

УДК 618.146-022:578.827]-018.73-078.33

ДЕТЕКЦИЯ ГЛИКОГЕНА В ПЛОСКИХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ МУКОПОЛИСАХАРИДОВ В ОДНОСЛОЙНОМ СТОЛБЧАТОМ ЭПИТЕЛИИ ШЕЙКИ МАТКИ В ЗОНЕ ТРАНСФОРМАЦИИ У ПАЦИЕНТОК С ВПЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

В. В. Ветелина

Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера, г. Пермь, Россия

DETECTION OF GLYCOGEN IN FLAT EPITHELIAL CELLS AND NEUTRAL MUCOPOLYSACCHARIDES IN MONOLAYER COLUMNAR UTERINE CERVIX EPITHELIUM IN TRANSFORMATION ZONE AMONG PATIENTS WITH HPV-INFECTION

V. V. Vetelina

Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner, Perm, Russian Federation

Цель. Изучить закономерности выявления гликогена в эпителии экзоцервикса и нейтральных мукополисахаридов в столбчатом эпителии в зоне трансформации у пациенток с ВПЧ-инфекцией.

Материалы и методы. Объектом исследований явились 105 женщин в возрасте от 25 до 39 лет с установленной при помощи ПЦР-метода ВПЧ-инфекцией. Больным проводилось стандартное гинекологическое обследование и расширенная кольпоскопия с прицельной (кольпоскопически ориентированной) биопсией шейки матки. Биопсийный материал подвергали гистологическому исследованию с использованием общепринятых гистологических методик. Полисахаридный состав мукополисахаридов изучали на основе комплекса гистохимических методов, включающего ряд аналитических и ферментативных обработок (PAS-реакция с постановкой контрольных реакций с диастазой); при проведении полуколичественной оценки результатов рассчитывали средний цитохимический коэффициент. Подсчет клеток в гистологических препаратах осуществляли при увеличении микроскопа $\times 400$ на тестовой площади $0,042 \text{ мм}^2$ не менее чем в 5 полях зрения в каждом препарате. Статистический анализ выполнен при помощи программного пакета Biostat. При проведении статистической обработки результатов использовали метод Крускала–Уоллиса.

Результаты. Анализ содержания углеводов (гликогена и нейтральных мукополисахаридов) в клетках многослойного плоского и однослойного столбчатого железистого эпителия в шейке матки пациенток с ВПЧ-инфекцией продемонстрировал уменьшение количества гликогена в плоских эпителиальных клетках по мере прогрессирования CIN вплоть до полного его исчезновения у пациенток с CIN III, а также уменьшение содержания в клетках столбчатого (железистого) эпителия нейтральных мукополисахаридов по мере прогрессирования CGIN. Полученные данные согласуются с современными представлениями о диспластических процессах в плоском и железистом эпителии шейки матки и отражают диспластические изменения в многослойном плоском и однослойном столбчатом эпителии, сопровождающие инфицирование вирусом папилломы человека.

Выводы. При проведении гистохимического исследования биопсийного материала, полученного от пациенток с патологией шейки матки при ВПЧ-инфекции, установлены закономерности изменения

© Ветелина В. В., 2013

e-mail: sei-p@mail.ru

тел. 8 (342) 217 10 31

[Ветелина В. В. – аспирант заочной формы обучения кафедры патологической физиологии].

содержания гликогена в многослойном плоском эпителии эктоцервикса по мере прогрессирования CIN и содержания нейтральных мукополисахаридов по мере прогрессирования CGIN.

Ключевые слова. Предраковые заболевания шейки матки, ВПЧ-инфекция, гистохимические реакции, гликоген, нейтральные мукополисахариды, CIN, CGIN.

Aim. To study the patterns of detecting glycogen in ectocervix epithelium and neutral polysaccharides – in columnar epithelium in the zone of transformation among patients with human papilloma virus infection (HPV-infection).

Materials and methods. The object of the study – 105 women aged 25 to 39 years who were diagnosed HPV-infection using PCR-method. Patients underwent standard gynecological examination and extended colposcopy with target (colposcopically oriented) biopsy of the uterine cervix. Bioptic material was subjected to histological investigation with generally accepted histological methods. Polysaccharide content of mucopolysaccharides was investigated on the basis of histochemical methods including analytical and enzymatic treatment (PAS-reaction with control diastase reactions; semiquantitative estimation of results by mean cytochemical coefficient). Histological specimens cells were calculated with 400-enlargement (x 400) of microscope on the test area of 0,042 mm², not less than in 5 vision fields for each specimen. Statistical analysis was performed using the program package Biostat. Statistical processing of the results was conducted with Kruscal-Wallis method.

