

Проточно-цитометрические исследования дисплазий шейки матки

Азербайджанский медицинский университет, Баку

Резюме. Представлены основные принципы и возможности использования проточной цитометрии в дифференциальной диагностике различных степеней дисплазии шейки матки. Предлагается использовать величину митотической активности клетки в качестве диагностической пробы малигнизации многослойного плоского эпителия. Обобщены и проанализированы данные 640 больных с патологией шейки матки, проходивших обследование в Бакинском онкологическом диспансере с 2007 по 2012 г. Из них у 143 (22,34%) больных была определена дисплазия шейки матки различной степени. Распределение содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты по плоидности и пролиферативной активности исследовалось у 110 больных путем проточной цитометрии. Проточно-цитометрическое исследование эпителиальных элементов шейки матки позволило выявить, что при дисплазиях I степени в клеточной популяции преобладают клетки с диплоидным содержанием дезоксирибонуклеиновой кислоты, отсутствуют полиплоидные и анеуплоидные клетки. При дисплазиях II степени в клеточной популяции преобладают клетки с три- и тетраплоидным содержанием дезоксирибонуклеиновой кислоты, присутствуют единичные полиплоидные клетки. Анеуплоидных клеток не обнаружено. При дисплазиях III степени в клеточной популяции преобладают клетки с тетраплоидным, пяти и шестиплоидным содержанием дезоксирибонуклеиновой кислоты, присутствуют многочисленные полиплоидные клетки, а также анеуплоидные элементы. Полагаем, что проточно-цитометрическое исследование с помощью гистограмм, при строгом цитологическом контроле, позволяет определять степень полиплоидии и анеуплоидии при дисплазиях шейки матки различной степени. Это делает данное направление перспективным в цитологии и открывает новые возможности для применения методики количественной микроскопии в научных исследованиях и клинической практике.

Ключевые слова: дисплазия шейки матки, митотическая активность, проточно-цитометрическое исследование, дезоксирибонуклеиновая кислота, полиплоидные клетки, анеуплоидные элементы.

Введение. Возможность применения методик количественной цитометрии в биологических и медицинских исследованиях очень широка [3, 4]. Эти методики включают множество задач, начиная от поиска наиболее информативных морфометрических и цитоспектрофотометрических критериев кинетики дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в клеточном цикле и кончая многопараметрическим изучением гетерогенных популяций исследуемых объектов [1, 7, 8]. Проточная цитометрия является современной методикой определения поверхностных и внутриклеточных маркеров [6].

Принципы проточной цитометрии весьма просты. Клетки или ядра поодиночке пересекает сфокусированный световой пучок, обычно лазерный. Свет определенной длины возбуждает молекулы флюоресцирующих красителей, связанных с различными клеточными компонентами, при этом может происходить одновременное возбуждение нескольких разных красителей, что позволяет оценить сразу несколько клеточных параметров. Свет, испускаемый красителями, собирают с помощью системы линз и зеркал и разлагают на компоненты. Световые сигналы детектируют, преобразуют в электрические импульсы и далее в форму, удобную для компьютерной обработки и хранения информации.

Используя проточную цитометрию можно получать самые разные данные: определять содержание в клетке ДНК и рибонуклеиновую кислоту (РНК), суммарное количество белков и количество специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами, исследовать клеточный метаболизм (например, измерять внутриклеточный pH), изучать транспорт ионов кальция и кинетику ферментативных реакций. Измерение содержания ДНК – одно из самых простых и распространенных применений проточной цитометрии. Из ДНК-гистограмм можно получить два рода данных. Во-первых, идентифицировать клетки с аномальным содержанием ДНК, так называемые анеуплоидные клетки. Во-вторых, определить долю клеток, находящихся в S-фазе (SPF), и оценить степень пролиферации.

Цель исследования. Обосновать основные принципы и возможности проточной цитометрии в дифференциальной диагностике различных степеней дисплазии шейки матки.

