

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ЗОН ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ



Представлен комплексный подход к оценке активности ядрышковых организаторов на материале лимфатических узлов 87 людей в норме. На основании исследования особенностей распределения и величины аргентофильных гранул в 7387 ядрах пролимфоцитов показана возможность визуализации на уровне световой микроскопии основных морфофункциональных типов ядрышек, а также различных подтипов ядрышек нуклеолонемного типа. Дана характеристика распределения аргентофильных гранул внеядрышковой локализации. Предложенный комплекс параметров ядрышкового аппарата лимфоидных клеток можно использовать в качестве контроля при исследовании различных лимфопролиферативных процессов.

© Т.Н. ТУГАНОВА, Л.С. БОЛГОВА, И.С. ТАНАСИЙЧУК,
2004

Введение. Анализ данных литературы свидетельствует о значимости показателей активности ядрышкообразующих регионов хромосом (ЯОР) при оценке морфофункционального состояния клеток различных органов и тканей в норме и при патологических изменениях различного генеза [1–14]. Вместе с тем отсутствие единого унифицированного подхода к изучению на светооптическом уровне с использованием метода импрегнации азотнокислым серебром ядрышкового аппарата клетки, а также сложность и субъективизм визуального восприятия изображения аргентофильных гранул (АГ) [14] приводит не только к несопоставимости результатов отдельных исследований, но и к явным противоречиям. Различные авторы неоднозначны в выборе критериев оценки активности ядрышкового аппарата клетки. Так, в части работ при характеристике зон ядрышковых организаторов (ЯОР) приводятся данные о распределении ассоциированных с ЯОР протеинов, визуализирующихся на светооптическом уровне в виде аргентофильных гранул [2, 4–7]. В других сообщениях приведены результаты исследования непосредственно самих ядрышкообразующих зон [1, 8]. Также имеются данные, свидетельствующие о высокой значимости показателей содержания различных морфофункциональных типов ядрышек при дифференциальной диагностике патологических состояний различного генеза [12, 13, 15], в частности, лимфопролиферативных процессов (ЛПП) [9–11]. Вместе с тем в ряде публикаций акцентируется внимание на том, что реакция с нитратом серебра направлена на выявление кислых негистоновых белков, ассоциированных с ЯОР, однако не предусматривает выявления ядрышка как такового [16, 17].

С учетом изложенного была поставлена следующая задача — изучить показатели активности ядрышкообразующих регионов хромосом и определить наиболее оптимальный их комплекс при оценке морфофункционального состояния лимфоидных клеток лимфатических узлов человека в норме.

Материалы и методы. Исследован материал отпечатков лимфатических узлов (ЛУ) 87 людей в возрасте от 0 до 89 лет, погибших от травмы или по причинам, не связанным с патологией лимфоидной ткани и крови. Применяли методику серебрения ядрышкообразующих регионов хромосом в интерфазных клетках по Howell

et al. [18] и в нашей модификации [19]. Исследование проводили на светооптическом уровне с помощью микроскопа МБИ-15-2 при $\times 900$ и $\times 1440$ -кратном увеличении иммерсионной оптической системы.

Исследование ЯОР проводили в каждом наблюдении в среднем в 50–100 ядрах. Всего было изучено 7387 ядер пролимфоцитов. Согласно поставленной цели работы проводили изучение: 1) качественных и количественных параметров аргентофильных гранул (количество, размеры, расположение по поверхности ядер); 2) структурно-функциональных особенностей, характера локализации и содержания в ядре основных выявляемых при световой микроскопии морфофункциональных типов ядрышек.

Все визуализировавшиеся АГ условно делили на две группы: АГ, входящие в состав ядрышек, и внеядрышковые аргентофильные гранулы (ВАГ).

Учитывая достаточно субъективный характер метода перед проведением исследования на нескольких цитограммах тремя специалистами были установлены эталоны для определения размерных градаций гранул. Учет размеров аргентофильных гранул проводили путем определения их процентного соотношения в ядрышках.

При исследовании ВАГ исходили из следующих характеристик их распределения по поверхности ядер: неравномерными бороздками (НБ); прерывисто маргинально (ПМ); одновременно неравномерными бороздками и прерывисто маргинально (НБ+ПМ); пылевидно по всей поверхности (ПП).

Качественное типирование основных выявляемых при световой микроскопии морфофункциональных типов ядрышек (нуклеолонемных, кольцевидных, микроядрышек) проводили на основании классификации, предложенной отечественными авторами [20]. Вычисляли абсолютное и процентное содержание различных морфофункциональных типов ядрышек в ядрах, изучали особенности их расположения. Ввиду выявления в цитограммах ЛУ человека в норме различных вариантов нуклеолонемных типов ядрышек были выделены семь их подтипов на основании размеров и топографии ядрышкообразующих АГ.

Результаты исследований и их обсуждение.

1. При изучении качественных и количественных характеристик выявляемых АГ ядер лимфоидных клеток в норме обращает на себя внимание их обильное количество, вариабельность размеров и топографии в ядре.