Results. Analysis of carbohydrate content (glycogen and neutral mucopolysaccharides) in the cells of multilayer flat and monolayer columnar glandular epithelium of uterine cervix in HPV-infected patients demonstrated decrease in flat epithelial cells glycogen content as CIN was progressing just till its full disappearance in patients with CIN III, as well as decrease in columnar (glandular) epithelial cells neutral mucopolysaccharide content as CGIN was progressing. The obtained data agree with a modern notion of dysplastic processes in flat and glandular uterine cervix epithelium and reflect dysplastic changes in multilayer flat and monolayer columnar epithelium which accompany human papilloma virus infection.

Conclusion. Histological investigation of bioptic material obtained from patients with uterine cervix pathology associated with HPV-infection established the regularities of changes in multilayer flat ectocervix epithelium glycogen content as CIN was progressing and neutral mucopolysaccharide content as CGIN was progressing.

Key words. Precancerous uterine cervix diseases, HPV-infection, histochemical reaction, glycogen, neutral mucopolysaccharides, CIN, CGIN.

ВВЕДЕНИЕ

Рак шейки матки относится к весьма распространенным онкологическим заболеваниям органов репродуктивной системы у женщин, отличающимся высокой летальностью [9]; занимает второе место по частоте среди злокачественных новообразований органов репродуктивной системы у женщин, уступая лишь раку молочной железы [9]. В Российской Федерации в 2009 г. рак шейки матки был зарегистрирован у 14 351 женщины, что составляет 13,9 на 100 000 женского населения. Кроме того, отмечается постоянный прирост этого показателя [9]. В Пермском крае в период с 2007 по 2010 г.

наблюдается рост заболеваемости раком шейки матки с 15,6 случая на 100 000 женского населения в 2007 г. до 16,2 в 2010 г. [3].

Диагностика предраковых состояний шейки матки имеет важное значение для предотвращения злокачественных новообразований [6]. Ситуация осложняется тем, что пациентки с одной и той же степенью цервикальной интраэпителиальной неоплазии (CIN) представляют собой весьма гетерогенные группы, внутри которых возможны разные исходы – с «понижением» степени CIN или, напротив, с «повышением», а также с развитием спонтанной регрессии CIN, что во многом обусловлено гистологическими особенностями [15]. Поэтому детальное изучение гистопатологических про-

цессов в шейке матки при CIN и инфицировании вирусом папилломы человека (ВПЧ-инфекция), связь которой с CIN общеизвестна, представляет в настоящее время несомненную актуальность.

Цель исследования – изучить закономерности выявления гликогена в эпителии эктоцервикса и нейтральных мукополисахаридов в однослойном столбчатом эпителии в зоне трансформации у пациенток с ВПЧ-инфекцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом наших исследований явились 105 женщин в возрасте от 25 до 39 лет – пациентки амбулаторно-поликлинического приема, которые проходили обследование в Пермском краевом онкологическом диспансере (главный врач – В. П. Плотников), а также в ООО «Центр эстетической гинекологии». Критериями включения пациенток в исследование являлось: наличие аномальных кольпоскопических картин, а именно: пунктуации и мозаики; неравномерная реакция на нанесение раствора уксусной кислоты и различный ее уровень; визуализация ацетобелого эпителия; визуализация атипических сосудов; обнаружение нетипичной ткани шейки матки, особенно легкоранимой; неровная поверхность ткани шейки матки (плюс ткань); наличие папиллярных разрастаний или изъязвлений; наличие лейкоплакии шейки матки, наличие установленной методом ПЦР ВПЧ-инфекции. Критерии исключения пациенток из исследования: наличие на момент обследования острых воспалительных заболеваний репродуктивных органов, беременность; хламидийная, цитомегаловирусная и герпесвирусная инфекции урогенительного тракта; экстрагенитальные заболевания в стадии декомпенсации; прием антибактериальных, противовирусных и иммуномодулирующих препаратов на протяжении последних 3 месяцев.