Материалы и методы. Обобщены и проанализированы данные 640 больных с патологией шейки матки, лечившихся в Бакинском онкологическом диспансере с 2007 по 2012 год. Распределение больных по годам выглядело следующим образом: 2007-й –

106 (16,6%), 2008-й – 100 (15,6%), 2009 – 98 (15,3%), 2010-й – 108 (16,8%), 2011-й – 116 (18,1%), 2012-й – 112 (17,5%) от общего числа госпитализированного контингента.

Дисплазия различной степени была определена у 143 (22,34%) обследованных, возраст которых варьировал от 21 до 70 лет. По степени дисплазии и конкретным возрастным диапазонам они были распределены в 3 группы.

Первая группа – дисплазия I степени – 60 больных. Возраст: 21–25 лет – 8 (13,3 %); 26–30 лет – 7 (11,6%); 31–35 лет – 11 (18,3%); 36–40 лет – 13 (21,6 %); 41–45 лет – 10 (16,6%); 46–50 лет – 2 (3,3%); 51–55 лет – 3 (5%); 56–60 лет – 3 (5 %); 61–65 лет – 2 (3,3 %); 66–70 лет – 1 (1,6%) от общего числа госпитализированных.

Вторая группа – дисплазия II степени – 50 больных. Возраст: 26–30 лет – 2 (4%); 31–35 лет – 6 (12%); 36–40 лет – 16 (32%); 41–45 лет – 9 (18%); 46–50 лет – 9 (18%); 51–55 лет – 5 (10%); 56–60 лет – 1 (2%); 61–65 лет – 2 (4%) от общего числа госпитализированных.

Третья группа – дисплазия III степени – 33 больных. Возраст: 26–30 лет – 4 (12,1%); 31–35 лет – 2 (6%); 36–40 лет – 7 (21,2%); 41–45 лет – 10 (30,3%); 46–50 лет – 8 (24,2%); 51–55 лет – 1 (3%); 56–60 лет – 1 (3%) от общего числа госпитализированных.

Обследованию каждой больной предшествовали тщательный опрос всех жалоб, сбор жизненного и гинекологического анамнезов. Во всех случаях производился влагалищный осмотр, брались вагинальные мазки и производилась диагностическая биопсия шейки матки. Наряду с общеклиническим обследованием основных органов и систем, осуществлялся общий и биохимический анализ крови и мочи. По необходимости выполнялись рентгенологические (71 больная), ультразвуковые (80 больных) и кольпоскопические исследования (100%), трем больным с тяжелой дисплазией был выполнен компьютерно-томографический анализ и двум – магнитно-резонансная томография.

С учетом специфики исследования, был применен комплекс светооптических и гистохимических методов: окраска по Романовскому – Гимзе; по Граму; гематоксилином-эозином. Также проводилась инкубация мазков в 0,05% забуференном растворе тионина; инкубация мазков в 1% растворе ализана синего при pH – 5,5. Микротомные срезы толщиной 5–7 мкм окрашивались гематоксилином-эозином, пикрофуксиновой смесью по ван-Гизону, а в отдельных случаях – 0,05% забуференным раствором тионина и гематоксилином-флюорэсцином (уранином).

Распределение содержания ДНК по пloidности и пролиферативной активности исследовалось у 110 больных путем проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре «FACSCAN» фирмы «Becton Dickinson» (Соединенные Штаты Америки).

Полученные данные подвергнуты статистической обработке непараметрическими методами по Вилкоксоу – Манну – Уитни. Для качественного анализа использовался χ^2 -критерий Пирсона.

Результаты и их обсуждение. По нашему мнению, одним из наиболее точных критериев темпа роста и степени злокачественности опухоли является величина митотической активности. Исходя из этого предлагаем использовать величину митотической активности в качестве диагностической пробы малигнизации многослойного плоского эпителия. Нами проведены исследования митотической активности в клетках покровного эпителия влагалищной части шейки матки в норме и при различной степени дисплазии шейки матки.

