

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΚΡΗΤΗΣ**

Διευθυντής : Καθηγητής Γ.Σ.Δελίδης

ΣΤΑΥΡΟΥ ΣΟΥΜΑΚΗ
Ιατρού Μαιευτήρα – Γυναικολόγου

**ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΓΚΩΝ ΑΠΟ ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ
ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2001

Στους γονείς μου.
(αν και καθυστερημένα...)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	2
ΜΕΡΟΣ Α	3
I ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	3
ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	3
Ενδομήτριο	3
Μυομήτριο	4
Ορογόνος χιτώνας	4
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	5
Καταμήνιος κύκλος	5
II ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ	8
ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	
Λειομύωματα ή Ινομύωματα	8
Ατυπα και Κυτταροβριθή Επιθηλιοειδή	9
Λειομύωματα	
Λειομυοσαρκώματα	11
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ	12
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ	
ΑΠΟ ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	
Μορφομετρικά κριτήρια	15
III ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ	17
ΚΥΤΤΑΡΩΝ	
ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ ΜΕ	17
ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	
ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ	19
ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	20
1. Απλές παράμετροι	20
2. Διφασικές παράμετροι (Two phase parameters)	22
3. Αθροιστικές παράμετροι (Contextual parameters)	22
4. Οπτική πυκνότητα	22
ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΤΩΝ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΩΝ	23
ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	
ΑΞΙΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΤΗΣ	24
ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑΣ	
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	26
ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΩΝ – ΚΥΤΤΑΡΩΝ	
ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΠΟΔΟΜΗ ΚΑΙ	29
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
ΤΗΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑΣ	
1. Μελέτη περιμέτρων	29
2. Μελέτη εμβαδών	29
3. Σύγκριση σχημάτων στόχων	30
4. Μέτρηση όγκων	31
5. Μέτρηση αριθμού αντικειμένων - στόχων	33
6. Έλεγχος κυτταροβριθείας	34

7. Μέτρηση επιφανειών ιστικών στοιχείων	34
ΔΕΙΚΤΗΣ ΠΥΡΗΝΟΚΙΝΗΣΙΩΝ ΚΑΙ	35
ΔΥΣΠΛΑΣΙΑ – ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟΥΣ	
ΟΓΚΟΥΣ ΑΠΟ ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	
ΜΕΡΟΣ Β	38
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	38
Ι ΥΛΙΚΟ	38
ΙΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	39
ΙΙΙ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ – ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	40
Περιφέρεια, άξονες, εμβαδόν	40
Κυτταροβρίθεια Μιτωτικός Δείκτης,	40
Διορθωμένος κατά τον όγκο Μιτωτικός Δείκτης	
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	41
ΜΕΡΟΣ Γ	43
Ι ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
ΙΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τον καθηγητή Γεώργιο Σ. Δελίδη ο οποίος μου ανέθεσε την παρούσα διατριβή και μου παρείχε πολύτιμες υποδείξεις, συμβουλές καθώς και την αμέριστη συμπαράστασή του σε όλες τις φάσεις, ευχαριστώ θερμά.

Ευχαριστώ, επίσης, το σύνολο του προσωπικού, ιατρικού και μη, του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Κρήτης για τη σημαντική βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχε.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κύριο Ιωάννη Παναγιωτίδη, Λέκτορα Παθολογικής Ανατομικής για τη βοήθεια στην εκμάθηση και την εφαρμογή των μορφομετρικών μεθόδων.

Για τους παραπάνω λόγους ευχαριστώ επίσης το σύνολο του προσωπικού, ιατρικού και μη, του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Νοσοκομείου "ΜΕΤΑΞΑ" και ιδιαίτερα την επιμελήτρια κυρία Έφη Πρωτοπαπά.

Τέλος, ευχαριστώ την κυρία Ε. Κουρή Διευθύντρια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Μαιευτηρίου "ΕΛΕΝΑ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ" για την παραχώρηση των περιπτώσεων.

Για την καταλυτική συμβολή του στη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Ιωάννη Βλαχονικολή.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λειομυώματα της μήτρας (ΛΜΜ) που λόγω της περιεκτικότητάς τους σε ινώδη συνδετικό ιστό έχει επικρατήσει να αποκαλούνται συνήθως ινομυώματα, είναι τα συχνότερα καλοήγη νεοπλάσματα στις γυναίκες απαντώμενα σε ποσοστό 20-30% των γυναικών ηλικίας μεγαλύτερης των 30 ετών ⁽¹⁾. Αντιθέτως τα λειομυοσαρκώματα είναι σπάνια και αποτελούν το 1,3% των κακοηθών νεοπλασμάτων της μήτρας ⁽²⁾.

Έως το 1987, είχαν δημοσιευθεί 12 περίπου περιπτώσεις καλοηθών ΛΜΜ που έδωσαν μεταστάσεις. Όλες όμως οι περιπτώσεις αμφισβητήθηκαν κατά πόσον πράγματι αφορούσαν καλοήγη ΛΜΜ ή λειομυοσαρκώματα ⁽¹⁾.

Η πενταετής επιβίωση για τα λειομυοσαρκώματα είναι 3-7,5%, η μεγάλη δε αυτή διακύμανση οφείλεται στα διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι παθολογοανατόμοι στην ταξινόμηση αυτών των νεοπλασμάτων ⁽³⁾.

Τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται είναι: 1) πυρηνική ατυπία, 2) παρουσία γιγάντιων κυτταρικών μορφών, 3) η μεγάλη κυτταροβρίθεια, 4) η διήθηση των αγγείων ⁽⁴⁾. Το σημαντικότερο όμως κριτήριο για τη διάγνωση και την πρόγνωση αυτών των όγκων είναι ο δείκτης μιτωτικής δραστηριότητας (Δ.Μ.Δ.) ^(5,6,7). Η χρησιμότητα αυτού του δείκτη αμφισβητήθηκε ⁽⁸⁾. Σήμερα όμως υπάρχει συμφωνία των περισσοτέρων ερευνητών ότι ο ΔΜΔ έχει μεγάλη προγνωστική αξία ⁽⁹⁾. Έτσι όγκοι με περισσότερες από 10 μιτώσεις/10 οπτικά πεδία με μεγάλη μεγέθυνση (X400) χαρακτηρίζονται ως λειομυοσαρκώματα ανεξάρτητα από το βαθμό ατυπίας, ενώ ΛΜΜ με 5-9 μιτώσεις/10 οπτικά πεδία (ο.π.) χωρίς ατυπία χαρακτηρίζονται ως ΛΜΜ με αβέβαιη ή δυνητική κακοήθεια ⁽¹⁰⁾.

Η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων σε 10 ο.π. αποτελεί το δείκτη μιτωτικής δραστηριότητας που είναι η παλαιότερη μορφομετρική μέθοδος προσδιορισμού της κακοήθειας. Ενώ ο βαθμός ατυπίας έχει γίνει γενικά παραδεκτό ότι αποτελεί υποκειμενική εκτίμηση του παθολογοανατόμου, ο ΔΜΔ θεωρείτο αντικειμενικό κριτήριο ⁽¹¹⁾.

Σε εργασίες της περασμένης δεκαετίας (1990, 1991) ^(12,13) απεδείχθη ότι ο αριθμός αυτός αποτελεί μη αντικειμενικό κριτήριο εξαρτώμενος από τη μεθοδολογία. Ειδικότερα εξαρτάται από τη διάμετρο του οπτικού πεδίου ^(14, 11) την "επιφάνεια" του νεοπλασματικού ιστού που περιλαμβάνεται στην τομή ⁽¹⁵⁾, την κυτταροβρίθεια και τις παραμέτρους μεγέθους πυρήνων μεταξύ των διαφόρων νεοπλασμάτων, ενώ οι παράμετροι αυτές εντός του ίδιου νεοπλάσματος αποτελούν δείκτη της κυτταρικής ατυπίας ⁽¹⁶⁾.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι ο υπολογισμός των μορφομετρικών παραμέτρων και του αριθμού των πυρηνοκινησιών σε όγκους από λείες μυϊκές ίνες μήτρας, συγκριτικά σε καλοήθειες, κακοήθειες και σε όγκους για τους οποίους η δυνητική κακοήθεια έχει πιθανολογηθεί κατά την ιστολογική εξέταση. Σκοπός επίσης είναι ναδειχθεί ότι ο υπολογισμός αυτός δεν εξαρτάται από την υποκειμενική εκτίμηση και τις γνώσεις ειδικού παθολογοανατόμου αλλά γίνεται από μη ειδικό, πλην όμως γνώστη της χρήσης μορφομετρικών συστημάτων.

ΜΕΡΟΣ Α

Ι ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Η μήτρα είναι κοίλο, μυώδες, αποειδές στο σχήμα, όργανο που βρίσκεται μέσα στην πυελική κοιλότητα μεταξύ ουροδόχου κύστης και ορθού. Οι διαστάσεις στις άτοκες γυναίκες είναι 8X5X2 εκ. (μήκος, πλάτος, πάχος) και το βάρος της 40-100 γραμμάρια. Στις γυναίκες που έχουν γεννήσεις οι διαστάσεις της μήτρας είναι 10-12X5-7X2,5-2,5 εκ. και το βάρος της 250 γραμμάρια. Είναι αποπλατυσμένη κατά τον προσθιοπίσθιο άξονα. Αδρά η μήτρα διακρίνεται σε τρία τμήματα: α) τον τράχηλο που είναι το κατώτερο τμήμα της β) Το σώμα που είναι το μεγαλύτερο, υποστρόγγυλο, μέσο τμήμα

της, και γ) τον πυθμένα δηλαδή τη συνέχεια του σώματος πάνω από το επίπεδο που αφορίζεται από την είσοδο των σαλπίνγων στο τοίχωμα του οργάνου που προβάλλει μέσα στον κόλπο⁽¹⁷⁾.

Το τοίχωμα της μήτρας είναι σχετικά παχύ και αποτελείται^{18,19} από τρία στρώματα ήτοι από μέσα προς τα έξω από: α) το ενδομήτριο ή βλεννογόνο της μήτρας, β) το μυϊκό τοίχωμα ή μυομήτριο και γ) τον ορογόνο που αποτελείται από συνδετικό ιστό επικαλυπτόμενο από μεσοθήλιο. Η μήτρα δεν έχει υποβλεννογόνο χιτώνα.

Ενδομήτριο

Το ενδομήτριο αποτελείται από επιθήλιο και χόριο (*lamina propria*) που περιέχει απλούς σωληνοειδείς αδένες οι οποίοι, μερικές φορές, παρουσιάζουν διακλαδώσεις στο βάθος κοντά στο μυομήτριο. Οι αδένες είναι ανοικτοί προς την επιφάνεια του ενδομητρίου και η επιθηλιακή τους επένδυση αποτελεί συνέχεια του επιθηλίου επιφανείας ως εάν πρόκειται περί καταδύσεων-εγκολπώσεων αυτού προς το χόριο.

Το επιθήλιο επιφανείας του ενδομητρίου (καλυπτικό επιθήλιο) είναι απλό κυλινδρικό, αποτελούμενο από κροσσωτά κύτταρα και εκκριτικά κύτταρα. Το επιθήλιο των ενδομητρικών αδένων μοιάζει μορφολογικά με το επιθήλιο επιφανείας αλλά τα κροσσωτά κύτταρα είναι πλέον σπάνια κατ' αυτό. Το χόριο του ενδομητρίου αποτελείται από τροποποιημένο κυτταροβριθή συνδετικό ιστό με άφθονη άμορφη μεσοκυττάρια ουσία. Σπάνια ανευρίσκονται σαυτό κολλαγόνες ίνες. Έτσι, ο ιστός αυτός μοιάζει μορφολογικά με μεσέγχυμα⁽²⁰⁾.

Το ενδομήτριο δέχεται αιμάτωση από τις μητριάιες αρτηρίες οι οποίες διακλαδιζόμενες δίνουν γένεση στις τοξοειδείς αρτηρίες που βρίσκονται στο μέσον του πάχους του μυομητρίου. Απ' αυτές ξεκινούν οι ευθείες αρτηρίες που αιματώνουν το κατώτερο τμήμα του ενδομητρίου (*stratum basale*) και οι ελικοειδείς αρτηρίες που αιματώνουν το ανώτερο τμήμα του (*stratum functionalis*).

Η διπλή αιμάτωση του ενδομητρίου έχει σημασία για την κυκλική-περιοδική απόπτωση του ανωτέρου τμήματος του πάχους του ενδομητρίου. Οι ευθείες αρτηρίες δεν αποπίπτουν, ενώ οι ελικοειδείς αποπίπτουν.

Το ενδομήτριο διακρίνεται ανατομολειτουργικά σε δύο μοίρες, ήτοι: α) την ανώτερη (3/5 του πάχους του ενδομητρίου) λειτουργική (*functionalis*) που αποτελεί το τμήμα που αποπίπτει κατά την έμμηνη ρύση και αντικαθίσταται κατά το υπόλοιπο του καταμηνίου κύκλου και β) τη βασική (*basalis*), ήτοι την κατώτερη μοίρα του πάχους του που δεν αποπίπτει κατά την έμμηνη ρύση και από την οποία αναγεννάται το επιθήλιο επιφανείας με τους αδένες και το χόριο. Τα μητρικά κύτταρα (*stem cells*) από τα οποία αναγεννάται το ενδομήτριο βρίσκονται στο βασικό τμήμα των αδένων του ενδομητρίου⁽¹⁸⁾.

Μυομήτριο

Το μυομήτριο είναι το παχύτερο τμήμα του τοιχώματος της μήτρας και αποτελείται από δεσμίδες μακρών λείων μυϊκών ινών ανάμεσα στις οποίες υπάρχει ινώδης συνδετικός

ιστός και αγγεία. Οι δεσμίδες των λείων μυικών ινών διατάσσονται σε τέσσερα μη σαφώς αφοριζόμενα στρώματα από τα οποία το έσω και το έξω αποτελούνται από επιμήκως φερόμενες (παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα της μήτρας) λείες μυϊκές ίνες. Τα δύο μέσα στρώματα του μυϊκού χιτώνα της μήτρας φέρουν τις τοξοειδείς αρτηρίες. Το μυομήτριο υπερτρέφεται και υπερπλάσσεται κατά την κύηση⁽¹⁸⁾.

Ορογόνος χιτώνας

Ο ορογόνος χιτώνας της μήτρας αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό. Αντίστοιχα προς τον πυθμένα ο συνδετικός ιστός καλύπτεται από μεσοθήλιο, ενώ αντίστοιχα προς το σώμα δεν φέρει μεσοθηλιακή επένδυση και μεταπίπτει στο συνδετικό ιστό των πλατέων συνδέσμων της μήτρας που ονομάζεται παραμήτριο.

Η πιο πάνω δομή του μητριαίου τοιχώματος αφορά στο σώμα και στον πυθμένα κυρίως.

Ο τράχηλος της μήτρας αποτελείται από πυκνό ινώδη συνδετικό ιστό και μικρό αριθμό λείων μυικών ινών. Ο βλεννογόνος του επενδύεται από απλό υψηλό κυλινδρικό επιθήλιο και φέρει πολλούς βλεννοπαραγωγούς πολυδιακλαδιζόμενους αδένες μέσα στο χόριο.

Η εξωτερική-κολπική του επιφάνεια επενδύεται από πολύστιβο πλακώδες μη κερατινοποιούμενο επιθήλιο. Ο βλεννογόνος του τραχήλου δεν αποπίπτει κατά την έμμηνη ρύση, αλλά, παρά ταύτα, υφίσταται κυκλικές μεταβολές που εκφράζονται ως μεταβολές της πυκνότητας και της ποσότητας των ενδοτραχηλικών εκκρίσεων⁽¹⁸⁾.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Καταμήνιος κύκλος

Το ενδομήτριο υφίσταται κατά μήνα 28 ημερών κυκλικές μεταβολές, που ελέγχονται από τις ορμόνες της ωοθήκης, οιστρογόνα και προγεστερόνη. Η έκκριση των πιο πάνω ορμονών ρυθμίζεται από την ωοθυλακιοτρόπο (FSH) και την ωχρινοτρόπο ορμόνη της υπόφυσης (LH). Κάθε κύκλος (περιοδικές μεταβολές του ενδομητρίου) διακρίνεται σε τρεις φάσεις²¹, ήτοι:

α) τη φάση της εμμηνορρυσίας, β) την παραγωγική φάση και γ) την εκκριτική φάση.

Η φάση της εμμηνορρυσίας διαρκεί 3-5 ημέρες και η πρώτη ημέρα της σημαίνει την αρχή του κύκλου. Η έκπτωση του επιπέδου της προγεστερόνης που οφείλεται στην εκφύλιση του ωχρού σωματίου της ωοθήκης προκαλεί διακεκομμένη σύσπαση των ελικοειδών αρτηριών του ενδομητρίου, ισχαιμία και αποικοδόμηση του ενδομητρίου, τέλος δε απόπτωση της λειτουργικής στιβάδας του (stratum functionalis) που εκφράζεται ως ροή αίματος, τμημάτων του διασπασμένου ενδομητρίου και εκκρίσεων του ενδοτραχήλου. Επειδή οι ευθείες αρτηρίες δεν επηρεάζονται από τις μεταβολές των ορμονών, η βασική στιβάδα του ενδομητρίου μένει άθικτη.

Η παραγωγική φάση διαρκεί από την τέταρτη έως έκτη ημέρα του κύκλου και φθάνει μέχρι τη δέκατη τέταρτη. Κατ' αυτήν υπό την επίδραση των οιστρογόνων των θυλακίων της ωοθήκης (τα οποία θυλάκια ωριμάζουν υπό την επίδραση της θυλακιοτρόπου ορμόνης) το ενδομήτριο αναγεννάται από τη βασική του στιβάδα. Καθώς αναγεννάται η λειτουργική στιβάδα οι αρτηρίες της αυξάνουν σε μήκος και είναι σχετικά ευθείες. Η επίδραση της ωχρινοτρόπου ορμόνης τη δέκατη τέταρτη ημέρα προκαλεί ωοθυλακιορρηξία το σχηματισμό του ωχρού σωματίου.

Η εκκριτική φάση διαρκεί από τη δέκατη τέταρτη ως την εικοστή όγδοη ημέρα του κύκλου. Υπό την επίδραση της προγεστερόνης του ωχρού σωματίου αυξάνονται οι αδένες του ενδομητρίου σε μέγεθος, διευρύνεται και διατείνεται ο αυλός τους, προκαλείται έκκριση απ' αυτούς, εξοιδένεται ο συνδετικός ιστός του χορίου του ενδομητρίου και ως τελική συνισταμένη όλων των πιο πάνω παχύνεται το ενδομήτριο.

Οι αδένες παρουσιάζουν έντονη ελίκωση (εικόνα πριονιού σε επιμήκη διατομή) και παρατηρείται προβάλλουσα έκκριση γλυκοπρωτεϊνών. Οι ελικοειδείς αρτηρίες επιμηκύνονται. Μέχρι την εικοστή ημέρα του κύκλου το ενδομήτριο έχει προετοιμασθεί στο μέγιστο για την υποδοχή γονιμοποιημένου ωαρίου. Αν δε συμβεί κάτι τέτοιο, ακολουθεί απόπτωση του ενδομητρίου - νέος κύκλος⁽²¹⁾.

II ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τον κλασικό ορισμό του Willis, νεόπλασμα ονομάζεται μια ανώμαλη μάζα ιστού, η αύξηση της οποίας είναι υπερβολική σε σχέση με την αύξηση των γύρω της ιστών, δεν υπόκειται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς (uncoordinated) και εξακολουθεί να αυξάνεται και μετά την παύση δράσης του αιτίου που την προκάλεσε²². Παρά τα χρόνια που πέρασαν από τότε που διατυπώθηκε από τον Willis ο πιο πάνω ορισμός του νεοπλάσματος και παρά την πρόοδο της επιστήμης και ιδιαίτερα της μοριακής βιολογίας και της ανοσολογίας, δεν φαίνεται να διατυπώθηκε πιο εμπειριστατωμένη περιγραφή της νεοπλασίας, τουλάχιστον για κλινική χρήση και γι' αυτό το λόγο ο ορισμός αυτός έχει υιοθετηθεί από την Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου - UICC.

Τα νεοπλάσματα (ή νεοπλασίες), από άποψη βιολογικής συμπεριφοράς διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα καλοήθη και τα κακοήθη. Με τα διαθέσιμα όμως μορφολογικά κριτήρια, ένα ποσοστό νεοπλασμάτων δεν είναι δυνατό να καταταχθούν, εκ του ασφαλούς, σε μία από τις δύο κατηγορίες. Έτσι, δημιουργήθηκε και μία τρίτη ομάδα, με ενδιάμεση ανάμεσα στις δύο πιο πάνω βιολογική συμπεριφορά. Τα νεοπλάσματα της ομάδας αυτής φέρονται στη βιβλιογραφία ως “οριακά” (“borderline”) ή “αβέβαιης βιολογικής συμπεριφοράς” νεοπλάσματα.

