен метод, тъй като при изчисленията се избягва субективната грешка (Автандилов, 2002; Caruntu, 2003). Използването на компютърен морфометричен анализ в патологията има

редица предимства. Изследването става по определени протоколи, което води до стандартизация на получените резултати. По този начин могат да се откриват разлики между обектите, които не могат да бъдат доловени с просто око. Броят на измерваните обекти може да бъде неограничен и не на последно място, получените резултати лесно се обработват статистически (Buldirev et al., 1994; Losa, 1995; Dey and Rajes, 2004; Rajes et al., 2004). Целта на настоящето проучване бе да се направи морфометричен анализ на спонтанни мамарни неоплазии при котката.

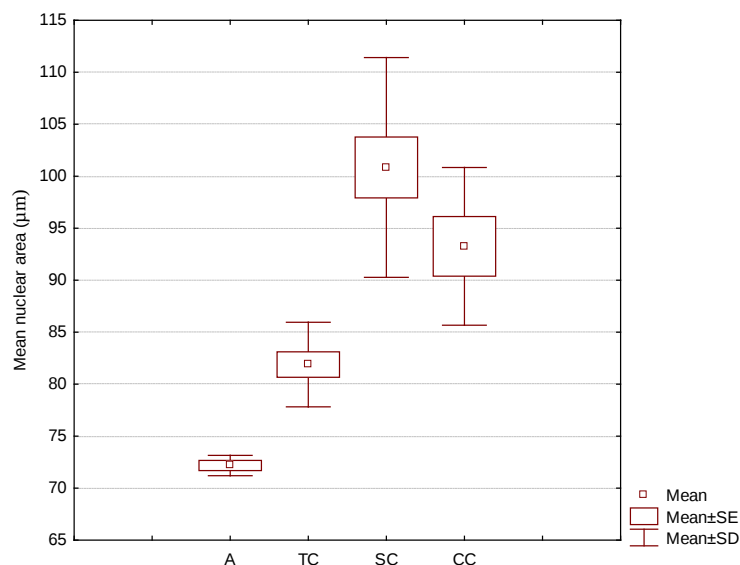
Материал и методи

Изследването бе проведено върху 35 спонтанни мамарни котешки тумора (4 аденома, 11 тубулопапиларни карцинома, 13 солидни карцинома и 7 крибриформни карцинома). Неопластичните клетки, получавани преоперативно посредством тънкоиглена аспирационна биопсия (ТАБ), бяха фиксирани незабавно с помощта на Merckofix spray® (Merck®, KGaA, Germany) и оцветени с Hemacolor® (Merck®, KGaA, Germany) ТАБ беше извършена върху четири различни участъци от неопластичните фармации. След оперативното отстраняване на туморите от всеки един от тях се вземаше материал за хистологично изследване и всички изследвани неоплазии бяха класифицирани съгласно WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals (Misdorp et al., 2001), допълнена от Histologic classification of feline mammary neoplasm (Meuten, 2017) Цитоморфометричният анализ на ядрата на клетките извършихме с помощта на дигитален микроскоп (Motic Professional B3 Digital microscope (Motic, China Group Co Ltd, Hong Kong, China), съвременна компютърна конфигурация и софтуер за анализ на микроскопски изображения (Image Pro Plus® Analysis System, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA, version 4.5.0.29 for Windows 98/NT/2000). Морфометричният анализ проведехме върху цитологични препарати оцветени с Hemacolor®. Компютърната цитоморфометрия извършихме съгласно протокола на софтуерния продукт (<http://www.mediacy.com>). Софтуерът за анализ на микроскопски изображения разполага със собствена статистическа програма. Това бе напълно достатъчно за първоначална обработка на получените резултати. За по-задълбочени изследвания, данните от получените резултати конвертирахме във формат .xls, след което ги прехвърляхме за окончателен ANOVA анализ последван от post hoc LSD тест в програмата Statistica 6.0. (StatSoft, Tulsa, OK, USA) при степен на достоверност $P < 0.05$.

