

**КОМПЮТЕРНА МІКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРІЯ**  
**СИСТЕМИ «ЕПІТЕЛІЙ-СПОЛУЧНА ТКАНИНА»**  
**В ДІАГНОСТИЦІ РАКУ ШИЙКИ МАТКИ**

Л.І Воробйова<sup>1</sup> О.П. Пересунько<sup>2</sup> Н.В. Зелінська<sup>2</sup>, О.І. Давиденко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний інститут раку, Київ

<sup>2</sup>Буковинський державний медичний університет, Чернівці

**РЕЗЮМЕ.** В даному дослідженні вперше використані комп'ютерні методи оцінки карбонільних та аміногруп білків у цитоплазмі пухлинних клітин, слизистих масах та у сполучнотканинних волокнах при плоскоклітинному (незроговілому та зроговілому) раку та аденокарциномі шийки матки з урахуванням базових показників стану системи «епітелій-сполучна тканина». Отримані вірогідні результати дозволяють проводити точну цито- та гістохімічну диференційну діагностику плоскоклітинного та залозистого раку різних ступенів диференціювання (G1, G2, G3), що свідчить про доцільність використання комп'ютерної мікроспектрофотометрії в аспекті чутливого додаткового діагностичного тесту.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** рак шийки матки, система «епітелій-сполучна тканина», диференційна діагностика, окислювальна модифікація білків.

Проблема своєчасної діагностики раку шийки матки (РШМ) в Україні далека від вирішення. РШМ належить до так званих «візуальних» локалізацій, для яких протягом багатьох десятиків років відомі засоби раннього виявлення. Однак смертність хворих протягом року від встановлення діагнозу втричі перевищує кількість випадків в IV стадії [4,5].

Біля 80% всіх випадків РШМ складає плоскоклітинний рак, біля 20% - аденокарцинома. В розвинутих країнах спостерігається значне зниження захворюваності плоскоклітинним РШМ і смертності від цієї патології, що ймовірно пов'язано з ефективним скринінгом. В той же час захворюваність аденокарциномою

шийки матки на протязі останніх 30 років збільшується, напевно внаслідок меншої ефективності цервікального цитологічного скринінгу і виявлення цього типу РШМ [2,3].

В світовій практиці поворотним пунктом у вирішенні проблеми РШМ стало впровадження масових цитологічних обстежень шийки матки – цитологічного скринінгу, цінність якого доведена. Враховуючи доступність шийки матки, точний діагноз в більшості випадків встановлюється за допомогою цервікальної цитології, теста Папаніколау чи цервікальної біопсії. Методи цервікального цитологічного скринінгу менш ефективні в діагностиці аденокарциноми, так як аденокарцинома вражає ділянки шийки, з яких важче отримати матеріал (тобто цервікальний канал). Підвищити вірогідність виявлення раку, в тому числі аденокарциноми шийки матки, можуть новітні діагностичні заходи [2,3,4,8].

Проблема РШМ має клінічний, епідеміологічний, морфологічний, імунологічний, біоклінічний та інші аспекти. Вирішення її неможливе без використання морфологічних дослідницьких прийомів. Досить відзначити, що тільки за допомогою морфологічних методів вдається виявити передракові зміни епітелію (дисплазію), внутрішньоепітеліальний і передклінічний інвазивний рак. Бурхливий розвиток електронної мікроскопії, гісто- і цитохімії ще більше розширює можливість клініцистів та онкоморфологів у вивченні механізмів малігнізації і закономірностей розвитку пухлин [1,12,13].

У даній роботі наводяться результати досліджень неураженої та ураженої тканини цервікального каналу та його вмісту при РШМ з використанням тих методів морфологічного дослідження, які, поки що, на нашу думку, несправедливо були поза увагою онкологів, які вивчають патологію шийки матки.

У першу чергу, мова йде про вивчення властивостей білків різних структур тканини аденокарцином G1, G2, G3 та плоскоклітинних раків за допомогою

гістохімічної та цитохімічної методик з бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво [1,7]. 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/B та G/B, 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 міняється при процесах окиснювальної модифікації білків (ОМБ), тому з урахуванням принципової можливості використання антиоксидантів у лікуванні хворих на пухлини, визначення показників R/B або G/B може бути використаним в удосконаленні методів лікування пацієнтів, хворих на те чи інше пухлинне захворювання. Ще один із шляхів застосування методики з бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво при пухлинах є оцінка стану волокнистого компонента стромы 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 [9,10].

Отже, в даному дослідженні вперше використані методи оцінки співвідношення між карбонільними та аміногрупами білків за коефіцієнтом R/B у цитоплазмі пухлинних клітин, у слизистих масах та у сполучнотканинних волокнах тканини різних форм раку шийки матки з урахуванням базових показників стану сполучнотканинних волокон [1,14].

**МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ.** Показати діагностичну цінність гісто- та цитохімічної комп'ютерної оцінки окислювальної модифікації білків та стану сполучно-тканинних волокон шийки матки в якості додаткового діагностичного тесту.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** В нашому дослідженні проаналізовані морфологічні (мазок на цитологію шийки матки, дослідження 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=19), плоскоклітинний рак (n=25), недиференційований рак (n=12), цитологічний контроль – пацієнтки з незмінним циліндричним епітелієм (n=15). У дослідженні були вивчені наступні групи: практично здорові жінки, аденокарцинома G1, G2, G3, плоскоклітинний рак незроговілий, плоскоклітинний рак зроговілий.

Для визначення ступеня окислювальної модифікації білків (ОМБ)

використовували мікроспектрофотометричний комп'ютерний аналіз цифрових зображень на основі методики забарвлення бромфеноловим синім за Мікель-Кальво, яка полягала у наступному:

1. Цитологічні препарати протягом 2-10 хв. фарбують у розчині А (21 мл етанолу, 9 мл оцтової кислоти, 0,03 г бромфенолового синього або 56 мл етанолу, 24 мл оцтової кислоти, 0,08 г бромфенолового синього)

2. Диференціюють кожне скло окремо доти, поки не відійдуть жовто-зелені хмаринки фарби у розчині В (21 мл етанолу, дистильована вода 9 мл, оцтова кислота – 0,3 мл).

Цитологічні препарати за методикою Мікель-Кальво під дією оцтової кислоти руйнуються, тому визначення показника R/B в цитологічних препаратах проводиться за дещо модифікованою методикою за Давиденко, яка на даний час знаходиться на стадії патентування.

Оптичні зображення за допомогою цифрової фотокамери Olympus C-740UZ та мікроскопа ЛЮМАМ-8 (Об.20<sup>x</sup>, Ок.10<sup>x</sup>) переводили у цифрові, а останні аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0, виробника ООО Видеотест (Росія, 2000) шляхом зондової комп'ютерної мікроспектрометрії у системі аналізу кольору RGB (від англ.- Red, Green, Blue). Згідно до вказаної системи аналізу кольору, оцінювали інтенсивність червоного і синього кольору в забарвленні. Оскільки червоне забарвлення при методиці Мікель-Кальво відповідає карбонільним групам, а синє – аміногрупам білків, то шляхом встановлення математичного співвідношення між інтенсивністю забарвлення в двох кольорах (ділянки спектру) оцінювали ступінь ОМБ (співвідношення карбоксильних та аміногруп). Таким чином, ступінь ОМБ в цитоплазмі епітелія шийки матки визначали за коефіцієнтом R/B (червоний/синій) [6,8].

