

УДК 618.146-006.66-079.4:616-018.2-002.16-092

*О.П. Пересунько,**Н.В. Зелінська,**І.О. Давиденко*

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

Ключові слова: *паренхіматозно-стромальні взаємини, аденокарцинома, плоскоклітинний рак, шийка матки, диференційна діагностика.*

ПАРЕНХІМАТОЗНО-СТРОМАЛЬНА ВЗАЄМОДІЯ ЯК ПАТОГЕНЕТИЧНИЙ ФАКТОР ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОС- ТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМИ ТА ПЛОСКОКЛІТИННОГО РАКУ ШИЙКИ МАТКИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ)

Резюме. *При аналізі публікацій, присвячених морфології раку шийки матки (РШМ), звертає на себе увагу факт, що до цього часу зміни в епітелії шийки матки в процесі канцерогенезу розглядаються окремо від супроводжуючих його змін у підлеглий стромі. Останні дані вітчизняної та зарубіжної літератури показують необхідність вивчення стромального компонента в диференційній діагностиці аденокарциноми та плоскоклітинного РШМ на різних стадіях пухлинного росту та обґрунтовують можливість визначення паренхіматозно-стромальних змін, як маркерів активації пухлинного процесу. Авторами за допомогою методу комп'ютерної мікроспектрометрії проведені оригінальні дослідження рівня окислювальної модифікації білків (ОМБ) в цитоплазмі епітелію та в стромі шийки матки, а також стану волокнистого компонента сполучної тканини шийки матки за показниками питомого об'єму та оптичної щільності у хворих на залозистий та плоскоклітинний РШМ. Отримані вірогідні результати дозволяють проводити точну гістохімічну диференційну діагностику РШМ різних ступенів диференціювання (G1, G2, G3), що свідчить про доцільність використання комп'ютерної мікроспектрофотометрії в аспекті додаткового діагностичного тесту оцінки системи "епітелій-сполучна тканина".*

Успіхи у вивченні біології злоякісних пухлин висунули на перший план значущість їх стромальних клітин, а також факторів, що продукуються останніми, як регулятори канцерогенезу, особливо пухлинної прогресії [19]. Але при аналізі робіт, які присвячені морфології росту ракових пухлин взагалі, та раку шийки матки (РШМ), зокрема, звертає на себе увагу той факт, що ці зміни в епітелії часто розглядають окремо. Будь-яка епітеліальна клітина існує в організмі не окремо, а в анатомічному і функціональному зв'язку зі сполучною тканиною. Процеси, які відбуваються у вогнищі злоякісного росту, і, безпосередньо, в епітелії, який малігнізується, відбуваються за участю сполучної тканини та під її контролем. Тому питання про значення функціонального стану сполучної тканин в патогенезі злоякісного процесу є важливими для оцінки етапів прогресії РШМ [1,3,9,14].

Вперше найбільш широкого розвитку уявлення про функції стромі і значення їх порушення для розвитку пухлинних процесів отримали у фундаментальних роботах О.О. Богомольця, які були присвячені фізіологічній системі сполучної тка-

нини. Ще в 1926 році О.О. Богомольць виказував думку про те, що "рак навряд чи може виникнути в організмі, ретикулоендотеліальна система якого виявляє достатню опірність" [4]. У подальшому питання про роль фізіологічної системи у розвитку пухлинного росту дістали ґрунтового дослідження у багатьох роботах академіка Р.С. Кавецького, який ще у 30-х роках минулого століття передбачав, що "в основі канцерогенезу лежать два взаємно пов'язаних процеси: місцеве утворення пухлинного зачатку і пухлинна диспозиція - загальні зміни в організмі, які обумовлюють можливість перетворення первинної пухлини у розповсюджений пухлинний процес в організмі людини" [10,11]. У подальшому питання взаємодії пухлини і організму детально обговорювались на VIII Міжнародному протираковому конгресі та у загальному виді представлені Р.С. Кавецьким у монографії "Опухоль и организм" (1962 р.) [9].

У теперішній час фундаментальні питання цієї важливої проблеми активно розробляються на різних рівнях організму його учнем академіка НАН України В.Ф. Чехуном [20] та співробітниками Інституту експериментальної патології,

онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. З багатьох робіт, присвячених цій проблемі, стає очевидним, що однією із ланок у ланцюжку складних взаємовідносин організму і пухлини є місцева реакція сполучної тканини навколо пухлинного вогнища, яка тісно пов'язана з загальним станом сполучної тканини а організмі. При дослідженні місцевої реакції сполучної тканини при пухлинному рості велике значення надається новим аспектам взаємодії пухлини та організму, зокрема системі інтерлейкінів [2,19].

Пухлинні клітини беруть участь в утворенні строми новоутворення, яке є складним багатостадійним процесом, основними ступенями якого можна вважати: 1) секрецію пухлинними клітинами мітогенних цитокінів - різних факторів росту і онкопротеїнів, стимулюючих проліферацію сполучнотканинних клітин, перш за все ендотелію, фібробластів, міофібробластів і гладких клітин; 2) синтез пухлинними клітинами деяких компонентів позаклітинного матриксу - колагенів, ламініну, фібронектину та ін.; 3) проліферацію і диференціювання клітин-попередниць сполучнотканинного походження, секрецію ними компонентів позаклітинного матриксу і формування тонкостінних судин капілярного типу, що в сукупності і є строною пухлини; 4) міграцію в строми пухлини клітин гематогенного походження - моноцитів, плазматичних, лімфоїдних елементів, тучних клітин та ін. [13].

Ще в роботах І.А. Яковлевої та Б.Г. Кукуте [22] майже при всіх формах дисплазії епітелію шийки матки і у більшості випадків в проміжній тканині поблизу епітеліального шару відмічена дрібноклітинна інфільтрація строми з лімфоїдних клітин з домішками гістіоцитів, плазматичних і тучних клітин. Накопичення кислих мукополісахаридів і аргірофільних волокон в проміжній тканині поблизу атипичного епітеліального шару раку *in situ* розцінюється авторами як накопичення пластичного матеріалу для побудови нових волокнистих структур і є показником мобілізації засобів місцевого захисту сполучної тканини.

