

УДК 535.33/.34 535.3

ВЛИЯНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА ИЗЛУЧАТЕЛЬНЫЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИООБЪЕКТОВ

© 2010 г. К.М. Гирав¹, Н.А. Ашурбеков¹, М.Т. Расулов², М.А. Шахназаров²

¹Дагестанский государственный университет,
ул. Гаджиева, 43а, г. Махачкала,
Республика Дагестан, 367000,
dgu@dgu.ru

¹Dagestan State University,
Gadjiev St., 43a, Makhachkala,
Republic Dagestan, 367000,
dgu@dgu.ru

²Дагестанская государственная медицинская академия,
пл. Ленина, 1, г. Махачкала,
Республика Дагестан, 367001,
dgma@list.ru

²Dagestan State Medical Academy,
Lenin Sq., 1, Makhachkala,
Republic Dagestan, 367001,
dgma@list.ru

Выполнены гистоморфологические и микрофлуоресцентные исследования тканей слизистой оболочки антрального отдела желудка в норме и при различных формах патологии (хронический атрофический гастрит, каллезный язвенный дефект и аденокарцинома). Показано характерное изображение структуры соответствующих биотканей, полученное на уровне светоптической микроскопии и в свете собственной флуоресценции. Проведен количественный анализ результатов и исследована динамика морфологических и спектрально-флуоресцентных свойств тканей желудка по мере развития патологических процессов.

Ключевые слова: гистоморфология, флуоресцентная микроскопия, слизистая оболочка, желудок, патология.

In this work histomorphological and microfluorescent researches for mucous of stomach's antrus tissues in norm and with various pathological forms (chronic atrophic gastritis, chronic ulcerous defects and adenocarcinoma) have been done. The typical image of a structure of appropriate tissues, obtained at level of lightoptical microscopy and in intrinsic fluorescence light is shown. The quantitative analysis of results is done and dynamic of morphological and spectral-fluorescent properties of stomach's tissues as pathological processes development have been researches.

Keywords: histomorphology, fluorescence microscopy, mucosa, stomach, pathology.

Достижения современной лучевой медицинской диагностики, включающей методы лазерной, рентгеновской и ультразвуковой интроскопии, позволяют дифференцировать различные патологические процессы, в том числе злокачественные новообразования с высоким пространственным разрешением [1–3]. На практике результаты, полученные при помощи указанных методов, должны быть верифицированы путем проведения дополнительного гистоморфологического анализа материалов, взятых непосредственно из зоны очага диагностируемого заболевания. В этой связи обоснованной является необходимость проведения гистоморфологических исследований при изучении лазерно-спектроскопических характеристик патологических биотканей, поскольку оптические свойства последних определяются особенностями их структурной организации и строения [4].

Одним из наиболее важных и перспективных инструментов в решении широкого круга диагностических задач является флуоресцентная микроскопия [4–6]. В ряде случаев нативная микрофлуориметрия позволяет не только отчетливо видеть форму соответствующих микроструктур и определить пространственное распределение флуорофоров, но и судить по спектральному составу и интенсивности свечения о содержании биологически активных веществ в клетках, а также изучить связь между флуоресцентными параметрами и функциональным состоянием биоткани.

Таким образом, представляется перспективным комбинированное использование методов светооптической и флуоресцентной микроскопии для изучения динамики структурно-морфологических и излучательных свойств биотканей в зависимости от степени и формы патологического процесса. С этой целью в настоящей работе были исследованы гистоморфологические и микрофлуоресцентные характеристики тканей слизистой оболочки пилорического отдела желудка в норме, при хронических атрофических и язвенных дефектах, а также раковой опухоли, используя анализ темнопольного и аутофлуоресцентного изображения биологических микроструктур.