Ανεξάρτητα από τη βιολογική τους συμπεριφορά, τα νεοπλάσματα ταξινομούνται και ανάλογα με την προέλευσή τους, σε δύο επίσης μεγάλες ομάδες, τα επιθηλιακής προέλευσης (καρκινώματα) και τα μεσεγχυματικούς προέλευσης που κατά κανόνα ονομάζονται σαρκώματα. Τα κριτήρια με βάση τα οποία τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε καλοήθη ή κακοήθη είναι κυτταρολογικά και ιστολογικά (δομικά, αρχιτεκτονικά) ενώ για τον προσδιορισμό της προέλευσής τους πρέπει να μπορεί κανείς να αναγνωρίζει τους φυσιολογικούς ιστούς και κατ' αντιστοιχία τα νεοπλασματικά τους αντίστοιχα. Τούτο είναι δύσκολο, μερικές φορές, όταν το νεόπλασμα είναι τόσο αδιαφοροποίητο που να μη μοιάζει με το φυσιολογικό ιστό από το οποίο προέρχεται.

Οι συνηθέστεροι τύποι μεσεγχυματογενών νεοπλασμάτων είναι ιστοκυτταρικής, οστεοκυτταρικής, ινοκυτταρικής, λιποκυτταρικής, μυϊκής, ενδοθηλιακής και νευρικής προέλευσης^{23,24}. Απαντώνται, επίσης, μεσεγχυματογενή νεοπλάσματα που αποτελούνται από περισσότερους του ενός τύπου ιστούς ή και αδιαφοροποίητα - αμετάπλαστα που δύσκολα αναγνωρίζεται η ιστοική τους προέλευση. Για μερικά απ' αυτά, ορισμένοι συγγραφείς δέχονται ότι προέρχονται από πολυδύναμα μητρικά κύτταρα των μεσεγχυματογενών ιστών^{23,24}.

Τα σαρκώματα αποτελούν ένα πολύ μικρότερο ποσοστό των κακοήθων νεοπλασμάτων σε σχέση με τα καρκινώματα και απαντώνται σε διάφορες θέσεις του σώματος μεταξύ των οποίων και το μυϊκό τοίχωμα της μήτρας (μυομήτριο). Εκτός των κακοήθων μεσεγχυματογενών νεοπλασμάτων στο μυομήτριο απαντώνται και τα καλοήθη αντίστοιχά τους. Τα συχνότερα αναπτυσσόμενα καλοήθη και κακοήθη μεσεγχυματογενή νεοπλάσματα της μήτρας προέρχονται από λείες μυϊκές ίνες.

ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Στη μήτρα αναπτύσσονται διαφόρων ειδών μεσεγχυματογενή νεοπλάσματα, καλοήθη και κακοήθη, τα πιο συχνά από τα οποία είναι τα καλοήθη από λείες μυϊκές ίνες που ονομάζονται λειομύωματα ή ινομύωματα. Η τελευταία ονομασία «ινομύωματα» έχει επικρατήσει λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε συνδετικό ιστό. Τα αντίστοιχα κακοήθη νεοπλάσματα ονομάζονται λειομυοσαρκώματα και είναι κατά πολύ σπανιότερα.

Λειομύωματα ή Ινομύωματα

Τα ινομύωματα απαντώνται σε ποσοστό 20-30% των γυναικών ηλικίας μεγαλύτερης των 30^{25,26}. Συνήθως απαντώνται κατά την τετάρτη και πέμπτη δεκαετία της ζωής, είναι περισσότερα του ενός, ενδοτοιχωματικά ή υποβλεννογόνια ή υπορογόνια, ποικίλλουν σε μέγεθος από πολύ μικρά (ινομυωματώδεις πυρήνες διαμέτρου μερικών χιλιοστών) έως τεράστια, συνήθως όμως, 3-5 εκ. σε διάμετρο. Όταν είναι μεγάλα είναι δυνατόν να εμφανίζουν κατά περιοχές, εκφυλιστικές αλλοιώσεις με εστίες αιμορραγικής διαπότισης, ακόμη δε νέκρωση και ασβεστοποίηση. Στις περιπτώσεις που παρατηρείται νέκρωση η σύστασή τους από στερεά γίνεται μαλακή οπότε δημιουργείται σε μακροσκοπικό επίπεδο θέμα διαφορικής διάγνωσης από σάρκωμα. Τα λειομύωματα αφορίζονται σαφώς από το γύρω τους μυομήτριο, αλλά δεν έχουν πραγματική κάψα, είναι υποστρόγγυλα, με λευκόφαιη ή λευκορόδινη χροιά. Στις διατομές, η όψη τους είναι δεσμιδωτή.

Από ιστολογική άποψη, τα λειομύωματα αποτελούνται από δεσμίδες λείων μυϊκών ινών που φέρονται προς διάφορες κατευθύνσεις και διαπλέκονται μεταξύ τους. Είναι ποικίλλουσας κυτταροβριθείας νεοπλάσματα, με μικρή αγγειοβριθεία και χαμηλή αυξητική δραστηριότητα. Τα κύτταρά τους (λείες μυϊκές ίνες) είναι ομοιόμορφα και ομοιομεγέθη με χαρακτηριστικό ωοειδή πυρήνα χωρίς ιδιαίτερος προβάλλοντα πυρήνια ή ανωμαλίες της περιφέρειας του πυρήνα. Η χρωματίνη του πυρήνα είναι λεπτά κατανεμημένη, το κυτταρόπλασμα τους λίγο και ηωσινόφιλο και τα όριά τους ασαφή. Το σχήμα του κυττάρου δηλαδή της μυϊκής ίνας είναι επίμηκες, ατρακτοειδές. Γιγαντοκύτταρα και δυσπλασία συνήθως δεν παρατηρούνται και οι πυρηνοκινησίες είναι από ανύπαρκτες έως σπάνιες και δεν ξεπερνούν τις 4 ανά 10 μεγάλα οπτικά πεδία (μεγέθυνση X400). Σε περιοχές εκφύλισης ή κοντά σε αγγεία, μπορεί να παρατηρηθεί κυτταρική πολυμορφία με συμμετοχή γιγαντίων κυτταρικών μορφών, χωρίς όμως παράλληλη αύξηση των πυρηνοκινησιών και χωρίς παρουσία ατύπων πυρηνοκινησιών²⁷. Τούτο πρέπει να είναι γνωστό ώστε να αποφεύγεται η λανθασμένη τοποθέτηση της διάγνωσης κακοήθειας στις ανάλογες περιπτώσεις.

Μερικά ινομύωματα αυξάνουν σε μέγεθος γρήγορα κατά τη διάρκεια της κύησης ή υπό την επίδραση ορμονικών σκευασμάτων^{25,26} και στις περιπτώσεις αυτές γεννιάται θέμα αποκλεισμού κακοήθους εξαλλαγής προϋπάρχοντος ινομύωματος. Παρ' όλα αυτά, η ανάπτυξη λειομυοσαρκώματος επί προϋπάρχοντος ινομύωματος²⁶ είναι πολύ σπάνια.

Άτυπα και Κυτταροβριθή Επιθηλιοειδή Λειομύωματα

Εκτός από τα κλασσικού τύπου λειομύωματα-ινομύωματα, υπάρχουν και ποικιλίες τους που εγείρουν, μερικές τουλάχιστον φορές, πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης από λειομυοσαρκώματα. Οι συνηθέστερες από τις μορφές αυτές είναι: τα κυτταροβριθή ινομύωματα, τα άτυπα ινομύωματα και τα επιθηλιοειδή ινομύωματα (λειομυοβλαστώματα)²⁵.

Στις περιπτώσεις αυτές παρά την αυξημένη κυτταροβρίθεια και την κυτταρική πολυμορφία, ο αριθμός των πυρηνοκινησιών είναι μικρότερος των 5 ανά 10 μεγάλα οπτικά πεδία και δεν παρατηρούνται άτυπες πυρηνοκινησίες^{2,28-33}. Υπάρχουν όμως και όγκοι από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας χωρίς ουσιώδη ατυπία, με κανονική ή ελαττωμένη κυτταροβρίθεια και αριθμό πυρηνοκινησιών 5 έως 9 ανά 10 μεγάλα οπτικά πεδία (μ.ο.π.). Οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται ως λειομύωματα με αυξημένο αριθμό πυρηνοκινησιών²⁵. Η βιολογική τους συμπεριφορά είναι δύσκολο να προσδιορισθεί και πιθανώς μερικές φορές, κάτω από τη μορφολογία αυτή υποκρύπτεται λειομυοσάρκωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας.

Σπάνιες μορφές λειομυωμάτων της μήτρας²⁵, μπορούν να δημιουργήσουν διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα γιατί έχουν μακροσκοπικούς και κυρίως μικροσκοπικούς μορφολογικούς χαρακτήρες τους οποίους παρουσιάζουν τα λειομυοσαρκώματα και άλλα κακοήθη μεσεγγυματογενή νεοπλάσματα.

Έτσι, τα μυξοειδή λειομύωματα είναι μαλακά και έχουν άμορφο μυξοειδές στρώμα μεταξύ των κυτταρικών τους στοιχείων. Δεν παρουσιάζουν, όμως, διηθητική ανάπτυξη προς τα γύρω, δεν έχουν ατυπία και δεν έχουν αυξημένες, τον αριθμό, ή άτυπες πυρηνοκινησίες. Αν και τα πιο πάνω λειομύωματα δεν έχουν διαγνωστικούς ιστολογικούς χαρακτήρες κακοήθειας, πρέπει να θεωρούνται πάντοτε νεοπλάσματα με αβέβαιη βιολογική συμπεριφορά²⁵. Ένα σημαντικό κώλυμα στην ορθή αξιολόγηση της βιολογικής τους συμπεριφοράς είναι ο αναλογικά ελαττωμένος αριθμός πυρηνοκινησιών λόγω του αυξημένου στρώματός τους και της κατά συνέπεια ελαττωμένης εκπροσώπησης του νεοπλασματικού κυτταρικού τους στοιχείου.

Μια άλλη ποικιλία λειομυωμάτων, τα αγγειοβριθή λειομύωματα δημιουργούν πρόβλημα διαφορικής διάγνωσης από αγγειακής προέλευσης νεοπλάσματα και λειομυοσαρκώματα που είναι αγγειοβριθέστερα των αντιστοιχών μη κακοηθών όγκων εκ λείων μυϊκών ινών.

Επί πλέον τα λειομύωματα μπορούν να προκαλέσουν πρόβλημα διαφοροδιάγνωσης από μεσοθηλιώματα αδενωματοειδούς τύπου (adenomatoid mesotheliomas) στην περίπτωση που έχουν σωληνόμορφους σχηματισμούς ή και από μεικτούς μεσοδερμικής προέλευσης όγκους, όταν περιέχουν στοιχεία επιθηλιοειδή. Ανάλογο πρόβλημα δημιουργούν και τα λιπολειομύωματα. Στις πιο πάνω περιπτώσεις μόνο η ποσοτική μελέτη και/ή ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος των διαφόρων συστατικών στοιχείων του νεοπλάσματος μπορούν να λύσουν το πρόβλημα.

Η διάχυτη λειομυωμάτωση και η ενδαγγειακή λειομυωμάτωση²³⁻²⁵ μπορούν να εκληφθούν ως διηθητικά και συνεπώς κακοήθη μεσεγγυματογενή νεοπλάσματα (λειομυοσαρκώματα). Στις περιπτώσεις αυτές καλείται να λύσει το πρόβλημα η

μέτρηση του αριθμού των πυρηνοκινησιών και ο προσδιορισμός των λοιπών μορφομετρικών παραμέτρων.

Η έννοια του καλοήθους λειομώματος που δίνει μεταστάσεις φαίνεται ότι δεν έχει πλέον λόγο ύπαρξης. Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι η ανάλυση των δημοσιευθεισών περιπτώσεων (12-24 κατά τους διάφορους συγγραφείς²³⁻²⁵) δεν περιελάμβανε ασφαλή μορφομετρικά κριτήρια και προφανώς επρόκειτο περί χαμηλού βαθμού κακοήθειας λειομυοσαρκωμάτων τα οποία διέφυγαν την κατ' αρχήν ορθή διάγνωση²⁵.

Λειομυοσαρκώματα

Από τα σαρκώματα της μήτρας, τα λειομυοσαρκώματα είναι τα δεύτερα σε συχνότητα σαρκώματα που αναπτύσσονται στο όργανο μετά τους κακοήθεις μεικτούς μεσοδερμικής προέλευσης όγκους. Αποτελούν το 1,3% όλων των κακοηθών νεοπλασμάτων της²⁵ και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητά τους μια δεκαετία μετά τα λειομώματα (έκτη δεκαετία της ζωής)²⁶.

Σήμερα δεν είναι αποδεκτό ότι προέρχονται από εξαλλαγή προϋπαρχόντων λειομυωμάτων παρά μόνον σπάνια και η άποψη αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα μισά έως τα 2/3 απ' αυτά είναι μονήρη^{3,33}.

Συνήθως αναπτύσσονται "De novo" από λείες μυϊκές ίνες κατά κανόνα του μυομητρίου. Παρουσιάζουν τάση υποτροπής μετά την αφαίρεσή τους, αν μάλιστα αυτή δεν είναι ριζική σε ποσοστό πάνω από 50% δίνουν μεταστάσεις κυρίως στους πνεύμονες, στα οστά και στον εγκέφαλο²⁶. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών κυμαίνεται γύρω στο 40%. Τα καλά διαφοροποιημένα έχουν καλύτερη πρόγνωση από τα λοιπά και μάλιστα τα αναπλαστικά των οποίων η πενταετής επιβίωση βρίσκεται γύρω στο 10 με 15%²⁶.

Γενικά στη βιβλιογραφία η πενταετής επιβίωση των ασθενών εμφανίζει μεγάλη διακύμανση (3-75%)²⁵. Ο λόγος για τη μεγάλη αυτή διακύμανση του υπολογιζόμενου χρόνου επιβίωσης των ασθενών με λειομυοσαρκώματα της μήτρας είναι η δυσκολία που συναντούν οι Παθολογοανατόμοι στην κατάταξη μορφολογικά οριακών νεοπλασμάτων από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας³ και μάλιστα όταν δεν εφαρμόζονται μορφομετρικές μέθοδοι αντικειμενικής εκτίμησης των διαφόρων ιστολογικών και κυτταρολογικών ευρημάτων. Ιδιαίτερα προβλήματα κατάταξης και προσδιορισμού της βιολογικής συμπεριφοράς τους παρουσιάζουν νεοπλάσματα από λείες μυϊκές ίνες χωρίς ή με οριακή κυτταρική ατυπία και αριθμό πυρηνοκινησιών μεταξύ 5 και 10 μ.ο.π. (X400). Τα νεοπλάσματα αυτά πρέπει να χαρακτηρίζονται ως λειομυοσαρκώματα απρόβλεπτης έκβασης (με απρόβλεπτη βιολογική συμπεριφορά).

Τα λειομυοσαρκώματα είναι συνήθως μονήρη, αναπτύσσονται μέσα στο μυομήτριο και μπορούν να σχηματίζουν μάζα που προβάλλει μέσα στην κοιλότητα της μήτρας. Ιστολογικά παρουσιάζουν ποικίλλουσα σε έκταση και ένταση κυτταρική πολυμορφία, ατυπία και αυξημένες ως και άτυπες πυρηνοκινησίες. Τα όριά τους είναι ασαφή και διηθούν τους γύρω μη νεοπλασματικούς ιστούς. Η διάγνωση του λειομυοσαρκώματος τοποθετείται σε ένα όγκο εκ λείων μυϊκών ινών της μήτρας όταν:

α. Υπάρχουν πάνω από 10 μιτώσεις ανά 10 μ.ο.π. (X400) ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι κυτταρικής ατυπίας, ή

β. Υπάρχουν 5-9 μιτώσεις/10 μ.ο.π. (X400) με παρουσία κυτταρικής ατυπίας.

Λειομυοσαρκώματα με μυξοειδείς ή επιθηλιοειδείς χαρακτήρες μπορούν να έχουν (φαινομενικά) λιγότερες από τις πιο πάνω πυρηνοκινησίες που αναφέρονται χωρίς τούτο να αλλάξει την επιθετική βιολογική τους συμπεριφορά³⁴.

Τα λειομυοσαρκώματα είναι μεγαλύτερα των λειομυμάτων (συχνά η διάμετρος είναι μεγαλύτερη από 10 εκ.), έχουν συχνότερα εκφυλιστικές αλλοιώσεις (νεκρώσεις και αιμορραγικές διηθήσεις) και παρουσιάζουν γρηγορότερη αύξηση του μεγέθους τους²³. Σε σχέση με τα λειομύματα, σε ιστολογικό επίπεδο, είναι κυτταροβριθέστερα, πολύμορφα, άτυπα, με γιγάντιες (συχνά) κυτταρικές μορφές, με διήθηση των αγγείων και των γύρω ιστών και με περισσότερες πυρηνοκινησίες.

Η διαφοροποίηση συμβαδίζει με το επίπεδο του αριθμού των πυρηνοκινησιών και το βαθμό της κυτταρικής πολυμορφίας²⁵. Ο αριθμός των πυρηνοκινησιών θεωρείται καλύτερος-ασφαλέστερος προγνωστικός δείκτης απ' ότι η πολυμορφία-ατυπία για τα κακοήθη αυτά νεοπλάσματα²⁵.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΛΕΙΕΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Τα καλοήθη νεοπλάσματα αναπτύσσονται απωθώντας τους γύρω ιστούς, δεν διηθούν αγγεία και δεν δίνουν μεταστάσεις. Αντίθετα τα κακοήθη διηθούν και καταστρέφουν τους γύρω ιστούς, διηθούν αγγεία και δίνουν μεταστάσεις. Η αδυναμία μας να διαφοροδιαγνώσουμε οριακές, ανάμεσα στις δύο πιο πάνω ομάδες, περιπτώσεις νεοπλασμάτων, έχει δημιουργήσει μια τρίτη ομάδα, την ομάδα των αβέβαιης βιολογικής συμπεριφοράς- έκβασης νεοπλασμάτων, η οποία σήμερα μικραίνει συνεχώς, με την εφαρμογή μορφομετρικών μεθόδων, την αυτοματοποίησή τους και τη βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας.

Προκειμένου, ειδικά, περί των μεσεγγυματογενών νεοπλασμάτων και ειδικότερα των όγκων από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας, είναι επιβεβλημένο να διαγνώσει κανείς εκ του ασφαλούς τις περιπτώσεις που αντιστοιχούν σε σαρκώματα ώστε να γίνει έγκαιρα η σωστή θεραπεία.

Την τελευταία πεντηκονταετία έχει γίνει σημαντική πρόοδος στη θεραπευτική αντιμετώπιση των σαρκωμάτων. Η εφαρμογή, όμως, της σωστής κατά περίπτωση θεραπείας προϋποθέτει την ασφαλή και ακριβή ιστογενετική διάγνωση του σαρκώματος ως και τον προσδιορισμό των μορφομετρικών παραμέτρων που έχουν προγνωστική αξία για το συγκεκριμένο σάρκωμα.

Η ιστολογική διάγνωση-ταυτοποίηση των σαρκωμάτων (που υποβοηθείται πλέον από την ανοσοϊστοχημεία) ακολουθείται από τον προσδιορισμό της διαφοροποίησής τους

που, σήμερα πλέον, για λόγους αναπαραγωγιμότητας-αξιοπιστίας, τείνει να γίνεται σε τρεις βαθμούς²³⁻²⁶ από μερικούς όμως σε 2 ή 4 βαθμούς²³. Ιστολογικός τύπος και βαθμός διαφοροποίησης έχουν προγνωστική έννοια, όχι όμως τόσο μεγάλη όσο πιστευόταν παλιότερα και όχι τόσο μεγάλη όσο ο βαθμός της επιθετικότητας του νεοπλάσματος όπως αυτός προσδιορίζεται από μια σειρά μορφομετρικών κριτηρίων σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει σε διάφορα νεοπλάσματα, με απλή μορφομετρία, με χρησιμοποίηση υπολογιστή και ειδικά προγράμματα ή με στατιστική ανάλυση εικόνας^{12,33,34-42}.

Με βάση τα κύρια από τα πιο πάνω κριτήρια (Πίνακας 1) τα σαρκώματα κατατάσσονται σε τρεις (3) βαθμούς κακοηθείας ή βιολογικής συμπεριφοράς, από τους οποίους ο βαθμός 1 αντιστοιχεί στην καλύτερη για τον ασθενή συμπεριφορά και ο βαθμός 3 στη χειρότερη.

Δεν υπάρχει ενιαίο σύστημα βαθμονόμησης της συμπεριφοράς των σαρκωμάτων όπως αυτή προσδιορίζεται με μορφολογικά κριτήρια και τούτο γιατί το κάθε ένα κριτήριο του πίνακα 1 έχει βρεθεί ότι έχει διαφορετική προγνωστική αξία για το κάθε είδος σαρκώματος⁴³. Έτσι, ενώ για τα λειομυοσαρκώματα ο καλύτερος προγνωστικός δείκτης είναι ο αριθμός των πυρηνοκινήσιων, για άλλα νεοπλάσματα μεσεγγυματογενούς προέλευσης, όπως τα κακοήθη ινώδη ιστιοκυτώματα, τα λιποσαρκώματα και τα αγγειοσαρκώματα έχει μικρότερη αξία⁴⁴.