Резултати

Средна площ на ядрата

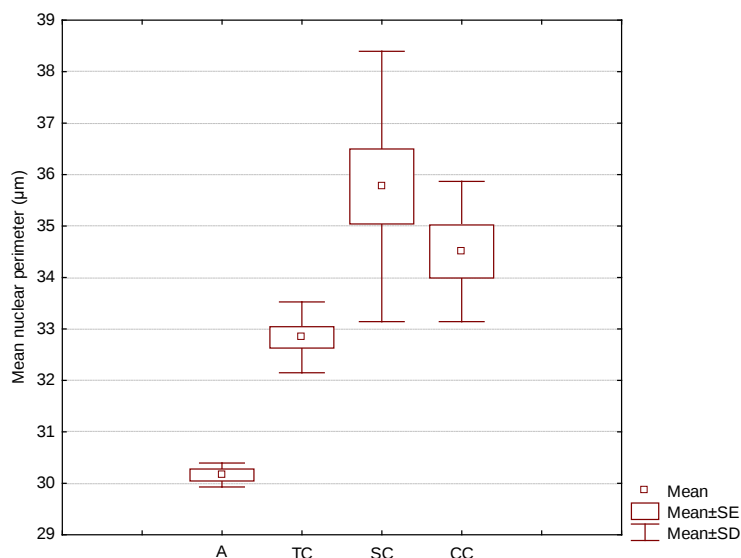
Резултатите са представени графично на Фиг. 1. След извършването на компютърния цитоморфометричен анализ получихме следните числени стойности: аденом – $72.17 \pm 0.96 \mu\text{m}^2$, тубулопапиларен карцином – $81.89 \pm 4.09 \mu\text{m}^2$, солиден карцином – $100.84 \pm 10.56 \mu\text{m}^2$, крибриформен карцином – $93.25 \pm 7.58 \mu\text{m}^2$. Средната площ на ядрата бе най-малка при аденом, а най-голяма при солиден карцином. При злокачествените мамарни неоплазии средната площ на ядрата бе $> 80 \mu\text{m}^2$.



Фиг. 1. Графично представяне на средната площ на ядрата. А – аденом, ТС – ту-булопапиларен карцином, SC – солиден карцином, CC – крибриформен карцином.

Среден периметър на ядрата

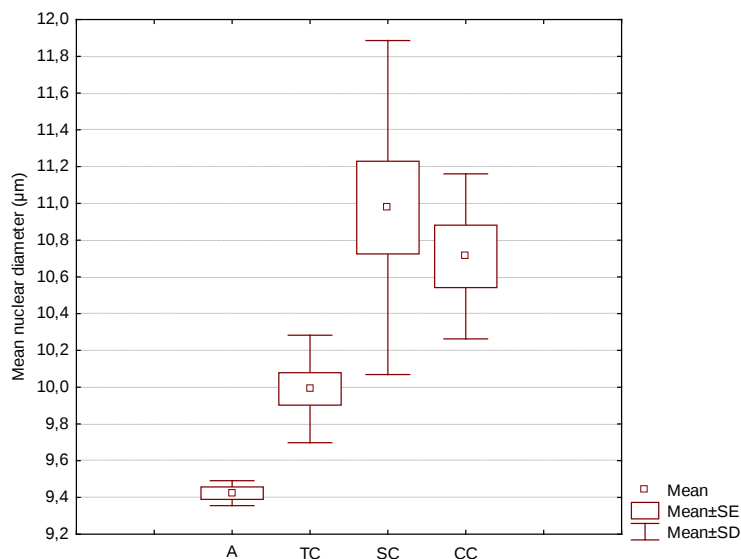
Резултатите са представени графично на Фиг. 2. Средните числените стойности на този морфометричен показател варираха в следните граници: аденом – $30.16 \pm 0.23 \mu\text{m}^2$, тубулопапиларен карцином – $32.83 \pm 0.68 \mu\text{m}^2$, солиден карцином – $35.76 \pm 2.62 \mu\text{m}^2$, крибриформен карцином – $34.50 \pm 1.36 \mu\text{m}^2$. Средният периметър на ядрата бе най-малък при аденом, а най-голям при солиден карцином. При злокачествените мамарни неоплазии средният периметър на ядрата бе над $31 \mu\text{m}^2$.



Фиг. 2. Графично представяне на средния периметър на ядрата. А – аденом, ТС – тубулопапиларен карцином, SC – солиден карцином, CC – крибриформен карцином.

