



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-076:616.992

Э.Э. ГАЛИХАНОВА, В.К. КОЗЛОВ, А.М. ХРОМОВА

Казанская государственная медицинская академия

Люминесцентная микроскопия в диагностике урогенитального кандидоза у пациенток, страдающих дистрофическими заболеваниями вульвы и влагалища

Галиханова Эльза Эдуардовна

ассистент кафедры дерматовенерологии и косметологии

420111, г. Казань, ул. Б. Красная, д. 11, тел. (843) 238-69-16

В статье представлены результаты гистоморфологического исследования с использованием люминесцентной микроскопии в диагностике кандидозной инфекции у пациенток, страдающих дистрофическими заболеваниями вульвы и влагалища. Показано, что метод является объективным и расширяет возможности диагностики инфекционной патологии.

Ключевые слова: кандидоз, диагностика, люминесцентная микроскопия.

E.E. GALIKHANOVA, V.K. KOZLOV, A.M. KHROMOVA

Kazan State Medical Academy

Luminescence microscopy in diagnostics of urogenital candidiasis of patients with dystrophic diseases of vulvae and vagine

The results of histomorphologic studies using fluorescent microscopy in the diagnosis of Candida infection in patients suffering from degenerative diseases of the vulva and vagina are presented. It is shown that the method is objective and extends the diagnostic capabilities of infectious pathology.

Keywords: candidiasis, diagnosis, fluorescent microscopy.

Во всем мире отмечается рост числа больных с патологией наружных половых органов. Одной из нерешенных проблем в дерматовенерологии остаются дистрофические заболевания, к которым относятся склеротический лишай и гиперпластическая дистрофия вульвы. Это хронические процессы наружных половых органов, на фоне которых могут возникать злокачественные опухоли. Увеличение частоты развития гиперпролиферативных процессов, в том числе рака вульвы, позволяет считать эту проблему еще более актуальной. В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение морфологических особенностей вульвы при дистрофических процессах у женщин с кандидозным вульвовагинитом.

Нами были отобраны 11 пациенток с типичными проявлениями кандидозной инфекции на фоне дистрофических за-

болеваний вульвы (склерозирующий лишай, плоскоклеточная гиперплазия вульвы и смешанная форма дистрофии). Возраст пациенток варьировал от 21 до 65 лет. Диагноз ставился на основании клинической картины и гистологического исследования биопсийного материала, взятого из очагов поражения. Для диагностики кандидозной инфекции использовались микроскопия мазков и культуральное исследование вагинального отделяемого, а также посевы биоптатов ткани вульвы на питательные среды Сабуро и кровяной агар для выделения дрожжеподобных грибов с определением степени колонизации (КОЕ/мл). В сыворотке крови определяли также уровень циркулирующего кандидозного антигена методом амперометрического иммуноферментного сенсора (ИФС) с поликлональной кроличьей сывороткой.

В комплексе применяемых диагностических методов важная роль должна принадлежать морфологическому исследованию, что особенно актуально в случае предположения наличия кандидозной инфекции, протекающей как фоновая у пациенток, страдающих дистрофическими заболеваниями вульвы и влагалища. Морфологическая верификация патологического процесса является одним из тех объективных методов, на котором базируется доказательная медицина. В арсенале современных морфологов имеются различные методы, позволяющие уточнять диагноз: гистохимическое, бактериологическое и цитологическое исследование, люминесцентная, сканирующая, электронная микроскопия. Материал для морфологического исследования в дерматологии получают путем иссечения кусочка из очагов поражения, а также при удалении различных новообразований кожи. Исследование препаратов кожи проводили с использованием микроскопа «Люмам И2». Все полученные результаты документировали, фотографируя цифровой камерой Sony, модель DSC-W90. Контрольными стали биоптаты ткани вульвы здоровых женщин.