Для гістохімічного дослідження стану сполучної тканини та її оптичної щіль-

ності матеріал біопсії фіксували 48-72 годин в 10% розчині нейтрального забуференого формаліну, після парафінової заливки на санному мікротомі MC-2 одержували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм. Гістологічні препарати зафарбовували гематоксиліном і еозином. Нами використана методика Н.З. Слінченко («хромотроп 2В»–«водний блакитний» після протравки фосфорно-вольфрамовою кислотою). Вказане забарвлення по результатах відповідає відомій методиці Меллорі, але на відміну від останньої дозволяє адекватно зафарбовувати тканини, фіксовані звичайним способом у формаліні. Після фарбування з'являється можливість візуалізувати волокна сполучної тканини - по чистому блакитному забарвленню різної інтенсивності, фібрин - малиновий колір, еритроцити – яскраво-червоні, різні клітини: їх ядра і цитоплазма забарвлюються у відтінки кольорів від блакитного до пурпурового. Оптичні зображення переводили в цифрові за допомогою мікроскопа ЛЮМAM-P8 і цифрової фотокамери Olympus C740UZ. Одержані цифрові зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВідеоТест–Розмір 5.0, виробника ТОВ Відеотест (Росія, 2000). Інтенсивність забарвлення вимірювали мікрозондовим методом згідно технології комп'ютерної мікроденсітометрії за показником "оптична щільність" в умовних одиницях від 0 (повністю проникний для світлового пучка) до 1 (абсолютно непроникний для світлового пучка). Там, де це було можливо, попіксельно визначали питому площу (%), займану сполучнотканинними волокнами. Для одержаних статистичних вибірок перевіряли гіпотезу про нормальність розподілу за допомогою критерію Уїлки-Хана-Шапіро. Хоча гіпотеза ні в одному випадку не була відхилена, використовували не тільки параметричний метод порівняння – непарний двосторонній критерій Стьюдента, але і непараметричний метод – критерій Манна-Уїтні. Рівнем статистичної значущості вважали  $p=0,05$  [6,7].

Вказаний підхід визначив групи досліджуваного матеріалу. Зокрема,

зазначеними методами вивчено: ділянки нормального плоского епітелію ектоцервіксу та нормального циліндричного епітелію ендоцервіксу позапухлинного поля, ділянки пухлинного поля (аденокарцинома G1, G2, G3, плоскоклітинний рак незроговілий та зроговілий). Окрім того, окремо вивчено некротичні ділянки в аденокарциномі або плоскоклітинному раку.

## **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.**

### *Комп'ютерна гістохімічна оцінка раку шийки матки*

Результати гістохімічного дослідження окислювальної модифікації білків по коефіцієнту R/B представлені в таблиці 1.

З даних, які наведено у таблиці 1, видно, що у цитоплазмі клітин найбільшу середню величину коефіцієнт R/B мав у загиблих клітинах некротичних ділянок в тканині пухлин, причому ця закономірність була однаковою і для всіх ступенів диференціювання аденокарцином і плоскоклітинних раків, тому результати по цим пухлинам об'єднані. Високий коефіцієнт R/B в некротичних ділянках може бути пояснений високим рівнем ОМБ. Частіше некротичні ділянки зустрічалися в аденокарциномі G3 та у плоскоклітинному незроговілому раку. Для прикладу, як виглядали некротичні ділянки в пухлинах, надається рисунок 1.

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 плоскоклітинному раку, що дозволяє використовувати коефіцієнт R/B як критерій диференціювання цих пухлин. Вказані закономірності, а також стан нормального епітелію проілюстровані на рисунках 2-6.

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» (рис. 2 - 4). 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 циліндричного епітелію. У той же час, у ділянках пухлинного поля плоскоклітинних раків слиз характеризується вірогідно більш високими значеннями коефіцієнту R/B. У некротичних ділянках про наявність слизистих мас впевнено не можна було судити (рис.1), тому в осередках некрозу дослідженні слизу не проводилися. Отже, наведені дані вказують на те, що по коефіцієнту R/B слизу можна диференціювати плоскоклітинні раки від аденокарцином, але аденокарциноми від норми диференціювати не має можливості.

Дослідження коефіцієнту R/B у сполучнотканинних волокнах проведено згідно наступних принципів. У ділянках нормального плоского епітелію ектоцервіксу та нормального циліндричного епітелію ендцервіксу позапухлинного поля вивчені осередки сполучної тканини у безпосередній близькості до вказаного епітелію, тобто субепітеліальна сполучна тканина. Осередки більш глибокого розташування не вивчалися, оскільки це не входило завдання даного дослідження. 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 вивчалася, 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 плоско клітинному раку.

Результати обрахунку середніх величин коефіцієнту R/B в сполучнотканинних волокнах представлені у третій колонці таблиці 1. Як видно з наведених даних, коефіцієнт R/B у сполучнотканинних волокнах строми пухлин при всіх формах раку шийки матки є значно нижчим, ніж в 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 ОМБ.

*Оцінка стану сполучно-тканинних волокон шийки матки.*

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». Такі дані наведені у таблиці 2.

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

Найменший питомий 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 її строму новоутворення. З цим висновком узгоджуються дані про середню величину коефіцієнту R/V у сполучнотканинних волокнах некротичних ділянок пухлин та з даними про найнижчу оптичну густина сполучнотканинних волокон в цій групі дослідження (таблиця 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 цих 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 приблизна така, як і у ділянках нормального плоского епітелію ектоцервіксу чи циліндричного епітелію ендцервіксу позапухлинного поля.

Вказані закономірності щодо питомого об'єму волокнистого компонента строми та оптичної густини забарвлення сполучнотканинних волокон строми у різних групах дослідження проілюстровані за допомогою рисунків 7 – 12.

#### *Комп'ютерна цитохімічна оцінка раку шийки матки*

Окремий матеріал для дослідження становили висушені нативні мазки з вмісту цервікального каналу. Можливим було вивчити наступні групи дослідження: практично здорові жінки, аденокарцинома G1, G2, G3, плоскоклітинний рак не зроговілий, плоскоклітинний рак зроговілий.

У мазках вмісту цервікального каналу, які пофарбовані бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за методом Мікель-Кальво, визначалися такі окремі об'єкти: епітеліальні клітини (непухлинні у практично здорових жінок або пухлинні при діагностиці пухлини), слиз (тобто безструктурні слизисті неклітинні маси), а також відмічалися об'єкти, які важко було з впевненістю віднести до якогось певного вищезазначеного типу об'єкта (неідентифіковані об'єкти мазків).

У всіх вищезазначених об'єктах на цитохімічних препаратах (мазки цервікального каналу), пофарбованих бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за методом Мікель-Кальво, був визначений коефіцієнт R/B. Середні величини цього коефіцієнту наведені у таблиці 3. Слід зазначити, що величини коефіцієнту R/B, які отримані на нативних мазках, не повинні точно збігатися з даними, які

отримані на гістохімічних препаратах, оскільки методика виготовлення гістохімічних препаратів передбачає іншу попередню обробку шматочків тканини (фіксація у формаліні, проводка у спиртах, заливка в парафін, депарафінація), яка сама по собі впливає на стан карбоксильних та аміногруп білків.

Відповідно до даних таблиці 3 при аденокарциномах різного ступеня диференціювання коефіцієнт R/B в атипових (пухлинних) клітинах у середньому є нижчим, ніж у практично здорових. При цьому в атипових клітинах аденокарциноми G3 він є особливо низьким, що важливо для диференційної діагностики ступенів диференціювання аденокарцином. У той же час коефіцієнт R/B є більшим, ніж у практично здорових при плоскоклітинних формах раку, особливо при зроговілій формі.