Среден диаметър на ядрата

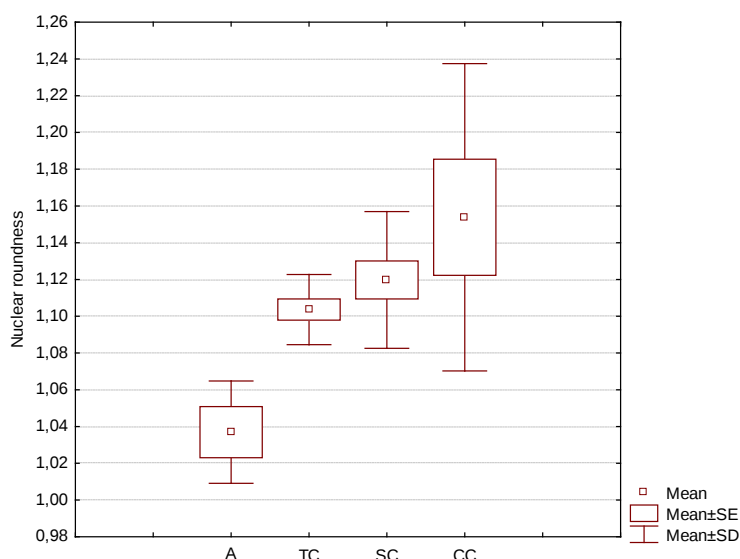
Средните числени стойности на морфометричния показател среден диаметър на ядрото варираха както следва: аденом - $9.42 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$, тубулопапиларен карцином – $9.99 \pm 0.29 \mu\text{m}^2$, солиден карцином – $10.97 \pm 0.9 \mu\text{m}^2$, крибриформен карцином – $10.71 \pm 0.44 \mu\text{m}^2$. Минималният диаметър на ядрата бе най-малък при аденом, а най-голяма при солиден карцином. При злокачествените мамарни неоплазии средният диаметър на ядрата бе над $9.5 \mu\text{m}^2$ (Фиг. 3).



Фиг. 3. Графично представяне на средния диаметър на ядрата. А – аденом, ТС – тубулопапиларен карцином, SC – солиден карцином, CC – крибриформен карцином.

Закръгленост на ядрата

Резултатите са представени графично на Фиг. 4. При компютърния цитоморфометричен анализ получихме следните средни числени стойности: аденом – 1.03 ± 0.02 , тубулопапиларен карцином – 1.10 ± 0.01 , солиден карцином – 1.06 ± 0.06 , крибриформен карцином – 1.15 ± 0.08 . Показателят закръгленост на ядрото бе най-малък при аденом, а най-голяма при крибриформен карцином. При злокачествените мамарни неоплазии закръгленост на ядрото бе над 1.05.



Фиг. 4. Графично представяне на закръглеността на ядрата. А – аденом, ТС – ту-булопапиларен карцином, SC – солиден карцином, CC – крибриформен карцином.

Обсъждане

При изследването на морфометричния показател площ на ядрото установихме високи статистически достоверни разлики ($p < 0.01$) при всички неоплазии, с изключение на солиден карцином/крибриформен карцином, където достоверността бе по-ниска ($p < 0.05$). Във ветеринарната медицина до настоящия момент не са провеждани цитоморфометрични проучвания върху показателят площ на ядрото при спонтанни мамарни неоплазии при котките. Аналогични проучвания са извършвани върху патохистологични препарати, а заключението, което авторите правят, е че има статистически достоверни разлики между доброкачествените и злокачествените мамарни тумори при кучката (Ciurea et al., 1992; Juntas and Pogacnik, 2000). При едно наше изследване (Симеонов, 2006) върху цитологични препарати при спонтанни неоплазии