Люминесцентная микроскопия — метод микроскопии, позволяющий наблюдать первичную или вторичную люминесценцию микроорганизмов, клеток, тканей или отдельных структур, входящих в их состав. Возникшая в начале века благодаря усовершенствованию аппаратуры она получает все большее распространение в научных и практических исследованиях в различных отраслях биологии и медицины. К достоинствам люминесцентной микроскопии относятся: ее высокая чувствительность, дающая возможность определения ничтожных концентраций биологически активных соединений; отсутствие сложностей в работе с люминесцентными приборами; доступность регистрации интенсивности светового потока, имитируемого [1, 2].

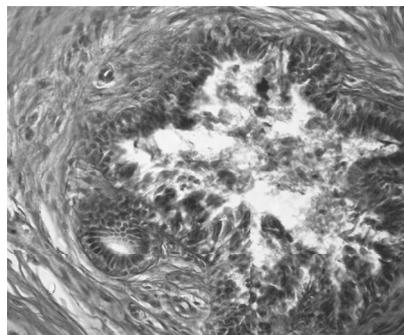
Любая клетка живого организма обладает собственной люминесценцией, которая обязана своим происхождением различным компонентам ее структуры и метаболизма. Собственная люминесценция лежит в основе ряда исключительно ценных методов исследования процессов внутриклеточной регуляции. Утверждение о наличии собственной люминесценции у любых клеток связано прежде всего с составляющими их основу белками, обладающими люминесценцией в ультрафиолетовой области спектра [3, 4, 5]. При воздействии на клетку излучения с длиной волны в области 280 нм (полоса поглощения белков) наблюдается полоса, максимум интенсивности которой лежит в области 330-350 нм. Установлено, что ответственными за ультрафиолетовую люминесценцию белков являются входящие в их состав ароматические аминокислоты: триптофан, тирозин и фенилаланин [6].

Наиболее яркой УФ-люминесценцией в клетке характеризуются сократительный аппарат, ядрышки, митохондрии и некоторые другие структуры цитоплазмы [7, 8, 9, 10]. Интенсивность УФ-люминесценции зависит от физиологического состояния клеток и меняется при различных воздействиях, в том числе и при ионизирующем облучении животных [11]. Специально проведенные исследования с применением специфических ингибиторов дыхания показали, что характер ультрафиолетовой люминесценции митохондрии в значительной мере определяется соотношением восстановленной и окисленной форм дыхательных ферментов и отражает функциональное состояние митохондрий [12]. Цвет люминесценции, то есть длина волны излучаемого света, зависит от химической структуры и от физико-химического состояния микроскопируемого объекта, что и обуславливает возможность использования люминесцентной микроскопии в целях микробиологической и цитологической диагностики для дифференцирования отдельных компонентов клеток.

При гистологическом исследовании ткани вульвы были выявлены изменения, соответствующие дистрофическим при плоскоклеточной гиперплазии: вульва выстлана многослойным плоским ороговевающим эпителием с многочисленными эпителиальными гребнями (рис. 1). В данном наблюдении индивидуальной особенностью строения явилось значительное количество меланоцитов в ростковом слое. Роговые чешуйки представлены минимально (одним-двумя слоями). Эпителий неравномерно утолщен, в основном за счет слоя шиповатых клеток. Причем последние характеризуются резко выраженным распространенным внутриклеточным отеком. В подслизистом слое определяется значительное количество сосудов, вплоть до образования обширных сплетений. Практически отсутствуют придатки кожи. Концевой отдел потовой железы, просвет которой резко расширен, деформирован. Отмечается апикальная и тотальная дистрофия цилиндрического эпителия, очаговая десквамация эпителиоцитов. В отдельных полях зрения имеется прерывание базальной мембраны с развитием перифокального отека стромы. В просвете железы находятся дистрофические эпителиоциты, скопление бактериальной микрофлоры и фрагменты мицелия. Вокруг придатков кожи повышенный цитоз, сформированный преимущественно лимфоцитами. Железистые структуры представлены в основном потовыми железами. Обращает на себя внимание расширение потовой железы с наличием разнообразной микрофлоры. Вокруг желез повышен фиброз, сформированный рыхлой соединительной тканью с повышенным гистиоцитарным цитозом. Отдельные волокнистые структуры окрашены метахроматично.