Материалы и методы

Микроскопические исследования спектральных и структурных параметров проводились на 42 образцах слизистой оболочки желудка (далее просто биоткань) с различными случаями очаговых поражений (язвенные дефекты, злокачественные новообразования), полученными в ходе плановых гастроскопических операций. Послеоперационные материалы представляли собой фрагменты биотканей размером около $10 \times 10 \times 10$ мм, резецированные непосредственно из зоны патологического очага, а также области, находящейся на расстоянии 4–5 см и 9–10 см от видимого края очага поражения. Последующий гистохимический анализ этих материалов позволил из общего числа патологических форм отобрать 24 образца с хроническим атрофическим гастритом, 23 – с каллезными язвенными дефектами и 19 – с раковой опухолью желудка (аденокарцинома). Контрольную группу составили 20 образцов биотканей с наименьшими морфологическими изменениями (поверхностные и функциональные расстройства).

Сразу же после резекции фрагменты биотканей ополаскивали в 0,9%-м физиологическом растворе для удаления остатков крови и затем при помощи криостатного микротомы CM-1510 S (Leica Microsystem, Германия) были получены поперечные гистологические срезы. При этом толщина срезов выбиралась различной в зависимости от вида дальнейших исследований. Для гистоморфологического анализа использовались тканевые срезы толщиной не более 10 мкм, окрашенные по стандартной методике с использованием гематоксилина и эозина [7], тогда как для исследований по флуоресцентной микроскопии – нативные срезы толщиной около 100 мкм.

Для изучения гистоморфологических свойств биотканей использовался аппаратно-программный комплекс «Мекос-Ц2» (ЗАО «Медицинские компьютерные системы», г. Москва), включающий в себя световой микроскоп DME (Leica Microsystem, Германия), сопряженный с цифровой видеокамерой HV-F31CL (Hitachi, Япония). Анализ микропрепаратов проводился в проходящем свете при освещении образцов снизу через конденсор микроскопа при общем увеличении в 200 и 400 раз. Программная база комплекса позволяла выполнять морфометрические и денситофотометрические измерения, работать с базой данных и проводить статистическую обработку результатов. Для количественной оценки структурных исследований рассматривались следующие морфологические параметры биотканей: d – толщина слизистой оболочки желудка, равная сумме толщин эпителия и собственной пластинки; S_{nuc} – площадь клеточных ядер; S_{cyt} – площадь цитоплазмы клеток; $\kappa_1 = S_{cyt}/S_{nuc}$ – ядерно-цитоплазматический индекс.

Исследования по флуоресцентной микроскопии проводились на базе отечественного люминесцентного микроскопа «ЛЮМАМ-И1» (ЛОМО, г. Санкт-Петербург) при возбуждении свечения на длине волны 365 ± 10 нм и регистрации 400–700 нм с общим увеличением до 250 раз (объектив $\times$ гомаль $\times$ окуляр). Фотографирование нативной флуоресценции микропрепаратов осуществлялось при помощи зеркальной CCD-камеры EOS 450D (Canon, Япония). Градуировка чувствительности фотокамеры проводилась путем подбора экспозиции, при которой плотность цветовой гаммы фотоснимков более полно соответствовала изображению объекта в свете флуоресценции. При этом учитывался как низкий уровень квантового выхода флуоресценции биотканей, так и способность их к быстрому фотообесцвечиванию [5].

Далее на базе программного пакета Mathcad (MathSoft Inc., США) выполнялось rgb -разложение (red, green, blue) флуоресцентных микроснимков и представление их в виде кривых спектрального распределения интенсивности свечения вдоль снимка. При этом предполагалось, что каждая из групп спектрального разложения соответствует свечению эндогенных флуорофоров: «синяя» компонента – свечению $NAD(P) \cdot H$ (восстановленная форма *никотинамид аденин динуклеотида*), «зеленая» компонента – свечению FAD и FMN (производных флавиновых групп, окисленная форма *флавопротеидов*), «красная» компонента – свечению эндогенных *порфиринов* [4, 5, 8]. Возможность цифрового rgb -разложения данных микрофлуориметрии позволила определить биохимические

показатели, характеризующие физиологическое состояние биотканей в процессе развития патологии: индекс оценки степени энергетического обмена (κ_2) и содержания порфиринов (κ_3). Согласно [9], показатель κ_2 может быть определен как отношение интенсивности флуоресценции флавинов $F_{flavins}$ и NAD(P)H $F_{NAD(P)H}$ и, следовательно, как отношение площадей «зеленой» ($S_{i,j}^{green}$) и «синей» ($S_{i,j}^{blue}$) составляющих спектрального