на млечната жлеза при кучката установихме, че този показател може да се използва за цитоморфометрично отдиференциране на доброкачествените от злокачествените мамарни тумори. Средните числени стойности на параметъра се увеличаваха постепенно със повишаване степента на злокачественост на епителните мамарни неоплазии. При злокачествените мамарни тумори средните числени стойности на морфометричния показател площ на ядрото бяха над $67 \mu\text{m}^2$. Морфометричният показател площ на ядрото се проучва от десетилетия в хуманната медицина. Изследванията на наши и чужди автори в доказват, че той може да се използва за отдиференциране на доброкачествените от злокачествените мамарни тумори при жените (Добрева, 1980; Boon et al., 1982b; Автандилов, 1984; Денчев, 1987; Wittekind and Schulte, 1987; Skjorten et al., 1991; Markopoulos et al., 1997; Dey et al., 2000; Tahlan et al., 2000; Tan et al., 2001; Joan et al., 2002; Rajesh et al., 2002). Това се потвърждава напълно и от резултатите от нашето проучване. При изследването на морфометричния показател среден периметър на ядрото установихме високи статистически достоверни разлики ($p < 0.01$) при всички неоплазии, с изключение на солиден карцином/крибриформен карцином, където достоверността бе по-ниска ($p < 0.05$). Според единственото проучване във ветеринарната медицина, показателят периметър на ядрото може да се използва в диагностиката на туморите на млечната жлеза при кучката (Симеонов, 2006). Авторът установява постепенно увеличаване на стойностите с повишаване степента на злокачественост на епителните мамарни неоплазии. При злокачествените мамарни тумори средните числени стойности на морфометричния показател периметър на ядрото са над $29.2 \mu\text{m}$. Тези тенденции се потвърждават и при котката. Резултатите от изследванията в хуманната медицина Добрева (1980), Boon et al. (1982 b), Автандилов (1984), Денчев (1987), Wittekind and Schulte (1987), Wolbert et al. (1993), Parada et al. (1999), Dey et al. (2000), Tahlan et al. (2000), Tan et al. (2001), Rajesh et al. (2002) са в унисон с нашите. При изследването на морфометричния показател среден диаметър на ядрото установихме високи статистически достоверни разлики ($p < 0.01$), при всички изследвани тумори, с изключение на солиден карцином/крибриформен карцином, където достоверността бе по-ниска ($p < 0.05$). При проучване върху показателя при мамарни неоплазии при кучката Симеонов (2006) установява, че от изследваните диаметри (минимален, максимален и среден) средните числени стойности на морфометричния показател среден диаметър на ядрото показват най-високи статистически достоверни разлики. Единствено между тубулопапиларен карцином/фибросарком разликата е по-ниска ($p < 0.01$). При всички останали случаи статистически достоверните разлики между отделните неоплазии са били достатъчно високи ($p < 0.001$). Резултатите от изследванията на наши автори в хуманната онкология показват, че средните числени стойности на показателите, свързани с диаметъра на ядрото (минимален, максимален и среден) показват статистически достоверни разлики между доброкачествените и злокачествените мамарни неоплазии (Добрева, 1980; Денчев, 1987). Освен това, много автори използват средните числените стойности на диаметрите и за субтипизиране на мамарните епителни неоплазии (Wittekind and Schulte, 1987; Fiorella et al., 1997; Dey et al., 2000; Nagashima et al., 2000; Tahlan et al., 2000; Rajesh et al., 2002). Средните числени стойности на параметрите, свързани с площта, периметъра и диаметрите на ядрата показват, че те биха могли да се използват за цитоморфометрично отдиференциране на доброкачествените от злокачествените мамарни неоплазии. Разликите между стойностите на тези показатели при злокачествените епителни тумори показват, че данните от цитоморфометрията биха могли да се използват и за определяне степента на злокачественост и прогнозата на