Склеротическому лихену сопутствует выраженная дистрофия волосяных фолликулов (рис. 2). Стержень волоса отсутствует, и в образовавшейся пустоте отмечается скопление разнообразной микрофлоры и нитей мицелия. Фиксируется плазматизация и гиалиноз стенок мелких сосудов. Имеет место скопления лейкоцитов среди структур эпидермиса. Вокруг придатков кожи определяется концентрическая круглоклеточная инфильтрация. Отмечено повышенное количество и сгруппированность меланоцитов, что клинически проявляется очаговой депигментацией и гиперпигментацией вульвы. Следует также указать на повышенное количество эпителиальных гребней с заостренными вершинами, очаговую диссоциацию слоев, обилие шиповатых клеток с выраженным внутриклеточным отеком и очаговую крупноклеточную периваскулярную и гистиоцитарную инфильтрацию.

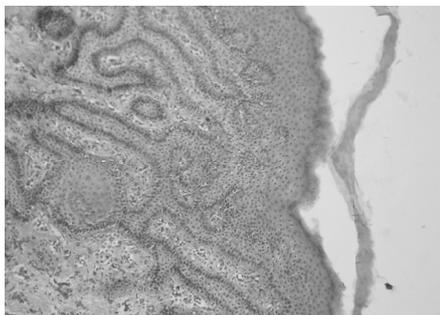
Рисунок 1.



Далее гистологические препараты анализировали на микроскопе «Люмам И2» с целью определения собственной люминесценции исследуемой ткани. Оптическая система микроскопа позволяет освещать объекты по методу темного поля. Используя цифровой фотоаппарат фирмы Sony, модель DSC-W90, при увеличении 2.3 Мрх были сделаны снимки отдельных срезов

соединительной ткани вульвы сначала при просвете лампой снизу, а потом при возбуждении аутолюминесценции (собственного свечения ткани), вызванной при облучении образца УФ-светом в течении 0,5-2 минут. Учет времени необходим в связи с тем, что, если облучать по времени меньше, ткань может не засветиться, а если больше — просто выгореть.

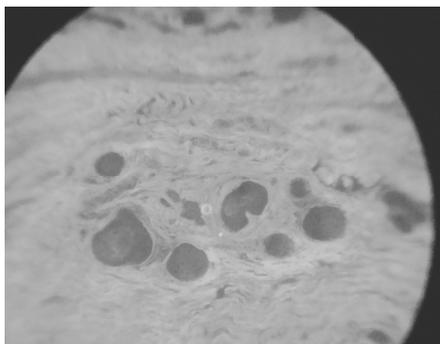
Рисунок 2.



Далее анализ проводился по снимкам с собственным свечением ткани. Так как мы имели дело с хронической кандидозной инфекцией, при влиянии которой были обнаружены структурные изменения ткани, из фотографий 3264x2448 pix (86,36x64,77 см) выбиралась центровая область размером 2100x1600 pix (55,56x42,33 см) и в программе Adobe PhotoshopCS измерялась интенсивность свечения в относительных единицах по отношению количества пикселей.

Результаты исследования показали, что все биоптаты ткани вульвы (норма и патология) имеют собственное свечение — от глубокого зеленого до желтого. Для здоровой ткани характерно свечение темно-зеленого или ярко-зеленого цветов, при этом уровень интенсивности свечения составляет 125 и выше. Свечение ткани при хроническом кандидозе на фоне дистрофических заболеваний вульвы имеет различную окраску (от белесовато-зеленого до ярко-желтого), а уровень интенсивности свечения при этом оказался достоверно меньше 125 ($p < 0,05$) (рис. 1а, рис. 2а).