Щодо слизу, то необхідно відзначити, що його дослідження також показало закономірні зміни.

Зокрема, при аденокарциномах коефіцієнт R/B у слизу був нижчим, ніж у практично здорових, але різниці між ступенями диференціювання цієї пухлини не і виявлено. При плоскоклітинних формах раку коефіцієнт R/B у слизу навпаки був вищим, ніж у практично здорових і особливо значні цифри відмічені для зроговілої форми плоскоклітинного раку. Пояснити високі цифри щодо коефіцієнту R/B при плоскоклітинних раках можна тим, що, можливо до складу слизу домішуються залишки пухлинних клітин.

У неідентифікованих об'єктах нативних мазків вмісту цервікального каналу зафіксовані найбільш високі середні величини коефіцієнту R/B, причому це спостерігалось у всіх групах дослідження приблизно на одному рівні. Остаточний висновок щодо неідентифікованих об'єктів мазків вмісту цервікального каналу робити важко, але можна припустити, що не ідентифікованими об'єктами в основному є клітини у стані некрозу (що властиво пухлинам) або апоптозу (що

властиво як пухлинним клітинам так і клітинам без ознак пухлинної атипії). У всякому разі варто зауважити, що не ідентифіковані об'єкти не мають значення для діагностики пухлин та їх диференціювання, але при великій їх кількості можуть призвести до хибних висновків, якщо їх враховувати в загальній масі, а не виділяти як окремий параметр дослідження.

Зображення мазків вмісту цервікального каналу представлені на рисунках 13-16.

### **ВИСНОВОК.**

Комп'ютерна гісто- та цитохімічна оцінка співвідношення між карбонільними та аміногрупами білків за коефіцієнтом R/B у цитоплазмі пухлинних клітин, слизових масах та сполучно-тканинних волокнах зроговілого і незроговілого плоскоклітинного раку та аденокарциноми шийки матки, є чутливим додатковим диференційно-діагностичним тестом та відкриває перспективи у вивченні механізмів малігнізації та закономірностей розвитку пухлин.

Таблиця 1

Коефіцієнт R/B у гістохімічних препаратах, пофарбованих бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за методом Мікель-Кальво у ділянках нормального епітелію та у ділянках пухлинного поля різних пухлин шийки матки

№ з/п	Групи дослідження	Коефіцієнт R/B		
		У цитоплазмі неущоджених епітеліальних клітин	У слизу	У сполучнотканинних волокнах
1.	Ділянки нормального плоского епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля	3,86±0,038	1,31±0,020	3,09±0,017
2.	Ділянки нормального циліндричного епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля	1,39±0,012 Рп<0,001	1,30±0,022 Рп>0,05	2,97±0,019 Рп=0,004
3.	Ділянки пухлинного поля (Аденокарцинома G1)	1,26±0,018 Рц=0,002	1,28±0,017 Рц>0,05	1,84±0,012 Рц<0,001
4.	Ділянки пухлинного поля (Аденокарцинома G2)	1,22±0,019 Рц<0,001 РG1>0,05	1,29±0,018 Рц>0,05 РG1>0,05	1,83±0,014 Рц<0,001 РG1>0,05
5.	Ділянки пухлинного поля (Аденокарцинома G3)	1,14±0,014 Рц<0,001 РG1=0,002 РG2=0,008	1,27±0,015 Рц>0,05 РG1>0,05 РG2>0,05	1,85±0,019 Рц<0,001 РG1>0,05 РG2>0,05
6.	Ділянки пухлинного поля (Плоскоклітинний рак незроговілий)	2,94±0,029 Рп<0,001 РG1<0,001 РG2<0,001 РG3<0,001	1,37±0,016 Рп=0,015	2,08±0,021 Рп<0,001 РG1<0,001 РG2<0,001 РG3<0,001
7.	Ділянки пухлинного поля (Плоскоклітинний рак зроговілий)	3,18±0,037 Рп<0,001 Рпнр=0,002 РG1<0,001 РG2<0,001 РG3<0,001	1,39±0,018 Рп=0,009 Рпнр>0,05 РG1<0,001 РG2<0,001 РG3<0,001	2,34±0,024 Рп<0,001 Рпнр<0,001 РG1<0,001 РG2<0,001 РG3<0,001
8.	Некротичні ділянки в аденокарциномі або плоскоклітинному раку	4,94±0,043 Р<0,001 (у порівнянні з будь-якою групою дослідження)	Слиз не визначалася	5,16±0,048 Р<0,001 (у порівнянні з будь-якою групою дослідження)

Примітка. Рп – у порівнянні з нормальним плоским епітелієм; Рц – у порівнянні з нормальним циліндричним епітелієм; РG1, РG2, РG3 – у порівнянні з пухлинним епітелієм відповідного гістологічного варіанту аденокарциноми; Рпнр – у порівнянні з пухлинним епітелієм плоскоклітинного незроговілого раку.

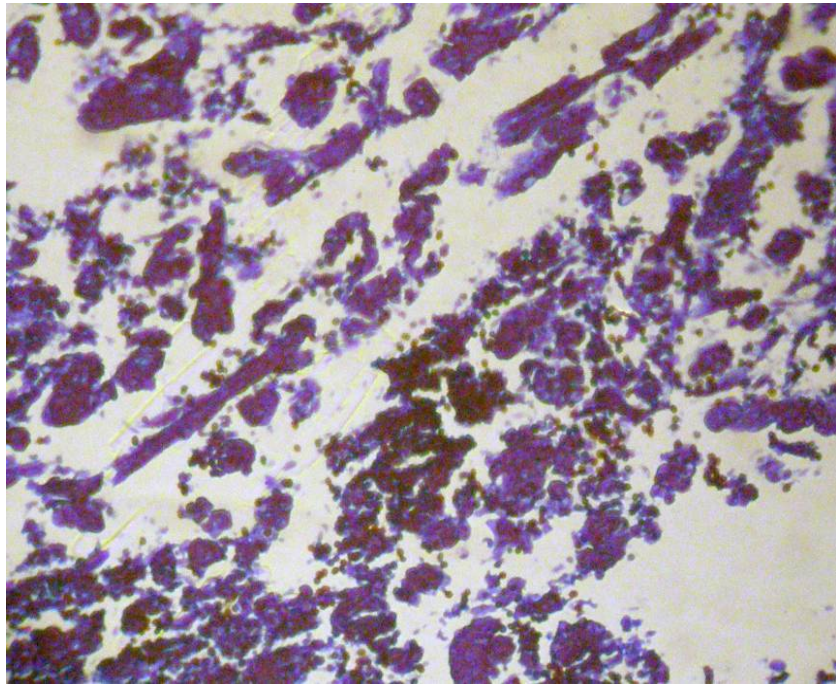


Рис.1. Гістохімічне дослідження некротичної ділянки аденокарциноми G3. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