разложения: $\kappa_2 = \frac{F_{flavins}}{F_{NAD(P)H}} = \frac{S_{i,j}^{green}}{S_{i,j}^{blue}}$, где i, j – про-

дольная и поперечная координата снимков. По аналогии с этим показатель κ_3 может быть определен отношением интенсивности свечения порфиринов $F_{porphyrins}$ и

NAD(P)H $F_{NAD(P)H}$: $\kappa_3 = \frac{F_{porphyrin}}{F_{NAD(P)H}} = \frac{S_{i,j}^{red}}{S_{i,j}^{blue}}$, где $S_{i,j}^{red}$ –

площадь «красной» компоненты rgb -разложения.

Результаты и обсуждение

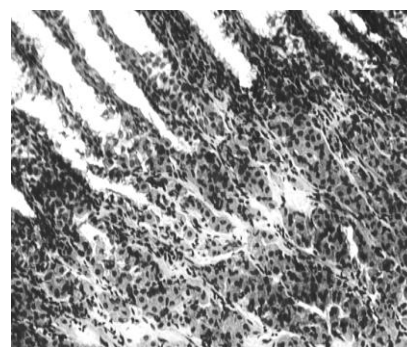
Типичная гистоморфологическая и микрофлуоресцентная картина слизистой оболочки желудка в норме показана на рис. 1, при хроническом атрофическом гастрите – на рис. 2, при каллезном язвенном дефекте – на рис. 3 и при раковой опухоли желудка – на рис. 4. Систематизация результатов гистоморфологических и микрофлуоресцентных исследований и их обобщение позволили отметить, что по мере развития патологических процессов в биотканях наблюдаются однотипные дегенеративные изменения, хотя существуют определенные морфологические и излучательные особенности, которые, по-видимому, связаны со своеобразием структурной организации исследуемых биосред. Более отчетливо эти различия видны также из таблицы, где приведены значения показателей микроскопических исследований нормальных и патологических биотканей.

В ходе проведения гистоморфологических исследований было обнаружено (рис. 1а–4а), что развитие патологических процессов в тканях слизистой оболочки желудка сопровождается прогрессированием атипичных изменений, затрагивающих структуру и строение биоткани как на тканевом, так и клеточном уровнях светооптической микроскопии.

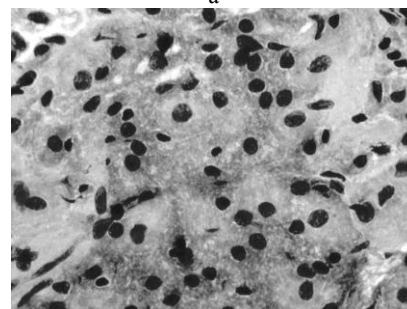
Индексы количественной оценки гистоморфологических и микрофлуоресцентных исследований нормальных и патологических тканей слизистой оболочки пилорического отдела желудка

Патологическое состояние биоткани	d , мм	S_{cyl} , мкм ²	S_{nuc} , мкм ²	κ_1	κ_2	κ_3
Норма	2,5±0,5	205±11,0	38,4±5,0	5,3±0,3	0,62±0,08	0,08
Хронический атрофический гастрит	1,8±0,2	167±10,0 16,4±2,0*	32,5±3,0 10,4±2,0*	5,1±0,2 1,55±0,1*	0,48±0,06	0,14±0,03
Хронический язвенный дефект	≥5	–27,9±3,0*	–15,7±2,0*	–1,8±0,1*	0,41±0,06	0,18±0,03
Адено-карцинома	≥5	224±12,0 17,5±2,0*	61,9±5,0 12,0±2,0*	3,6±0,3 1,4±0,1*	0,45±0,7	0,3±0,05

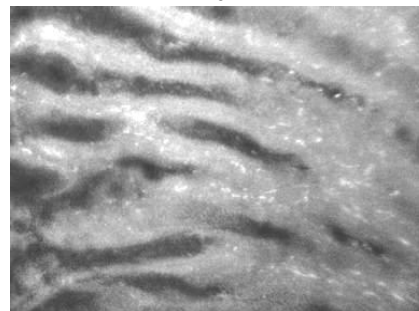
* – воспалительные клетки.