У монографії О.К. Хмельницького [16] вказується, що при розвитку дисплазії епітелію і *Ca in situ* шийки матки у підлеглий сполучній тканині також відбуваються морфологічні зміни. У стромі спостерігаються скупчення фібробластів з гіпертрофованими ядрами, лейкоцитів, плазматичних, тучних клітин і гістіоцитів одночасно з васкуляризацією підепітеліальної сполучної тканини і вираженими деструктивними змінами аргірофільних, еластичних і колагенових волокон.

Строма пухлини, як і строма нормальної тка-

нини, в основному, виконує трофічну, модулюючу та опорну функції. Стромальні елементи пухлини представлені клітинами і позаклітинним екстрацелюлярним матриксом (ЕЦМ), судинами і нервовими закінченнями. ЕЦМ представлений двома структурними компонентами: базальними мембранами і інтерстиціальним сполучнотканинним матриксом. До складу базальних мембран входять колагени IV, VI і VII типів, глікопротеїди (ламінін, фібронектин, вітронектин), протеоглікани (гепарансульфат та ін.). Інтерстиціальний сполучнотканинний матрикс містить колаген I і III типів, фібронектин, протеоглікани і глікозаміноглікани [30,38].

У строми новоутворення неоплазій задіяні клітини як місцевого, гістіогенного, так і гематогенного походження. Стромальні клітини продукують різноманітні фактори росту, що стимулюють проліферацію клітин (фактори росту фібробластів, фактор росту тромбоцитів, фактор некрозу пухлин альфа, фібронектин, інсуліноподібний фактор росту та ін.). Деякі онкобілки (*c-sis*, *c-myc*) одночасно експресують рецептори, що зв'язують фактори росту, і можуть стимулювати проліферацію як по аутокринному, так і по паракринному шляху. Крім того, самі клітини строми здатні виділяти різноманітні протеолітичні ферменти, що призводять до деградації позаклітинного матриксу [29].

Згідно із новими уявленнями, центральна роль у прогресії пухлин належить екстрацелюлярному матриксу (ЕЦМ), який складається з колагенових та фібринових волокон і клітин сполучної тканини. Велика кількість ензимів, протеїнів та ростових факторів, що є в ЕЦМ, сприяють його перебудові, розвитку мультиклітинності, інвазії пухлинних клітин у підлеглий тканини, новим протеїновим "архітектурам". Біохімічні та біомеханічні сигнали ЕЦМ у різних комбінаціях модулюють відповіді до екстрацелюлярних сигналів, що зумовлюють диференціювання, проліферацію, апоптоз клітин. Проте деградація ЕЦМ - це ключова подія розвитку раку, хоча остаточні механізми залишаються невідомими [38]. Загалом, зміни в ЕЦМ спостерігаються у нормі, але такі, що пов'язані зі змінами композиції і організації ЕЦМ, асоційовані з патологією і можуть сприяти розвитку раку [28], а також сприяти епітеліально-мезенхімальному переходу пухлинних клітин, в якому задіяний такий протеїн ЕЦМ як фібронектин [39].

Наведене підтверджується результатами раніше проведених досліджень, які свідчать, що при *Ca in situ* шийки матки може спостерігатися зникнення підепітеліальної сітки еластичних волокон, які потім знову з'являються навколо вог-

ниці більш розвинутої пухлини [12,24,31]. Показано також, що в базальній мембрані ділянки Ca *in situ* кількість мукоплісахаридів зменшується аж до зникнення, аргірофільні волокна розволокнені або зовсім розчинені, порівняно з диспластичними і метапластичними ураженнями, де, навпаки, спостерігається концентрація аргірофільних субстанцій [13,35].

Більш детально вивчена участь місцевих змін строми при карциномі *in situ* і мікроінвазивній карциномі у роботах О.Ф. Чешика [18], який виявив, що на початку інвазивного росту відбуваються чергування процесів "розплавлення" і новоутворення базальної мембрани і волокнистих структур строми. Ці процеси обумовлені поєднаною дією лімфо-гістіоцитарних елементів і пухлинних клітин. Зроблено припущення, що саме наявність вираженого лімфо-гістіоцитарного інфільтрату у стромі шийки матки при карциномі *in situ* обумовлює загибель груп пухлинних клітин, які періодично "занурюються" у підлеглу строму. Зниження інтенсивності лімфо-гістіоцитарної реакції забезпечує виживання ракових клітин [1,2].

Таким чином, з наведених даних літератури, місцевій реакції сполучної тканини при пухлинному рості приділяється велика увага при дослідженні проблеми взаємозв'язку пухлини і організму. Послідовники поглядів академіка О.О. Богомольця про роль фізіологічної системи сполучної притримуються думки про захисну природу місцевих змін строми під час пухлинного росту [4], але, на нашу думку, вона неоднакова на різних етапах пухлинної прогресії. Існує точка зору на деякі місцеві процеси, які відбуваються в прилеглий тканині навколо пухлини і сприяють росту пухлини, а не перешкоджають йому [17,33].

Злоякісні пухлини часто формують строму, в якій домінує тип колагену строми відповідного органу на стадії ембріонального розвитку. Так, наприклад, в стромі раку легень переважаючим типом колагену є колаген III, характерний для ембріонального раку легень. Різні пухлини можуть відрізнятися за складом колагенів строми. У карциномах, як правило, домінують колагени III типу (рак легень), IV типу (нирковоклітинний рак і нефробластоми), в саркомах - інтерстиціальні колагени, але в хондросаркомах - колаген II типу, у синовіальній саркомі досить багато колагену IV типу [21]. Описані відмінності в будові строми особливо важливо враховувати при диференціальної діагностики сарком. Поряд з факторами росту пухлин та її ангиогенезу в ангиогенезі велике значення має склад ЕЦМ строми пухлини та компонентів базальних мембран - ламініну, фібронектину і колагену IV типу. Формування судин в

пухлинах відбувається на тлі збоченої мітогенетичної стимуляції і зміненого позаклітинного матриксу.