При постановке диагноза руководствовались Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 808н от 2 октября 2009 г. «Об утверждении порядка оказания акушерско-гинекологической помощи». Диагностика цервикальных интраэпителиальных неоплазий осуществлялась в соответствии МКБ-X (1995).

С целью верификации диагноза и определения распространенности патологических изменений всем больным проводились стандартное гинекологическое обследование и расширенная кольпоскопия с прицельной (кольпоскопически ориентированной) биопсией шейки матки аппаратом «ФОТЕК E80M» (г. Екатеринбург). Биопсийный материал маркировали, фиксировали в 10%-ном забуференном по Лилли (pH – 7,2) формалине и подвергали гистологическому исследованию с использованием общепринятых гистологических методик. Для окрашивания микропрепаратов применяли растворы красителей, приготовленные общепринятыми методами [8]. При проведении гистохимических исследований руководствовались рекомендациями Пирс (1968), согласно которым полисахаридный состав мукополисахаридов изучают на основе комплекса гистохимических методов, включающего ряд аналитических и ферментативных обработок [14]. Для визуализации в эпителиальных клетках гликогена и нейтральных мукополисахаридов использовали PAS-реакцию, которую дополняли постановкой контрольных реакций с диастазой (Diastase pig pancreas for enzymatic digestion 04-140805, Bio-Optica, Milano S.p.a., Italia) [7].

Анализируя содержание нейтральных мукополисахаридов в клетках столбчатого (железистого) эпителия, при проведении полуколичественной оценки результатов рассчитывали средний цитохимический коэффициент с использованием принципа Астальди и Берга (1967), основанного на выявлении различной степени интенсивности специфической окра-

ски клеток [10]. Согласно этому принципу клетки столбчатого эпителия в зависимости от интенсивности их окрашивания относили к 4 группам: с отрицательной реакцией (-), слабоположительной (+), положительной (++) и резко положительной (+++). Для количественного выражения результатов подсчитывали 100 клеток, дифференцируя их по указанному принципу, затем число клеток с одинаковой интенсивностью окраски (выраженное в процентах) умножали на соответствующее данной группе число плюсов. Сумма этих произведений, деленная на 100, и являлась средним цитохимическим коэффициентом для одной клетки [5]. Подсчет клеток в гистологических препаратах осуществляли при увеличении микроскопа $\times 400$ на тестовой площади $0,042 \text{ мм}^2$ не менее чем в 5 полях зрения в каждом препарате. Статистический анализ выполнен при помощи программного пакета Biostat. При проведении статистической обработки результатов, характеризуя выборки, вычисляли выборочные средние, ошибку среднего и стандартное отклонение; для оценки различий между несколькими случайными выборками использовали метод Крускала–Уоллиса [1]. За критический уровень значимости выявленных различий принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении кольпоскопии у обследуемых пациенток выявлены макроскопические признаки патологии шейки матки. Анализируя гистологические препараты, мы систематизировали изучаемую выборку по степени CIN. В исследуемой когорте 39 пациенток имели CIN I, 24 – CIN II, 12 – CIN III. Группу сравнения составили 30 пациенток без CIN, но с доказанной при помощи ПЦР-исследования ВПЧ-инфекцией.

У пациенток группы сравнения гликоген в клетках многослойного плоского эпителия выявлялся в промежуточном и поверхностном слоях. В группе лиц с CIN I

и CIN II его содержание снижалось, что выражалось как в уменьшении количества клеточных слоев, содержащих гликоген, так и в обеднении клеток гликогеном (рис. 1). У пациенток с CIN III мы наблюдали практически полное исчезновение гликогена из клеток многослойного плоского эпителия, включая клетки поверхностного слоя (рис. 2).

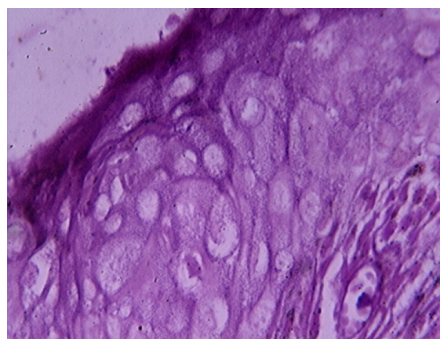


Рис. 1. Многослойный плоский эпителий эктоцервикса у пациентки с CIN II: гликоген определяется только в верхних слоях поверхностного слоя. PAS-реакция, $\times 600$