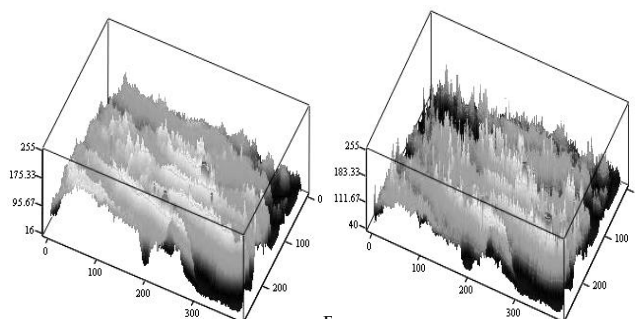
а



б



в



г

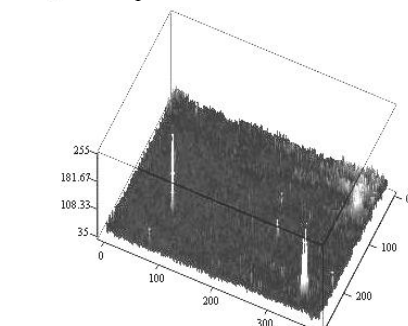
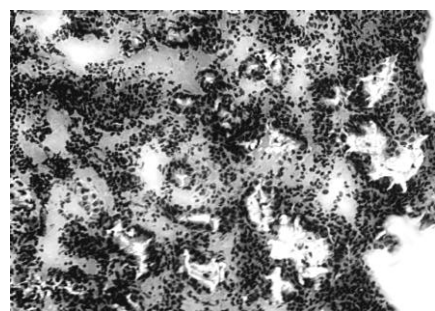
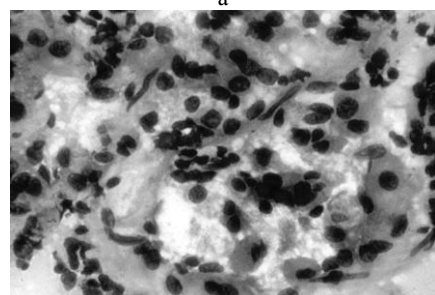


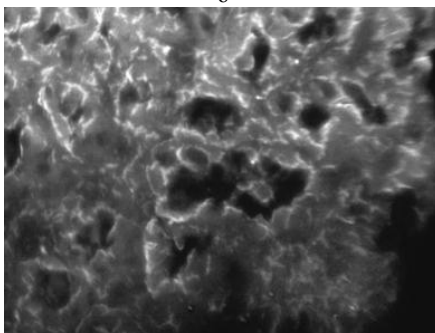
Рис. 1. Микроснимки ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка в норме: а – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 250$; б – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 400$; в – флуоресцентный микроснимок при увеличении $\times 250$; г – результат его разложения на rgb -составляющие