Роль строми для пухлини не обмежується тільки трофічними і опорними функціями. Строма надає модифікуючі вплив на поведінку пухлинних клітин, тобто надає регуляторний вплив на проліферацію, диференціювання пухлинних клітин, можливість інвазивного росту і метастазування. Модифікуючий вплив строми на пухлину здійснюється завдяки наявності на клітинних мембранах пухлинних клітин інтегрінових рецепторів і адгезивних молекул, здатних передавати сигнали на елементи цитоскелета і далі в ядро пухлинної клітини [34].

Як свідчать роботи останніх років, у нормальному ЕЦМ присутній нефібрилярний колаген XV типу, який детектується у зоні базальної мембрани, але він зникає при початку метастатичного процесу. Це вказує на фундаментальну роль цього колагену у підтримці стійкості базальної мембрани і попередженні метастазування через такий бар'єр. Навпаки, у мікрооточенні розвинутих пухлин часто збільшується синтез колагену I та IV типу, які асоційовані з фіброзом [28].

Аналізуючи літературу про роль строми у стабільності і прогресії пухлин, ми звернули увагу на нещодавно опублікований огляд, в якому чітко простежені контрольні функції ЕЦМ, які змінюються з віком людини та під час пухлинного росту. Встановлена його роль у створенні ніш для стовбурових і ракових стовбурових клітин, у підтримці та регуляції їх біологічних властивостей, підтримці полярності клітин і архітектури тканин, у попередженні інвазії пухлинних клітин. Проте зміни нормального стану ЕЦМ призводять до утворення пухлинного мікрооточення, появи пухлинного ангіо та лімфогенезу та інвазії пухлинних клітин [29,37].

Залежно від розвиненості строми пухлини поділяються на органоїдні і гістіоїдні. У органоїдних пухлинах є паренхіма і розвинена строма. Прикладом органоїдності пухлин можуть служити різні пухлини епітеліального генезу. При цьому ступінь розвиненості строми може також варіювати від вузьких фіброзних прошарків і судин капілярного типу при медулярному раку до потужних полів фіброзної тканини, в якій епітеліальні пухлинні ланцюжки бувають ледь помітними, наприклад, при скірозній формі. У гістіоїдних пухлинах домінує паренхіма, строма практично відсутня, бо представлена лише тонкостінними судинами капілярного типу. За гістіоїдним типом побудовані пухлини з власної сполучної тканини і деякі інші

неоплазії [27].

Таким чином, пухлинна строма, її клітинний та ЕЦМ - це основні компоненти клітинно-стромальних взаємодій у пухлинній тканині, функція яких може сприяти або стримувати інвазію пухлинних клітин та їх метастазування. Це диктує необхідність вивчення стромального компоненту РШМ на різних стадіях пухлинного росту та можливість визначення його змін як маркерів активності пухлинного процесу [15,26,37].

Далі нами наводяться результати досліджень неураженої та ураженої тканини цервікального каналу при РШМ з використанням тих методів морфологічного дослідження, які, поки що, на нашу думку, несправедливо були поза увагою онкологів, які вивчають патологію шийки матки, що безпосередньо враховує стан "епітелій-сполучна тканина".

У першу чергу, мова йде про вивчення властивостей білків різних структур тканини аденокарцином G1, G2, G3 та плоскоклітинних раків за допомогою гістохімічної методики з бромфеноловим синім на "кислі" та "основні" білки за Мікель-Кальво [6,7]. Вказана методика дозволяє за кольором диференціювати білки, в яких переважають карбоксильні групи над аміногрупами білків (так звані "кислі" білки) - червона (Red) та зелена (Green) ділянки спектру, від білків, в яких аміногрупи переважають над карбоксильними ("основні" білки) - синя (Blue) ділянка спектру. Сучасні можливості об'єктивної оцінки кольору (комп'ютерна мікроспектрофотометрія) дозволяють отримувати високоточні та відтворювані результати вимірювань кольору. На основі комп'ютерної мікроспектрофотометрії отримують два показники - R/V та G/V, тлумачення яких, по суті, однакове, але, залежно від особливостей певного протеїну або від механізмів розвитку певної патології, один з них може бути більш чутливим. Так, без сумніву, властивості білків у цитоплазмі пухлинних клітин, які є паренхімою пухлини, залежать, у першу чергу, від конкретних порушень генетичного матеріалу клітин певного типу пухлини. Отже, різні властивості продукованих клітинами різних типів пухлин потенційно мають діагностичне значення. З іншого боку, відомо, що співвідношення між карбоксильними та аміногрупами білків змінюється при процесах окиснювальної модифікації білків (ОМБ), тому, з урахуванням принципової можливості, використання протиокисдантів у лікуванні хворих на пухлини, визначення показників R/V або G/V може бути використаним в удосконаленні методів лікування пацієнтів, хворих на те чи інше пухлинне захворювання. Ще одних із шляхів застосування

методики з бромфеноловим синім на "кислі" та "основні" білки за Мікель-Кальво при пухлинах є оцінка стану волокнистого компонента строми пухлини. Підґрунтям для цього є той факт, що у протеїнах "молодих" (недавно утворених) сполучнотканинних волокон хоч і переважають карбонільні групи над аміногрупами, все ж це переважання є не таким відчутним, як у зрілих сполучнотканинних волокнах. Тобто, співвідношення між карбонільними та аміногрупами білків дає кількісне уявлення про зрілість колагенових волокон. Оцінка стромального компонента пухлини є одним з цінних показників стану пухлинної тканини. У той же час, оцінка тільки одного співвідношення між карбонільними та аміногрупами білків сполучнотканинних волокон є недостатньою і вимагає урахування таких базових показників стану цих волокон, як питомий об'єм їх у стромі та оптична густина (по суті - щільність) їх забарвлення при використанні тих методів, що дозволяють отримати кількісне уявлення про колаген [8,26].

Отже, в даному дослідженні вперше використані методи оцінки співвідношення між карбонільними та аміногрупами білків за коефіцієнтом R/V у цитоплазмі пухлинних клітин, у слизистих масах та у сполучнотканинних волокнах тканини різних форм раку шийки матки з урахуванням базових показників стану сполучнотканинних волокон.