Ядрышкообразующие АГ лимфоидных клеток характеризовались различными размерами — от пылевидных до крупных. Среднее процентное содержание мелких (М) АГ составило $78,20 \pm 4,259$. Количество же средних (С) и крупных (К) гранул было значительно ниже — $18,00 \pm 3,259$ и $3,80 \pm 1,211$ % соответственно.

Таким образом, показатели процентного содержания АГ находились в количественном соотношении

$$M : C : K = 20 : 5 : 1.$$

Однако следует отметить, что часть ядрышкообразующих АГ, описываемых нами как пылевидные, имели настолько мелкие размеры, что их количественная оценка была весьма затруднительной и носила лишь констатирующий характер. Наличие пылевидных гранул, входящих в состав ядрышка, отмечалось в 100 % исследованных нами цитограмм. Кроме того, в 75,86 % наблюдений определялись такие типы ядрышек, подсчитать в которых количество АГ не представлялось возможным: гранулы либо сливались друг с другом, образуя плотный ободок по периферии ядрышка, либо в виде пылевидной зернистости заполняли всю его центральную часть. Процентное содержание таких форм ядрышек составило $14,28 \pm 2,899$.

Содержание ВАГ в ядрах пролимфоцитов ЛУ человека в норме было всегда значительным, распределение их носило различный характер. Так, расположение ВАГ, описанное нами как НБ + ПМ (рис. 1, в) отмечалось в $59,17 \pm 10,327$ % ядер пролимфоцитов. Показатели распределения ВАГ в виде НБ (рис. 1, а) и ПМ (рис. 1, б) были значительно ниже предыдущего и составили соответственно $29,97 \pm 8,106$ и $7,91 \pm 5,078$ %. Пылевидным расположением (рис. 1, г) внеядрышковых гранул характеризовались только $2,52 \pm 1,992$ % ядер.

Считаем необходимым подчеркнуть выявленное нами в пролимфоцитах ЛУ с условной нормой обилие АГ, локализирующихся непосредственно в нуклеоплазме. Следует отметить, что рядом исследователей [1, 6] было зарегист-

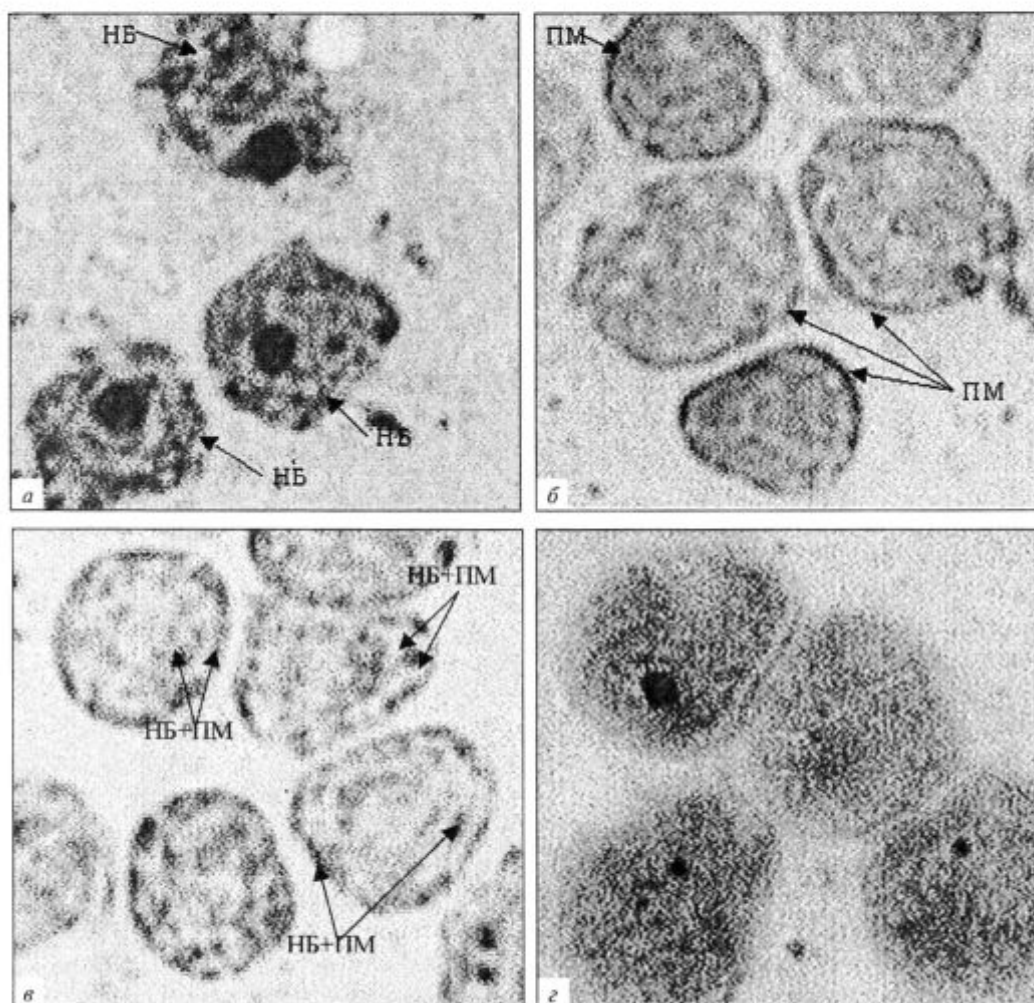


Рис. 1. Характер расположения внеядрышковых аргентофильных гранул в ядрах пролимфоцитов лимфатических узлов человека в норме, импрегнация серебром, $\times 900$: а — неравномерными бороздками (НБ); б — прерывисто маргинально (ПМ); в — неравномерными бороздками и прерывисто маргинально (НБ + ПМ); з — пылевидно по всей поверхности (ПП)