Τα μορφολογικά κριτήρια του πίνακα 1 εκτός του ότι προσδιορίζουν το καθένα χωριστά και σε συνδυασμούς τη βιολογική συμπεριφορά των σαρκωμάτων, παράλληλα προσδιορίζουν και το επίπεδο της διαφοροποίησής τους, γεγονός που δείχνει το πόσο αλληλένδετα είναι η διαφοροποίηση και η πρόγνωση των σαρκωμάτων. Παρ' όλα αυτά, η κλινική παρατήρηση έχει δείξει ότι τα διάφορα σαρκώματα του ίδιου επιπέδου διαφοροποίησης

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.

Βιολογική συμπεριφορά των σαρκωμάτων

Κυτταρομορφολογικοί και ιστολογικοί δείκτες	Βαθμός 1	Βαθμός 2	Βαθμός 3
Κυτταρική πολυμορφία (ποικιλία σχήματος) μεγέθους,	Μικρή	Μέση	Μεγάλη
Πυρήνια	Δεν υπάρχουν ή είναι μικρά	Μικρού έως μέσου μεγέθους	Μεγάλου μεγέθους
Πυρηνοκινήσιες	Λίγες	Μέτριες	Πολλές
Άτυπες πυρηνοκινήσιες	Δεν υπάρχουν	Μερικές άτυπες	Πολλές άτυπες
Ανωμαλία κατανομής χρωματίνης	Δεν υπάρχει	Μετρίου βαθμού	Μεγάλου βαθμού
Κυτταροβρίθεια	Μικρή	Μέτρια	Μεγάλη
Νέκρωση	Δεν υπάρχει	Εστιακή	Εκτεταμένη
Κυτταρική διαφοροποίηση	Καλή	Μέση	Χαμηλή

Αγγειοβρίθεια	Μικρή	Μέση	Μεγάλη
Στρώμα	Πολύ	Μέτριο	Λίγο
Αιμορραγική διήθηση	Μικρή	Μέτρια	Μεγάλη

συμπεριφέρονται ανάλογα με την ιστογενετική τους προέλευση διαφορετικά⁴⁴ και τούτο αποδεικνύει ότι οι βιολογικοί δείκτες συμπεριφοράς τους και κυρίως ο αριθμός των πυρηνοκινησιών, τροποποιεί κατά περίπτωση την επιθετικότητάς τους. Η εντόπιση (επιτολής ή εν τω βάθει), το όργανο προέλευσης του σαρκώματος και το μέγεθός του είναι δύο επί πλέον παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του^{45,46}.

Τα λειομυοσαρκώματα της μήτρας δεν εξετάζονται συνήθως με τα υπόλοιπα λειομυοσαρκώματα των μαλακών μορίων, παρ' όλα αυτά και γι' αυτά ισχύουν οι ίδιοι δείκτες ταξινόμησης, μόνο που η αξία τους είναι διαφορετική απ' ότι στα υπόλοιπα λειομυοσαρκώματα. Ακριβώς, η διαφορετική συμπεριφορά των λειομυοσαρκωμάτων ή ινολειομυοσαρκωμάτων της μήτρας επιβάλλει και τη χωριστή μελέτη τους.

Ο βαθμός διαφοροποίησεως ενός σαρκώματος βασίζεται παραδοσιακά στις πιο κάτω ιστολογικές παραμέτρους^{23,24}:

- 1) Κυτταροβρίθεια
- 2) Κυτταρική και πυρηνική πολυμορφία και ατυπία
- 3) Μιτωτική δραστηριότητα (αριθμός και ατυπία των πυρηνοκινησιών)
- 4) Βαθμός διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων
- 5) Νέκρωση
- 6) Ποσότητα στρώματος

Η παρουσία αιμορραγικών διηθήσεων, ασβεστώσεων και φλεγμονωδών διηθήσεων έχουν συζητηθεί σαν παράγοντες με προγνωστική σημασία. Η αξιοπιστία τους όμως αμφισβητείται από πολλούς ερευνητές.

Τα πιο πάνω μορφολογικά κριτήρια μαζί με τη διήθηση των γύρω ιστών ως και αγγείων και νεύρων χρησιμοποιούνται και για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων μεσεγχυματογενών νεοπλασμάτων.

Μορφομετρικά κριτήρια

Οι παραπάνω διαγνωστικοί και προγνωστικοί αυτοί δείκτες δύσκολα αξιολογούνται με υποκειμενικά ποιοτικά ή έστω ημιποσοτικά κριτήρια και δύσκολα αναπαράγονται ακόμη και από τον ίδιο τον Παθολογοανατόμο που έκανε την αρχική διάγνωση, πολύ δε περισσότερο από περισσότερους του ενός Παθολογοανατόμους⁴⁷. Γι' αυτό η ποσοτική μικροσκοπική ανάλυση ιστών και κυττάρων είναι αναγκαία όχι μόνο για αντικειμενική αξιολόγηση των διαφόρων μορφολογικών χαρακτηριστικών, αλλά και για ανάδειξη στοιχείων τα οποία ξεφεύγουν από την απλή υποκειμενική εκτίμηση⁴⁸⁻⁵¹.

Ακόμη ο σπουδαιότερος από τους πιο πάνω δείκτες, προκειμένου για τα σαρκώματα, ο αριθμός των πυρηνοκινησιών^{3,6,33}, αμφισβητήθηκε⁵³. Σήμερα όμως πλέον φαίνεται να μην υπάρχουν σοβαρές αντιρρήσεις για την αξία του^{54,55}.

Ανάλογες διαπιστώσεις έχουν γίνει και σε άλλα νεοπλάσματα εκτός από τους όγκους από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας^{14,56}. Σε άλλες μελέτες κυριότερος δείκτης πρόγνωσης σαρκωμάτων θεωρείται η νέκρωση η οποία χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό της βιολογικής τους συμπεριφοράς και πρόγνωσης τους^{45,57}.

Ο καθορισμός της ευπλοειδικότητας του κυτταρικού πληθυσμού των σαρκωμάτων έχει χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης πρόγνωσης. Ο δείκτης αυτός υπολείπεται όμως σαφώς του αριθμού των πυρηνοκινήσιών γιατί υπάρχουν σαρκώματα που δεν παρουσιάζουν ανευπλοειδικό DNA ενώ μη νεοπλασματικές αλλοιώσεις, μπορεί να είναι ανευπλοειδείς^{58,59}.

Εκτός, όμως, από τον μιτωτικό δείκτη και άλλες μορφομετρικές παράμετροι, του πυρήνα των κυττάρων θεωρούνται σήμερα χρήσιμες για την ταξινόμηση και την πρόγνωση της βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασμάτων. Οι κυριότεροι απ' αυτούς είναι η περίμετρος, η διάμετρος, η επιφάνεια, το σχήμα (σχηματικός παράγοντας) και οι αποκλίσεις των πιο πάνω^{36,37,40}.

Είναι αποδεδειγμένο ότι το στάδιο, δηλαδή η έκταση της νόσου, κατά το χρόνο διάγνωσης είναι επίσης ένας από τους πιο σπουδαίους προγνωστικούς δείκτες^{23,24} των σαρκωμάτων όπως και των λοιπών κακοήθων νεοπλασμάτων, αλλά ο προσδιορισμός του σταδίου είναι προϊόν κλινικοεργαστηριακής συνεργασίας και ακολουθεί την αρχική ιστολογική διάγνωση.

Όσον αφορά στον παθολογοανατόμο απαιτεί ποιοτικό έλεγχο και όχι ποσοτικές μετρήσεις. Έτσι, δεν αναμένεται στη φάση αυτή της μελέτης της νόσου σημαντική συμβολή ειδικών ιστοπαθολογικών μεθόδων όπως η μορφομετρία κ.λ.π.

III ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ιστών και κυττάρων

Σήμερα υπάρχουν διάφορες μέθοδοι και διάφορα συστήματα ποσοτικής μελέτης ιστών και κυττάρων σε ιστολογικά και κυτταρολογικά παρασκευάσματα. Τα κυριότερα απ' αυτά είναι:

α) **Κλασσική μορφομετρία** που χρησιμοποιεί από απλά μορφομετρικά συστήματα όπως ο Βερνιέρος του μικροσκοπίου και πλέγματα/Grids που τοποθετούνται στον ένα προσοφθάλμιο φακό και επιπροβάλλονται στην εξεταζόμενη εικόνα (στην περίπτωση αυτή απαιτείται βαθμονόμηση με τη βοήθεια ειδικής αντικειμενοφόρου πλάκας που φέρει χαραγές σε σταθερές κανονικές αποστάσεις), έως πλέον περίπλοκα συστήματα όπως σωλήνας προβολής-σχεδίασης εικόνας μικροσκοπίου ή Camera Lucida, οθόνη προβολής μικροσκοπικής εικόνας, κλειστό κύκλωμα τηλεόρασης) ή και συστήματα που χρησιμοποιούν ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με ευαίσθητη ηλεκτρομαγνητική πλάκα (digitizing tablet), μικροσκόπιο και σωλήνα σχεδίασης ή μηχανή λήψης εικόνας (camera). Μερικά από τα τελευταία αυτά συστήματα (video overlay systems) έχουν αντί για ηλεκτρομαγνητική δισκέτα με δείκτη (cursor), ένα "mouse".

β) **Στατική, ψηφιακή ηλεκτρονική ανάλυση εικόνας** (Image Analysis), αυτόματη ή ημιαυτόματη (interactive).

γ) **Κυτταρομετρία ροής** (flow cytometry), που όμως απαιτεί διάσπαση του εξεταζόμενου ιστού και συνεπάγεται απώλεια της δυνατότητας αρχιτεκτονικής μελέτης του.

Οι πιο περίπλοκες από τις πιο πάνω διατάξεις έχουν μειονεκτήματα που συχνά επισκιάζουν την ταχύτητα ελέγχου που αποδίδουν.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ ΜΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Η αυτοματοποιημένη (μερικώς ή πλήρως) ανάλυση εικόνας μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες, ήτοι α) τη μικροφωτομετρία και β) τη μετατροπή εικόνας σε αριθμητικά δεδομένα (image analysis). Η κλασσική μορφομετρία βασίζεται στη μικροφωτομετρία¹⁰.

Όταν το ορατό φως περνάει από μία ιστική τομή μέρος του απορροφάται. Η απορρόφηση αυτή εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός, από την πυκνότητα της ουσίας μέσα από την οποία περνάει και το πάχος της ιστικής τομής. Το χρησιμοποιούμενο στη μικροφωτομετρία φως μπορεί να είναι προσπίπτον ή διερχόμενο. Τα μικροφωτομετρικά συστήματα φέρουν εκτός από το φωτόμετρο και το μικροσκόπιο και φωτοπολλαπλασιαστές. Ακόμη μπορεί να φέρουν μηχανή λήψης, ηλεκτρονικό υπολογιστή-επεξεργαστή και κατάλληλο λογισμικό-πρόγραμμα (software). Στις πιο πάνω διατάξεις που λειτουργούν με κοινό φως και δεν απαιτούν την εφαρμογή ιστοχημικών ή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων προκειμένου για μορφομετρικές αναλύσεις και όχι για πυκνομετρία, παρεμβάλλεται και παίζει σημαντικό ρόλο ο χειριστής (interactive systems). Μολονότι οι "interactive" διατάξεις-συσκευές μερικές τουλάχιστον φορές υπολείπονται, έναντι των αυτομάτων, σε διακριτική ικανότητα και

ταχύτητα, έχουν το πλεονέκτημα ότι σε κριτικές φάσεις της όλης διαδικασίας επιτρέπουν την παρεμβολή του χειριστή, όπως π.χ. στον προσδιορισμό των ορίων των προς μελέτη εικόνων.

Στις αυτόματες συσκευές, η μικρή φασματική διαφορά / αντίθεση μεταξύ αντικειμένου - στόχου (foreground) και υποστρώματος (back-ground) όπως συμβαίνει στα κοινά μικροσκοπικά παρασκευάσματα, δεν επιτρέπει τον σαφή και ορθό καθορισμό των ορίων των εικόνων (segmentation) και έτσι μπορεί να οδηγήσει είτε σε σφαλερά αποτελέσματα είτε σε αδυναμία περάτωσης του ελέγχου. Βέβαια, τα πιο σύγχρονα αυτόματα συστήματα επιτρέπουν και αυτά την παρεμβολή του χειριστή. Η αξία κτήσης τους, όμως, είναι υπερβολική. Δύο επί πλέον μειονεκτήματα των πλήρως αυτοματοποιημένων συστημάτων είναι α) το ότι παρουσιάζουν αδυναμία ελέγχου πολύπλοκων εικόνων, όπως είναι οι ιστολογικές όπου και πάλι απαιτείται η παρέμβαση του χειριστή, γεγονός που τους αφαιρεί το πλεονέκτημα της ταχύτητας και β) το ότι όταν εξετάζονται τομές βαμμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη ή van Gieson, δεν μπορούν να διακρίνουν τα διαφορετικά μήκη κύματος γιατί οι πιο πάνω χρωστικές που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό έχουν αλληλοεπιβαίνοντα φάσματα (spectra)¹⁰.

Κατά κανόνα, όταν χρησιμοποιούμε τον όρο μορφομετρία δεν περιλαμβάνουμε τη στατική (in situ) ή την δια ροής (κυτταρομετρία ροής) ανάλυση του DNA, αλλά απλούστερες μορφομετρικές μεθόδους που αφορούν σε κυτταρομορφολογικά χαρακτηριστικά. Και στις αναλύσεις αυτές όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιούνται σήμερα πλέον ηλεκτρονικοί υπολογιστές, κατάλληλα προγράμματα λογισμικού (software) και συστήματα παρεμβολής του εξεταστή στις διαδικασίες του ηλεκτρονικού υπολογιστή (interactive systems).

Η ηλεκτρονική πλήρως αυτοματοποιημένη in situ, ψηφιακή ανάλυση εικόνας (image analysis) καθώς και η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) φέρονται σήμερα υπό τον όρο "αυτοματοποιημένη μορφομετρία".⁴³

Σε εξέλιξη βρίσκεται η σαρωτική μικροσκοπία με ακτίνες Laser (Laser scanning microscopy) που βασίζεται στη μονοχρωματική (ένα μήκος κύματος) εκπομπή ειδικής πηγής και εφαρμόζεται για α) ταχύ έλεγχο μεγάλων περιοχών της ελεγχόμενης ιστικής τομής και β) αυξημένη διακριτική μελέτη (high resolution).

Στην εξέλιξη των ποσοτικών μεθόδων μελέτης έχει συμβάλει πάρα πολύ η εκμετάλλευση των υψηλής στάθμης προγραμμάτων υπολογιστών (artificial intelligence). Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων των ποσοτικών μεθόδων επιτυγχάνεται χάρις στη βιομετρία ήτοι την στατιστική ανάλυση βιολογικών δεδομένων.

ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ

Η ανάγκη ποσοτικής έκφρασης και μελέτης των διαφόρων χαρακτηριστικών των νεοπλασμάτων με αντικειμενικό σκοπό τη διαφορική διάγνωση κατ' αρχήν και την ανάδειξη προγνωστικών δεικτών στη συνέχεια επιβάλλει την εφαρμογή μεθόδων της μορφομετρίας. Οι δυσκολίες που προκύπτουν, μερικές φορές, στη διαφορική διάγνωση μεταξύ λειομυωμάτων και λειομυοσαρκωμάτων έχουν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο. Επίσης, έχει αναφερθεί το ότι ενώ το οπλισμένο με τους φακούς του

μικροσκοπίου μάτι του εξεταστή μπορεί να κάνει ποιοτικές παρατηρήσεις με βάση την αρχή του όλου ή του μηδενός, οι ποσοτικές μέθοδοι μπορούν να αναδεικνύουν παραμέτρους που μπορούν άλλως να διαφεύγουν και ιδιαίτερα σε αναφορά σε συνεχή μεγέθη όπως το μέγεθος και η πυκνότητα. Έτσι, μπορούν να εφαρμοσθούν σε ένα επόμενο στάδιο και στατιστικές αναλύσεις.

Η μορφομετρία είναι ακριβώς ο κλάδος της μορφολογίας (ιστοπαθολογίας και κυτταροπαθολογίας) που αφορά στην ποσοτική περιγραφή και μελέτη γεωμετρικών παραμέτρων κυττάρων και ιστών¹⁰. Η μορφομετρία βασίζεται στη φασματοφωτομετρία. Παρά τη μη πλήρη συμφωνία όλων των ειδικών ο όρος "μορφομετρία" αντικαταστάθηκε από τον όρο "Υπολογιστική Παθολογική Ανατομική" (Quantitative Pathology) από την ομάδα μορφομετρίας της Ευρωπαϊκής Παθολογοανατομικής Εταιρείας⁶⁰.

Η μορφομετρία διακρίνεται σε α) **Μακροσκοπική** που βασίζεται στην αξιοποίηση των διαστάσεων και/ή του βάρους του χειρουργικού παρασκευάσματος. Εφαρμόζοντας τις αρχές της ελέγχουμε τις πιθανότητες που έχουμε να εντοπίσουμε μέσα του μια αλλοίωση⁶⁰ και β) **Μικροσκοπική** με τις αρχές της οποίας μπορούμε να υπολογίσουμε παραμέτρους πυρήνων, κυττάρων, μεγαλύτερων σχηματισμών, να υπολογίσουμε αριθμό πυρηνοκινησιών κλπ.

Η μικροσκοπική μορφομετρία διακρίνεται σε κυτταρομορφομετρία και ιστομορφομετρία. Τα αποτελεσμάτα των μεθόδων της μορφομετρίας εκφράζονται σε απόλυτους αριθμούς, αλλά όταν πρόκειται να γίνουν συγκρίσεις και σε συμβατικές μονάδες. Η χρήση συμβατικών μονάδων είναι αναγκαία γιατί οι πραγματικές διαστάσεις ενός αντικειμένου - στόχου επηρεάζονται από το μορφομετρικό σύστημα, τη μονιμοποίηση του εξεταζόμενου υλικού, το πάχος και την αντιπροσωπευτικότητα των ελεγχόμενων ιστικών τομών⁶⁰. Η μικροσκοπική μορφομετρία μπορεί να εφαρμοσθεί σε ιστικές τομές, σε δια βελόνης βιοψίες, σε κυτταρολογικά επιχρίσματα και παρασκευάσματα επαφής ή εντυπώματα ως και σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα από υγρά (ασκίτικό, πλευριτικό, εγκεφαλονωτιαίο κλπ.). Πλανιμετρία ονομάζεται το τμήμα εκείνο της μορφομετρίας που αναφέρεται στην ανάλυση δισδιάστατων εικόνων, ενώ στερεομετρία ονομάζεται το τμήμα της εκείνο που ανάγει τα δεδομένα που απορρέουν από τη δισδιάστατη ανάλυση σε τρεις διαστάσεις.

ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Οι γεωμετρικές παράμετροι - δείκτες που μπορούν να εξετασθούν και εκφραστούν ποσοτικά κατά τη μελέτη νεοπλασματικών ιστών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Αναλυτικότερα, οι μορφομετρικές παράμετροι που συνηθέστερα εξετάζονται κατατάσσονται σε τέσσερις (4) ομάδες⁶¹ τις εξής:

1. Απλές παράμετροι

α) **Επιφάνεια**: Η επιφάνεια του εξεταζόμενου στόχου όπως περιγράφεται από καμπύλη που περνάει από τα σημεία που αφορίζουν την περιφέρειά του.

Πίνακας 2.

Παράμετροι που μελετώνται και εκφράζονται με μορφομετρικές μεθόδους.

Πυρηνική επιφάνεια

Κυτταροπλασματική επιφάνεια

Επιφάνεια πυρηνίων

Περιφέρεια, άξονες και σχέσεις αξόνων πυρήνων

Μορφή περιφέρειας πυρήνων

Σταθερή απόκλιση μεγέθους πυρήνων

Πυρηνοκυτταροπλασματική σχέση

Κατανομή χρωματίνης πυρήνων

Μιτωτικός δείκτης

Μέγεθος νεοπλασματικών σχηματισμών

(π.χ. καρκινωματοδών βλαστών)

Ποσοστά συστατικών στοιχείων νεοπλασμάτων (π.χ. ποσοστό επιθηλιακών στοιχείων) και κυτταροβρίθεια

Μέγεθος κυττάρων και δομών του νεοπλάσματος

Καθορισμός δείκτη ευπλοειδικότητας

(πυκνομετρική ανάλυση του DNA)

β) **Διάμετρος**: Η διάμετρος ενός κύκλου με την ίδια επιφάνεια του μετρούμενου αντικειμενικού - στόχου.

γ) **Περίμετρος**: Το μήκος της περιφέρειας του αντικειμένου - στόχου.

δ) **Βραχύτερος άξονας**: Ο βραχύτερος άξονας μιας έλλειψης με την ίδια προς το εξεταζόμενο αντικείμενο - στόχο επιφάνεια.