Мета дослідження

Показати діагностичну цінність гістохімічної комп'ютерної оцінки окислювальної модифікації білків та стану сполучно-тканинних волокон шийки матки в якості додаткового тесту оцінки стану системи "епітелій-сполучна тканина" для диференційної діагностики аденокарциноми та плоскоклітинного раку шийки матки.

Матеріал і методи

У нашому дослідженні проаналізовані морфологічні (дослідження матеріалу роздільного діагностичного вишкрібання цервікального каналу та стінок порожнини матки, прицільної біопсії та післяопераційних препаратів матки) дані хворих на патологію шийки матки: аденокарцинома шийки матки (n=50), плоскоклітинний рак (n=56). У дослідженні були вивчені наступні групи: нормальний плоский епітелій ектоцервіксу позапухлинного поля; нормальний циліндричний епітелій ендцервіксу позапухлинного поля; аденокарцинома G1, G2, G3; плоскоклітинний рак не зроговілий; плоскоклітинний рак зроговілий.

Для визначення ступеня окислювальної модифікації білків (ОМБ) використовували мікрос-

пектрофотометричний комп'ютерний аналіз цифрових зображень, який полягав у наступному: мікротомні зрізи біопатів шийки матки або операційного матеріалу завтовшки 4-5 мікрметрів, які робили на санному мікротомі МС-2. Після депарафінізації гістологічних зрізів застосовували гістохімічну методику для визначення "кислих" та "основних" білків у пухлинних клітинах за Micel Calvo [6,7]. Вибір цієї методики ґрунтувався на тому, що зафарбовані бромфеноловим синім за Micel Calvo гістологічні зрізи можуть підлягати диференційним кількісним дослідженням. При забарвленні бромфеноловим синім за Micel Calvo протеїни, в яких переважають карбоксильні групи (кислі білки), дають більш червоне забарвлення, а протеїни, в яких переважають аміногрупи (основні білки), синє забарвлення.

Після візуальної оцінки валідності застосованих методик, приступали до отримання кількісних параметрів стану пухлинних клітин. Для цього спочатку отримували цифрові копії оптичних зображень шляхом застосування системи "світловий мікроскоп - цифрова камера". Зокрема, використана світлооптична система мікроскопа ЛЮМАМ-Р8 (об'єктив 20x - планахромат, ок.10x) та цифрова камера Olympus SP550UZ (первинний формат запису цифрового файлу - TIFF (Tagged Image File Format) без компресії).

З метою кількісної оцінки співвідношення кислих та основних білків на цифрових копіях оптичних зображень гістологічних зрізів (фарбування бромфеноловим синім за Micel Calvo), проводили мікроспектрометрію у системі цифрового аналізу кольору RGB (від англ. - Red, Green, Blue). Це здійснювалося за допомогою комп'ютерної програми GIMP version 2,8 (Graphics Image Manipulation Program, ліцензія GPL). Згідно системи цифрового аналізу кольору RGB в кожному полі зонду (ділянка цифрового зображення розміром 5x5 пікселів) спочатку оцінювали два параметри за 256 бальною шкалою - червоний компонент кольору (показник R) та синій компонент кольору (показник B), далі на підставі вказаних показників обраховували коефіцієнт R/B (червоний/синій). Вказаний коефіцієнт є математичним співвідношенням між червоним та синім компонентами забарвлення у полі зонду і дозволяє об'єктивно визначити кількісне співвідношення між кислими та основними білками у гістологічних зрізах.

Оцінку стану сполучної тканини шийки матки проводили після забарвлення гістологічних препаратів хромотропом 2В-водним блакитним за методикою Н.З. Слінченко [8], яка специфічно виявляє колаген та фібрин. Останні оцінювали кількісно на цифрових копіях оптичних зображень

у середовищі вищезазначеної комп'ютерної програми GIMP за двома параметрами: 1) питомий об'єм волокнистого компонента строми (у %), 2) оптична щільність забарвлення сполучнотканинних волокон строми (в умовних одиницях оптичної густини). Перший показник обраховували зі співвідношення кількості пікселів цифрового зображення, які відповідали питомому об'єму волокнистого компонента визначеної ділянки строми та кількості пікселів цифрового зображення, які відповідали площі цієї ж ділянки строми. Згідно відомого в стереометрії принципу Делессе, таке співвідношення, за умов багаторазового вимірювання в різних ділянках, у середньому відповідає величині питомого об'єму. Оптичну густину забарвлення сполучнотканинних волокон строми, яка по суті відповідає концентрації колагену в колагенових волокнах, визначали методом комп'ютерної мікроденситометрії з логарифмічним перерахунком в умовні одиниці оптичної густини, яка для зручного тлумачення подається у діапазоні від "0" (абсолютна прозорість об'єкта) до "1" (абсолютна непрозорість об'єкта).

Статистичну обробку отриманого масиву інформації при обстеженні хворих на РШМ проводили із застосуванням пакету прикладних програм Statistica 6.0. Значимість відмінностей між окремими групами оцінювали за допомогою точного критерію Ст'юдента. Значимість відмінностей вважали статистично достовірними, якщо ймовірність (p) була меншою або дорівнювала 0,05 при вірогідності 0,95. Кореляційний зв'язок оцінювали шляхом розрахунку коефіцієнта кореляції Пірсона (r) з подальшою перевіркою статистичної значимості шляхом визначення величини t-критерію і порівняння отриманого значення з табличним критичним значенням t при ступені свободи $k = n - 2$ та рівні значущості (α) 0,05.

Обговорення результатів дослідження

Стан паренхіми та строми шийки матки за показниками окисної модифікації білків при аденокарциномі та плоскоклітинному раку

Вказаний підхід визначив групи хворих і осередки раку шийки матки. Результати дослідження представлені у табл. 1.

Зокрема, зазначеними методами вивчено: нормальний плоский епітелій ектоцервіксу та нормального циліндричного епітелію ендодерміксу позапухлинного поля, ділянки пухлинного поля (аденокарцинома G1, G2, G3, плоскоклітинний рак незроговілий та зроговілий).