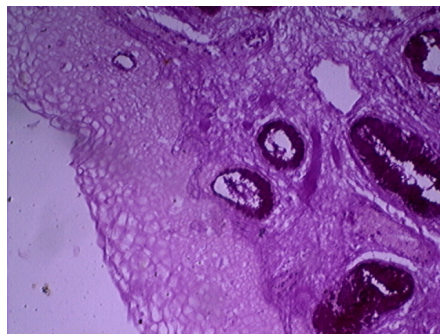


Рис. 2. Исчезновение гликогена из клеток многослойного плоского эпителия эктоцервикса у пациентки с CIN III; клетки желез в собственной пластинке слизистой оболочки содержат большое количество нейтральных мукополисахаридов. PAS-реакция, $\times 150$

Известно, что ВПЧ-инфекция вызывает, помимо CIN, также цервикальную glandулярную интраэпителиальную неоплазию (CGIN), т.е. предшествующие аденокарциноме изменения железистого (однослойного столбчатого) эпителия шейки матки, неред-

ко сопровождающие CIN [2]. Клетки как поверхностного железистого эпителия, так и эпителия желез шейки матки в норме содержат большое количество нейтральных муцинов [12]. При проведении гистологического анализа мы выявляли у наблюдаемых пациенток дисплазию железистого эпителия разной степени. Так, в группе сравнения (ВПЧ без CIN) CGIN I была обнаружена у 46,67% больных (от количества пациенток с определяемой в гистологических препаратах зонной трансформации), в группе больных с CIN I CGIN I определена у 52,94% человек (от общего числа случаев выявления зоны трансформации в группе), в группе с CIN II CGIN I определялась у 33,33%, CGIN II – у 16,67% (от количества пациенток с определяемой в препаратах зоной трансформации), в группе с CIN III CGIN I определялась у 50,0%, CGIN II – у 20,0% и CGIN III – у 10,0% больных (от числа пациенток с визуализируемой зоной трансформации в гистологических препаратах) (см. рис. 1).

Неизменный железистый эпителий в группе сравнения и у некоторых пациенток с CIN I и CIN II (не имеющих CGIN) содержал большое количество нейтральных мукополисахаридов (см. рис. 2). При увеличении степени тяжести CGIN его количество в клетках железистого эпителия уменьшалось (рис. 3).

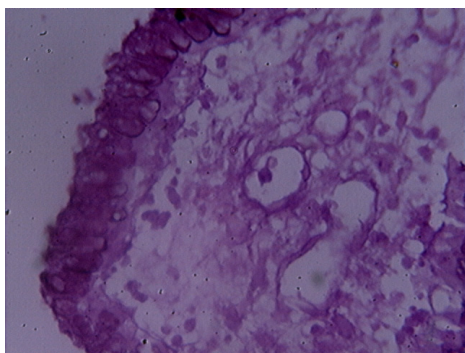


Рис. 3. Обеднение клеток столбчатого эпителия в зоне трансформации нейтральными мукополисахаридами у пациентки с CIN II, CGIN II. PAS-реакция, контроль с диастазой, $\times 600$

В гистохимических исследованиях с помощью PAS-реакции с диастазой установлен следующий средний цитохимический коэффициент в столбчатом эпителии зоны трансформации: у пациенток группы сравнения ($n=30$) – $2,768 \pm 0,094$; у пациенток с CIN I ($n=39$) – $2,352 \pm 0,182$; с CIN II ($n=24$) – $1,28 \pm 0,57$; с CIN III ($n=12$) – $0,45 \pm 0,013$ ($p < 0,05$) по отношению к группе сравнения; метод статистического анализа – критерий Крускала–Уоллиса. Анализ содержания углеводов (гликогена и нейтральных мукополисахаридов) в клетках многослойного плоского и однослойного столбчатого железистого эпителия в шейке матки пациенток с ВПЧ-инфекцией продемонстрировал уменьшение количества гликогена в плоских эпителиальных клетках по мере прогрессирования CIN вплоть до полного его исчезновения у пациенток с CIN III, а также уменьшение содержания в клетках железистого эпителия нейтральных мукополисахаридов по мере прогрессирования CGIN. Полученные данные согласуются с современными представлениями о диспластических процессах в плоском и железистом эпителии шейки матки и свидетельствуют о наличии диспластических изменений в многослойном плоском и однослойном столбчатом эпителии, сопровождающих инфицирование вирусом папилломы человека.