мамарните карциноми. В хуманната медицина това вече е доказано (Moroz et al., 1997; Kronqvist et al., 1998; Dey et al., 2000; Tahlan et al., 2000; Jalava et al., 2001; Mommers et al., 2001; Kronqvist et al., 2002). Перфектната закръгленост на обектите има числена стойност единица. Всяка по-висока стойност от това показва колко е по-неправилна тяхната форма (в случая, на ядрата на неопластичните клетки). При изследването на морфометричния показател закръгленост на ядрото установихме високи статистически достоверни разлики ($p < 0.01$) между аденом/ тубулопапиларен карцином, аденом/солиден карцином, и по-ниски такива между аденом/крибриформен карцином ($p < 0.05$). Във ветеринарната онкология има две съобщения за използването на морфометричния показател закръгленост на ядрото в диагностиката на мамарните тумори при кучката (Ciurea et al., 1992). Резултатите на авторите показват, че параметърът може да се използва за хистоморфометрично отдиференциране на доброкачествените от злокачествените мамарни неоплазии. При другото проучване, резултатите показват, че параметърът закръгленост на ядрото може да се използва за цитоморфометрично отдиференциране на доброкачествените от злокачествените тумори на млечната жлеза при кучката (Симеонов, 2006). Авторът не установява статистически достоверни разлики между тубулопапиларен карцином/липосарком, солиден карцином/фибросарком, фибросарком/остеосарком и липосарком/солиден карцином. С по-малка статистическа достоверност са били разликите между тубулопапиларен карцином/фиброаденом, тубулопапиларен карцином/солиден карцином и солиден карцином/остеосарком ($p < 0.05$); между фибросарком/липосарком и остеосарком/липосарком статистически достоверните разлики са по-високи ($p < 0.01$). В хуманната медицина има редица изследвания, които показват практическата полза от използването закръглеността на ядрото в туморната диагностика (Mijovic et al., 1999; Kalogeraki et al., 2000; Scierski et al., 2000; Brahmi et al., 2001; Milord et al., 2001; Appel et al., 2003; Scierski et al., 2003; Namyslowsky et al., 2004; Rajesh et al., 2004a; Rajesh et al., 2004b). При злокачествените мамарни неоплазии формата на ядрата е по-неправилна в сравнение с доброкачествените тумори (Giardina et al., 1994; Tahlan et al., 2000; Grizzi et al., 2001; Rajesh et al., 2002). Поради преобладаването на ядрата с приблизително еднакъв размер, хистограмите при доброкачествените тумори на млечната жлеза при котката показват наличие на малък брой върхове във вариационните криви. Поради еднообразието на клетъчните популации и малките размери на ядрата вариационните криви при доброкачествените тумори са изместени наляво, за сметка на ядрените групи с малка площ. Обратно, поради хетерогенността на клетъчните ядра, при злокачествените неоплазии се наблюдава липса на изразени върхове на вариационните криви. Същите са изместени надясно, за сметка на ядрените групи с големи размери. По този начин ние потвърждаваме напълно резултатите от изследванията на други автори, работещи по проблема в хуманната медицина (Добрева, 1980; Денчев, 1987; Dey et al., 2000; Tan et al., 2001; Joan et al., 2002; Rajes et al., 2002; Dey and Mohanty, 2003; Tsygankov et al., 2004). В заключение, резултатите от нашето изследване показват, че показателите средна площ на ядрото, среден периметър на ядрото, среден диаметър на ядрото и закръгленост на ядрото могат да бъдат използвани като допълнителен диагностичен метод за отдиференциране на доброкачествените от злокачествените неоплазии на млечната жлеза при котката.

Литература

1. Allen, D. General application of morphometry. In: Quantitative Clinical Pathology, eds. Hamilton, P. and D. Allen, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 27-121, 1995.