З даних, які наведено у таблиці 1, видно, що

найменші середні значення коефіцієнту R/B зафіксовано у цитоплазмі пухлинних клітин аденокарцином, причому виявлене вірогідне ($p < 0,05$) закономірне зниження коефіцієнту R/B по мірі зменшення ступеня диференціювання аденокарциноми. Слід зазначити, що коефіцієнт R/B при аденокарциномах був у 3-4 рази нижчим, ніж у пухлинних клітинах при плоскоклітинних раках, що дозволяє використовувати коефіцієнт R/B як критерій диференціювання цих пухлин.

У цьому дослідженні вперше вивчені властивості білків слизу при різних формах раку шийки матки. Вивчався слиз як на поверхні слизової оболонки, так і у спостереженнях аденокарцином - у слизу просвітів пухлинних "залоз" (див. табл. 1.).

Згідно табличних даних, коефіцієнт R/B у слизу ділянок пухлинного поля при аденокарциномах

всіх ступенів диференціювання у середньому не відрізняється від показників слизу ділянок нормального плоского і стовпчастого епітелію. У той же час, у ділянках пухлинного поля плоскоклітинних раків слиз характеризується вірогідно більш високими значеннями коефіцієнту R/B. Отже, наведені дані вказують на те, що за коефіцієнтом R/B слизу можна диференціювати плоскоклітинний рак від аденокарцином, але аденокарциноми від норми диференціювати немає можливості через близькі середні показники.

Дослідження коефіцієнту R/B у сполучнотканинних волокнах проведено згідно наступних принципів. У ділянках нормального плоского епітелію ектоцервіксу та нормального циліндричного епітелію ендочервіксу позапухлинного поля вивчені осередки сполучної тканини у безпосередній близькості до вказаного епітелію, тобто субепі-

Таблиця 1

Коефіцієнт R/B у гістологічних зрізах пухлини пофарбованих бромфеноловим синім на "кислі" та "основні" білки за методом Мікель-Кальво, у ділянках нормального епітелію та у ділянках раку шийки матки

№ з/п	Групи дослідження	Коефіцієнт R/B та ступінь достовірності змін		
		У цитоплазмі нешкоджених епітеліальних клітин	У слизу цервікального каналу	У сполучнотканинних волокнах пухлини
1.	Нормальний плоский епітелій ектоцервіксу позапухлинного поля (n=43)	3,86±0,038	1,31±0,020	3,09±0,017
2.	Нормальний циліндричний епітелій ендочервіксу позапухлинного поля (n=38)	1,39±0,012 Рп<0,001	1,30±0,022 Рп>0,05	2,97±0,019 Рп=0,004
3.	Аденокарцинома G1 (n=13)	1,26±0,018 Рц=0,002	1,28±0,017 Рц>0,05	1,84±0,012 Рц<0,001
4.	Аденокарцинома G2 (n=22)	1,22±0,019 Рц<0,001 РГ1>0,05	1,29±0,018 Рц>0,05 РГ1>0,05	1,83±0,014 Рц<0,001 РГ1>0,05
5.	Аденокарцинома G3 (n=15)	1,14±0,014 Рц<0,001 РГ1=0,002 РГ2=0,008	1,27±0,015 Рц>0,05 РГ1>0,05 РГ2>0,05	1,85±0,019 Рц<0,001 РГ1>0,05 РГ2>0,05
6.	Плоскоклітинний рак незроговілий (n=50)	2,94±0,029 Рп<0,001 РГ1<0,001 РГ2<0,001 РГ3<0,001	1,37±0,016 Рп=0,015	2,08±0,021 Рп<0,001 РГ1<0,001 РГ2<0,001 РГ3<0,001
7.	Плоскоклітинний рак зроговілий (n=6)	3,18±0,037 Рп<0,001 Рпнр=0,002 РГ1<0,001 РГ2<0,001 РГ3<0,001	1,39±0,018 Рп=0,009 Рпнр>0,05 РГ1<0,001 РГ2<0,001 РГ3<0,001	2,34±0,024 Рп<0,001 Рпнр<0,001 РГ1<0,001 РГ2<0,001 РГ3<0,001

Примітка: Рп – у порівнянні з нормальним плоским епітелієм; Рц – у порівнянні з нормальним циліндричним епітелієм; РГ1, РГ2, РГ3 – у порівнянні з відповідним гістологічним варіантом аденокарциноми; Рпнр – у порівнянні з плоскоклітинним незроговілим раком.

тєліальна сполучна тканина. Подібний принцип був використаний і щодо ділянок пухлинного поля - вивчалися осередки безпосередньо навколо пухлинних клітин. Осередки більш щільної сполучної тканини, яка оточувала пухлину ззовні, в даному дослідженні не вивчалися, адже існував ризик вивчення в такому разі не строми пухлини, а строми нормальної частини шийки матки. Стан сполучної тканини також можна було вивчити і в більшості некротичних ділянок як в аденокарциномі, так і в плоскоклітинному раку.

Результати обрахунку середніх величин коефіцієнту R/V в сполучнотканинних волокнах представлені у третій колонці таблиці 1. Як видно з наведених даних, коефіцієнт R/V у сполучнотканинних волокнах строми пухлин при всіх формах раку шийки матки є значно нижчим, ніж у ділянках нормального епітелію, причому найнижчі величини відповідають аденокарциномам різного ступеня диференціювання. Окрім того, величина коефіцієнту R/V є вищою при плоскоклітинному зроговілому раку ніж при незроговілому. Вказані дані можна пояснити меншою зрілістю сполучнотканинних волокон при низькому коефіцієнту R/V. Найбільші середні величини коефіцієнту R/V сполучнотканинних волокон відмічені для некротичних ділянок, що пояснюється підвищеним рівнем процесів окислювальної модифікації білків.

Морфологічний стан паренхіми і волокнистого компонента строми шийки матки у хворих на аденокарциному та плоскоклітинний рак

З огляду на наведені суттєві відмінності властивостей білків сполучнотканинних волокон, важливою була оцінка таких показників стану сполучної тканини як "питомий об'єм волокнистого компонента строми" та "оптична густина забарвлення сполучнотканинних волокон строми". Для цього використовували метод комп'ютерної планіметрії та метод комп'ютерної мікроденситометрії. Такі дані наведені у таблиці 2.