ε) **Μακρύτερος άξονας**: Ο μακρύτερος άξονας μιας έλλειψης με την ίδια επιφάνεια του εξεταζόμενου αντικειμένου-στόχου.

στ) **Μέγιστη προβολή** (μέγιστος προβαλλόμενος άξονας) εξεταζόμενου στόχου στον άξονα X (Feret X).

ζ) **Μέγιστη προβολή** (μέγιστος προβαλλόμενος άξονας) του εξεταζόμενου στόχου στον άξονα Y (Feret Y).

2. Παράμετροι σχήματος (shape factors) που περιγράφουν το σχήμα του αντικειμένου-στόχου όπως παράγονται από το περισσότερο ή λιγότερο ανώμαλο σχήμα του.

α) **Σχέση αξόνων**: Σχέση μακρύτερου και βραχύτερου άξονα.

β) *Σχέση περιμέτρου και επιφανείας* (π.χ. τον πυρήνα (Nuclear/contour index).

γ) *Σφαιρικότητα* π.χ. του πυρήνα. $\text{Περίμετρος}/2\Pi$.

δ) *Σχέση AR* (AR Form): $1/4 \Pi$. μακρύτερος άξονας / βραχύτερος άξονας.

ε) *Σχέση PE* (PE Form): 4Π .Επιφάνεια/Περίμετρος².

2. Διφασικές παράμετροι (Two phase parameters)

α) *Πυρηνοκυτταροπλασματική σχέση* (N/C Ratio): Σχέση επιφανείας πυρήνα προς επιφάνεια του κυττάρου.

β) *Πυρηνιοπυρηνική σχέση* (NN Ratio): Σχέση επιφανείας πυρηνίου προς επιφάνεια πυρήνα.

γ) *Διαφορά επιφανειών* (Area difference): Διαφορά της μίας συγκρινόμενης επιφάνειας από την άλλη.

δ) *Σχέση θέσης* συγκρινόμενων φάσεων /παραμέτρων (eccentricity).

3. Αθροιστικές παράμετροι (Contextual parameters)

α) *Επιφάνεια*: Ομοειδών στόχων (cluster area)

β) *Αριθμός στόχων κατά μικροάθροιση* (elements per cluster).

γ) *Σχήμα μικροαθροίσεων* στόχων (cluster shape).

δ) *Απόσταση* μεταξύ μικροαθροίσεων στόχων (distance between clusters).

4. Οπτική πυκνότητα

Από τις πιο πάνω παραμέτρους μερικές χρησιμεύουν περισσότερο για τον προσδιορισμό του επιπέδου της διαφοροποίησης ενός νεοπλάσματος και τη διαφοροδιάγνωση και άλλες κυρίως οι των παραγράφων 1 και 2 για τον προσδιορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς του νεοπλάσματος (grading). Επίσης, ανάλογα με τον τύπο του νεοπλάσματος, άλλοτε αποκτά μεγαλύτερη αξία μια παράμετρος και άλλοτε μια άλλη.

ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΤΩΝ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Οι μορφομετρικές μέθοδοι παρουσιάζουν επαναληψιμότητα, ακρίβεια και ευαισθησία ως ένα μόνο βαθμό και τούτο γιατί μπορούν να υπεισέλθουν διάφορα, κατά περίπτωση, σφάλματα. Ειδικά η επαναληψιμότητα (δηλαδή ο βαθμός σύμπτωσης των αποτελεσμάτων επανειλημμένων μετρήσεων ενός συγκεκριμένου δείγματος ή

αντιπροσωπευτικών δειγμάτων αντικειμένων - στόχων) υπόκειται σε τρία συνήθως σφάλματα, ειδικότερα σε σχέση με τα πιο κάτω:

α) Απόσταση της υπολογιζόμενης μέσης τιμής από την πραγματική ζητούμενη τιμή (Bias).

β) Απόσταση των τιμών των επανειλημμένων μετρήσεων από τη μέση τιμή (Precision).

γ) Απόσταση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων από την πραγματική ζητούμενη τιμή (Accuracy).

Αρκετές στατιστικές παράμετροι περιγράφουν την ακρίβεια και την ευαισθησία και αρκετά σφάλματα μπορούν να υπεισέλθουν και σ' αυτές⁴⁴.

Η μορφομετρία όπως έχει ήδη διαφανεί από τα πιο πάνω έχει και αυτή περιορισμούς. Έτσι, για κάθε μία παράμετρο μπορεί να υπάρχουν ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα και μία "γκρίζα" ζώνη ασάφειας όσον αφορά σε ορισμένα τουλάχιστον νεοπλάσματα. Η ζώνη αυτή μικραίνει όταν επιλέγουμε με προσοχή την κατάλληλη παράμετρο και όταν ιδίως χρησιμοποιούμε περισσότερες της μιας παραμέτρους. Προσθήκη οσωνδήποτε πέραν των 5 παραμέτρων δεν βελτιώνει το αποτέλεσμα όπως έχει ήδη αποδειχθεί πειραματικά⁶².

Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αξιοπιστία της μορφομετρίας είναι:

α) Τρόπος μονιμοποίησης (χρόνος από τις αφαιρέσεις του παρασκευάσματος μέχρι της εμφάνισής του στο μονιμοποιητικό, διάρκεια μονιμοποίησης, είδος μονιμοποιητικού και επεξεργασίας διατομές πριν την εμφάνιση στο μονιμοποιητικό).

β) Μέγεθος του ελεγχόμενου δείγματος.

γ) Πάχος ιστικών τομών.

δ) Αντιπροσωπευτική ή όχι επιλογή του δείγματος.

ε) Καθορισμός των ορίων του μετρούμενου δείγματος, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται ημιαυτόματες διατάξεις.

στ) Διάταξη (εξοπλισμός) δια μέσου της οποίας επιτελούνται οι μετρήσεις.

ζ) Πείρα και ορθή κατάστρωση του πρωτοκόλλου μελέτης.

ΑΞΙΑ ΚΑΙ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑΣ

Η διάγνωση συχνά ενέχει την έννοια της πρόγνωσης⁶⁰ όπως π.χ. στην περίπτωση του μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα. Στην περίπτωση αυτή η πρόγνωση μπορεί να χαρακτηριστεί ως "απόλυτη".

Πολλές φορές όμως, η πρόγνωση που προκύπτει από τη διάγνωση κυμαίνεται σε ευρέα πλαίσια, όπως π.χ. στο καρκίνωμα του μαστού.

Ο προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης κακοηθείας και του σταδίου ενός κακοήθους νεοπλασματος μετατρέπει μια σχετική πρόγνωση σε απόλυτη⁶⁰. Η αντικειμενικοποίηση συνεπώς του βαθμού κακοηθείας από την άποψη του Παθολογοανατόμου, είναι απαραίτητη και επιτυγχάνεται δια μέσου της μορφομετρίας. Με τη μορφομετρία μίας ή περισσότερων αντικειμενικών παραμέτρων επιτυγχάνεται καλύτερη πρόγνωση, μόνο που στην περίπτωση αυτή θα πρέπει το σταθερό σφάλμα της μορφομετρικής μεθόδου που εφαρμόζεται να είναι μικρότερο από εκείνο της υποκειμενικής εκτίμησης⁶³.

Για να αντιληφθούμε πληρέστερα την αξία της μορφομετρίας αρκεί να σκεφτούμε τι μπορεί να κρύβεται κάτω από τον περιγραφικό όρο "ευμεγέθη κυτταρικά στοιχεία". Αύξηση του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα ή και των δύο, κατά περίπτωση ή και μέσα στο ίδιο νεόπλασμα.

Για τον προσδιορισμό των πιο πάνω πιθανών αλλοιώσεων και την ποσοτική τους έκφραση αρκεί ο (μορφομετρικός) έλεγχος επιφανειών διατομής των κυττάρων-στόχων, με την κατάλληλη διόρθωση. Το ίδιο ισχύει και για τα πυρήνια. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι αντιστοιχίες μορφομετρικών και περιγραφικών όρων. Είναι φανερό ότι η μορφομετρία είναι αντικειμενικότερη της απλής περιγραφής.

Δεν είναι υπερβολή να υποστηρίζει κανείς ότι σε κάθε ένα νεόπλασμα πρέπει η ιστολογική έκθεση να συμπληρώνεται με μορφολογικές παραμέτρους που έχουν για κάθε συγκεκριμένο νεόπλασμα προγνωστική έννοια. Τούτο, όμως, απαιτεί χρόνο, κατάλληλο (έστω και ελάχιστο) εξοπλισμό και προ παντός εμπειρία.

Πίνακας 3.

Αντιστοιχίες όρων Μορφομετρίας και Περιγραφικής Κυτταροπαθολογίας

Περιγραφικοί όροι	Μορφομετρικοί όροι
1. Κυτταρική πολυμορφία 2. Πυρηνική πολυμορφία	Μεταβολή της περιφερείας κυττάρων ή πυρήνων (Roundness)
3. Ανισομεγέθεις ή ποικιλομεγέθεις πυρήνες	Αυξημένη σταθερή απόκλιση μεγέθους πυρήνων
4. Μεγεθυσμένα κύτταρα ή πυρήνες ή πυρήνια	Αυξημένη κυτταροπλασματική επιφάνεια Αυξημένη πυρηνική επιφάνεια Αυξημένη πυρηνιακή επιφάνεια
5. Αυξημένη πυρηνοκυτταροπλασματική σχέση	Αυξημένη σχέση επιφάνειας πυρήνα προς επιφάνεια κυτταροπλάσματος
6. Αλλαγή κατανομής χρωματί-νης	Μεταβολή παραμέτρων δομής πυρήνα (Nuclear texture)
7. Ελαττωμένη κυτταρική συ-νοχή	Μικρό μέγεθος βλαστών και λίγα κύτταρα βλαστών

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΣΤΩΝ - ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αυτόματα και ημιαυτόματα συστήματα μπορούν να εξετάζουν ιστικό υλικό μονιμοποιημένο κατάλληλα σε διάλυμα φορμόλης (κατά προτίμηση ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης τελικής αραιώσης 3,7-4%) ή και οινόπνευμα. όταν πρόκειται να γίνει έλεγχος DNA, τα μονιμοποιητικά που περιέχουν βαρέα μέταλλα είναι ακατάλληλα και τότε απαιτείται και ειδική χρώση (τροποποιημένη Feulgen).

Εάν η μονιμοποίηση των ιστών είναι ανεπαρκής ή μη έγκαιρη μπορεί να προκύψουν για όλες τις αυτόματες, πλήρως ή μη αυτόματες μεθόδους πρόσθετα προβλήματα όπως η μη μέτρηση του πραγματικού αριθμού των πυρηνοκινήσιων⁶⁴ (πράγμα που ισχύει και για τα απλούστερα μορφομετρικά συστήματα), αδυναμία καθορισμού του αντικειμένου-στόχου σε σχέση με το υπόστρωμα ως και ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Το πάχος των ελεγχόμενων ιστικών τομών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4 μικρών (μ).

Η χρήση δείκτη αντί πέννας για τον προσδιορισμό του στόχου, οι μεγάλες μεγεθύνσεις προκειμένου για πυρήνες κυττάρων (έτσι ώστε το CV -συντελεστής μεταβλητότητας- να παίρνει τη μικρότερη δυνατή τιμή που έχει βρεθεί ότι πρέπει να είναι περί το 1,5%), η λογική ταχύτητα (7-20 χιλ./sec, γιατί μεγαλύτερη ταχύτητα ανεβάζει το CV, δηλαδή τον συντελεστή μεταβλητότητας) και η μέτρηση απευθείας μέσω του μικροσκοπίου είναι οι πλέον ιδανικές συνθήκες αξιοποίησης της ημιαυτόματης-interactive μορφομετρίας. Συνιστάται, επίσης, να γίνεται έλεγχος - μέτρηση στο κέντρο του εξεταζόμενου οπτικού πεδίου και όχι στην περιφέρεια για τον κίνδυνο υπερεκτίμησης στόχων που βρίσκονται εκεί⁶⁵. Όλα τα πιο πάνω μαζί με την ορθή επιλογή της κατάλληλης διάταξης (συσκευής), αλλά καθώς και ο έλεγχος - calibration πριν από κάθε χρήση και η τήρηση ορισμένων κανόνων ασφαλείας απαιτούνται για να παίρνουμε αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα⁶⁶.

Όσον αφορά στη διαδικασία της μορφομετρίας καθαυτής, βασικότατος παράγοντας για μια αξιόπιστη και επαναλήψιμη μορφομετρική μελέτη είναι, επίσης, η επιλογή της πλέον αντιπροσωπευτικής θέσης του παρασκευάσματος⁶⁷. Πρέπει πάντοτε να επιλέγεται η θέση με τα πλέον άτυπα κυτταρικά στοιχεία μετά προσεκτική ενδελεχή μικροσκοπική⁶¹. Εάν μέσα στις τιμές ενός παρασκευάσματος υπάρχει μεγάλη διακύμανση (ποικιλομορφία, ποικιλία μεγέθους πυρήνων κλπ) των διαφόρων παραμέτρων, απαιτείται μέτρηση μεγάλου αριθμού στόχων (π.χ. πυρήνων). Αν στο παρασκεύασμα παρόμοια στην εμφάνισή τους κυτταρικά στοιχεία σχηματίζουν μικροσκοπικές αθροίσεις (clusters) που παρουσιάζουν διαφορές στην κυτταρική τους σύνθεση, τότε πρέπει να γίνεται αμέσως έλεγχος κυττάρων σε πολλές διαφορετικές μικροαθροίσεις⁶¹.

Εφόσον επιλεγεί η κατάλληλη θέση-περιοχή μέτρησης, πρέπει να γίνει επιλογή των στόχων που θα μετρηθούν. Αποκλείονται τα κατεστραμμένα ή οπωσδήποτε αλλοιωμένα κυτταρικά στοιχεία και τα μη νεοπλασματικά κύτταρα. Από τα κρινόμενα ως κατάλληλα για μέτρηση κύτταρα η επιλογή μπορεί να γίνει:

α) Τυχαία βάσει του ποια κύτταρα ή πυρήνες βρίσκονται σε επαφή με ορισμένα τυχαία σημεία του προβαλλόμενου στο ιστολογικό παρασκεύασμα προσοφθάλμιου πλέγματος (grid).

β) Βάσει του ποια κύτταρα έρχονται σ' επαφή με την προβαλλόμενη εικόνα του προσοφθάλμιου πλέγματος.

γ) Βάσει του ποια κύτταρα βρίσκονται μέσα σε μια συγκεκριμένη ζώνη εύρους που καθορίζεται από τον εξεταστή. Η μέθοδος αυτή θεωρείται η πιο καλή⁶¹.

δ) Χωρίς καμία επιλογή, ανάλογα με το ποια κύτταρα "πέφτουν" στο μάτι του εξεταστή. Αυτή η μέθοδος θεωρείται η λιγότερο αντικειμενική.

ε) Βάσει του ποια κύτταρα φαίνονται εκ πρώτης όψης να παρουσιάζουν σε έντονο βαθμό την αναμενόμενη απόκλιση από το φυσιολογικό. Η μέθοδος αυτή, εξ ορισμού, δεν είναι αντικειμενική, πλην όμως σκοπεύει ακριβώς στην καρδιά του προβλήματος προσδιορίζοντας τον κυτταρικό πληθυσμό με τη μεγαλύτερη απόκλιση που πιθανώς θα είναι και ο πλέον βιολογικά επιθετικός.

Ένα μεγάλο ανοικτό ερωτηματικό είναι το πόσα αντικείμενα-στόχοι (π.χ. κύτταρα ή πυρήνες) πρέπει να μετρηθούν ώστε το αποτέλεσμα της μέτρησης να είναι αξιόπιστο. Μεγάλος αριθμός στόχων απαιτεί πολύ χρόνο και μικρός δίνει αναξιόπιστα αποτελέσματα. Με βάση μελέτες που έχουν γίνει από τον Dettoff, ο αριθμός των κυττάρων που μετρούνται, κατά περίπτωση, ώστε τα αποτελέσματα του ελέγχου να είναι αξιόπιστα προκύπτει από τον τύπο $n = [z \cdot 100 \cdot SD / CE \cdot x]^2$ όπου n ο αριθμός των κυττάρων που πρέπει να μετρηθούν, CE =συντελεστής μεταβλητότητας (=5%, που θεωρείται επαρκές όριο για τις περισσότερες εφαρμογές), $z=1,96$, SD =σταθερή απόκλιση και x =μέση επιφάνεια (πυρήνων ή άλλων μετρούμενων στόχων).

Συνοπτικά, αρχίζοντας τις μετρήσεις πρέπει να έχουμε ξεκαθαρίσει το τι, που, πως και σε τι αριθμούς θα μετρήσουμε και ακόμη θα πρέπει να ακολουθήσουμε τις πιο κάτω διαδικασίες:

α) Εντόπιση μιας περιοχής του παρασκευάσματος με τα πλέον άτυπα κύτταρα, χωρίς νέκρωση και φλεγμονώδη διήθηση.

β) Μέτρηση όλων των άθικτων κυττάρων μέσα σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Αποφυγή αλλοιωμένων και περιοχών που δεν έχουν βαφεί επαρκώς. Αποφυγή κυττάρων ή πυρήνων που δεν παρουσιάζουν σαφή όρια. Μέτρηση κυττάρων ή πυρήνων που δεν επιπροβάλλονται σε άλλα κυτταρικά ή μη στοιχεία της τομής.

γ) Στάθμιση της διάταξης ελέγχου (calibration) και συχνοί έλεγχοι της λειτουργίας της περιλαμβανομένου του φωτισμού. Αυστηρή τήρηση της εστίασης κατά τον έλεγχο.

δ) Τήρηση του ίδιου τρόπου επιλογής των μετρούμενων στόχων σε όλη τη διάρκεια της μέτρησης.

ε) Έλεγχος των αποτελεσμάτων με πρότυπα (standard) παρασκευάσματα (quality control) και χρήση θετικών και αρνητικών μαρτύρων (controls), ενδογενών και εξωγενών.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΥΠΟΔΟΜΗ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑΣ

1. Μελέτη περιμέτρων

Για την ανεύρεση της περιμέτρου ενός στόχου⁶⁰ εφαρμόζουμε τη θεωρία του G.L.Leclerc χρησιμοποιώντας ένα επίπεδο με παράλληλες οριζόντιες γραμμές σταθερής

μεταξύ τους απόστασης όπου προβάλλουμε την προς μέτρηση εικόνα. Η περίμετρος παρέχεται από τον τύπο $L=\pi d/2xN$, όπου L =η ζητούμενη περίμετρος, $\pi=3,14$, d = η απόσταση μεταξύ των οριζοντίων γραμμών του επιπέδου προβολής και N = ο αριθμός των σημείων στα οποία οι παράλληλες γραμμές τέμνουν την περίμετρο.

2. Μελέτη εμβადών

Το εμβαδόν μιας εικόνας - αντικειμένου - στόχου μπορεί να βρεθεί⁶⁰ με:

α) Πολλαπλασιασμό της τιμής της μικρότερης επί την μεγαλύτερη διάμετρο της εικόνας (σχήματος).

β) Το εμβαδόμετρο (πλανίμετρο) που χρησιμοποιούν οι μηχανικοί για τη μέτρηση επιφανειών.

γ) Προβολή της εικόνας μέσω του σωλήνα σχεδίασης του μικροσκοπίου (camera Lucida), επακόλουθο ζωγράφισμα ή φωτογράφησή της, κόψιμο και ζύγιση όλων των εξεταζόμενων εικόνων σε ζυγό ακριβείας και εφαρμογή του τύπου $E=Ba.100/Bx$, όπου Bx = το βάρος του χαρτιού 10x10 εκ. και Ba = το βάρος του προς μέτρηση στοιχείου.

δ) Μέτρηση του αριθμού των στιγμών ειδικού πλέγματος (grid) που βρίσκονται σε σταθερές μεταξύ τους αποστάσεις και καλύπτουν την προς μέτρηση επιφάνεια. Αν μετρήσουμε σε πραγματικές μονάδες, το πρόβλημα που προκύπτει είναι ότι πάνω στο μετρούμενο σχήμα, ιδιαίτερα αν είναι μικρό (π.χ. πυρήνας) μπορεί να προβάλλεται μόνο μία ή και καμία στιγμή. Γι αυτό και αριθμός αυτός των στιγμών αναλογίζεται στη συνέχεια, στο σύνολο της επιφανείας που καλύπτεται από το προς μέτρηση αντικείμενο, ιδιαίτερα τους πυρήνες και στη συνέχεια υπολογίζεται η μέση τιμή ανά πυρήνα. Η μέτρηση με τη μέθοδο αυτή είναι δύσκολη, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για πυρήνες, όπως ήδη αναφέρθηκε και γι αυτό εφαρμόζεται κυρίως σε τμήματα ιστών.