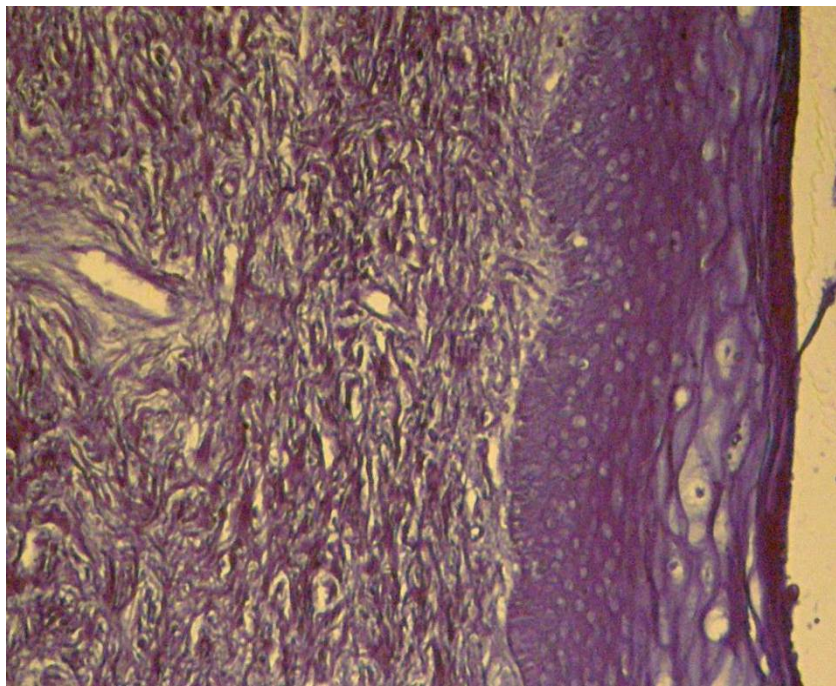


Рис.2. Гістохімічне дослідження ділянки нормального плоского епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.



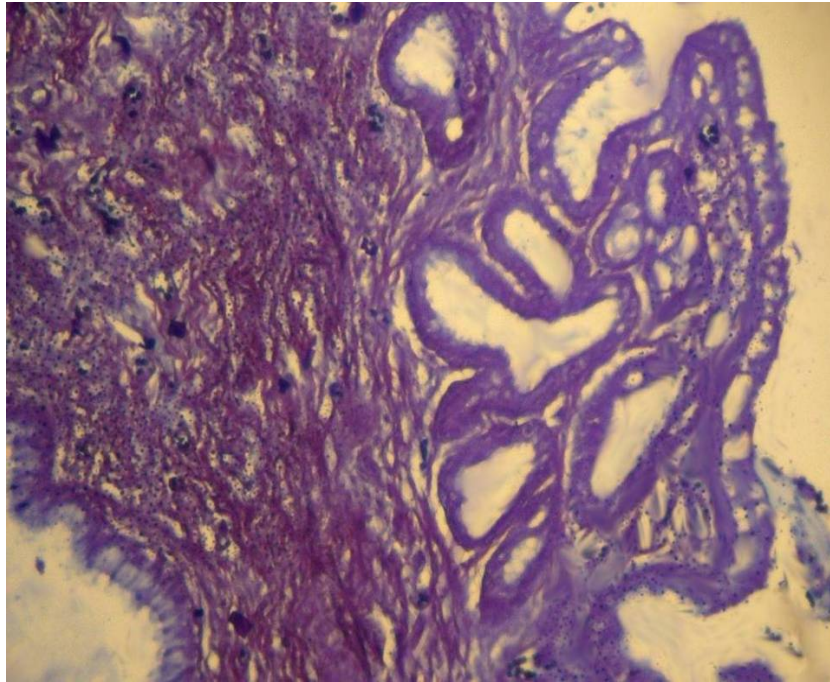


Рис.3. Гістохімічне дослідження ділянки нормального циліндричного епітелію ендocerвіксу позапухлинного поля. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

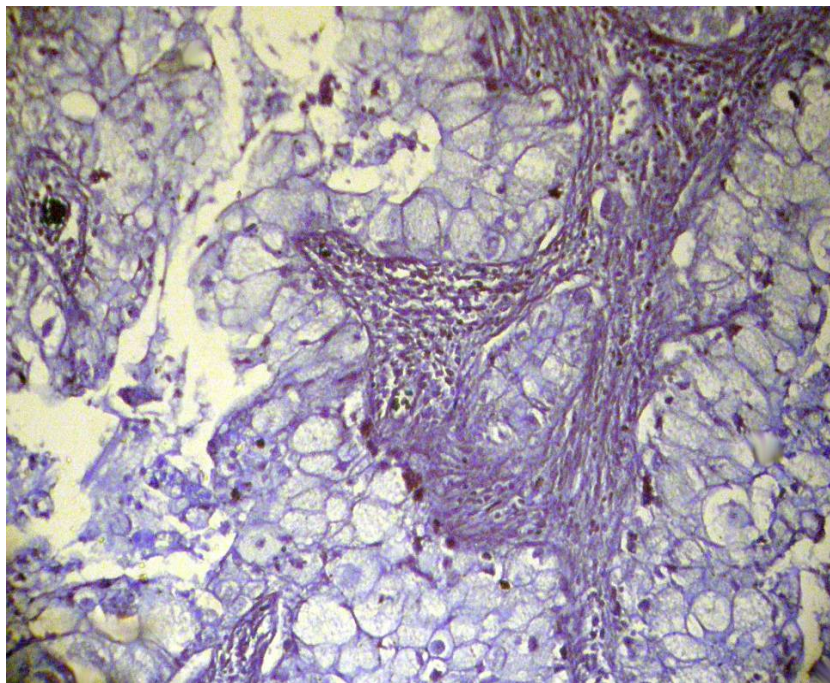


Рис.4 Гістохімічне дослідження пухлинних клітин аденокарциноми G2. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.



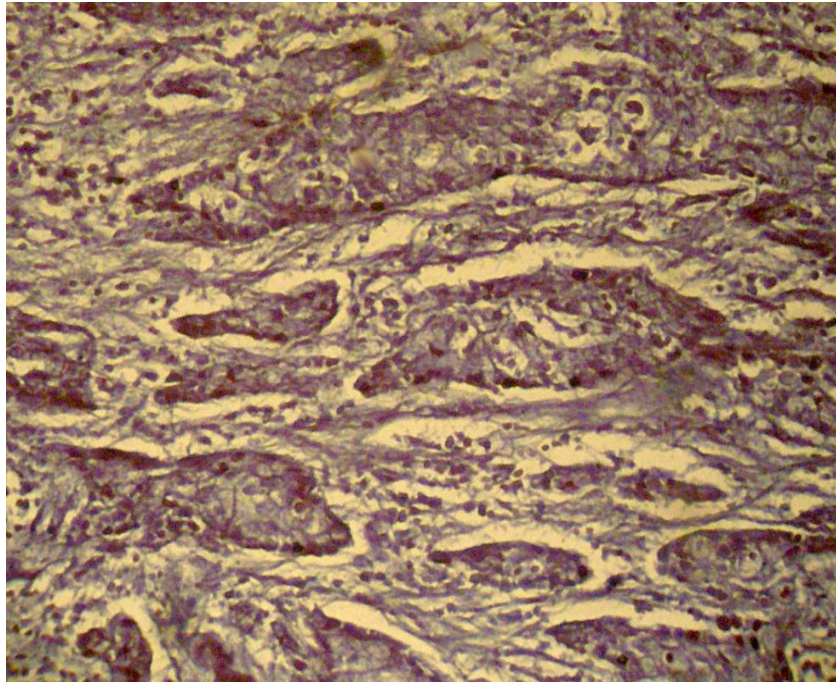


Рис.5 Гістохімічне дослідження пухлинних клітин плоскоклітинного незроговілого раку. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