Дані таблиці 2 свідчать про те, що питомих об'єм волокнистого компонента строми є найвищим у ділянках нормального епітелію позапухлинного поля, причому, в найбільшій мірі це стосується ділянок плоского епітелію ектоцервіксу.

Найменший питомих об'єм волокнистого компонента строми відмічений у некротичних ділянках аденокарциноми або плоскоклітинного раку, що пояснюється деструктивними процесами, які захоплюють не тільки паренхіму пухлини, але і строми новоутворення. З цим висновком узгоджуються дані про середню величину коефіцієнту R/V у сполучнотканинних волокнах некротичних ділянок пухлин (див. табл. 1) та з

даними про найнижчу оптичну густину сполучнотканинних волокон в цих препаратах (див. табл. 2).

Серед неуражених некрозом ділянок пухлинного поля найнижчі показники питомого об'єму волокнистого компонента строми спостерігались в аденокарциномах, причому приблизно однаково при різних ступенях диференціювання пухлин. У цих же ділянках пухлин виявлено найнижчу середню оптичну густину забарвлення сполучнотканинних волокон, яка також не залежить від ступеня диференціювання аденокарциноми. При плоскоклітинних раках, у порівнянні з аденокарциномами, відмічені більш високі показники питомого об'єму волокнистого компонента строми і, окрім того, важливо, що при цьому оптична густина забарвлення сполучнотканинних волокон не просто є вищою, але приблизно така, як і в ділянках нормального плоского епітелію ектоцервіксу чи циліндричного епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля. Вказане може говорити про те, що сполучна тканина при плоскоклітинних раках більш зріла, ніж при аденокарциномі.

Таким чином, підсумувавши вище наведене, нами встановлено значення співвідношення між "кислими" та "основними" білками (коефіцієнт R/V) для оптимізації діагностики пухлинних процесів у шийці матки (аденокарцинома або плоскоклітинний рак) в гістологічних зрізах з можливістю диференційної діагностики між вказаними формами раку. Коефіцієнт R/V має суттєве значення для гістохімічної діагностики змін у сполучнотканинних волокнах, характерних для строми аденокарциноми або плоскоклітинного раку, а також для диференційної діагностики між вказаними формами раку. Зокрема, при величині коефіцієнту R/V у сполучнотканинних волокнах нижче за 2,5 є підстави для встановлення діагнозу раку, а при величині коефіцієнту R/V у сполучнотканинних волокнах нижче за 1,95 є підстави відхилити діагноз плоскоклітинного раку на користь аденокарциноми. Дані щодо коефіцієнту R/V слід використовувати не як основну, а як додаткову ознаку, яка підсилює аргументацію на користь певного діагнозу.

Показник "питомих об'єм волокнистого компонента строми (%)" та "оптична густина забарвлення сполучнотканинних волокон строми (ум.од.опт.густини)" відображають зміни у формуванні сполучнотканинних волокон строми аденокарциноми або плоскоклітинного раку з можливістю диференційної діагностики між вказаними формами раку. Зокрема, при обох формах плоскоклітинного раку питомих об'єм волокнистого компонента строми завжди більше за 50%, оп-

Таблиця 2

Стан сполучної тканини у ділянках нормального епітелію та у ділянках раку шийки матки, при забарвленні гістологічних препаратів хромотропом-водним блакитним за Н.З.Слісценко

№ з/п	Групи дослідження	Показники	
		Питомий об'єм волокнистого компонента строми (%)	Оптична густина забарвлення сполучнотканинних волокон строми (ум.од.опт.густини)
1.	Нормальний плоский епітелій ектоцервіксу позапухлинного поля (n =43)	90,4±0,27	0,192±0,0015
2.	Нормальний циліндричний епітелій ендцервіксу позапухлинного поля (n =38)	82,7±0,17 Рп<0,001	0,194±0,0016 Рп>0,05
3.	Аденокарцинома шийки матки G1 (n =13)	48,9±0,19 Рп<0,001 Рц<0,001	0,164±0,0024 Рп<0,001 Рц<0,001
4.	Аденокарцинома шийки матки G2 (n =22)	47,6±0,18 Рп<0,001 Рц<0,001 PG1>0,05	0,162±0,0023 Рп<0,001 Рц<0,001 PG1>0,05
5.	Аденокарцинома шийки матки G3 (n =15)	46,9±0,22 Рп<0,001 Рц<0,001 PG1>0,05 PG2>0,05	0,160±0,0023 Рп<0,001 Рц<0,001 PG1>0,05 PG2>0,05
6.	Плоскоклітинний незроговілий рак шийки матки (n =50)	54,6±0,24 Рп<0,001 Рц<0,001 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001	0,189±0,0025 Рп>0,05 Рц>0,05 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001
7.	Плоскоклітинний зроговілий рак шийки матки (n =6)	55,9±0,21 Рп<0,001 Рц<0,001 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001 Рпнр=0,004	0,190±0,0024 Рп>0,05 Рц>0,05 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001 Рпнр>0,05

Примітка: Рп – у порівнянні з ділянками нормального плоского епітелієм; Рц – у порівнянні з ділянками нормального циліндричного епітелію; PG1, PG2, PG3 – у порівнянні з ділянками відповідного гістологічного варіанту аденокарциноми; Рпнр – у порівнянні з ділянками плоскоклітинного незроговілого раку.

тична густина забарвлення сполучнотканинних волокон строми завжди більша за 0,180 ум.од. опт. густині, тоді коли для аденокарцином вказані величини завжди є меншими, ніж зазначені цифри.

Висновок

Вирішення проблеми діагностики та лікування злоякісних пухлин взагалі, та раку шийки матки не можливе без використання морфологічних дослідницьких прийомів, що обов'язково враховують вивчення стромального компоненту як маркера активації пухлинного росту.