3. Σύγκριση σχημάτων στόχων

Για τη σύγκριση σχημάτων – στόχων⁶⁰ πρέπει να γνωρίζουμε την περίμετρο και την επιφάνειά της για να εφαρμόσουμε τον τύπο $r=4\pi.S/p^2$, όπου S = η επιφάνεια του σχήματος, p = η περίμετρος, $\pi=3,14$ και r = ο παράγοντας κυκλικότητας του σχήματος (roundness) που ζητάμε για να τον συγκρίνουμε με τον παράγοντα κυκλικότητας του κύκλου που ορίζεται ως 1 (μονάδα). Εναλλακτικά, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το σχηματικό παράγοντα (shape factor) που συμβολίζεται με το f και παρέχεται από τον τύπο $f=S/p$, όπου S = η επιφάνεια του μετρούμενου αντικειμένου - στόχου και p = η περίμετρος του. Αν γνωρίζουμε τους παράγοντες f και r μπορούμε να συγκρίνουμε όχι μόνο προς ένα κύκλο αλλά και με άλλα σχήματα. Οι παράγοντες f και r αφορούν σε επίπεδα σχήματα όπως αυτά που παίρνουμε με το μικροσκόπιο και συνήθως επαρκούν στις μορφομετρικές μελέτες του ιστό- και κυτταροπαθολόγου. Είναι όμως δυνατό να ελέγξει κανείς και τη σχηματική σταθερά β (shape coefficient), ο προσδιορισμός της οποίας απαιτεί τη γνώση του όγκου του ελεγχόμενου στόχου. Αναλυτική ανάπτυξη των παραγόντων f , r και β παρουσιάζεται στο εγχειρίδιο "Στοιχεία μορφομετρίας" του Γ. Δελίδη (1990)⁶⁰.

4. Μέτρηση όγκων

Η μέτρηση όγκων μπορεί να γίνει μορφομετρικά με τη μέθοδο επιπροβολής πλέγματος (grid) στιγμών σε ιστικές τομές της υπό μελέτη αλλοίωσης⁶⁰. Ο όγκος της αλλοίωσης (Va) ισούται με το άθροισμα των λόγων των στιγμών που καλύπτουν την αλλοίωση κατά οπτικό πεδίο (T) προς το σύνολο των στιγμών που καλύπτουν ολόκληρο το οπτικό πεδίο (S), ήτοι:

$$V_a = \frac{T_1}{S_1} + \frac{T_2}{S_2} + \dots + \frac{T_n}{S_n}$$

Ο τύπος απλουστεύεται αν η μετρούμενη ιστική τομή καλύπτει ολόκληρο το οπτικό πεδίο οπότε και παίρνει τη μορφή:

$$V_a = \frac{T}{S}$$

Ο αριθμός των στιγμών που πρέπει να μετρηθούν ,κατ' ελάχιστο, προκύπτει από τον τύπο:

$$RSE = \frac{1 - V_v}{n}$$

αν λυθεί ως προς n. Όπου RSE = το σταθερό σφάλμα (0,05), Vv = ο σχετικός όγκος όπως προκύπτει από δοκιμαστική μέτρηση (αριθμός στιγμών επί του δοκ. μετρ. στοιχείου/100) και n = ο αριθμός των στιγμών που κατά τη δοκιμαστική μέτρηση πέφτουν πάνω στο προς μέτρηση στοιχείο.

Στη συνέχεια, γίνεται υποκατάσταση των τιμών n και Vv στον τύπο:

$$\Sigma = n \frac{1}{V_v}$$

όπου Σ = ο αριθμός των στιγμών που πρέπει να μετρηθούν και Vv = ο σχετικός όγκος όπως προκύπτει από τη δοκιμαστική μέτρηση.

Σημασία δεν έχει το από πόσα οπτικά πεδία θα μετρηθούν (και το αν προέρχονται από διαφορετικές θέσεις της αλλοίωσης) οι Σ στιγμές, αλλά το σύνολό τους. Πάντως, είναι καλύτερα να μετρηθούν λίγες στιγμές σε πολλές ιστικές τομές, παρά πολλές σε λίγες

τομές. Όσο μικρότερος είναι ο όγκος ενός μετρούμενου στοιχείου, τόσο περισσότερες πρέπει να είναι οι τιμές που θα ελεγχθούν.

Το σταθερό σφάλμα του μετρούμενου όγκου υπολογίζεται από τον τύπο:

$$SE = \frac{P(100 - P)}{N}$$

Όπου P = το ποσοστό επί τοις % των στιγμών που καλύπτουν το προς μέτρηση στοιχείο στο σύνολο των οπτικών πεδίων μιας τομής και N = ο αριθμός των στιγμών που καλύπτουν το σύνολο των ιστών στην τομή. Το SE στο σύνολο των μετρήσεων παρέχεται από την εξίσωση:

$$SE = \frac{1}{N} \sum_i N_i P_i (100 - P_i) = [N_1 P_1 (100 - P_1) + N_2 P_2 (100 - P_2) \dots + N_n P_n (100 - P_n)]$$

όπου \sum_i το άθροισμα των (100-P) όλων των τιμών, N_i = το σύνολο των στιγμών που καλύπτουν την τομή 1, P_i = το ποσοστό των στιγμών που καλύπτουν το προς μέτρηση στοιχείο στην τομή 1.

Με την διαδικασία και την ίδια λογική ο όγκος που καταλαμβάνουν τα νεοπλασματικά κύτταρα μέσα σε ένα νεόπλασμα (εξαιρουμένου συνδετικού υποστρώματος κλπ μη νεοπλασματικών κυτταρικών στοιχείων) παρέχεται κατά τον Underwood (1972)⁶⁹ από τον τύπο:

$$V_V = \frac{T_2(1^3 - 0^3) + T_2(2^3 - 1^3) + \dots + T_n[N^3 - (N-1)^3]}{S_1(1^3 - 0^3) + S_2(2^3 - 1^3) + \dots + S_n[n^3 - (N-1)^3]}$$

αν ληφθούν υπ' όψη οι τύποι:

$$V_a = \frac{T_1}{S_1} + \frac{T_2}{S_2} + \dots + \frac{T_n}{S_n} \text{ και } V_a = \frac{T}{S}$$

Από τον τύπο αυτό προκύπτουν όχι απόλυτοι αριθμοί κυττάρων αλλά ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων στο συνολικό όγκο του νεοπλάσματος. Έχει βρεθεί ότι νεοπλάσματα με ίδιες εξωτερικές διαστάσεις και ίδιο ιστολογικό τύπο περιέχουν διαφορετικό αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων⁷⁰⁻⁷³.

5. Μέτρηση αριθμού αντικειμένων - στόχων

Μέτρηση κυττάρων, πυρηνοκινησιών, μαλπιγιανών σωματίων, κυτταρικών εγκλείστων και άλλων στοιχείων μπορεί να γίνει αξιόπιστα και αντικειμενικά, μορφομετρικά, βάσει του τύπου:

$$Nv = N_A = \frac{NA}{D}$$

όπου Nv = ο αριθμός των κυττάρων (παραδείγματος χάριν) στο νεόπλασμα, NA = η μέση τιμή των διατομών των κυττάρων (ή άλλων στοιχείων) που μελετήθηκαν στο οπτικό πεδίο και D = ο μέσος όρος των διαμέτρων των διατομών των κυττάρων (ή άλλων στοιχείων) που μετρήθηκαν. Ο τύπος αυτός ισχύει υπό την προϋπόθεση ότι τα μετρούμενα σχήματα είναι ή τείνουν προς το σφαιρικό και τα δείγματα – ιστικές τομές είναι αντιπροσωπευτικά της συνολικής αλλοίωσης, λαμβανομένης υπόψη της ανατομίας και ιστολογίας του ελεγχόμενου οργάνου – ιστού.

Ο αριθμός των στόχων που θα μετρηθούν ως δείγμα προκύπτει από μια δοκιμαστική μέτρηση με βοήθεια πλέγματος, καθορισμό ορίων πεδίου κατά την αξιολόγηση της οποίας (δοκιμαστικής μέτρησης) λαμβάνεται υπόψη ότι το σταθερό σφάλμα (SE) πρέπει να είναι μικρότερο του 5% (0,05). Μετράμε 10 οπτικά πεδία, βρίσκουμε τη μέση τιμή (x) και τη σταθερή απόκλιση SDx και εφαρμόζουμε τον τύπο των Dettolf και Rhines (1968)⁷⁴.

$$N = \left[\frac{200}{Y} \left(\frac{SDx}{X} \right) \right]^2$$

Όπου Y το ποσοστό του SE (= 5), n = ο αριθμός των οπτικών πεδίων που πρέπει να μετρήσουμε, X = η μέση τιμή των στοιχείων που μελετήθηκαν στην αρχική δοκιμαστική μέτρηση 10 οπτικών πεδίων και SDx = η σταθερή απόκλιση που προέκυψε από τη δοκιμαστική μέτρηση. Μας μένει να επιλέξουμε αριθμό στοιχείων κατά οπτικό πεδίο και αριθμό οπτικών πεδίων που θα μετρηθούν. Αυτό γίνεται με δύο ακόμη δοκιμαστικές μετρήσεις και επιλογή της μεθόδου που δίνει το μικρότερο SE. Τέλος, βρίσκουμε στρογγυλεύοντας τον αριθμό των οπτικών πεδίων που πρέπει να μετρήσουμε.

6. Έλεγχος κυτταροβρίθειας

Κυτταροβρίθεια σημαίνει αριθμό κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όγκο ιστού και για αυτό είναι διαφορετική από τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε ένα ιστοτεμάχιο⁶⁰. Για να υπολογίσουμε την κυτταροβρίθεια ενός νεοπλάσματος εφαρμόζουμε τον τύπο $e = t/D + t \times e'$, όπου e = η κυτταροβρίθεια (δείκτης κυτταροβρίθειας), e' = αριθμός κυττάρων ανά οπτικό πεδίο, D = μέση διάμετρος κυττάρων, t = πάχος της ιστικής τομής που ελέγχουμε και η οποία έχει παρθεί με μικροτόμο ακριβείας. Συνήθως επιπροβάλλουμε ένα πλέγμα με 16 τετράγωνα στην ιστική τομή και μετράμε τους πυρήνες των κυττάρων σε μεγέθυνση 400X. Μετράμε τις πλέον κυτταροβριθείς περιοχές και όχι τα κύτταρα που βρίσκονται σ' επαφή με τα όρια του πλέγματος. Ανάλογη μέθοδος έχει περιγραφεί από του Baak και συν. (1982)⁷⁵.

7. Μέτρηση επιφανειών ιστικών στοιχείων

Η μέτρηση επιφανειών⁶⁰ προϋποθέτει τη γνώση (με εκ των προτέρων υπολογισμό) του όγκου του προς μέτρηση στοιχείου και προκύπτει από την εφαρμογή του τύπου $S = 2V/L$, όπου $V =$ ο όγκος του προς μέτρηση στοιχείου, $S =$ η επιφάνεια που ζητούμε και $L =$ η μέση τιμή γραμμικής διατομής του στοιχείου η οποία παρέχεται από τον τύπο $L = N \cdot 2L/I$, όπου $n =$ ο αριθμός των οπτικών πεδίων, $I =$ ο αριθμός του γνωστού μήκους, κάθετες μεταξύ του $S(2)$ γραμμές του πλέγματος (grid) θα κόψουν τα όρια του προς μέτρηση στοιχείου και $L =$ το μήκος των γραμμών αυτών.

Ο παράγοντας 2 γίνεται 4 όταν έχουμε προς μέτρηση μια διφασική επιφάνεια, ήτοι επιφάνεια που επενδύεται π.χ. από δύο διαφορετικής λειτουργίας κυτταρικούς πληθυσμούς όπως συμβαίνει στις κυψελίδες του πνεύμονα.

Ακόμη, μεγαλύτερης αξίας είναι η σχέση επιφάνειας – όγκου που παρέχεται από τον τύπο $S/V = 4C/I \cdot n$, όπου $C =$ ο αριθμός των διατομών της επιφάνειας από τις γραμμές του πλέγματος, $I =$ το μήκος των δύο γραμμών του πλέγματος και $n =$ ο αριθμός των συμπτώσεων των άκρων των γραμμών με τον προς μελέτη σχηματισμό. Για να εφαρμοσθεί ο πιο πάνω τύπος, ο εξεταζόμενος ιστός πρέπει να είναι ισότροπος. Αν είναι ανισότροπος οι γραμμές του πλέγματος πρέπει να έχουν τυχαία φορά.

Στα ημιαυτόματα και περισσότερο στα αυτόματα συστήματα ποσοτικού ελέγχου, οι πιο πάνω διαδικασίες εκτελούνται από τον υπολογιστή και έτσι τα αποτελέσματα είναι πλέον αντικειμενικά και έρχονται συντομότερα.

ΔΕΙΚΤΗΣ ΠΥΡΗΝΟΚΙΝΗΣΙΩΝ ΚΑΙ ΔΥΣΠΛΑΣΙΑ –ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΑΠΟ ΛΕΙΠΣ ΜΥΙΚΕΣ ΙΝΕΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Παρά το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια έχει προβληθεί ιδιαίτερα η αξία του υπολογισμού του DNA ως προγνωστικού δείκτη των κακοήθων νεοπλασμάτων, το γεγονός ότι πολλά κακοήθη νεοπλάσματα δεν παρουσιάζονται ανευπλοειδικά ως προς το DNA και το γεγονός ότι δεν έχουν χαρτογραφηθεί ακόμη όλα τα κακοήθη νεοπλάσματα ως προς τον δείκτη αυτό, καθιστούν τη μέθοδο μειωμένης αξίας⁵⁶ σε σχέση με τους κλασσικούς μορφολογικούς και μάλιστα μικροσκοπικούς δείκτες (αριθμός πυρηνοκινησιών, δυσπλασία κλπ). Σήμερα, μάλιστα, με την εισαγωγή των ηλεκτρονικών υπολογιστών στη μορφομετρία οι μορφομετρικοί δείκτες αποκτούν νέα αίγλη.

Η δυσπλασία παραδοσιακά εθεωρείτο σημαντικός προγνωστικός δείκτης αλλά και δείκτης κατάταξης των νεοπλασμάτων σε βαθμούς βιολογικής συμπεριφοράς – κακοηθείας^{23,24,26,76-81}. Η δυσπλασία του κυττάρου μεταφράζεται κυρίως σε δυσπλασία του πυρήνα εκφραζόμενη ως αύξηση του μεγέθους του^{42,82}, βαθυχρωμασία, διαταραχή της κατανομής της χρωματίνης, ανωμαλία του σχήματός του και εμφάνιση πυρηνίων. Τα πιο πάνω σε μορφομετρικούς όρους εκφράζονται σε επιφάνειες, διαμέτρους, σχέσεις διαμέτρων, κανονικότητα – στρογγυλότητα περιφέρειας και ακόμη απορρόφηση φωτός. Συνεπώς εύκολα, αντικειμενικά και γρήγορα μπορούν να ελεγχθούν με τα σύγχρονα μορφομετρικά συστήματα.

Σε ορισμένες μη νεοπλασματικές αλλοιώσεις δυνατόν να παρουσιαστούν εικόνες που μιμούνται τη δυσπλασία και δημιουργούν διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα. Τέτοιες εικόνες απαντώνται στο στομάχι όπου έχει γίνει προσπάθεια επίλυσής τους με μορφομετρικές μεθόδους^{83,84}, στο παχύ έντερο επί ιδιοπαθούς φλεγμονώδους νόσου και άλλα όργανα μεταξύ των οποίων και η μήτρα, στα ινομυώματα της οποίας δυνατόν να απαντάται δυσπλασία γύρω από περιοχές εκφύλισης⁸⁵. Επί πλέον, όπου υπάρχει δυσπλασία προκύπτει ανάγκη βαθμονόμησής της και τούτο είναι τελείως υποκειμενικό. Ειδικά για τα σαρκώματα, περιλαμβανομένων των λειομυοσαρκωμάτων της μήτρας οι κλασσικοί μορφολογικοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες αποτελούν τους πλέον καταξιωμένους^{23,24,26,27}. Στους όγκους εκ λείων μυϊκών ινών της μήτρας, όπως ήδη αναφέρθηκε, υπάρχει μια «γκρίζα» ζώνη όταν ο αριθμός των πυρηνοκινησιών κυμαίνεται από 5-9/10 μ.ο.π. (x400), οπότε η ύπαρξη δυσπλασίας χαρακτηρίζει την αλλοίωση ως σάρκωμα. Υπάρχει, συνεπώς, ανάγκη προκειμένου για τους όγκους εκ λείων μυϊκών ινών της μήτρας, μορφομετρικής ανάλυσης. Στη μελέτη αυτή θα ελεγχθούν μορφομετρικές παράμετροι οι οποίες εκφράζουν την κατάσταση των πυρήνων των νεοπλασματικών κυττάρων (μήκος αξόνων, επιφάνεια, περίμετρος, σχηματικός παράγοντας).

Η μέτρηση του αριθμού των πυρηνοκινησιών σε ένα νεόπλασμα είναι ένας εύκολος τρόπος μελέτης της αυξητικής του δραστηριότητας αλλά συγχρόνως και αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης^{6,24,25,27,33,52,85,86}. Ειδικά προκειμένου για τους όγκους εκ λείων μυϊκών ινών της μήτρας, υπάρχουν φανατικοί υποστηρικτές του αριθμού των πυρηνοκινησιών ως διαγνωστικού και ιδιαίτερα προγνωστικού δείκτη⁸⁷.

Αυτοί³⁵ που πιστεύουν ότι ο αριθμός των πυρηνοκινησιών δεν είναι σημαντικός προγνωστικός δείκτης προκειμένου για τους όγκους εκ λείων μυϊκών ινών της μήτρας πιθανώς να έχουν παραπλανηθεί από τη σχετική μεταβολή του σχετικού δείκτη σε όγκους με άφθονο υπόστρωμα ή από τις διάφορες μεθόδους υπολογισμού του που μερικές φορές δεν επιτρέπει την εύκολη σύγκριση αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών. Σίγουρα, όμως, η μη εφαρμογή αντικειμενικών μορφομετρικών μεθόδων μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα σχετικά με το δείκτη μτώσεων, ενώ η κακή και καθυστερημένη μονιμοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε απατηλή μείωσή του.

Όταν λέμε αριθμός πυρηνοκινησιών (mitotic count) εννοούμε τον αριθμό αυτών ανά οπτικό πεδίο και πρέπει να καθορίζουμε τι οπτικό πεδίο είναι αυτό (ποιού μεγέθους) ή ποιας επιφανείας. Ο ολικός αριθμός πυρηνοκινησιών (total mitotic count) αναφέρεται στο άθροισμα του αριθμού των πυρηνοκινησιών σε όλα τα εξετασθέντα οπτικά πεδία. Ως δείκτης μιτωτικής δραστηριότητας (MIA ή mitotic index) χαρακτηρίζεται ο αριθμός των πυρηνοκινησιών ανά 10 μεγάλα οπτικά πεδία, συνήθως x400. Ο όρος μιτωτικός ρυθμός (Mitotic Rate) ισοδυναμεί με τον ανά οπτικό πεδίο μέσο όρο των πυρηνοκινησιών που παρατηρήθηκαν σε ορισμένα οπτικά πεδία που ελέγχθηκαν. Ως μέσος μιτωτικός δείκτης (Mean Mitotic Rate) χαρακτηρίζεται ο μέσος όρος των μιτωτικών δεικτών που μελετήθηκαν σε περισσότερα του ενός ομοειδή νεοπλάσματα.

Στη μελέτη αυτή θα γίνει σύγκριση τεσσάρων τύπων δείκτη πυρηνοκινησιών, του αδρού, του διορθωμένου ως προς τον όγκο, ως και σε σχέση με το σύνολο των κυττάρων και τα νεοπλασματικά κύτταρα ιδιαίτερα. Επίσης ο διορθωμένος δείκτης θα ελεγχθεί σε σχέση με το οπτικό πεδίο.

ΜΕΡΟΣ Β

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Ι ΥΛΙΚΟ

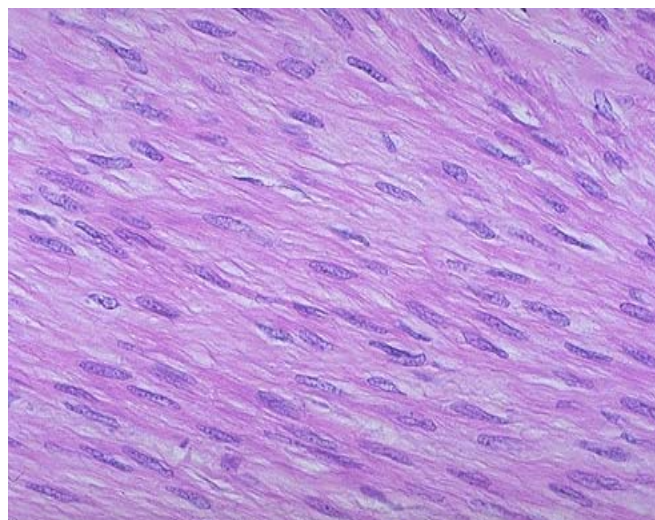
Το υλικό της παρούσης διατριβής αποτελέστηκε από:

A) όλους τους όγκους από λείες μυϊκές ίνες, που είχαν διαγνωσθεί ως :

- 1) άτυπα λειομύωματα
- 2) λειομυοσαρκώματα και
- 3) αβέβαιης βιολογικής συμπεριφοράς, σύμφωνα με τα γενικώς παραδεκτά ιστολογικά κριτήρια (1).