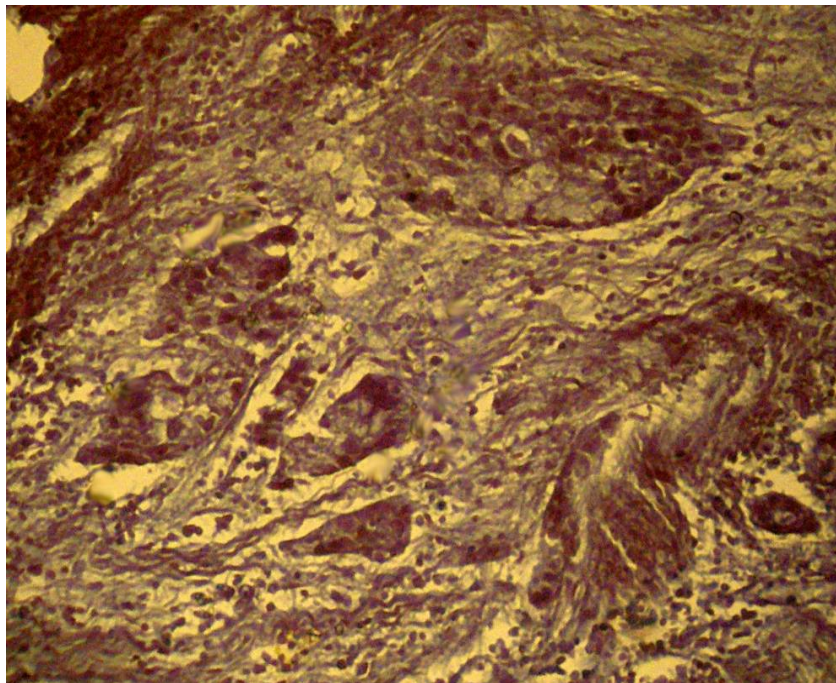


Рис.6 Гістохімічне дослідження пухлинних клітин плоскоклітинного зроговілого раку. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.



Таблиця 2

Стан сполучної тканини при забарвленні гістологічних препаратів хромотропом-водним блакитним за Н.З.Слінченко у ділянках нормального епітелію та у ділянках пухлинного поля різних пухлин

№ з/п	Групи дослідження	Показники	
		Питомий об'єм волокнистого компонента строми (%)	Оптична густина забарвлення сполучнотканинних волокон строми (ум.од.опт.густини)
1.	Ділянки нормального плоского епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля	90,4±0,27	0,192±0,0015
2.	Ділянки нормального циліндричного епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля	82,7±0,17 Рп<0,001	0,194±0,0016 Рп>0,05
3.	Ділянки пухлинного поля (Аденокарцинома G1)	48,9±0,19 Рп<0,001 Рц<0,001	0,164±0,0024 Рп<0,001 Рц<0,001
4.	Ділянки пухлинного поля (Аденокарцинома G2)	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.	Ділянки пухлинного поля (Аденокарцинома G3)	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.	Ділянки пухлинного поля (Плоскоклітинний рак незроговілий)	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.	Ділянки пухлинного поля (Плоскоклітинний рак зроговілий)	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
8.	Некротичні ділянки в аденокарциномі або плоскоклітинному раку	40,1±0,38 Р<0,001 (у порівнянні з будь-якою групою дослідження)	0,124±0,0041 Р<0,001 (у порівнянні з будь-якою групою дослідження)

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.

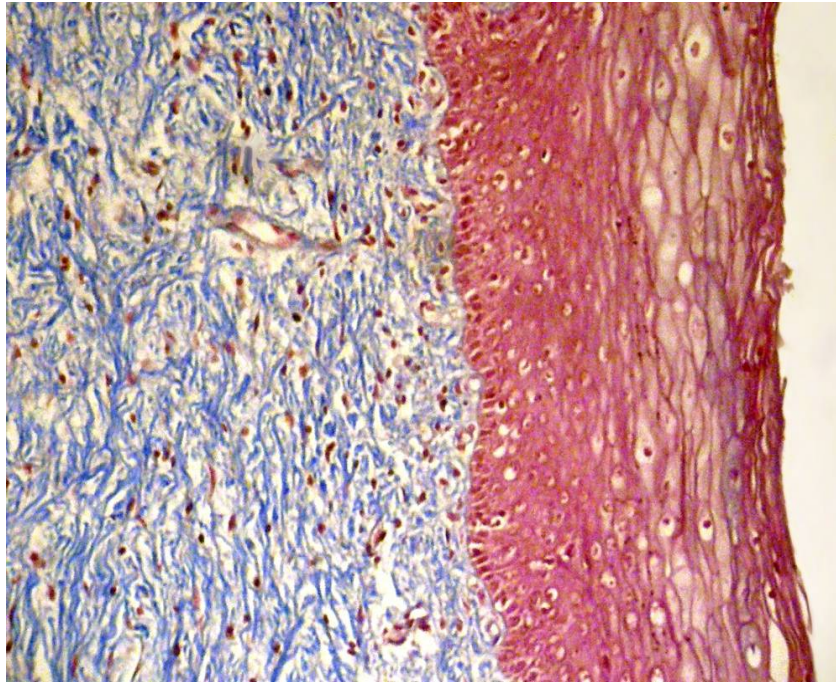


Рис. 7 Гістологічна картина стромы ділянки нормального плоского епітелію ектоцервіксу позапухлинного поля. Зabarвлення за Н.З.Слiнченко. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

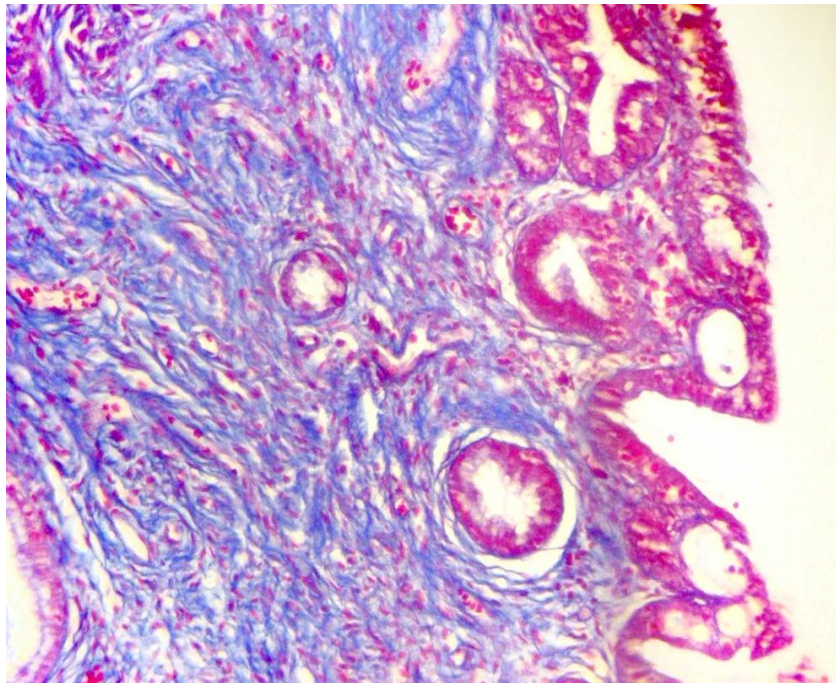


Рис.8. Гістологічна картина стромы ділянки нормального циліндричного епітелію ендоецервіксу позапухлинного поля. Зabarвлення за Н.З.Слiнченко. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.