Комп'ютерна гістохімічна оцінка співвідношення між карбонільними та аміногрупами білків за коефіцієнтом R/B у цитоплазмі пухлинних клітин та сполучно-тканинних волокнах зроговілого і незроговілого плоскоклітинного раку та аденокарциноми шийки матки та визначення стану волокнистого компонента сполучної тканини шийки матки за показниками питомого об'єму та оптичної щільності є чутливими додатковими диференційно-діагностичними тестами, що відкриває перспективи у вивченні механізмів малігнізації та закономірностей розвитку раку шийки матки з урахуванням стану системи "епітелій-сполучна

тканина"

Перспективи подальших досліджень

Запропоновану методику комп'ютерної мікроспектрометрії рекомендовано в подальших дослідженнях паренхіматозно-стромальних взаємодій при патології ендометрія.

Література. 1. Бережна Н.М. Иммунология злокачественного роста / Н.М. Бережна, В.Ф. Чехун // Наукова думка, Київ. - 2005. - 719 с. 2. Бережная Н.М. Система интерлейкинов и рак (новые аспекты взаимодействия опухоли и организма) / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун // - К.: ДИА. - 2000. - 224 с. 3. Бехтерева И.А. Особенности морфогенеза предрака (папилломавирусная инфекция) и рака шейки матки с позиций паренхиматозно-стромальных взаимоотношений (морфометрическое и иммуногистохимическое исследование) Автореф. Дис. доктора мед наук, 14.03.02 - патологическая анатомия - Смоленск. - 2014. - 40с. 4. Богомолец А.А. Учение об опухолях (Онкология) / А.А. Богомолец // Патологическая физиология. - Саратов: Гос. Изд-во. - 1923. - с. 94-120с. 5. Бохман Я.В. Руководство по онкогистологии / Я.В. Бохман // С-Пб.: Фолиант. - 2002. 6. Давиденко І.С. Модифікація гістохімічної методики фарбування фібрину та колагенових волокон у плаценті / І.С. Давиденко // Буковинський медичний вісник. - 2001. - Т. 5, №1. - С. 147-150. 7. Давиденко І.С. Спосіб вимірювання окиснювальної модифікації білків в структурах плаценти // І.С. Давиденко, О.П. Шендерюк // Деклараційний патент України на винахід. - 2006. - №13712U.- Бюл. №4.- 2с. 8. Запорожан В.М. Стан системи "епітелій-сполучна тканина" при передракових змінах і раку шийки матки: клініко-морфологічні і лазерно-поляриметричні особливості / Запорожан В.М., Пішак В.П., Пересунько О.П. [та ін.] // Журн. АМН України. - 2003. - Т. 9, №3. - С. 511-522. 9. Кавецкий Р.Е. Опухоль и организм / Р.Е. Кавецкий // К.: Госмедиздат УССР, 1962. - 301 с. 10. Кавецкий Р.Е. Взаимодействие организма и опухоли / Р.Е. Кавецкий // К.: Наук. думка, 1977. - 235 с. 11. Кавецкий Р.Е. Роль активной мезенхимы в диспозиции организма до злоякісних новотворів / Р.Е. Кавецкий // К., 1937. - С.189-203. 12. Клініко-морфологічні та молекулярно-біологічні фактори прогнозу у хворих на рак шийки матки / Л.І. Воробйова, І.В. Гончарук, Н.Ю. Лук'янова, В.Ф. Чехун // Онкологія. - 2008. - 10, N 4. - С. 382-388. 13. Молекули адгезії та їх значення при розвитку злоякісних пухлин / Л.З. Поліщук, О.Д. Рябцева, Н.Ю. Лук'янова, В.Ф. Чехун // Онкологія. - 2011. - 13, N 1. - С. 4-11. 14. Рак шийки матки: міжнародний опыт скрининга и возможности его реализации в Украине / Воробьева Л.И., Лигирда Н.Ф., Федоренко З.П. [и др.] // Мат. Наук.-практ. конф. "Сучасні принципи діагностики та лікування візуальних форм генітального раку у жінок". - 2002. - С. 11-13. 15. Саргсян С.А. Аденокарцинома шейки матки / С.А. Саргсян, В.В. Кузнецов, М.А. Шабанов [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН - 2006. - Т.17, №3. - С. 37-39. 16. Хмельницький О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки / О.К. Хмельницький // СПб.: СОТИС, 2000. - С. 336. 17. Цитологический скрининг рака шейки матки (пособие для врачей) Л.С. Болгова, Т.Н. Туганова, Л.И. Воробьева [и др.] / Киев: СПД Коляда О.П. - 2011. - 176 с. 18. Чепик О.Ф. Морфологические критерии, влияющие на прогноз плоскоклеточного рака шейки матки / О.Ф. Чепик, С.Я. Максимов, А.Г. Косников // Издание: Вопросы онкологии. Год издания: 1998 Объем: 3с. Дополнительная информация: 1998. - N 2.-С.167-169. 19. Чехун В.Ф. Строма - регулятор прогрессии опухолевых клеток / В.Ф. Чехун // Ж. Онкологія. - 2009. - т.11, №3. - С. 164-165. 20. Чехун В.Ф. Сучасний стан та перспективи фундаментальних досліджень в експериментальній та клінічній онкології / В.Ф. Чехун // Онкологія. - 2010. - Т.12, №3. - С. 219-223. 21. Юшина В.І. Функціональні групи белка стромы шейки матки в процессе развития эпителиальных дисплазий и малигнизации эпителия / В.И. Юшина // Актуальные вопросы акушерства и гинекологии. - Воронеж, мед. ин-т. - 1976. - С. 85-86. 22. Яковлева И.А. Морфологическая диагностика предопухолевых процессов и опухолей матки по биопсиям и соскобам // И.А. Яковлева, Б.Г. Кукутэ // Кишинев "Штиинца", 1979. - С. 147. 23. Яковлева И.А. Эпителий шейки матки в процессе малигнизации / И.А. Яковлева, А.П. Черный, З.Р. Ботнар // Кишинев: Штиинца. - 1981. - 128 с. 24. A retrospective clinicopathological analysis of small-cell carcinoma of the uterine cervix / S. Dongol, Y. Tai, Y. Shao [et al.] // Molecular and Clinical Oncology. - 2014. - Vol. 2. - P.71-75. 25. American Cancer Society Guideline for early detection of cervical neoplasia and cancer / CA Cancer Clin. - 2002. - Vol. 52. - P. 342-362. 26. Argerophilik cells and ectocervical epithelium / F. Fetsisof, B. Serre, B. Arbeille [et al.] // Int. Gynecol. Pathol. - 1999. - Vol. 10. - P. 177-190. 27. Cervix - malignant tumors. In: Pathology of the female reproductive tract / S.J. Robboy, M.C. Anderson, P.R. Russel [et al.] // Edinburgh: Churchill Livingstone. - 2002. - P. 195-240. 28. Cichon M.A. Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor-β signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer / M.A. Cichon, D.C. Radisky // Cell Adh Migr. - 2014. - Vol. 8, N6. - P. 588 - 594. 29. Clementz AG, Harris A. Collagen XV: exploring its structure and role within the tumor microenvironment // Mol Cancer Res. 2013 ;11(12):1481-6. 30. Comparison of Protein Profiles of Cervical Tissue Homogenate, Exfoliated Cells from Cervix and Serum in Normal and Cervical Malignancy Conditions / S. Bhat, V.B. Kartha, L. Raj [et al.] // J Chromatogr Sci. - 2014. - Vol.23. - P. 635-645. 31. Computerized measurement of intercapillary distance using image analysis in women with cervical intraepithelial neoplasia: correlation with severity / M.S. Mikhail, P.R. Palan, J. Basu [et al.] // Acta. Obstet. Gynecol. Scand. - 2004. - Vol. 83, N 3. - P. 308-310. 32. Cooper P. Adenocarcinoma of the endocervix - a histochemical study / P. Cooper, G. Russel, B. Wilson // Histopathology. - 1987. - Vol. 11. - № 12. - P. 1321-1330. 33. De Wever O. Role of tissue stroma in cancer cell invasion / De Wever O., Mareel M. // J. Pathol. - 2003. - Vol. 200, N 4. - P. 429-447. 34. High pathologic misdiagnosis of cervical adenocarcinoma in situ / S.M. Jordan, D.M. Chase, T. Watanabe [et al.] // Eur J Gynaecol Oncol. - 2013. - Vol.34, № 5. - P.446-449. 35. Höckel M. Association between developmental steps in the organogenesis of the uterine cervix and locoregional progression of cervical cancer: a prospective clinicopathological analysis / M. Höckel, B. Hentschel, L.C. Horn // Lancet Oncol. - 2014. - Vol. 15, № 4. - P.445-456. 36. Hynes R.O. Overview of the Matrisome-An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions / R.O. Hynes, A. Naba // Cold Spring Harb Perspect Biol. - 2012. - Vol. 4, N1. - P. 150. 37. Lu P., Weaver V.M., Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression // JCB. - 2012. - 196, N4. - P. 395. 38. Madsen D.H. The source of matrix-degrading enzymes in human cancer: Problems of research reproducibility and possible solutions / D.H. Madsen, T.H. Bugge // J Cell Biol. - 2015. - Vol. 209, N2. - P. 95-98. 39. Park J. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition / J. Park, J.E. Schwarzbauer // Oncogene. - 2014. - Vol. 27, N33, (13). - P. 1649-1657