Τα νεοπλάσματα αυτά προέρχονται από τα αρχεία του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου «Μαρίκα Ηλιάδη», του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Μεταξά» καθώς και από το «Περιφερικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου» και διαγνώστηκαν μεταξύ των ετών 1991 και 1993.

Περιπτώσεις στις οποίες είχε γίνει οποιαδήποτε ορμονοθεραπεία τουλάχιστον 6 μήνες πριν από την εγχείρηση, και περιπτώσεις γυναικών σε θηλασμό δεν περιλήφθηκαν.



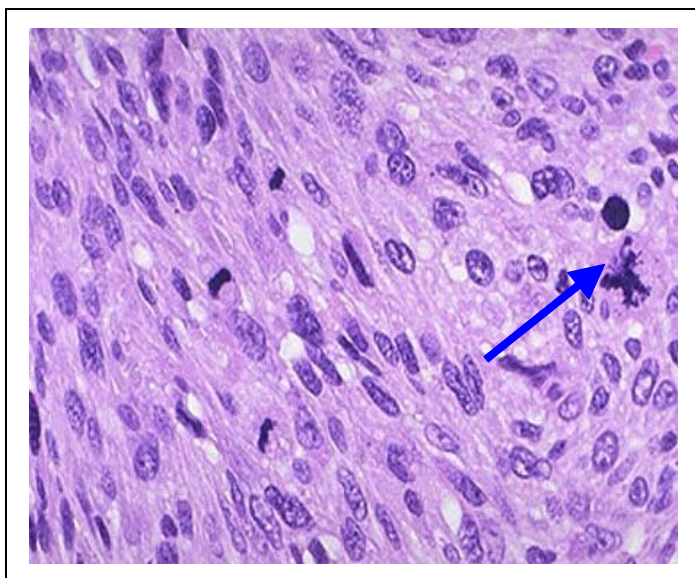
Εικόνα 1 Λειομύωμα. Περίπτωση του υλικού μας.
(Αιματ.ηως. X 200)

Οι όγκοι αυτοί αφορούσαν πέντε (5) λειομυοσαρκώματα ,(εικόνα 2) εννέα (9) άτυπα λειομύωματα και πέντε (5) όγκους από λείες μυϊκές ίνες αβέβαιης βιολογικής συμπεριφοράς.

Τη συγκριτική ομάδα αποτέλεσαν 14 λειομύωματα, (εικόνα 1) που διαγνώστηκαν στη διάρκεια μιας εβδομάδας στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η. Σύμφωνα με τα παραπάνω το υλικό ταξινομήθηκε σε τέσσερις ομάδες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4

Ομάδες	Διάγνωση	Αριθμός περιπτώσεων
1	Λειομυώματα	14
2	Λειομυοσαρκώματα	5
3	άτυπα λειομυώματα	9
4	ακαθόριστης πρόγνωσης	5



Εικόνα 2 Λειομυοσάρκωμα. Περίπτωση του υλικού μας. Με το βέλος δείχνεται χαρακτηριστική πυρηνοκίνησια (Αιματ.ηως. X 200)

ιστοτεμάχια σύμφωνα με τις προδιαγραφές που έχουν τεθεί για τους όγκους από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας από τους Zeboutec και Norris⁽²⁵⁾ δηλαδή ένα ιστοτεμάχιο για κάθε εκατοστό της διαμέτρου του όγκου.

Τα ιστοτεμάχια εγλείστηκαν σε παραφίνη και πάρθηκαν τομές πάχους 4 μικρών, που στη συνέχεια χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη ηωσίνη.

Μετά από μία πρώτη μικροσκοπική εξέταση αποκλείστηκαν περιοχές με νέκρωση, ασβεστοποίηση ή φλεγμονή, όπως π.χ. περιοχές με λεμφοκυτταρική και σπάνια με διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Στη συνέχεια οι τομές μικροσκοπήθηκαν με οπτικά πεδία που επιλέχθηκαν με τυχαία μέθοδο.

II ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Αμέσως μετά την χειρουργική αφαίρεση της μήτρας, ιστοτεμάχια από τους όγκους μονιμοποιούνταν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης για 48 έως 72 ώρες. Οι παραπάνω συνθήκες μονιμοποίησης είναι πολύ κοντά στις θεωρούμενες ως ιδανικές για την διατήρηση των πυρηνικών μορφομετρικών παραμέτρων⁽²⁷⁾ δεδομένου ότι τυχόν καθυστέρηση στην μονιμοποίηση, μπορεί να

προκαλέσει παραλλαγές της μορφολογίας των κυττάρων και του αριθμού των μιτώσεων⁽²⁸⁾.

Στη συνέχεια από όλους τους όγκους λαμβάνονται

III ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ-ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Οι πυρήνες μικροσκοπήθηκαν σε μεγέθυνση X787 (αντικειμενικός φακός X63 και προσοφθάλμιος X12,5) με οπτικό σωλήνα μήκους 160 χιλ. σε μικροσκόπιο Reichart Diavar συνδεδεμένο μέσω βιντεοκάμερας με υπολογιστή IBM συμβατό. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εμπορικό πρόγραμμα Image Pro, έκδοση 2 /0.

Περιφέρεια, άξονες, εμβαδόν

Όταν κάθε κύτταρο εμφανιζόταν στην οθόνη, η περιφέρειά του σημειωνόταν με το πρόγραμμα. (εικόνα 1) Αυτόματα και μέσω του προγράμματος εμετρώντο οι δύο άξονες του πυρήνος (μεγαλύτερος και μικρότερος, η περιφέρεια και το εμβαδόν της επιφάνειας). Η σχηματική σταθερά υπολογιζόταν από τον τύπο:

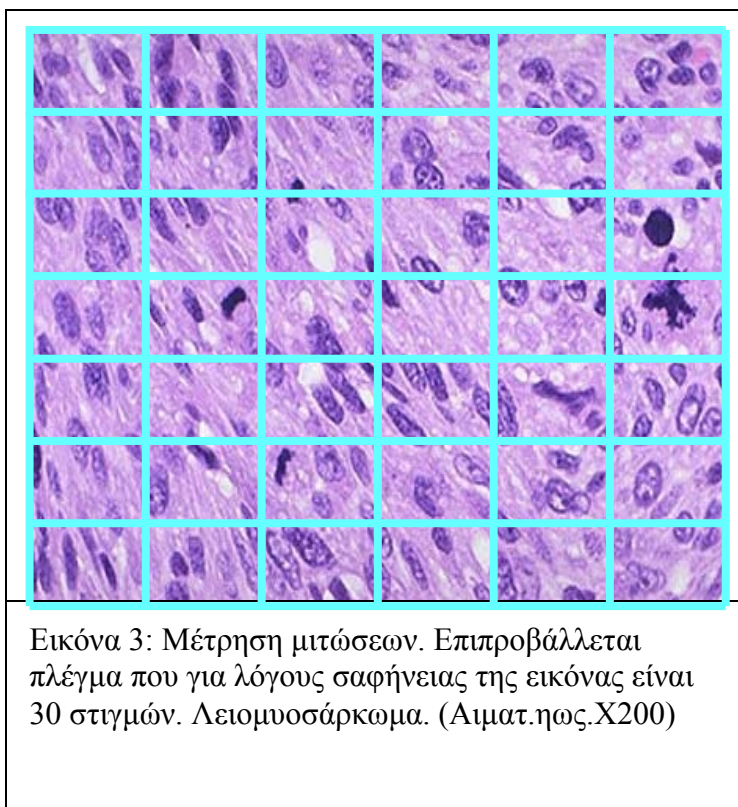
$$\frac{4\pi \times \text{επιφάνεια}}{\text{περίμετρο}^2}$$

Για κάθε περίπτωση εμετρώντο οι παραπάνω παράμετροι σε εκατό (100) πυρήνες και υπολογίζονταν ο μέσος όρος κάθε παραμέτρου και η σταθερή απόκλιση.

Κυτταροβρίθεια Μιτωτικός Δείκτης, Διορθωμένος κατά τον όγκο Μιτωτικός Δείκτης

Αυτή υπολογίστηκε με τη μέθοδο αρίθμησης στιγμών σε ένα πλέγμα 63 τετραγώνων που επιπροβάλλετο στο οπτικό πεδίο και σε 20 συνεχόμενα οπτικά πεδία με μεγέθυνση X500 (αντικειμενικός φακός X40 και προσοφθάλμιος X12,5). (εικόνα 2) Στα οπτικά αυτά πεδία εμετράτο επίσης ο μέσος αριθμός μιτώσεων (αναφερόμενος ως μιτωτικός δείκτης) και στη συνέχεια υπολογίζετο ο διορθωμένος κατά τον όγκο μιτωτικός δείκτης (Volume Corrected Mitotic Index-VCMI) αφού προηγουμένως υπολογιζόταν το εκατοστιαίο ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων. Ο VCMI υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$$\text{VCMI}^* = \frac{100 \left(\sum_{i=1}^n M_i \right)}{\pi^2 \left(\sum_{i=1}^n v_i \right)}$$



Εικόνα 3: Μέτρηση μιτώσεων. Επιπροβάλλεται πλέγμα που για λόγους σαφήνειας της εικόνας είναι 30 στιγμών. Λειομυοσάρκωμα. (Αιματ.ηως.X200)

Όπου MI ο αριθμός των μιτώσεων του νεοπλασματικού ιστού στο οπτικό πεδίο $V_v =$ το εκατοστιαίο ποσοστό του όγκου που καταλαμβάνουν τα νεοπλασματικά κύτταρα στο οπτικό πεδίο $r =$ η ακτίνα του οπτικού πεδίου σε χιλιοστά.

Η αναγνώριση των μιτώσεων έγινε με τα κριτήρια που αναφέρονται από τους Fleege και συν.⁽⁸⁹⁾ και van Diest και συν.⁽⁹⁰⁾. Ειδικότερα για να χαρακτηριστεί μια μίτωση, πρέπει να μην υπάρχει πυρηνική μεμβράνη, οι προσεκβολές του πυρηνικού υλικού να είναι τριχοειδείς και όχι ακτινωτές χωρίς κεντρική κενή ζώνη και το κυτταρόπλασμα βασεόφιλο

και όχι ηωσινόφιλο. (εικόνα 3)

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε κάθε μια από τις περιπτώσεις, υπολογίστηκαν οι ακόλουθοι έξι (6) παράμετροι:

- 1) Μεγαλύτερος άξονας (μήκος)
- 2) Μικρότερος άξονας (εύρος)
- 3) Περίμετρος
- 4) Επιφάνεια
- 5) Σχηματικός παράγων και
- 6) Κυτταροβρίθεια

Περίληφθηκε επίσης ο μιτωτικός δείκτης και ο V.C.M.I.

Για κάθε ομάδα υπολογίστηκε η μέση τιμή και η σταθερή απόκλιση κάθε μιας παραμέτρου.

1) Οι συγκρίσεις των μέσων τιμών έγιναν με τη στατική ανάλυση διασποράς (one-way analysis of variance).

2) Ακολούθως εφαρμόστηκε η πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων (οι ατομικοί έλεγχοι των συγκρίσεων για κάθε μία μεταβλητή δεν έχουν παρά μόνο μερικό ενδιαφέρον αφού δε λαμβάνουν υπ' όψη τις συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών, που στην περίπτωση αυτή είναι και πολύ ισχυρές).

Η σύγκριση των ομάδων αυτών έγινε με τη μέθοδο της Διακρίνουσας Ανάλυσης (Discriminant analysis) ^{91,92} που χρησιμοποιήθηκε με απλό και βηματικό τρόπο. Η μέθοδος αυτή παρέχει επίσης τη δυνατότητα ταξινόμησης των περιπτώσεων σε μία από τις βασικές ομάδες.

Έγιναν δύο αναλύσεις:

Στην πρώτη συμπεριλήφθησαν οι βασικές ομάδες 1 και 2, και στην δεύτερη οι βασικές ομάδες 1, 2 και 3. Οι περιπτώσεις που δεν συμπεριλήφθηκαν σε κάθε μία από αυτές τις αναλύσεις ταξινομήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα σε μία από τις βασικές ομάδες.

3) Ακολούθως, υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης (Pearson) μεταξύ των μέσων των 6 μεταβλητών (μήκος, εύρος, περίμετρος, επιφάνεια, σχηματικός παράγοντας και κυτταροβρίθεια) και του ποσοστού πυρηνοκινήσιων/10 οπτικά πεδία, καθώς επίσης και μεταξύ των σταθερών αποκλίσεων των παραπάνω 6 μεταβλητών και του αριθμού πυρηνοκινήσιων/10 οπτικά πεδία.

4) Τέλος εφαρμόστηκε η παραγοντική ανάλυση (factor analysis) με σκοπό να εξετασθεί κατά πόσο οι παραπάνω μετρήσεις σχηματίζουν συνδυασμούς (ενότητες) που αποτελούν κοινούς παράγοντες.

ΜΕΡΟΣ Γ

Ι ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή οι περιπτώσεις που κατατάχθηκαν στις ομάδες που ελέγχθηκαν ήταν διαγνωσμένες από έμπειρους παθολογοανατόμους. Γεγονός είναι όμως ότι και μη ειδικευμένος διαγνώστης, ο οποίος όμως λόγω της ερευνητικής απασχόλησης εξοικειώθηκε για κάποιο χρονικό διάστημα στην παρατήρηση των νεοπλασμάτων που εξετάστηκαν δεν έχει πρόβλημα να διαχωρίσει την ομάδα των λειομυμάτων από τις λοιπές, καθώς και στις περισσότερες περιπτώσεις τα λειομυοσαρκώματα. Πρόβλημα βεβαίως αποτελεί όχι μόνο γι' αυτόν αλλά και για τον έμπειρο παθολογοανατόμο ο διαγνωστικός χαρακτηρισμός των άτυπων λειομυμάτων, η διαφορική διάγνυσή τους από τα λειομυοσαρκώματα, όπως επίσης και η ομάδα των αταξινόμητων νεοπλασμάτων.

ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους πίνακες 5 και 6 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές (πίνακας 5) και οι τυπικές αποκλίσεις (πίνακας 6) των αποτελεσμάτων των μετρήσεων της κάθε ομάδας για κάθε μία από τις παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Πίνακας 5

Μέσες τιμές και σταθερά σφάλματα των κυτταρικών παραμέτρων κατά ομάδες
(1=λειομυώματα,2=λειομυοσαρκώματα,3=άτυπα λειομυώματα,4=όγκοι αβέβαιης
πρόγνωσης.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΟΜΑΔΕΣ				P(Ανάλυση διασποράς)	P(K-W)
		1(n=14)	2(n=5)	3(n=9)	4(n=5)		
Μήκος	Μέση Τιμή	44.165	51.959	41.642	42.337	Μ.Σ	Μ.Σ
	Σταθ.Σφάλμα	2.249	5.989	1.911	3.769		
Εύρος	Μέση Τιμή	37.384	47.238	36.749	40.414	<0.05	0.068
	Σταθ.Σφάλμα	1.485	2.569	1.935	3.550		
Περίμετρος	Μέση Τιμή	222.694	216.481	159.402	202.839	<0.01	<0.01
	Σταθ.Σφάλμα	7.316	13.305	11.772	9.000		
Επιφάνεια	Μέση Τιμή	2.032.981	2.434.010	1.508.473	1.905.371	<0.01	<0.05
	Σταθ.Σφάλμα	105.220	302.024	163.489	179.503		
Σχημ.Παρ.	Μέση Τιμή	0.522	0.653	0.747	0.576	<0.001	<0.01
	Σταθ.Σφάλμα	0.025	0.053	0.041	0.012		
Κυτταροβρίθεια	Μέση Τιμή	38.109	38.094	42.893	39.957	Μ.Σ	Μ.Σ
	Σταθ.Σφάλμα	1.354	5.039	1.970	8.449		
Μιτωτικός Δείκτης	Μέση Τιμή	3.571	5.400	6.333	7.600	0.083	0.105
	Σταθ.Σφάλμα	0.454	2.227	0.882	2.379		
V.C.M.I	Μέση Τιμή	9.796	33.516	14.668	26.558	<0.01	<0.01
	Σταθ.Σφάλμα	1.424	3.603	1.808	14.712		

Μ.Σ = Μη σημαντικό

Πίνακας 6

Μέσες τιμές σταθερής απόκλισης και σταθερό σφάλμα των κυτταρικών παραμέτρων κατά ομάδες

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ		ΟΜΑΔΕΣ				P(Ανάλυση διασποράς)	P(K-W)
		1(n=14)	2(n=5)	3(n=9)	4(n=5)		
Μήκος	Μέση Τιμή	1.494	1.402	1.342	1.470	M.Σ	M.Σ
	Σταθ.Σφάλμα	0.042	0.086	0.043	0.019		
Εύρος	Μέση Τιμή	1.411	1.446	1.334	1.507	M.Σ	0.081
	Σταθ.Σφάλμα	0.036	0.052	0.040	0.061		
Περίμετρος	Μέση Τιμή	1.204	1.232	2.335	1.249	M.Σ	M.Σ
	Σταθ.Σφάλμα	0.016	0.029	1.144	0.029		
Επιφάνεια	Μέση Τιμή	1.309	1.372	1.336	1.428	M.Σ	M.Σ
	Σταθ.Σφάλμα	0.023	0.050	0.029	0.061		
Σχημ.Παρ.	Μέση Τιμή	1.251	1.233	1.149	1.274	<0.01	<0.05
	Σταθ.Σφάλμα	0.021	0.029	0.023	0.020		
Κυτταροβρίθεια	Μέση Τιμή	1.200	1.252	1.159	1.390	M.Σ	M.Σ
	Σταθ.Σφάλμα	0.020	0.046	0.020	0.216		

M.Σ = Μη σημαντικό

Η στατιστική ανάλυση με την ανάλυση διασποράς (one way analysis of variance) έδειξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ όλων των τεσσάρων ομάδων που αφορούσε τις μέσες τιμές του εύρους του πυρήνα, της επιφάνειας, της περιμέτρου και του σχηματικού παράγοντα όπως επίσης και του κατά όγκο διορθωμένου μιτωτικού δείκτη (VCMΙ). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τον μεγαλύτερο άξονα μήκος άξονα και την κυτταροβρίθεια.

Η σύγκριση των σταθερών αποκλίσεων- μεταβλητών δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά με την εξαίρεση του σχηματικού παράγοντα (πίνακας 6) Τα ίδια αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από την ανάλυση με μη – παραμετρικό έλεγχο (Kruskal – Wallis test), εκτός της μεταβλητής «εύρους πυρήνων» (P=0,081). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς παρουσιάζονται στην στήλη P (1-way) και του μη – παραμετρικού ελέγχου στην στήλη P(K-W).

Όπως αναφέρθηκε και στην μεθοδολογία εφαρμόστηκε ακόλουθα η μέθοδος της διακρίνουσας ανάλυσης με απλό και με βηματικό τρόπο πρώτα μεταξύ των ομάδων 1 και 2 και στην συνέχεια μεταξύ των ομάδων 1,2 και 3.

Και στις δύο παραπάνω αναλύσεις οι περιπτώσεις επαναταξινομήθηκαν με τον κανόνα ταξινόμησης της γραμμικής διακρίνουσας συνάρτησης του Fisher (με όλες τις μεταβλητές) (Fisher's linear discriminant function-FLDF). Η διάκριση και η ταξινόμηση έγιναν με βάση την μέθοδο της «απόρριψης ενός στοιχείου»(leave-one-out).

Μεταξύ των ομάδων 1 και 2 δηλαδή μεταξύ των λειομυωμάτων και των λειομυοσαρκωμάτων, η μέθοδος της διακρίνουσας ανάλυσης έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν χρησιμοποιήθηκαν όλες οι προαναφερθείσες παράμετροι εκτός από τον μιτωτικό δείκτη. (Wilk's $\Lambda = 0.1146$, $\chi^2 = 22.746$, $DF=13$, $P<0.05$).

Με την γραμμική διακρίνουσα συνάρτηση του Fisher οι περιπτώσεις επαναταξινομήθηκαν με επιτυχία στις ομάδες 1 και 2 σε ποσοστό 100%.

Όταν ο VCMI αντικαταστάθηκε από τον μιτωτικό δείκτη η διακρίνουσα ανάλυση δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων 1 και 2. (Wilk's $\Lambda = 0.220$, $\chi^2 = 15.805$, $DF=13$, $P<0.2598$).

Επομένως από το παραπάνω αποτέλεσμα αποδεικνύεται ότι ο ανά όγκο VCMI διορθωμένος μιτωτικός δείκτης αποτελεί ισχυρότερο διαφοροδιαγνωστικό παράγοντα από τον απλό μιτωτικό δείκτη μεταξύ των λειομυωμάτων και των λειομυοσαρκωμάτων.