Проведенные исследования показали уменьшение содержания гликогена в плоских эпителиальных клетках по мере прогрессирования CIN (вплоть до полного его исчезновения у пациенток с CIN III), а также уменьшение содержания в клетках железистого эпителия нейтральных мукополисахаридов по мере прогрессирования CGIN.

Полученные результаты не противоречат литературным данным. Известно, что процесс метаплазии многослойного плоского эпителия представляет собой механизм реэпителизации, который восстанавливает

на уровне шейки, занятой эктропионом, физиологически желаемую ситуацию; при этом происходят пролиферация многослойного плоского эпителия, «соскальзывание» его клеток под слой столбчатого эпителия, последующее их созревание и дифференцировка [4]. Тем не менее этот процесс не всегда идет гладко – метапластический эпителий может задерживаться в своем созревании, количество слоев, состоящих из парабазальных клеток, увеличивается, происходит неполноценная дифференциация многослойного плоского эпителия; при этом новообразованные клетки незрелые, не содержат гликоген [4]. С другой стороны, цитоплазма предраковых и злокачественных эпителиальных клеток в эндометрии и шейке матки содержит сульфатированные и несulfатированные кислые мукополисахариды, в отличие от нормальных плоских и железистых эпителиальных клеток, цитоплазма которых содержит гликоген и нейтральные мукополисахариды соответственно [13, 11].

Выводы

У пациенток с ВПЧ-инфекцией отмечается уменьшение содержания гликогена в плоских эпителиальных клетках по мере прогрессирования CIN (вплоть до полного его исчезновения у пациенток с CIN III).

По мере прогрессирования CGIN уменьшается содержание в клетках железистого эпителия нейтральных мукополисахаридов.

Библиографический список

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика 1999; 459.
2. Данилова Н.В., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. Опухоли шейки матки: морфологическая диагностика и генетика: руководство для врачей / под ред. Ю.Ю. Андреевой, Г.А. Франка. М.: Практическая медицина 2012; 115.
3. Коломойцева Т.Н., Орлов О.А., Казаков Ю.В. Диагностика, тактика ведения женщин с доброкачественными поражениями шейки матки: метод. рекомендации. Пермь 2012; 27.
4. Маршетта Ж., Декамп Ф. Кольпоскопия. Метод и диагностика / под общ. ред. В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс-информ 2009; 200.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина 1987; 368.
6. Прилепская В.Н., Кондриков Н.И., Бебнева Т.Н. Значение вируса папилломы человека в развитии диспластических процессов шейки матки. Consilium Medicum: Гинекология 2000; 2 (3): 56–62.
7. Рядинская Н.И., Сурашиев Р.З. Гистологическая и гистохимическая характеристика поджелудочной железы оленевых Алтая. Цитология 2008; 50 (8): 719–723.
8. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина 1996; 544.
9. Сухих Г.Т., Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки: руководство для врачей / под ред. Г.Т. Сухих и В.Н. Прилепской. 3-е изд., перераб. и доп. М.: МЕДпресс-информ 2012; 190.
10. Шубич М.Г., Могильная Г.М. Значение ШИК-метода в гистохимическом анализе углеводных и углеводсодержащих биополимеров. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии 1982; 5: 90–93.
11. Kondo T., Hasbi A., Murata Sh., Nakazawa T., Yuminatocchi T. Endocervical adenocarcinomas associated with lobular endocervical glandular hyperplasia: a report of four cases with histochemical and immunohistochemical analyses. Modern Pathology 2005; 18: 1199–1210.
12. Lapertosa G., Baracchini P., Fulcheri E., Tanzi R. Patterns of mucous secretion in normal and pathological conditions of the

- endocervix. *European Journal of Gynaecological Oncology* 1986; 7 (2): 113–119.
13. *Lurie M, Elmalach I, Weill S.* The pattern of epithelial mucin secretion in normal, hyperplastic, and adenocarcinomatous endometrium. *Gynecol. Oncol.* 1988; 30(2): 274–84.
14. *Pearse A.* *Histochemistry. Theoretical and applied.* London 1968; 962.
15. *Stoler M, Schiffman M.* Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* 2001; 285: 1500–1505.

Материал поступил в редакцию 10.12.2012