ПАРЕНХИМАТОЗНО-СТРОМАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАК ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)

А.П. Пересунько, Н.В. Зелинская, И.А. Давыденко

Резюме. При анализе публикаций, посвященных морфологии рака шейки матки (РШМ), обращает на себя внимание факт, что до сих пор изменения в эпителии шейки матки в процессе канцерогенеза рассматриваются отдельно от сопровождающих его изменений в подчиненной строме. Последние данные отечественной и зарубежной литературы показывают необходимость изучения стромального компонента в дифференциальной диагностике аденокарциномы и плоскоклеточного РШМ на разных стадиях опухолевого роста и обосновывают возможность определения паренхиматозно-стромальных изменений, как маркеров активации опухолевого процесса. Авторами с помощью метода компьютерной микроспектрометрии проведены оригинальные исследования уровня окислительной модификации белков (ОМБ) в цитоплазме эпителия и в строме шейки

матки, а также состояния волокнистого компонента соединительной ткани шейки матки по показателям удельного объема и оптической плотности у больных с железистым и плоскоклеточным РШМ. Полученные достоверные результаты позволяют проводить точную гистохимическую дифференциальную диагностику РШМ разной степени дифференцировки (G1, G2, G3), что свидетельствует о целесообразности использования компьютерной микроспектрофотометрии в аспекте дополнительного диагностического теста оценки системы "эпителий-соединительная ткань".

Ключевые слова: паренхиматозно-стромальные взаимоотношения, аденокарцинома, плоскоклеточный рак, шейка матки, дифференциальная диагностика.

PARENCHYMAL-STROMAL INTERACTION AS A PATHOGENIC FACTOR OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL CANCER (REVIEW OF LITERATURE AND IN-HOUSE RESEARCH)

O.P.Peresunko, N.V.Zelinska, I.O.Davydenko

Abstract. In the analysis of publications devoted to the morphology of the cervix, attention is drawn to the fact that by this time the changes in cervical epithelium during carcinogenesis

have been considered separately from the accompanying changes in the stroma subordinates. Recent figures of national and foreign literature show the need to study stromal component in the differential diagnosis of adenocarcinoma and squamous cell cervical cancer at various stages of tumor growth and substantiate the possibility of determining parenchymal-stromal changes as markers of activation of cancer. By means of computer microspectrometry the authors conducted the original study of oxidative modification of proteins in the cytoplasm of the epithelium and stroma of the cervix and the state of fiber volume and the optical density in patients with glandular and squamous cell carcinoma of the cervix. The obtained credible results allow histochemical accurate differential diagnosis of cervical cancer of different degrees of differentiation (G1, G2, G3), indicating the feasibility of using computer microspectrometry in terms of additional diagnostic test evaluation system "epithelium-connective tissue".

Key words: parenchymal-stromal interaction, adenocarcinoma, squamous cell cancer, uterine cervix, differential diagnosis.

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol.-2016.-Vol.15,№2(56).p.1.-P.220-229.

Надійшла до редакції 10.04.2016

Рецензент – проф. О.М. Юзько

© О.П. Пересунько, Н.В. Зелінська, І.О. Давиденко, 2016