Установлено, что митотическая активность в клетках покровного эпителия влагалищной части шейки матки здоровых женщин сравнительно невысокая – индекс равнялся $0,05 \pm 0,01\%$. По мере нарастания тяжести морфологических изменений в клетках эпителиального пласта митотическая активность увеличивается. Так, при легкой эпителиальной дисплазии она составляет $0,22 \pm 0,03\%$, при тяжелой дисплазии – $0,4 \pm 0,02\%$.

При проточно-цитометрическом исследовании содержания ДНК в клетках шейки матки при дисплазиях I степени (38 больных) выявлено диплоидное распределение ДНК. На ДНК-гистограмме отмечался один пик (G0/1) в области флуоресценции лимфоцитов (91,9%). Число пролиферирующих клеток было невелико и составило в S-фазе 3,7%, G2+M-фазе – 5,6%. Индекс пролиферации соответствовал 8,4, а индекс ДНК (идНК) был равен 1. Анеуплоидных и полиплоидных клеток не обнаружено (табл. 1).

Таблица 1
Проточно-цитометрические параметры при дисплазиях I степени (M и пределы колебания)

C ₀ /1	S-фаза	G2+M	>4с	ИП	идНК	Ан
90,5 (85-92)	3,7 (3,8-4,4)	5,6 (4,9-6,9)	0,2 (0,1-0,6)	8,4 (8,1-9,8)	1 (0,9-1,01)	–

При дисплазиях II степени (42 больные) в эпителиальных элементах шейки матки преобладают клетки с триплоидным и тетраплоидным содержанием ДНК. Число пролиферирующих клеток составило в S-фазе 4,6%, G2+M-фазе – 5,5%. Индекс пролиферации соответствовал 9,6, ДНК был равен 1,2. Присутствуют единичные полиплоидные клетки, анеуплоидных клеток также не обнаружено (табл. 2).

Таблица 2
Проточно-цитометрические параметры при дисплазиях II степени (M и пределы колебаний)

C ₀ /1	S-фаза	G ₂ +M	>4с	ИП	идНК	Ан
88,6 (85-91)	4,6 (3,8-5,1)	5,5 (4,8-6)	1,3 (0,9-1,6)	9,6 (8,7-11,1)	1,2 (0,7-1,3)	–

При дисплазиях III степени во всех образцах эпителиальных элементов шейки матки выявлено тетраплоидное, пяти и шестиплоидное распределение ДНК. Число пролиферирующих клеток составило в S-фазе 6,9%, G2+M-фаза – 9%. Индекс пролиферации соответствовал 15,2, ДНК был равен 1,4. Присутствуют многочисленные полиплоидные клетки, анеуплоидные клетки составили около 1% (табл.3).

Таблица 3

Проточно-цитометрические параметры при дисплазиях III степени (M и пределы колебания)

C _p /1	S-фаза	G ₂ +M	> 4с	ИП	иДНК	Ан
82,7 (80–83)	6,9 (6,1–7,5)	9 (8,8–10,4)	1,4 (0,9–1,7)	15,2 (14,2–17,1)	1,4 (0,9–1,6)	1

Заключение. С помощью проточно-цитометрического исследования и гистограмм, при строгом цитологическом контроле выделены группы больных с диплоидными и анеуплоидными новообразованиями. Учитывая показатели и ДНК можно определять степень поли- и анеуплоидии при дисплазиях шейки матки различной степени. Подтип гистограммы дает возможность при каждом ее типе учитывать число анеуплоидных клеток и их пролиферативную активность.

В целом, проточно-цитометрическое исследование можно считать перспективным в цитологии, дающим возможность широкого применения методик количественной микроскопии в научных исследованиях и клинической практике.