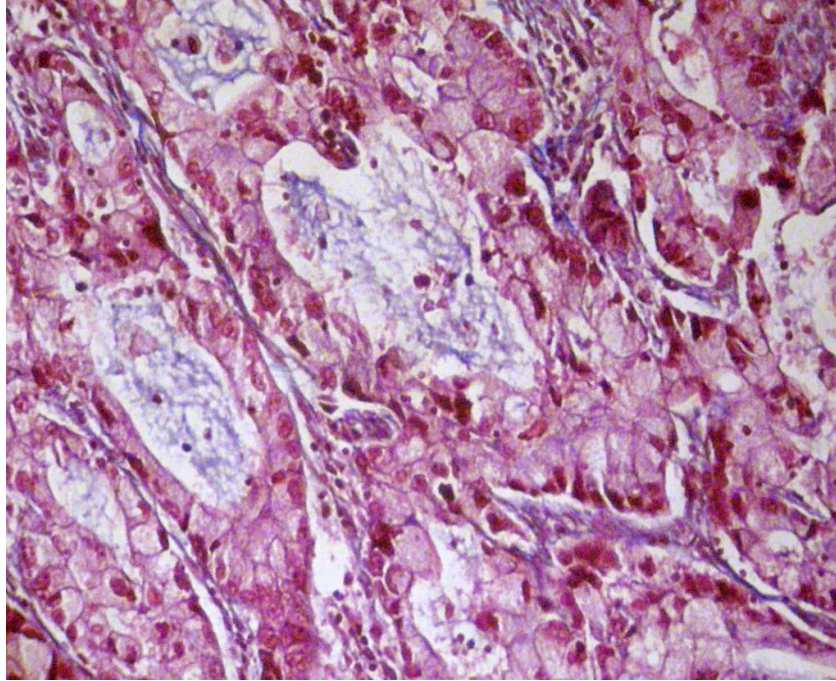


Рис.9 Гістологічна картина стромы ділянки пухлинного поля (аденокарцинома G2). Зabarвлення за Н.З.Слiнченко. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

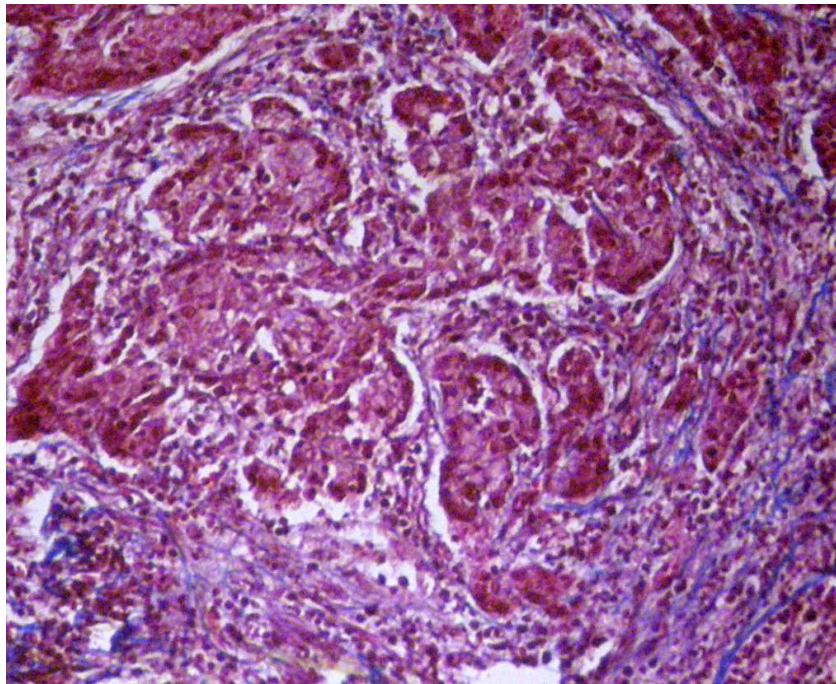


Рис. 10 Гістологічна картина стромы ділянки пухлинного поля (плоскоклітинний рак незроговілий). Зabarвлення за Н.З.Слiнченко. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.



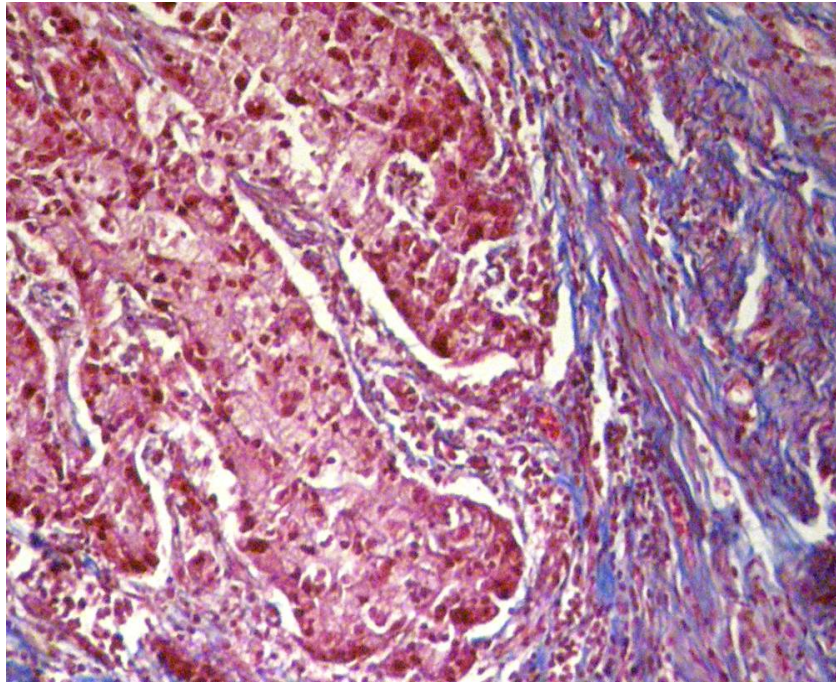


Рис. 11 Гістологічна картина стромі ділянки пухлинного поля (плоскоклітинний рак зроговілий). Забарвлення за Н.З.Слінченко. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

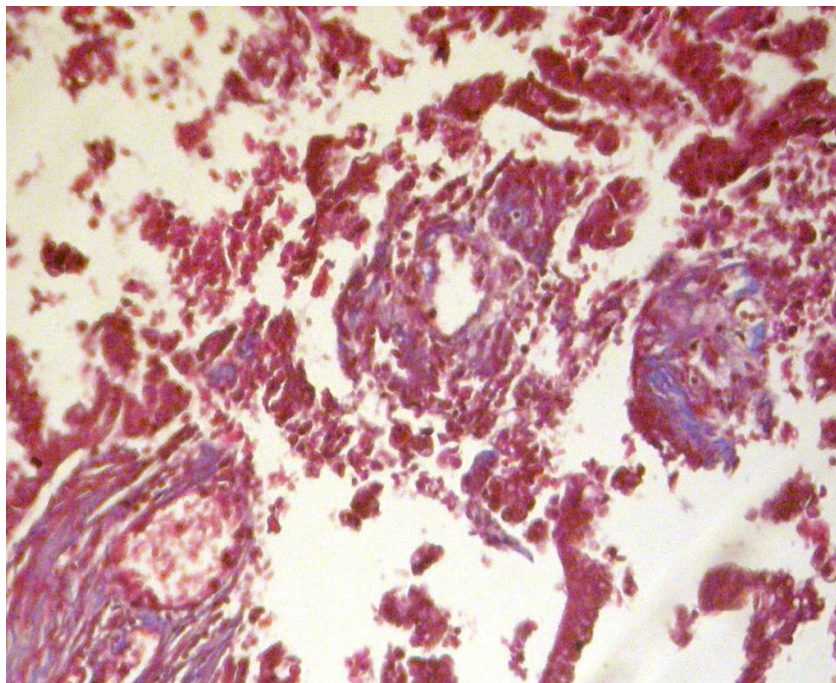


Рис. 12 Гістологічна картина залишків стромі ділянки пухлинного поля в некротичних ділянках. Забарвлення за Н.З.Слінченко. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