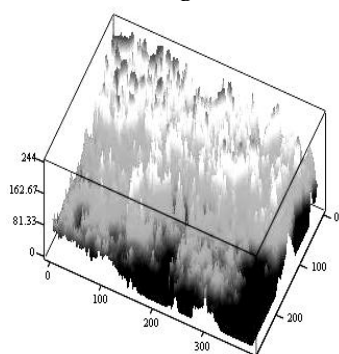
а



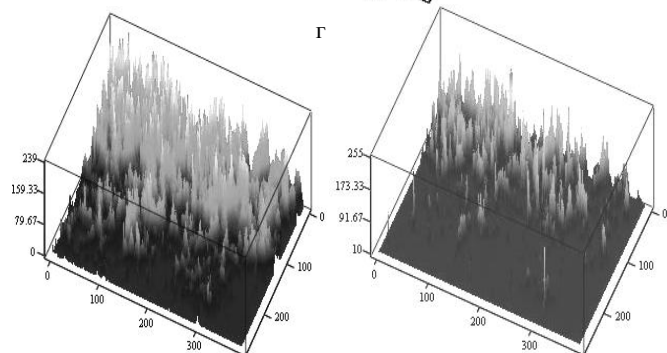
б



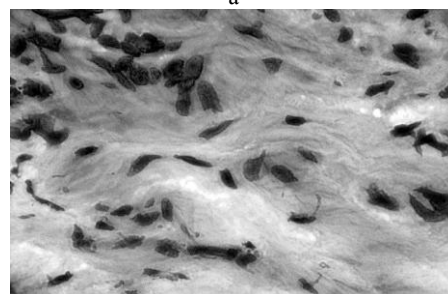
в



г



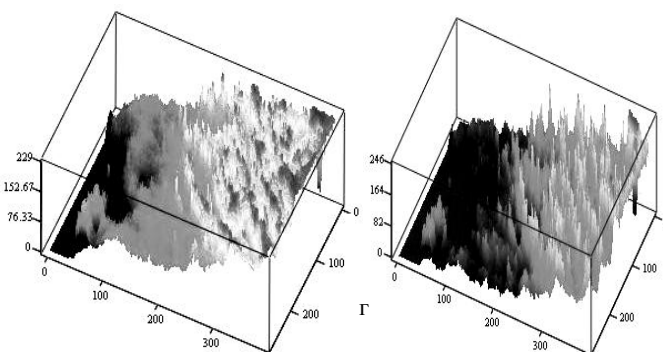
а



б



в



г

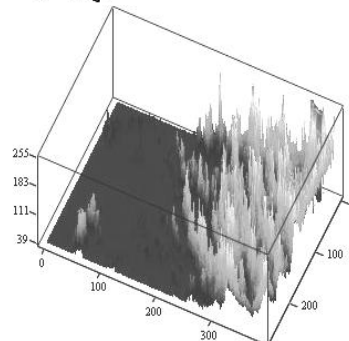
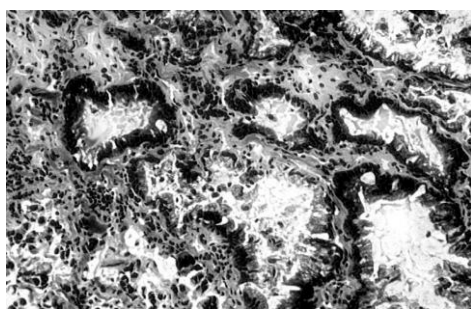
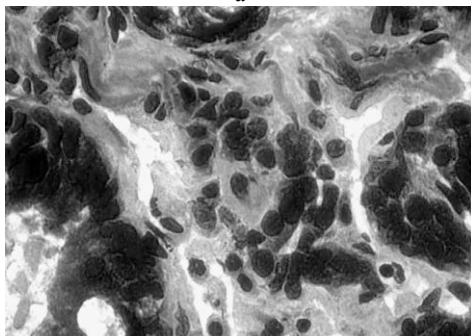


Рис. 2. Микроснимки ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка при хроническом атрофическом гастрите: а – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 250$; б – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 400$; в – флуоресцентный микроснимок при увеличении $\times 250$; г – результат его разложения на *rgb*-составляющие

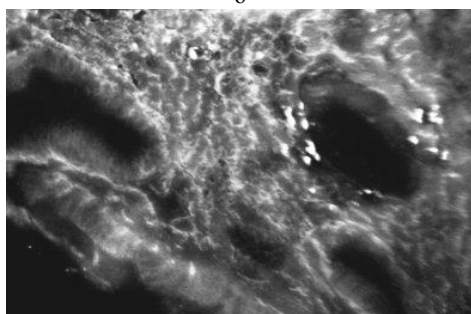
Рис. 3. Микроснимки ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка при хроническом язвенном дефекте: а – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 250$; б – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 400$; в – флуоресцентный микроснимок при увеличении $\times 250$; г – результат его разложения на *rgb*-составляющие