Η βηματική προσέγγιση με την συμμετοχή όλων των παραμέτρων εκτός του μιτωτικού δείκτη έδειξε τον VCMI, τον σχηματικό παράγοντα και την κυτταροβρίθεια ως τις τρεις σημαντικότερες διαφοροδιαγνωστικές παραμέτρους με τις οποίες και με την γραμμική διακρίνουσα συνάρτηση του Fisher επιτυγχάνεται επαναταξινόμηση των περιπτώσεων σε ποσοστό 100% στις ομάδες 1 και 2.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά όταν συμπεριλήφθηκε ο μιτωτικός δείκτης ώστε η βηματική προσέγγιση επιβεβαίωσε την υπεροχή του VCMI έναντι του μιτωτικού δείκτη.

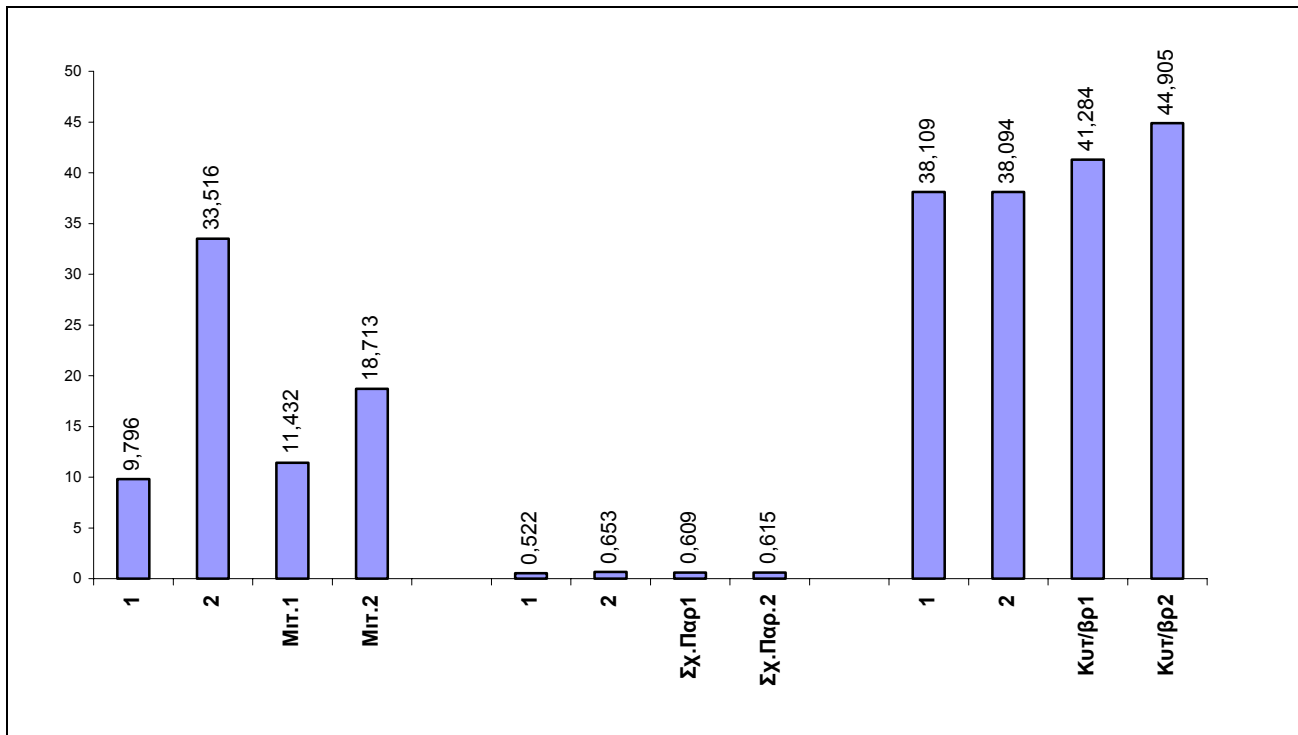
Η παραπάνω στατιστική προσέγγιση επαναλήφθηκε για τις ομάδες 1,2 και 3 δηλαδή με την συμμετοχή των άτυπων λειομυωμάτων.

Η διακρίνουσα ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών παραπάνω ομάδων με την συμμετοχή όλων των μορφομετρικών παραμέτρων. (Wilk's $\Lambda = 0.0391$, $\chi^2 = 61.559$, $DF=326$, $P<0.0001$).

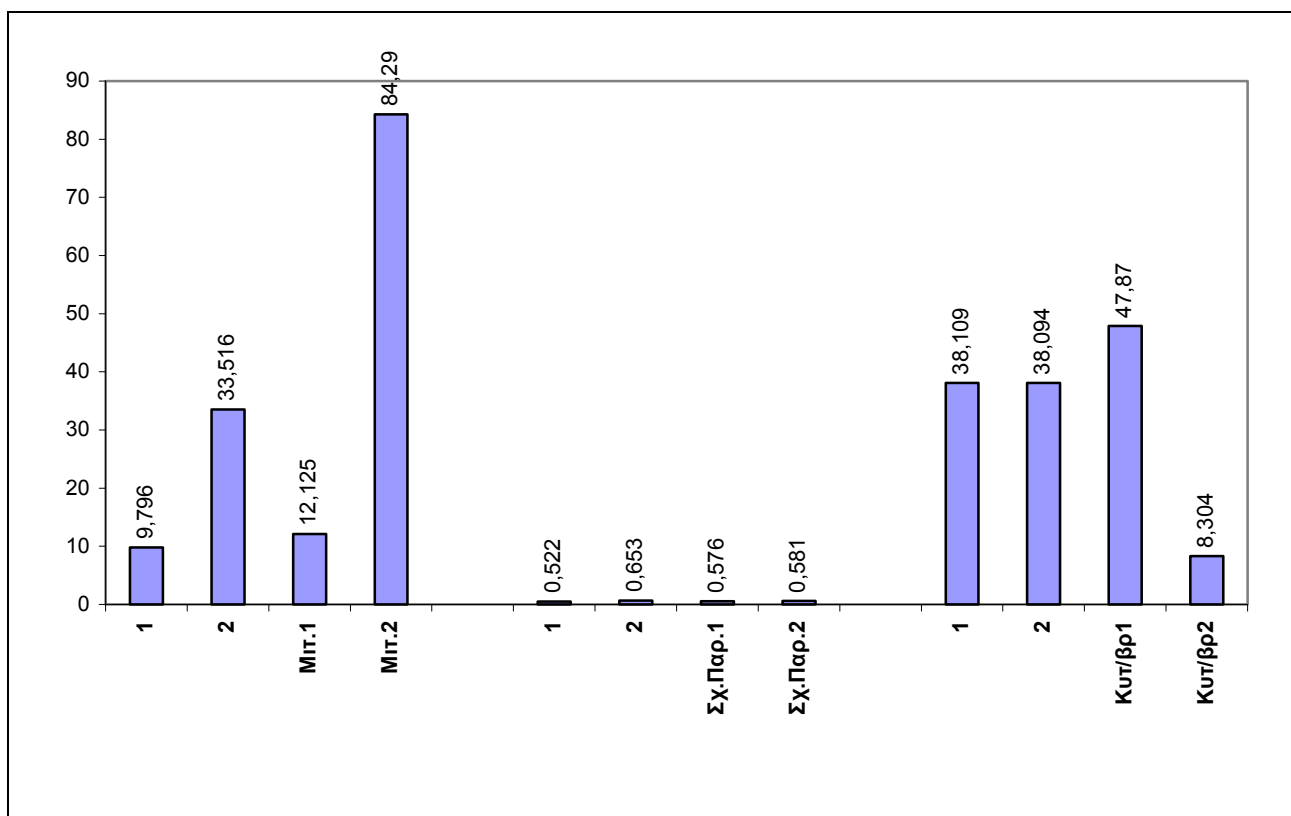
Η βηματική προσέγγιση έδειξε τέσσερις παραμέτρους σε φθίνουσα σειρά σημαντικότητας: VCMI, σχηματικό παράγοντα, κυτταροβρίθεια και εύρος επιτυγχάνοντας με την γραμμική διακρίνουσα συνάρτηση του Fisher ι επαναταξινόμηση των περιπτώσεων σωστή επαναταξινόμηση των περιπτώσεων στις ομάδες 1 , 2 και 3 σε ποσοστό 92.86%. (ειδικότερα τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 92,9% για την ομάδα 1, 100% για την ομάδα 2 και 88.9% για την ομάδα 3.

Με την παραπάνω μεθοδολογία οι περιπτώσεις της ομάδας 4 (όγκοι ακαθόριστης πρόγνωσης) επαναταξινομήθηκαν σε μία από τις προηγούμενες ομάδες. (ανά μία στις ομάδες 1 και 2 και οι υπόλοιπες τρεις στην ομάδα 3) (πίνακες 7,8,9)

Πίνακας 7
Μέσες τιμές των επαναταξινομηθεισών περιπτώσεων της ομάδας 3 (άτυπα
λειομυώματα) στις ομάδες 1 και 2

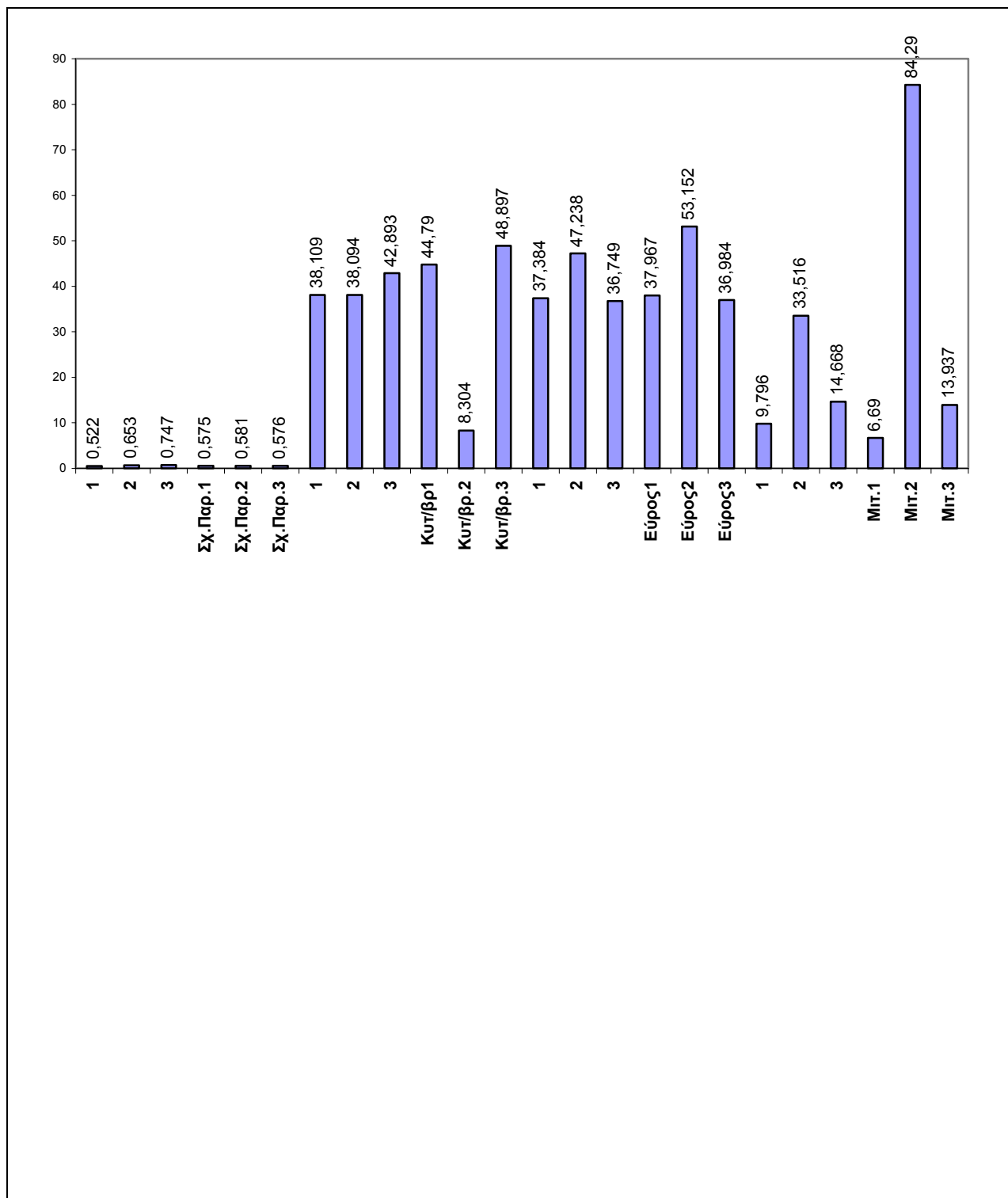


Πίνακας 8
Μέσες τιμές των επαναταξινομηθεισών περιπτώσεων της ομάδας 4 (οριακοί όγκοι) στις ομάδες 1 και 2



Πίνακας 9

Μέσες τιμές των επαναταξινομηθεισών περιπτώσεων της ομάδας 4 (οριακοί όγκοι) στις ομάδες 1, 2 και 3



Ο VCMΙ και ο σχηματικός παράγοντας αποδείχθηκαν και πάλι οι πλέον χρήσιμες διαφοροδιαγνωστικές παράμετροι.

Οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των μέσων τιμών και των σταθερών αποκλίσεων όλων των παραμέτρων σε επίπεδο μικρότερο ή ίσο του 5% ($p < 0.05$) παρουσιάζονται στους πίνακες 10 και 11 αντίστοιχα.

Πίνακας 10

Στατιστικά σημαντικοί συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των μέσων τιμών των μεταβλητών: μήκος, εύρος, περίμετρος, επιφάνεια, σχημ.παράγοντας και κυτταροβρίθεια και του Μιτωτικού Δείκτη και του V.C.M.I/20. ο.π.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ							
Μήκος	Μήκος	Εύρος	Περίμετρος	Επιφάνεια	Σχημ.Παρ.	Κυτταροβρίθεια	Μιτωτικός Δείκτης
Εύρος							
Περίμετρος	0.352 (<0.05)	0.328 (0.063)					
Επιφάνεια	0.684 (<0.001)	0.646 (<0.001)	0.819 (<0.001)				
Σχημ.Παρ.			-0.784 (<0,001)	-0.300 (0.090)			
Κυτταροβρίθεια		-0.255 (0.098)		-0.382 (<0.05)			
Μιτωτικός Δείκτης		0.336 (0.056)			0.030 (0.087)	0.406 (<0.05)	
V.C.M.I.		0.583 (<0.001)		0.311 (0.078)		-0.565 (0.001)	0.595 (<0.001)

Πίνακας 11

Στατιστικά σημαντικοί συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των σταθερών αποκλίσεων των μεταβλητών: μήκος, εύρος, επιφάνεια, σχημ.παράγοντα, και κυτταροβρίθεια και του Μιτωτικού Δείκτη και του V.C.M.I/20. ο.π.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	Μήκος	Εύρος	Περίμετρος	Επιφάνεια	Σχημ.Παρ.	Κυτταροβρίθεια	Μιτωτικός Δείκτης
Μήκος							
Εύρος	0.577						
	(<0.001)						
Περίμετρος							
Επιφάνεια							
Σχημ.Παρ.	0.686	0.578		0.339			
	(<0.001)	(<0.001)		(0.053)			
Κυτταροβρίθεια		0.345		0.299			
		(<0.05)		(0.091)			
Μιτωτικός Δείκτης				0.493		0.422	
				(<0.01)		(<0.05)	
V.C.M.I.		0.412		0.394		0.804	0.0595
		(<0.5)		(0.05)		(<0.001)	(<0.001)

Τέλος με την εφαρμογή της παραγοντικής ανάλυσης των μέσων τιμών όλων των παραγόντων προκειμένου να ανευρεθούν κοινοί παράγοντες μέσω σχηματισμών (ενοτήτων) , βρέθηκαν ενότητες που συνολικά αντιπροσώπευαν το 80.7% όλων των μεταβλητών:

Η πρώτη ενότητα (40.6%) αποτελείται από τις μέσες τιμές του VCMI, της κυτταροβρίθειας και του εύρους , η δεύτερη (26.2%) από τις μέσες τιμές της περιμέτρου, της επιφάνειας και του σχηματικού παράγοντα και η τρίτη (13.9%) από τις μέσες τιμές του μήκους, του εύρους, της περιμέτρου και της επιφάνειας.

Όταν η ίδια μεθοδολογία εφαρμόστηκε χωριστά για τις ομάδες 1 και 3 (δεδομένου ότι οι ομάδες 2 και 4 είχαν πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων για την εφαρμογή της μεθόδου) η πρώτη ενότητα της ομάδας 1 (32.4% του συνόλου των μεταβλητών) αποτελέστηκε από τις μέσες τιμές του VCMI, της κυτταροβρίθειας και του εύρους των πυρήνων ενώ η πρώτη ενότητα για την ομάδα 3 (53.5% του συνόλου των μεταβλητών) αποτελέστηκε από τις μέσες τιμές του VCMI, της κυτταροβρίθειας , του σχηματικού παράγοντα και της περιμέτρου.

Η ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αριθμός αύξησης των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να εκτιμηθεί με μια σειρά μεθόδων όπως το κοινό μικροσκόπιο, η κυτταρομετρία ροής, και η αυτοραδιογραφία των ιστών ή ακόμα και η ανοσοϊστοχημεία. Η αύξηση αυτή αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προγνωστικούς δείκτες σε πολλά νεοπλάσματα ⁽⁹³⁾. Παρά το ότι η προγνωστική αξία κάθε μιας από τις παραπάνω μεθόδους έχει αποδειχθεί σημαντική, τεχνικά αλλά και οικονομικά προβλήματα περιορίζουν την ευρύτητα εφαρμογής των ⁽⁹⁴⁾. Ο προσδιορισμός της μιτωτικής δραστηριότητας στα νεοπλάσματα, παραμένει μια από τις ευρύτατα διαδεδομένες και παραδεκτές μεθόδους σε πολλά από αυτά, όπως π.χ. καρκινώματα μαστού ^(14,94) ωοθηκών ^(15, 95, 96) ουροδόχου κύστης ⁽²³⁾ παγκρέατος ⁽²⁴⁾ καθώς και στα κακοήγη μελανώματα ⁽²⁵⁾.

Υπάρχουν βασικά δύο προσεγγίσεις στις μετρήσεις της μιτωτικής δραστηριότητας ⁽⁹⁴⁾. Η πρώτη αφορά την κλασσική μέτρηση στιγμών ^(89,90) και η δεύτερη στην οποία μετράται ο αριθμός των μιτώσεων ανά οπτικό πεδίο M.M. ⁽⁹⁷⁾. Η επαναληψιμότητα των παραπάνω μεθόδων βασίζεται σε σταθερές συνθήκες μονιμοποίησης, έγκλεισης σε παραφίνη και χρώσεις όπως επίσης και σε αυστηρά κριτήρια προσδιορισμού των μιτώσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οπωσδήποτε η πρώτη μέθοδος είναι χρονοβόρος, ειδικά όταν εφαρμόζεται σε καθημερινή πρακτική, ενώ η κριτική της δεύτερης μεθόδου εστιάζεται στη φτωχή επαναληψιμότητα και ειδικότερα στις μεταβολές της διαμέτρου των οπτικών πεδίων μεταξύ διαφόρων μικροσκοπίων ^(89, 97, 98).

Η μέθοδος της ανά όγκο διόρθωσης του μιτωτικού δείκτη (VMCI) διορθώνει το ενδεχόμενο λάθους δεδομένου ότι δεν επηρεάζεται από τη διάμετρο των οπτικών πεδίων ή την κυτταροβρίθεια του νεοπλάσματος ⁽²⁸⁾ και έχει αποδειχτεί ένας αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης σε καρκινώματα που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Από το 1937 οι Novac και Anderson έδειξαν τη σημασία του μιτωτικού δείκτη στην πρόγνωση των νεοπλασμάτων από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας και έκτοτε απεδείχθη επανειλημμένα σε σειρά εργασιών ^(25,29,99,100,101) παρά το ότι διατυπώθηκαν μεμονωμένες αντιρρήσεις ⁽⁵³⁾.

Δεδομένου ότι η κυτταροβρίθεια των νεοπλασμάτων αυτών παρουσιάζει διαφορές τόσο μέσα στον ίδιο όγκο όσο και μεταξύ των όγκων, διαφορές που οφείλονται στην παρουσία ινώδους ιστού – εστιακά λιπώδους ιστού ^(25,100) μυξωματώδους στρώματος ⁽¹⁰²⁾ εστιών αιμορραγίας και νέκρωσης ⁽²⁹⁾ ή σε οίδημα λόγω προηγηθείσης χορήγησης οιστρογόνων ⁽²⁵⁾, η επιλογή των οπτικών πεδίων είναι υποκειμενική και οδηγεί στην επιλογή των «χειροτέρων» περιοχών ⁽¹⁰⁰⁾.

Η εργασία μας έδειξε ότι η ανά όγκο διόρθωση του μιτωτικού δείκτη αποτελεί έναν αντικειμενικό δείκτη για την προγνωστική σημασία, δεδομένου ότι είναι άσχετος με τα παραπάνω προβλήματα μικροσκόπησης.