Коефіцієнт R/B у цитохімічних препаратах (мазки цервікального каналу),  
пофарбованих бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за методом  
Мікель-Кальво у практично здорових жінок та у жінок, які хворі на різні форми раку  
шийки матки

№ з/п	Групи дослідження	Коефіцієнт R/B		
		У цитоплазмі епітеліальних клітин	У слизу	У неідентифікованих об'єктах мазків
1.	Практично здорові жінки	1,17±0,053	1,24±0,062	3,41±0,219
2.	Аденокарцинома G1	0,98±0,077 Рпз=0,049	0,94±0,106 Рпз=0,032	3,46±0,198 Рпз>0,05
3.	Аденокарцинома G2	0,97±0,075 Рпз=0,036 PG1>0,05	0,92±0,104 Рпз=0,024 PG1>0,05	3,43±0,206 Рпз>0,05 PG1>0,05
4.	Аденокарцинома G3	0,74±0,084 Рпз=0,004 PG1=0,042 PG2=0,048	0,91±0,120 Рпз=0,021 PG1>0,05 PG2>0,05	3,45±0,218 Рпз>0,05 PG1>0,05 PG2>0,05
5.	Плоскоклітинний рак незроговілий	1,62±0,093 Рпз=0,004 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001	1,38±0,096 Рпз>0,05 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001	3,38±0,208 Рпз>0,05 PG1>0,05 PG2>0,05 PG3>0,05
6.	Плоскоклітинний рак зроговілий	3,28±0,241 Рпз<0,001 Рпнр<0,001 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001	2,12±0,058 Рпз<0,001 Рпнр<0,001 PG1<0,001 PG2<0,001 PG3<0,001	3,52±0,193 Рпз>0,05 Рпнр>0,05 PG1>0,05 PG2>0,05 PG3>0,05

Примітка. Рз – у порівнянні з практично здоровими жінками; PG1, PG2, PG3 – у порівнянні з відповідним гістологічним варіантом аденокарциноми; Рпнр – у порівнянні з плоскоклітинним незроговілим раком.

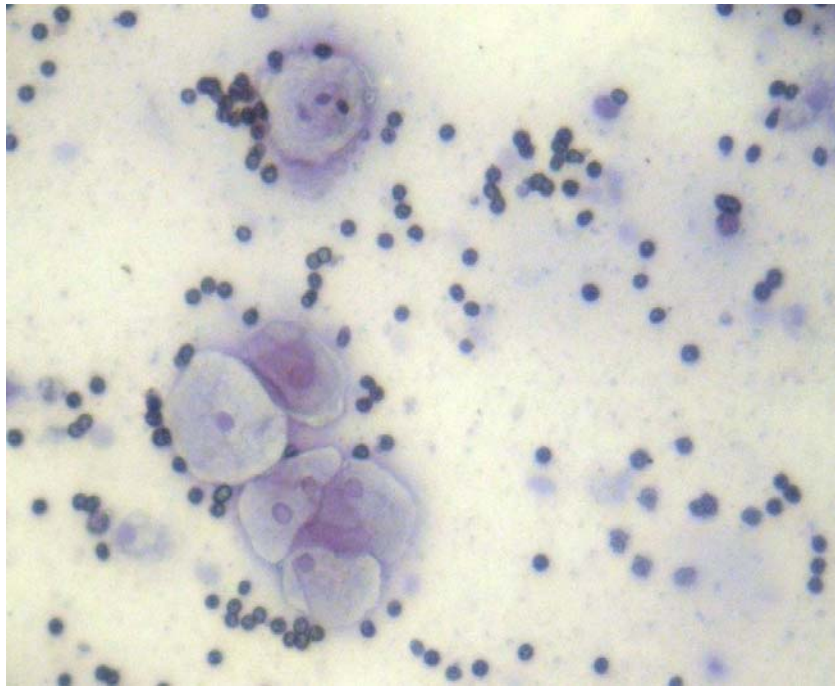


Рис. 13 Мазок вмісту цервікального каналу. Практично здорова жінка. У полі зору клітини без ознак атипії. Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

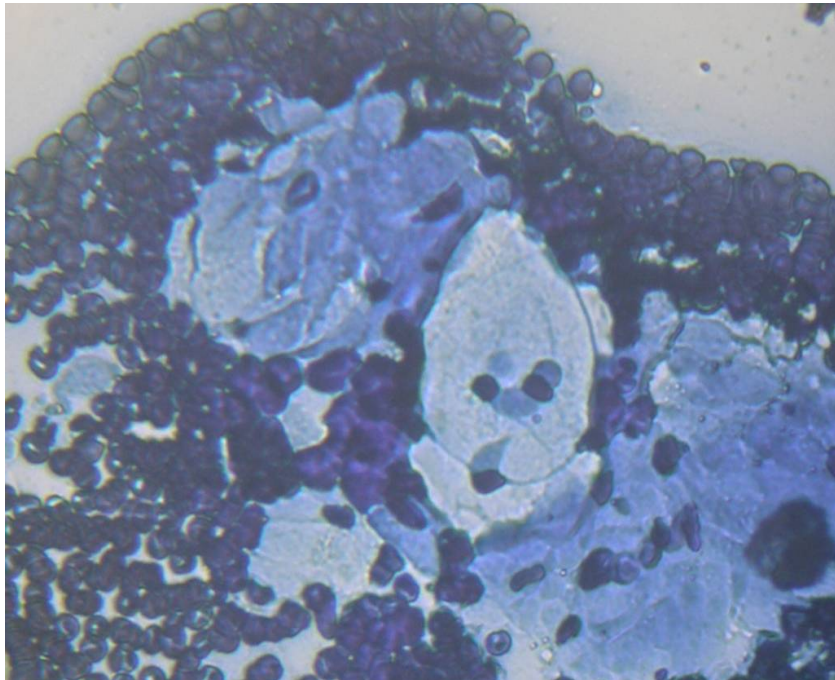


Рис. 14 Мазок вмісту цервікального каналу. Аденокарцинома G2. У полі зору клітина з ознаками атипії (позначена стрілкою). Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.



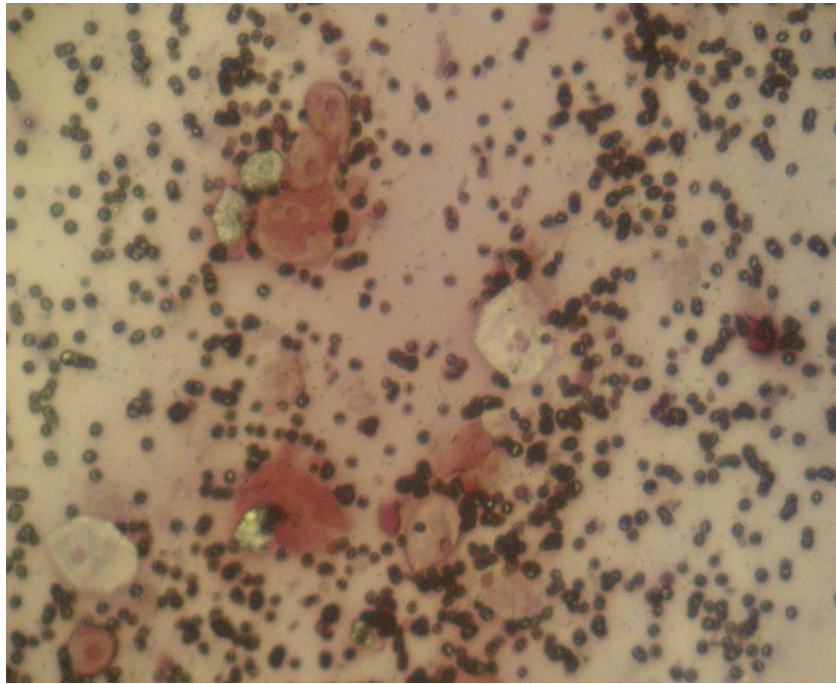


Рис. 15 Мазок вмісту цервікального каналу. Плоскоклітинний рак незроговілий. У полі зору клітини з ознаками атипії (позначені стрілками). Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