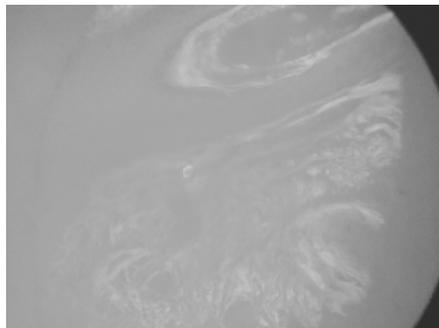
Рисунок 1а.



У обследуемых больных данной группы выявлялся кандидозный антиген, преимущественно в высоких титрах (10^{-4} - 10^{-5} мг/мл), бактериологически — грибковая инфекция обнаруживалась в 25% случаев. Чем выше уровень циркулирующего в крови кандидозного антигена, тем ниже уровень интенсивности свечения ткани вульвы.

Анализируя полученные данные, можем констатировать, что инфекционный агент (в данном случае дрожжеподобные грибы рода *Candida*) изменяет характер окраски и уровень интенсивности свечения пораженной ткани.

Рисунок 2а.



Таким образом, морфологическая диагностика позволила уточнить характер и стадию кандидозного инфекционного процесса у пациенток, страдающих дистрофическими заболеваниями вульвы и влагалища, то есть уточнить фоновую патологию, сопровождающую основную и патологический процесс. Фотолюминесцентный метод выявления собственного свечения ткани с использованием люминесцентной микроскопии подтвердил наличие кандидозной инфекции в исследуемой ткани в 100% случаев.

Полученные в ходе эксперимента данные позволяют судить о целесообразности проведения исследований в этом направлении и свидетельствуют о том, что возможно использовать для люминесцентной микроскопии гистологические препараты, окрашенные гематаксилин-эозином, что в свою очередь определяет фотолюминесцентный метод как доступный, объективный, расширяющий круг экспертных доказательств в диагностике инфекционной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. — М.: Медицина, 1982. — С. 304.
2. Бахшиев Н.П. Введение в молекулярную спектроскопию. Учебное пособие. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. — С. 215.
3. Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М.: Мир, 1965. — С. 484.
4. Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф. Фотобиология и спектральные методы исследования. Практикум по общей биофизике. — М.: Высшая школа, 1964. — Т. 8. — С. 210.
5. Баренбойм Г.М., Доманский А.В., Туроверов К.К. Люминесценция биополимеров и клеток. Л.: Наука, 1966. — С. 233.
6. Розанов Ю.М., Черноградская Н.А., Шудель М.С., Боровиков Ю.С. Изучение спектров ультрафиолетовой флуоресценции клеток различных тканей // Цитология. 1969. — Т. 11. — № 1. — С. 104.
7. Черноградская В.А., Пильщик Е.М., Шудель М.С., Кудрявцева М.В., Асташина Т.П. К вопросу об ультрафиолетовой флуоресценции митохондрий. ДАН СССР, 1964. — Т. 156. — С. 174-176.
8. Хрущев Н.Г. Ультрафиолетовая флуоресценция элементов рыхлой соединительной ткани в норме и в условиях воспаления. Архив анат. гистол. эмбриол., 1963. — Т. 46. — № 2. — С. 39-45.
9. Барский И.Я., Брумберг Е.М., Брумберг В.А. Об ультрафиолетовой флуоресценции мышц. — ДАН СССР, 1962. — Т. 147. — № 2. — С. 474.
10. Сафронов В.Г., Ягунов А.С. УФ-флуоресценция живых и убитых клеток крови и костного мозга облученных животных // Цитология, 1969. — Т. 10. — № 4. — С. 471-475.
11. Черноградская Н.А., Пильщик Е.М., Шудель М.С., Кудрявцева М.В., Асташина Т.П. Некоторые данные по ультрафиолетовой флуоресценции клеток различных тканей. «Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки». М.-Л.: Наука, 1964. — С. 82-87.