Литература

1. Зуева, Е.В. Иммуногистохимическая и проточно-цитометрическая характеристика интраутеральных лимфоцитов при серозной аденокарциноме яичников/Е.В. Зуева [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2009. – №3, 4. – С. 117–121.
2. Лысенко, С.А. Проточно-цитометрическое исследование содержания днк в опухолевых клетках больных раком легкого с паранеопластическим ревматологическим синдромом / С.А. Лысенко, С.И. Киркилевский, И.Л. Черешнюк // Росс. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – № 4. – С. 128–133.
3. Хайдуков, С.В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Мед. иммунол. – 2007. – Т. 9, № 4, 5. – С. 373–378.
4. Baldetorp, B. Analysis of protein expression in pure cell nuclei populations isolated from human breast cancer tissue by DNA flow cytometric sorting / B. Baldetorp [et al.] // J. Proteomics. – 2010. – Vol. 73, № 6. – P. 1111–1116.
5. Böcking, A. Diagnostic and prognostic use of DNA image cytometry in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma / A. Böcking, V. Nguyen // Cancer cytopathology. – 2004. – Vol. 102. – P. 41–54.
6. Bosch, F.X. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer / F.X. Bosch [et al.] // J. of clin. pathol. – 2002. – Vol. 55, № 4. – P. 244–265.
7. Donnenberg, V.S. Flow cytometric determination of stem/progenitor content in epithelial tissues: an example from nonsmall lung cancer and normal lung / V.S. Donnenberg [et al.] // Cytometry A. – 2013. – Vol. 83, № 1. – P. 141–149.
8. Giaretti, W. Chromosomal instability, aneuploidy and routine high-resolution DNA content analysis in oral cancer risk evaluation / W. Giaretti [et al.] // Future oncol. – 2012. – Vol. 8, № 10. – P. 1257–1271.
9. Kim, D.W. Effects of DNA ploidy and S-phase fraction on fluorine-18 FDG uptake of primary breast cancer lesions / D.W. Kim, C.G. Kim // Clin. breast cancer. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 196–201.
10. Oki, E. Clinical aspect and molecular mechanism of DNA aneuploidy in gastric cancers / E. Oki [et al.] // J. Gastroenterol. – 2012. – Vol. 47, № 4. – P. 351–358.

N. Shamseddinskaya, Sh.G. Bagirova, Kh.K. Muradov

Flow-cytometric study of cervical dysplasia

Abstract. The basic principles and the possibility of using flow cytometry in the differential diagnosis of various degrees of cervical dysplasia are presented. It is proposed to use the value of the mitotic activity of cells as a diagnostic test for malignancy stratified pavement epithelium. Were compiled and analyzed the data of 640 patients with cervical pathology undergoing tests at Baku Oncology Center from 2007 to 2012. Of these, 143 (22,34%) of the patients was determined cervical dysplasia varying degrees. Study of the distribution of Deoxyribonucleic acid content on the ploidy and proliferative activity by flow cytometry was performed in 110 patients. Flow-cytometric study of epithelial elements of the cervix uteri found that at the I degree of dysplasia in the cell population is dominated cells with a diploid Deoxyribonucleic acid content, there are no polyploid and aneuploid cells. At the II degree of dysplasia in the cell population predominate cells with tri- and tetraploid Deoxyribonucleic acid content and single polyploid cells present. Aneuploid cells were't found. At the III degree of dysplasia in the cell population dominate cells with the tetraploid, and five- and six ploid Deoxyribonucleic acid content, there are numerous polyploid cells and also aneuploid elements. The obtaining results allow to suggest that the flow-cytometric study by using histograms, with the strict cytological control, makes it possible to characterize the degree of aneuploidy and polyploidy at the cervical dysplasia varying degrees, which makes this a promising direction in cytology and opens up new opportunities for the application of quantitative microscopy methods in scientific researches and clinical practice.

Key words: cervical dysplasia, mitotic activity, flow-cytometric study, Deoxyribonucleic acid, polyploid cells aneuploidnye elements.

Контактный телефон: +9-945-055-168-32; e-mail: rjafarova@bk.ru