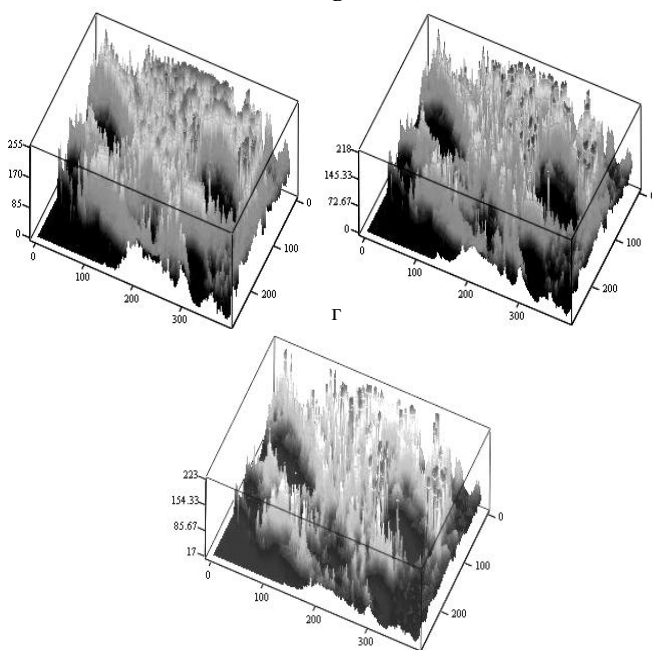
а



б



в



г

Рис. 4. Микроснимки ткани слизистой оболочки антрального отдела желудка при злокачественной опухоли (аденокарцинома): а – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 250$; б – гистоморфологическая картина при увеличении $\times 400$; в – флуоресцентный микроснимок при увеличении $\times 250$; г – результат его разложения на *rgb*-составляющие

По сравнению с нормальным состоянием в биотканях при хроническом атрофическом гастрите и каллезном язвенном дефекте происходит рост полиморфизма клеток и клеточных ядер с уменьшением их размеров до 2 раз и некоторым снижением ядерно-цитоплазматического индекса (рис. 2а, б и 3а, б). В поле зрения наблюдается увеличение плотности атипичных клеток на условную единицу с образованием очагов их скопления. Однако дальнейшее развитие процессов патологического поражения (низкодифференцированная форма рака, аденокарцинома) на фоне еще более выраженного полиморфизма клеточных структур приводит к увеличению их размеров в 1,5–2 раза при снижении индекса κ_1 до 1,5 раз относительно нормы (рис. 4а, б). При этом вследствие активной пролиферации эпителия концентрация атипичных клеток в некоторых фрагментах биоткани до 2 раза превосходит нормальные показатели, а их пространственное распределение носит плотноупакованный кластерный характер. Для всех исследуемых форм патологий существует эффект хронического продуктивного воспаления, результатом которого является диффузная инфильтрация биотканей воспалительными клетками, размеры структур которых в 3–4 раза меньше нормальных, а также активное разрастание соединительной ткани. Причем наибольшее развитие эти эффекты получили при язвенном хроническом дефекте (рис. 3а, б), где в результате длительных деструктивных нарушений строма биоткани полностью замещена плотной рубцовой тканью, выраженной в виде спирально-скрученных коллагеновых волокон различного диаметра, а клеточный состав патологии представлен преимущественно воспалительными клетками и фибробластами. Также обнаружено, что относительно нормы развитие хронического атрофического гастрита приводит к уменьшению толщины слизистого слоя d до 1,5 раз, тогда как при более тяжелых формах патологии (каллезная язва и рак) толщина очага поражения в тканях слизистой оболочки может достигать 5 мм и более (см. таблицу).