2. Anderson, G., MacAulay, C., Maticic, J., Garner, D. and B. Palcic. The use of an automated image cytometer for screening and quantitative assesment of cervical lesions in the British Columbia Cervical Smear Screening Programme. *Cytopathology*, 8, 298-312.
3. Azis, D. and R. Barathur. Quantitation and morphometric analysis of tumours by image analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 19, 120-125, 1994.
4. Baak, J., Kurver P., De Snoo-Niewlaat A., De Graef S., Makkink B. and M. Boon. Prognostic indicators in breast cancer-morphometric methods. *Histopathology*, 6, 327-339, 1982.
5. Baak, J. and J. Ort. A manual of morphometry in diagnostic pathology. eds. Baak J. and J. Ort, New-York, Springer-Verlag, 96–103, 1983.
6. Baak, J., van Dop, H., Kurver, P. and J. Hermans. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer*, 56, 374-382, 1985.
7. Bahr, A. Images from the 2003 Certification Examination of the American College of Veterinary Radiology: abdomen section. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 45, 279-280, 2004.
8. Boon, M., Trott, P, van Kaam, H., Kurcer, P., Leach, A. and J. Baak. Morphometry and cytodagnosis of breast lesions. *Virchows Archive of Pathological Anatomy and Histopathology*, 396, 9-18, 1982 b.
9. Buhmeida, A. Quantitative Pathology: Historical Background, Clinical Research and Application of Nuclear morphometry and DNA Image Cytometry. *Libyan Journal of Medicine*, 1, 126-139, 2006.
10. Buldyrev, S., Goldberger A., Halvin S., Peng C. and H. Stanley. Fractals in biology and medicine: from DNA to the heartbeat. In: *Fractals in science*, eds. Bude, A. and S. Halvin, Heidelberg, Springer, vol I, 49-87, 1994.
11. Carbo, M. Billedbehandling – laer det selv. IDG Denmark Books, Translation Copirygh@Egmont Bulgaria, 2000.
12. Caruntu, I. Microscopic morphometry - a modern approach. *Revista Medico-Chirurgicala A Societatii de Medici si Naturalisti Din Iasi* , 107, 9-18, 2003.
13. Chieco, P., Jonker A. and C. van Noorden. *Image Cytometry*, eds. Chieco P., Jonker A. and C. van Noorden. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 1-5, 2001.
14. Gil, J., Wu, H. and B. Wang. Image analysis and morphometry in the diagnosis of breast cancer. *Microscopy Research and Techniques* 59, 109-118, 2002.
15. Ciurea, D., Wilkins R., Shalev M., Liu Z., Barba B. and J. Gil. Use of computerezed interactive morphometry in the diagnosis of mammary adenoma and adenocarcinoma in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 300-303, 1992.
16. Cross, S. Fractals in pathology. *Journal of Pathology*, 182, 1-8, 1997.
17. Cullen, J., Page R. and W. Misdorp. An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management. In: *Tumors in Domestic Animals*, ed., Meuten, D., Iowa State Press, 4 th edition, pp. 3-45, 2002.
18. Destexhe, E., Bicker E. and F. Coignoul. Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumors. *Journal of Comparative Pathology*, 113, 205-216, 1995 a.

19. Destexhe, E., Vanmanshove P. and F. Coignoul. Comparison of argyrophilic nuclear organizer regions by counting and image analysis in canine mammary tumors. *American Journal of Veterinary Research*, 569, 185-187, 1995 b.
20. De Vico, G. and P. Maiolino. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117, 99-105, 1997.
21. De Vico, G., Sfacteria A., Maiolino P. and G. Mazzullo. Comparison of nuclear morphometric parameters in cytologic smears and histologic section of spontaneous canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 31, 16-18, 2002.
22. De Vico, G., Maiolino., P., Cataldi., M., Mazzullo, G. and B. Restucci. Nuclear morphometry in relation to lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary Research Communication*, 31(8), 1005-1011, 2007.
23. Dey, P., Ghoshal S. and S. Pattari. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 22, 483-485, 2000.
24. Dey, P. and S. Mohanty. Fractal dimension of breast lesion on cytology smears. *Diagnostic Cytopathology*, 29, 58-86, 2003.
25. Diamond, D., Berry S., Umbricht C., Jewett H. and D. Coffey. Computerized image analysis of nuclear shape as a prognostic factor for prostatic cancer. *Prostate*, 3, 321-332, 1982.
26. Maiolino, P., Restucci B., Papparella S. and G. De Vico. Nuclear morphometry in squamous cell carcinomas of canine skin. *Journal of Comparative Pathology*, 127, 114-117, 2002.
27. Misdorp, W. Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in Domestic Animals*, ed. D. Meuten, Iowa State Press, fourth edition, 575-607, 2002.
28. Simeonov, R. and G. Simeonova. Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Veterinary Clinical Pathology* 35, 88-90, 2006.
29. Simeonov, R. and G. Simeonova. Fractal dimension of canine mammary epithelial tumors on cytologic smears. *Veterinary Clinical Pathology*, ISSN: 1939-165X, December; 35 (4): 444-448, 2006.
30. Simeonov R. Computer-assisted fractal analysis of spontaneous canine mammary gland tumours on cytologic smears. *Trakia Journal of Sciences*, ISSN: 1312-1723, vol.5, Number 1: 65-68, 2007.
31. Simeonov, R. and G. Simeonova. Computerized Cytomorphometric Analysis of Nuclear Area, Nuclear Perimeter and Mean Nuclear Diameter in Spontaneous Canine Mammary Gland Tumours. *Veterinary Research Communications*, 31, 553-558, 2007.