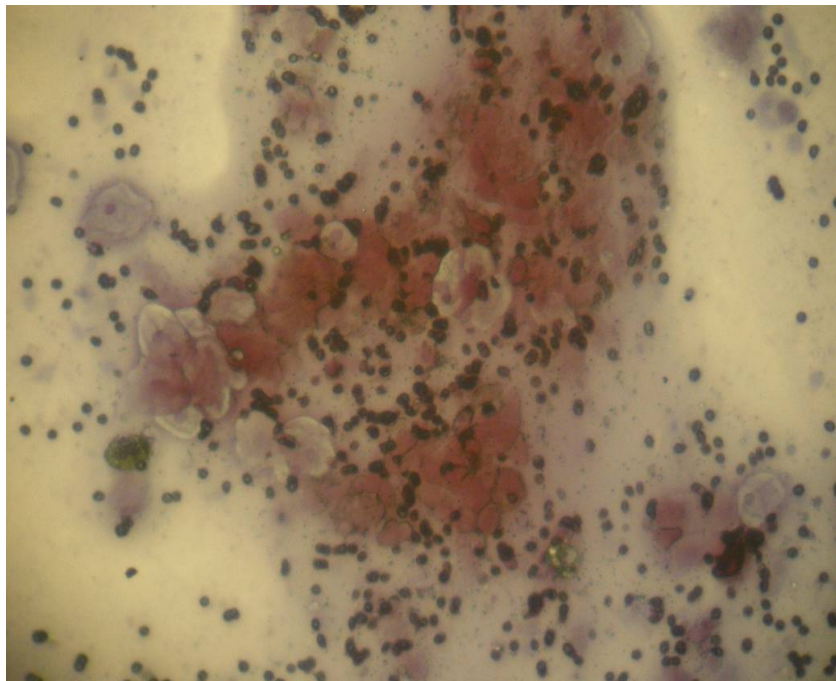


Рис.16 Мазок вмісту цервікального каналу. Плоскоклітинний рак зроговілий. У полі зору клітини з ознаками атипії (позначені стрілками). Забарвлення бромфеноловим синім на «кислі» та «основні» білки за Мікель-Кальво. Об. 20<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

## Література.

1. Болгова Л.С., Туганова Т.Н., Воробьева Л.И. и др. (2007) Цитологический скрининг рака шейки матки. Пособие для врачей, 147 с.
2. Бохман Я.В. (2002) Руководство по онкогинекологии. С-Пб.: Фолиант.
3. Воробьева Л.И., Лигирда Н.Ф., Федоренко З.П. и др. (2002) Рак шейки матки: международный опыт скрининга и возможности его реализации в Украине. Мат. Наук.-практ. конф. «Сучасні принципи діагностики та лікування візуальних форм генітального раку у жінок», 11-13.
4. Давиденко І.С. (2001) Модифікація гістохімічної методики фарбування фібрину та колагенових волокон у плаценті. Буковинський медичний вісник, 5(1): 147-150.
5. Давиденко І.С., Шендерюк О.П. (2006) Спосіб вимірювання окиснювальної модифікації білків в структурах плаценти. Деклараційний патент України на винахід №13712U.- Бюл. №4.- 2с.
6. Запорожан В.М., Пішак В.П., Пересунько О.П. та ін. (2003) Стан системи «епітелій-сполучна тканина» при передракових змінах і раку шийки матки: клініко-морфологічні і лазерно-поляриметричні особливості. Журн. АМН України, 9 (3): 511-522
7. Саргсян С.А, Кузнецов В.В., Шабанов М.А. и др. (2006) Аденокарцинома шейки матки. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 17 (3): 37-39.
8. Хмельницкий О.К. (2000) Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний шейки и тела матки. СПб.: Сотис, 233 с.
9. Юшина В. Й. (1976) Функциональные группы белка стромы шейки матки в процессе развития эпителиальных дисплазий и малигнизации эпителия. Актуальные вопросы акушерства и гинекологии. Воронеж, мед. ин-т., 85-86.
10. Яковлева И. А., Черный А. П., Ботнарь З. Р. (1981) Эпителий шейки матки в процессе малигнизации. Кишинев: Штиинца, 128 с.



11. American Cancer Society Guidline for early detection of cervical neoplasia and cancer (2002) CA Cancer Clin 52: 342-362.
12. De Wever O., Mareel M. (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. J. Pathol., 200 (4): 429-447.
13. Fettisof F., Serre B., Arbeille B. et al. (1999) Argerophilik cellsand ectocervical epithelium. Int. Gynecol. Pathol., 10:177-190.
14. Mikhail M.S., Palan P.R., Basu J. et al. (2004) Computerized measurement of intercapillary distance using image analysis in women with cervical intraepithelial neoplasia: correlation with severity. Acta. Obstet. Gynecol. Scand., 83 (3): 308-310.

**Компьютерная микроспектрофотометрия системы «эпителий-соединительная ткань» в диагностике рака шейки матки.**

**Л.И Воробьева, А.П. Пересунько, Н.В. Зелинская, О.И. Давыденко**

**Национальный институт рака, Киев**

**Буковинский государственный медицинский университет, Черновцы**

**Резюме.** В данном исследовании впервые использованы компьютерные методы оценки карбонильных и аминокрупп белков в цитоплазме опухолевых клеток, слизистых массах и в соединительнотканых волокнах при плоскоклеточном (неороговевающем и ороговевающим) раке и аденокарциноме шейки матки с учетом базовых показателей состояния системы «эпителий-соединительная ткань». Полученные вероятные результаты позволяют проводить точную цито- и гистохимическую дифференциальную диагностику плоскоклеточного и железистого рака различных степеней дифференцирования (G1, G2, G3), что свидетельствует о целесообразности использования компьютерной микроспектрофотометрии в аспекте чувствительного дополнительного диагностического теста.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, система «эпителий-соединительная ткань», дифференциальная диагностика, окислительная модификация белков.

**Computer microspectrophotometry of the system “epithelium – connective tissue” in the diagnostic of the cancer cervix uteri**

**L.I. Vorobjova, A.P. Peresunko, N.V. Zelinska, O.I. Davydenko**

**National cancer institution, Kyiv**

**Bukovinian state medical university, Chernivtsi**

**ABSTRACT.** The computer methods of evaluation of carbonyl and amino groups of proteins in the cytoplasm of tumor cells, mucous masses and connective tissue fibers in patients with keratinized and non-keratinized squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of cervix have been used in this study for the first time, considering the basal indices of the state of system “epithelium – connective tissue”. The acquired reliable results allow conducting of exact cyto- and histochemical differential diagnostics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of different degrees of differentiation (G1, G2, G3), which indicates the significance of computer microspectrophotometry as a sensitive additional diagnostic test.

**KEY WORDS:** cancer cervix uteri, system “epithelium – connective tissue”, differential diagnostics, oxidative protein modification.