Η ποικιλία του πυρηνικού σχήματος είναι ένα από τα πλέον χαρακτηριστικά σημεία της κυτταρικής ατυπίας ⁽¹⁰³⁾. Θεωρούμε λοιπόν ότι η πυρηνική σχηματική σταθερά ως τη

δεύτερη κατά σειρά σημαντική παράμετρο μετά την μιτωτική δραστηριότητα στην ταξινόμηση των νεοπλασμάτων από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των παραμέτρων επισημαίνουν τη σημασία των δύο παραδοσιακών κριτηρίων της ιστολογικής ταξινόμησης (μιτωτικής δραστηριότητας και κυτταρικής ατυπίας).

Οι δύο από τις τρεις παραμέτρους περιλαμβάνονται στην κύρια πρώτη ομάδα παραγόντων (VCM1 και κυτταροβρίθεια) που μπορεί να θεωρηθούν ως ενδεικτικοί της νεοπλασματικής δραστηριότητας, ενώ οι τρεις παράμετροι της δεύτερης ομάδας (πυρηνική περίμετρος, επιφάνεια και σχηματική σταθερά) είναι ενδεικτικές του σχήματος του πυρήνα.

Η «γκρίζα ζώνη» των νεοπλασμάτων με αβέβαιη κακοήθεια είναι η πλέον προβληματική και η χρήση συμπληρωματικών ιστολογικών κριτηρίων όπως η νέκρωση των νεοπλασματικών κυττάρων έχει προταθεί ως κριτήριο ταξινόμησης των νεοπλασμάτων αυτών σε μια χωριστή προγνωστική ομάδα ⁽³⁶⁾.

Επιχειρήσαμε να επανακατατάξουμε τις (λίγες πραγματικά) τέτοιες περιπτώσεις του υλικού μας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας.

Οι περισσότερες περιπτώσεις (τρεις από τις πέντε) επαναταξινομήθηκαν και κατατάχθηκαν στην ομάδα των ατύπων λειομυωμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην υποεκτίμηση του βαθμού της κυτταρικής ατυπίας ή σε υπερεκτίμηση της μιτωτικής δραστηριότητας κατά το χρόνο της αρχικής διάγνωσης. Το γεγονός ότι όλες οι περιπτώσεις δεν διαγνώστηκαν αρχικά από τον ίδιο παθολογοανατόμο είναι ενδεικτικό του ότι μπορεί να υπάρχουν διαφοροποιήσεις στα διαγνωστικά κριτήρια.

ΤΕΛΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της διατριβής μας, πιστεύουμε ότι η χρήση υπολογιστικών μετρήσεων αναβαθμίζει τα μέχρι σήμερα παραδεκτά ιστολογικά κριτήρια για την ταξινόμηση των νεοπλασμάτων από λείες μυϊκές ίνες της μήτρας.

Επιπλέον θεωρούμε ότι ο διορθωμένος κατά όγκο μιτωτικός δείκτης αποτελεί καλύτερο προγνωστικό κριτήριο από τον απλό μιτωτικό δείκτη, υπολογίζεται σε οπτικά πεδία με μεγάλη μεγέθυνση και επομένως είναι σκόπιμο ο τελευταίος να αντικατασταθεί ως κριτήριο ταξινόμησης. Τέλος θεωρούμε επίσης σκόπιμο να σημειώσουμε ότι η εφαρμογή των μορφομετρικών μεθόδων σε διαγνωσμένα ήδη από έμπειρο παθολογοανατόμο παρασκευάσματα δεν απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία στην παθολογική ανατομική και επομένως, παρά το ότι είναι χρονοβόρα, είναι δυνατόν μετά από πλήρη εκπαίδευση να χρησιμεύσει στην καθημερινή πρακτική.

Τέλος θα πρέπει να σημειώσουμε επίσης ότι από την εποχή κατά την οποία έγιναν οι μετρήσεις, τα μορφομετρικά προγράμματα των υπολογιστών έχουν εξελιχθεί σημαντικά ούτως ώστε η εφαρμογή γίνεται πολύ πιο εύκολη και οπωσδήποτε λιγότερο χρονοβόρος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Blaustein's: Pathology of the female genital tract – 3rd ed. Robert Kurman ed. Springer – Verlag New York 1987.
2. Christopherson M, Williamson O, Gray A.: Leiomyosarkoma of the uterus. *Cancer* 29:1512, 1972.
3. Stegner HE: Clinical aspects of uterine sarcoma. *Pathol Res Pract* 169:120-126, 1980.
4. Darby S, Papadaki L, Beilly A. : Unusual leiomyosarcoma of the uterus containing osteoclast – like giant cells. *Cancer* 36:495, 1975.
5. Taylor B, Norris S.: Mesenchymal tumours of the uterus IV. Diagnosis and prognosis of leiomyosarcomas. *Arch Pathol* 82:40-44, 1976.
6. Christopherson M, Williamson O, Gray A.: Leiomyosarkoma of the uterus. *Cancer* 29:1512-1517, 1972.
7. Ebelr M, Pfeiderer A, Teufel G, Bachamasin F.: Sarcomas of the uterus. Morphologic criteria and clinical course. *Pathol Res Pract* 169:165-172, 1980.
8. Silverberg G.: Reproducibility of mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumours of the uterus. *Hum. Pathol.* 7:451-454, 1976.
9. Sully F.: Mitosis counting (editorial). *Hum. Pathol.* 7:481-482, 1976.
10. S. Baak,: *Manual of Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prog-nosis.* Springer – Verlag, New York 1991.
11. Collan Y, Kumpusalo L, Personen E, Eskelinen M, Pajatinen P, Kettunen K.: Prediction of prognosis of breast cancer: multivariate analysis of mitotic index, lymph node status and tumor size. *Acta Univ Ouluensis M>ed* 174:8, 1988.
12. Lipponen PK, Eskeilinen MJ, Collan Y, Marin S, Alhava E.: Volume-corrected mitotic index in human pancreatic cancer. Relation to histological grade, clinical stage, and prognosis. *Scand J Gastroenterol* 25:548-554, 1990.
13. Collan Y, Haapasalo H.: The value of mitotic counting in the assessment of prognosis and proliferation in human tumours. Letter to the editor. *J Pathol* 163, 1991.
14. Baak JPA, Van Dop H, Kurver PHJ, Hermans J.: The value of morphometry to classic prognostics in breast. *Cancer* 56:374-382, 1985.
15. Haapasalo H, Collan Y, Personen E.: Volume corrected mitotic index (M/V index)-the standard of mitotic activity in neoplasms. *Pathol Res Pract* 185:551-554, 1989.
16. Haapasalo H, Collan Y, Aktin NB, Personen E, Seppa A.: Prognosis of ovarian carcinomas: prediction by histoquantitative methods. *Histopathology* 15:167-168, 1989.
17. Langlois PL. the size of the normal uterus. *J Reprod Med* 1970, 4:220.
18. Junqueira LC, Carneiro J.: *Basic Histology*, 3rd ed. Lange Med Publ, Los Altos, California, 1980.
19. Panlsen DF.: *Basic Histology. Examination and Board Rewiew.* Appleton and Lange, Norwalk, California, 1990.
20. Moore K.L.: *Clinically oriented Anatomy.* 3rd ed. William and Wilkins Baltimore 1992
21. Ross M. Rompell, L.J. : *Histology* 3rd ed. William and Wilkins Baltimore 1989
22. Willis RA.: *The spread of tumors in the human body.* Butterworth and Co, London, 1952.

23. Enzinger FM, Weiss SW.: Soft tissue tumors. Mosby CV Co, St. Louis- Toronto – London, 1983.
24. Hajdu SI.: Pathology of soft tissue tumors. Lea and Febiger, Philadelphia, 1979.
25. Zaloudek C, Norris HJ.: Mesenchymal tumors of the uterus. 13. In : Blaustein's Pathology of the female genital tract. Kurman PJ (ed). 3rd Ed., Springer – Verlag, N.Y. – Berlin – Heidelberg – London – Paris – Tokyo, 1987, pp 373-408.
26. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Robbin S.: Pathologic basis of disease. 4th Ed., W>B. Saunders, Philadelphia – London-Toronto- Montreal-Sydney-Tokyo, 1989, pp 1151-1156.
27. Ashley DJB.: Enans histological appearances of tumours. 3rd Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh-London-N.Y., 1978, pp 30-43.
28. Barter JF, Smith EB, Szpak CA, Hinshaw W, et al.: Leiomyosarcoma of the uterus: Clinicopathologic study of 21 cases. *Cynecol Oncol* 1984, 21:220.
29. Burns B, Curry HR, Bell MEA. Morphologic features of prognostic significance in uterine smooth muscle tumors: A review of eighty-four cases. *Am J Obstet Gynecol* 1979, 135:109.
30. Kempson RL, Bari W.: uterine sarcoma. Classification, diagnosis and prognosis. *Hum Pathol* 1970, 1:331.
31. MarcheseMJ, Liskow AS, Crum CP, Mc Caaffrey RH, et al.: Uterine sarcomas: A clinicopathologic study, 1965-1981. *Gynecol Oncol* 1984, 18:299.
32. Saksela E, Lampiney V, Procope BJ.: Malignant mesenchymal tumors of the yterine corpus. *Am J Obstet Gynecol* 1974, 120:452.
33. Taylor HB, Norris HJ.: Mesenchymal tumors of the uterus. IV. Diagnosis and prognosis of leiomyosarcomas. *Arch Patholn* 1966, 82:40.
34. Buscema J et al.: Epithelioid leiomyosarcoma. *Cancer* 1986, 47:1192.
35. Baak JPA, v Dop H, Kurver PHJ, Hermans J.: The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985, 56:374.
36. Marchevsky AM, Gil J.: Applications of computerized interactive morphometry in pathology. II. A model for computer generated "diagnosis". *Lab invest* 1986, 54:708.
37. Marchevsky AM, Klapper E, Gil J.: Computerized interactive morphometry: Automatic classification of nuclear profiles in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1987, 87:561.
38. Baak JPA.: Prognostic value of histopathological morphometry in endocrine-related cancer. *Rev End-related Cancer* 1987, 27:21.
39. Fleege JC, Baak JPA, Smeulders AWM.: Analysis of measuring system parameters that influence reproducibility of morphometric assesments with a graphic tablet. *Hum Oathol* 1988, 19:513.
40. Marchevsky AM, Hauptman E, Shepard D et al.: Computerized interactive morphometry of brushing cytology specimens. *Acta Cytol* 1988, 32:343.
41. Schipper NW, Smeulders AWM, de Lange JHM, Baak JPA.: Quantification of epithelial area by image processing applied to endometrial carcinomas: A comparison with ovarian tumors. *Hum Oathol* 1989, 20:1125.
42. Blomjons CEM, Vos W, Schipper NW et al.: The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *Hum Pathol* 1990, 21:409.

43. Russel WO, Cohen J, Cutte S et al.: Staging system for soft tissue sarcoma. American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting, Task Force on Soft Tissue Sarcoma, Chicago, American College of Surgeons, 1980.
44. Angervall L, Kindblom L-G, Rydholm A, Stener B.: The diagnosis and prognosis of soft tissue tumors. *Sem Diagn Pathol* 1986, 3:240.
45. Costa J, Wesley RA, Glatstein E, Rosenberg SA.: The grading of soft tissue sarcomas. Results of a clinicopathologic correlation in a series of 163 cases. *Cancer* 1984, 53:530.
46. Rooser B.: Prognosis in soft tissue sarcoma. *Acta Orth Scand Suppl* 225, Munksgaard, Copenhagen 1987, p 58.
47. Baak JPA, Oort J. In: A manual of morphometry. Springer-Verlag, Berlin, 1983.
48. Weibel ER.: Serological methods: Practical methods for biological morphometry. Vol 1. Academic Press, London, 1979.
49. Aherne WA, Dunnill MS.: Morphometry. Arnold (ed.), London, 1982.
50. Oberholzer M.: Morphometrie in der Klinischen pathologie. Springer-Verlag, heidelberg, 1983.
51. Hall TL, Fu YS.: Laboratory investigations 1985, 53:5.
52. Ebelv M, Pfeiderer A, Jeufel G, Bachamasin F.: Sarcomas of the uterus morphologic and clinical course. *Pathol Res Pract* 1980, 169:165.
53. Silverberg G.: Reproducibility of mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumours of the uterus. *Hum Pathjol* 1976, 7:451.
54. Scully E.: Mitosis counting (Editorial). *Hum Pathol* 1976, 7:481.
55. Collan Y, Haapasalo H.: The value of mitotic counting in the assessment of prognosis and proliferation in human tumours. *J Pathol* 1991, 163:361.
56. Vyterlinde AM, Schipper NW, Baak JPA et al.: Limited prognostic value of cellular DNA content to classical and morphometrical parameters in invasive ductal breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1988, 89:301.
57. Boddaert A, Trojani M, Contesso G et al.: Soft tissue sarcomas of adults: Study of pathological variables and definition of a histopathological grading system. In *Management of Soft Tissue and Bone Sarcomas*. Oosterom and Unnik (eds), Ranen Press, N.Y., 1986, p 17.
58. Auer G, Askenstein U, Ahrens O.: Cytophotometry. *Hum Pathol* 1989, 20:518.
59. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP.: Flow cytometric measurements of DNA and other components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol* 1989, 20:528.
60. Δελίδης Γ.Σ.: Στοιχεία Μορφομετρίας. Αθήνα, 1990.
61. Van Diest PJ, Baak JPA.: Morphometry. 35/36. In *Comprehensive cytopathology*. Bibbo M (ed), WB Saunders Co, Philadelphia, 1991, pp 946-984.
62. Baak JPA, Langley FA, Hermans J.: Classification of a new course: Some aspects of single and multivariate analysis. In *A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology*. Baak JPA, Dort J (eds). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-N.Y.-Tokyo, 1983, pp 27-40.
63. Delides G.S, Garas G, Georgouli G et al.: Intra-laboratory variability in the grading of breast carcinoma. *Arch Pathol Lab med* 1982, 105:126.
64. Gamel JW, Mc Lean IW.: Computerized histopathologic assessment of malignant potential. II. Refinement of measurement and data analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1984, 6:37.

65. Bullagh WS.: Mitotic activity in the tissues of dead mice, and in tissues kept in physiological salt solutions. *Exp Cell Res* 1950, 1:40.
66. Dardick I, Caldwell D.: Reproducibility of morphometric image analysis. *Hum Pathol* 1985, 16:1178.
67. Collan Y, Torkeli T, Koswa VW et al.: Sampling in diagnostic morphometry. *Pathol Res Pract* 1987, 182:401.
68. Dettoff RT.: Sampling of material and statistical analysis in quantitative stereology. In *stereology. Proceedings of the Second International for Stereology*. Elias H (ed). Springer-Verlag, Berlin, 1967.
69. Underwood JCE.: A morphometric analysis of human breast carcinoma. *Br J Cancer* 1972, 26:234.
70. Δελίδης Γ.Σ., Παπαϊωάννου Β, Κουτσάφτης Φ.: Ογκομετρική μελέτη του καρκινώματος του μαστού και αποτελέσματα αυτής. 2^ο Εθνικό Συνέδριο Ογκολογίας. Πρακτικά, 1975, σελ. 284.
71. Delides GS, Elemenoglou J, Garas G, Kyparides E, Lissaios B.: Tumour cell volume as a prognostic parameter of malignant melanoma. In *Malignant melanoma*. OECI (eds). 1981, p 28.
72. Δαδιώτη Π.: Προγνωστικές παρατηρήσεις στο μαλπιγιακό καρκίνωμα του κάτω χείλους μετά από ιστομετρική ανάλυση. Διδακτορική διατριβή, Αθήνα, 1982.
73. Δελίδης ΓΣ, Αραπαντώνη-Δαδιώτη Π, Λέκκα Ι, Ιακωβίδου Ι, Παπαδόπουλος Ν, Γεωργούλης Β, Λισσαίος Β. Ζαμπάκος Ι.: Συγκριτική μορφομετρική μελέτη της περιεκτικότητας σε νεοπλασματικά κύτταρα σαν κριτήριο πρόγνωσης, σε δύο διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων. 2^ο Πανελλήνιο Ογκολογικό Συνέδριο. Πρακτικά, 1983, σελ. 397.
74. Dettoff RT, Rhines FN.: *Quantitative microscopy*. Mc Graw-Hill, N.Y. 1968.
75. Baak JPA, Kurver PHJ, Snoo-Nienwlaat JE, et al.: Prognostic indicators in breast cancer-morphometric methods. *Histopathology* 1982, 6:327.
76. Mostofi FK.: Testicular tumors: epidemiologic and pathologic features. *Cancer* 1973, 32:1186.
77. Mostofi FK.: Pathology of germ cell tumors of testis: a progress report. *Cancer* 1980, 45:1735.
78. Nochomovitz LE.: Seminoma of a testis. *Pathol Update Sem* 1983, 1:1.
79. Bloom HJG.: Prognosis in carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1950, 4:259.
80. Black MM, Speer FD.: Nuclear structure in cancer tissues. *Surg Gynecolo Obstet* 1957, 105:97.
81. Fisher ER, Redmond C, Fisher B.: Histologic gradind of breast cancer, *Pathol Ann* 1980, 15:239.
82. Lee T-K, Myers RT. Bond MG et al.: The significance of nuclear diameter in the biologic behavior of thyroid carcinomas: A retrospective study of 127 cases. *Hum Pathol* 1987, 18:1252.
83. Rubio CA, Hirota T, Itabashi T.: Atypical mitoses in elevated dysplasias of the stomach. *Pathol Res Pract* 1985, 180:372.
84. Tosi P, Baak JPA, Luzi P et al.: Morphometric distinction of low and high grade dysplasias in gastric biopsies. *Hum pathol* 1989, 20:839.
85. Russo J, Frederic J, Ownby HE et al.: Prognostic factors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Ann J Clin Pathol* 1987, 88:123.
86. Ie Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S et al.: Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved

- score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive breast carcinomas. *Cancer* 1989, 64:1914.
87. Kempson R.L.: Mitosis counting (Editorial). *Hum Pathol* 1976, 7:482.
 88. Norris H.J.: Mitosis counting (Editorial). *Hum Pathol* 1976, 7:483.
 89. Heege J.C., van Diest P.J., Baak J.P.A.: "Reliability of quantitative pathological assessments, standards and quality control". In: "Manual of Quantitative Pathology in cancer diagnosis and prognosis". Baak J.P.A. (Ed.). Berlin-Heidelberg, Springer – Verlag, 1991, 151.
 90. Van Diest P.J., Baak J.P.A., Matze-Cok P., Wisse-Brekelmans E.C.M., van Galen C.M., Kurver P.H.J. et al.: "Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens, *Hum Pathol.*, 1992,
 91. Morrisson D.F.: "Multivariate statistical methods". 2nd edition, New York, Mc Graw-Hill, 1976.
 92. Vlachonikolis K.G., Marriott F.H.C.: "Discrimination with mixed binary and continuous data". *Applied Statistics*, 1982, 31,23.
 93. Hilsenbeek S.G., Allred D.C.: "Improved methods of estimating mitotic activity in solid tumors (Editorial)". *Hum. Pathol.*, 1992, 601.
 94. Biesterfeld S., Noll I., Noll E., Wohltmann D., Bocking A.: "Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer", *Hum. Pathol.*, 1995, 26, 47.
 95. Haapasalo H., Collan Y., Atkin N.B.: "Major prognostic factors in ovarian carcinomas". *Int. J. Gynec. Cancer*, 1991, 1, 155.
 96. Katsoulis M., Lekka J., Vlachonikolis I., Delides G.S.: "The prognostic value of morphometry in advanced epithelial ovarian cancer". *Br. J. Cancer*, 1995, 72, 958.
 97. Simpson J.F., Dutt P.L., Page D.L.: "Expression of mitoses per thousand cells and cell density in breast carcinomas: a proposal". *Hum. Pathol.*, 1992, 23, 608.
 98. Elston C.W., Ellis I.O.: "Pathological prognostic factors in breast cancer. I: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up". *Histopathology*, 1991, 19, 403.
 99. Eberl M., Pfeidere A., Teufel G., Bachmann F.: "Sarkome des Uterus : morphologische Kriterien und Klinischen und klinische Verlauf". *Path. Res. Pract.*, 1980, 169, 165.
 100. Novak E.P., Woodruff J.D.: "Sarcoma and allied lesions of the uterus". In: "Novak's Gynecologic and Obstetric Pathology". Novak E.R., Woodruff J.R. (Eds), 7th edition, Philadelphia-London. W.B. Saunders, 1974, 272.
 101. Baak J.P.A., van Diest P.G.: "Morphometric and combined morphometric – DNA cytometric applications: the female reproductive tract". In: "Manual of Quantitative Pathology in cancer diagnosis and prognosis". Baak J.P.A. (Ed), Berlin-Heidelberg, Springer Verlag, 1991, 327.
 102. Enzinger F.M., Weiss S.W.: "Leiomyosarcoma". In: "Soft tissue tumors". 2nd edition, St. Louis, C.V. Mosby, 1988,402.
 103. Bell S.W., Kempson R.L., Hendrickson M.R.: "Problematic uterine smooth muscle neoplasms: a clinicopathologic study of 213 cases". *Am. J. Surg. Pathol.*, 1994, 18, 535.