Относительно гистоморфологической картины, для которой характерны ярко-выраженные индивидуальные особенности, описание исследуемых патологий тканей слизистой оболочки желудка на уровне флуоресцентной микроскопии обнаруживает ряд общих свойств и закономерностей. В свете собственной флуоресценции хорошо просматривается строение и структурная организация, характерные для нормальных (рис. 1в) и патологически измененных (рис. 2в–4в) биотканей, которые в отличие от своей гистоморфологической картины выглядят более однородными, флуоресцирующими ярко-голубым светом. При этом сопоставление результатов светооптической и флуоресцентной микроскопии позволило выявить, что эпителиальный покров слизистой оболочки желудка не вносит существенных изменений в общую картину флуоресценции. Данный факт в совокупности с результатами измерения толщины слизистой оболочки желудка позволяет рассматривать исследуемые биоткани как оптически однослойные полубесконечные среды, что при лазерно-спектроскопических исследованиях позволяет не учитывать влияние более глубоких слоев биоткани (подслизистая основа и мышечная

пластинка) в виде эффектов дополнительного отражения и преломления на границе их раздела.

Указанное предположение также подтверждается *rgb*-разложением результатов микрофлуориметрии, анализ которых показывает, что спектральный состав свечения как нормальных, так и патологических биотканей представлен, в основном, «синей» и «зеленой» компонентой, однако по мере развития процессов поражения вклад «красной» составляющей также может быть различимым. Как видно из рисунков, наиболее высокая интенсивность спектральных компонентов наблюдается преимущественно в толще биосреды и вокруг желез на участках скопления атипичных клеток и фиброзной ткани, где сконцентрированы эндогенные флуорофоры – коферменты дегидрогеназ (NAD(P)H и флавопротеиды) и структурные белки (группа коллагена) [4, 5, 8]. Развитие патологических процессов приводит к уменьшению вклада «зеленой» и росту «синей» составляющей, что, по-видимому, соответствует угнетению флуоресценции флавиновых групп и возгоранию NAD(P)H и, как следствие, снижению индекса κ_2 в 1,5–2 раза относительно нормы. Согласно работам [9, 10], подобный факт свидетельствует об угнетении клеточного дыхания и развитии истощения терминального окисления, сопровождающих воспалительные процессы. Для раковых биотканей изменение в соотношениях этих коферментов носит обратный характер, достигая значений, близких к предыдущим формам патологии, что, вероятно, связано со скоплением в опухолевых клетках недоокисленных промежуточных продуктов обмена [9–12].

В сравнении с этим при злокачественных формах поражения слизистой оболочки желудка привлекает внимание возгорание красноволновой компоненты, а также характер ее пространственного распределения. Наибольшая интенсивность этой составляющей наблюдается также вокруг желез и достоверно указывает на скопление в атипичных клетках таких флуорофоров, как липофусцин и производные порфириновых групп [4, 5, 8], что приводит к увеличению индекса κ_3 в 3–4 раза относительно нормы (таблица). Согласно [8, 13], интенсификация порфириновой компоненты может быть также связана с кислотным *ph*-сдвигом аномальных биотканей, при котором происходит отрыв иона железа от молекулы гемопорфирина, что и приводит к резкому возгоранию флуоресценции этого флуорофора.

Следует отметить, что представляет принципиальный интерес сравнительный анализ результатов гистоморфологических исследований патологических биотканей с позиции светорассеяния. Характерное для рассматриваемых форм патологии увеличение плотности клеток и клеточных ядер, а также активное разрастание соединительной ткани, являющиеся основными центрами оптической неоднородности биотканей, как известно, должны неизбежно приводить к росту объемного светорассеяния [4, 11]. Согласно этим же работам, уменьшение геометрических размеров клеточных структур, наблюдаемых для хронического атрофического и язвенного дефектов, по-видимому, должно сопровождаться снижением анизотропии рассеяния, тогда как их увеличение, характерное для опухолевых

процессов, приводит к обратному эффекту – возрастанию рассеивающих свойств биоткани. Выдвинутые предположения хорошо согласуются с известными литературными данными [4, 11] и полностью подтверждаются результатами наших оптических исследований соответствующих биотканей, где наибольшие значения параметров анизотропии рассеяния присущи тканям желудка при хронических язвенных дефектах и злокачественных новообразованиях.

Из вышеизложенного можно сделать следующие выводы. Систематизация и обобщение экспериментальных результатов, полученных в ходе проведения спектроскопических и микроскопических исследований, позволяют выделить ряд закономерностей и характерных особенностей влияния патологических процессов на динамику микрофлуоресцентные и структурно-морфологические свойства биологических тканей.

1. Относительно нормы развитие хронического атрофического и язвенного дефектов на фоне общего роста концентрации клеток приводит к уменьшению размеров ядер в 1,5–2 раза и инфильтрации воспалительными клетками еще более меньшего размера, а также к активному разрастанию соединительной ткани. По мере развития крайних форм поражения происходит увеличение размеров клеток и клеточных ядер до 2 раз при снижении ядерно-цитоплазматического индекса в 1,5 раза, что находит свое подтверждение в характере поведения спектральной зависимости диффузно-оптических свойств соответствующих биотканей.

2. Сопоставление результатов микрофлуориметрии и гистоморфологии показывают, что ткани слизистой оболочки пилорического отдела желудка могут рассматриваться как однослойные полубесконечные мутные среды, поскольку эпителий, покрывающий слизистую основу, не вносит изменений в общую картину флуоресценции, а толщина биоткани при всех исследуемых формах патологии достаточна для того, чтобы не учитывать влияние эффектов отражения и преломления, возникающих на границе раздела более глубоких слоев.

3. Анализ спектрального *rgb*-разложения флуоресцентных изображений тканей слизистой оболочки желудка показывает, что наибольшая концентрация эндогенных флуорофоров: структурных белков (группа коллагена) и NAD(P)H, а также флавопротеидов и порфиринов, представленных «синей», «зеленой» и «красной» компонентами разложения, наблюдается в толще биоткани и вокруг желез, на участках скопления атипичных клеток и фиброзной ткани.

4. По мере развития патологических процессов наблюдается снижение индекса степени энергетического обмена до 2 раз и увеличение индекса накопления порфиринов до 4 раз относительно нормы, что обусловлено угнетением флуоресценции флавиновых групп и возгоранием NAD(P)H и группы производных порфиринов.

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.», проект НК-38Р-17, госконтракт № П382.

Литература

1. Руководство по оптической когерентной томографии / под ред. Н.Д. Гладковой, Н.М. Шаховой, А.М. Сергеева. М., 2007. 296 с.
2. *Терещенко С.А.* Методы вычислительной томографии. М., 2004. 320 с.
3. Применение ультразвука в медицине. Физические основы / под ред. Э. Миллера, К.Р. Хилла, Дж. Бэмбера. М., 1989. 568 с.
4. Оптическая биомедицинская диагностика : пер. с англ. / под ред. В.В. Тучина. М., 2007. Т. 1. 560 с.; Т. 2. 368 с.
5. *Rost F.W.D.* Fluorescence microscopy. Cambridge, 1995. Vol. 1. 249 p.; Vol. 2. 451 p.
6. *Закржевский Е.Б.* Люминесцентная микроскопия в клинико-гематологических исследованиях. Л., 1963. 87 с.
7. *Меркулов Г.А.* Курс патологической техники. Л., 1969. 424 с.
8. *Юденфренд С.* Флуоресцентный анализ в биологии и медицине : пер. с англ. М., 1965. 468 с.
9. *Карнаухов В.Н.* Спектральные исследования энергетического аппарата живых нервных клеток // Биофизика. 1973. Т. 13. С. 185 – 188.
10. *Карнаухов В.Н.* Спектральный анализ и изучение внутриклеточной регуляции обмена веществ и энергий // Цитология. 1976. Т. 18. С. 622 – 629.
11. *Schmitt M., Kumar G.* Optical scattering properties of soft tissues: a discrete particle model // Appl. Optics. 1998. Vol. 37. P. 2788 – 2797.
12. Общая патология человека/ под ред. А.И. Струкова, В.В. Серова, Д.С. Саркисова. М., 1982. 656 с.
13. Избирательное воздействие лазерного излучения на раковые клетки лазерная спектроскопия клетки (обзор) / В.Ф. Камалов [и др.] // Квант. электрон. 1985. Т. 12. С. 1997 – 2023.

*Поступила в редакцию**2 сентября 2010 г.*