рировано увеличение количества внеядрышковых АГ в ядрах опухолевых клеток НЗЛ высокой степени злокачественности. Возникает закономерный вопрос о природе внеядрышкового аргентофильного материала, обнаруживающегося в пролимфоцитах ЛУ человека в норме. Ответить определенно на этот вопрос чрезвычайно сложно. Совпадение результатов наших исследований с данными некоторых авторов [1, 6, 21] о наличии АГ в интерхроматиновых районах ядер лимфоцитов позволяет однозначно исключить гипотезу о том, что выпадение гранул серебра вне ядрышковой зоны является дефектом окрашивания. Более того, нами отмечена определенная обратно пропорциональ-

ная зависимость между количеством внеядрышковой аргентофильной зернистости и активностью ядрышкового аппарата. Вероятно, следует согласиться с рядом исследователей [21] о наличии в интерхроматиновых зонах ядер белка нуклеоплазмина, проявляющего в отношении серебра аналогичную кислым негистоновым белкам активность. Мы полагаем, что детальное изучение внеядрышкового аргентофильного материала может дать ценную дополнительную информацию о пролиферативной активности клетки в целом.

2. При изучении морфофункциональных типов ядрышек исходили из того, что АГ опосредованно через визуализацию на светооптическом

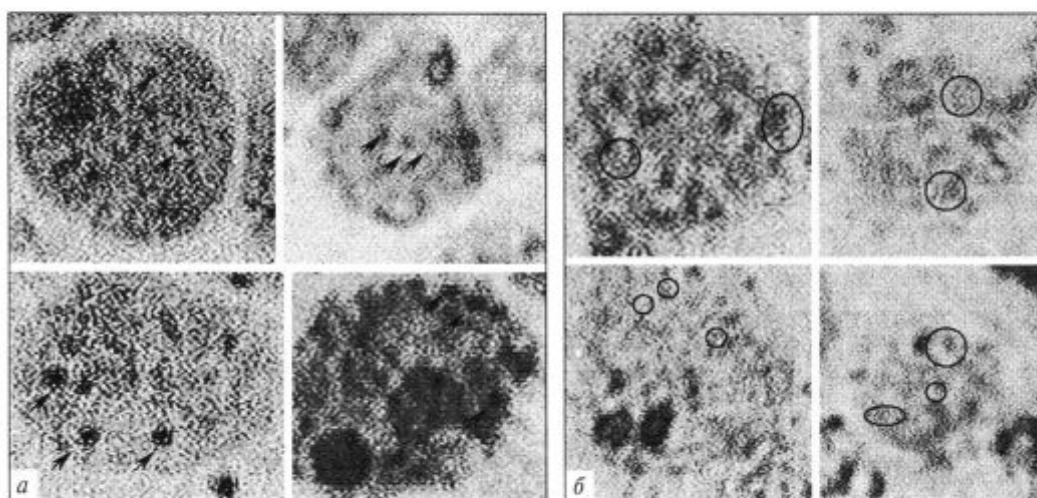


Рис. 2. Микроядрышки (а) и кольцевидные (б) в ядрах пролимфоцитов лимфатических узлов человека в норме, импрегнация серебром, $\times 900$

уровне импрегнированных кислых негистоно-вых белков позволяют выявлять определенную их структурную организацию, связанную с функциональной активностью ядрышка и отражающую его определенный морфофункциональный тип [22–25]. В связи с этим мы считаем небезосновательной возможность визуализации на светооптическом уровне структуры самого ядрышка, а не только ЯОР, а также образующих их АГ, качественные и количественные характеристики которых не только отражают уровень транскрипционной активности, но и позволяют судить об изменении активности самого ядрышка [9–11, 26].

Из девяти описанных на ультраструктурном уровне [20] морфофункциональных типов ядрышек при световой микроскопии достоверно можно идентифицировать только четыре варианта: компактные, нуклеолонемные, кольцевидные и микроядрышки. Из них компактные ядрышки не выявлялись в ядрах лимфоидных клеток ЛУ человека в норме, в то время как они отмечались при злокачественных новообразованиях лимфатических узлов [9].

Наибольшими показателями абсолютного и процентного содержания в ядрах, как и наибольшей амплитудой их колебания, характеризовались *микроядрышки*. В пролимфоцитах ЛУ человека в норме их среднее количество составило $4,34 \pm 0,361$ ядрышка на ядро. Микроядрышки характеризовались мелкими размерами и высокой оптической плотностью. Обычно

идентификация данных типов ядрышек не составляла сложности, однако в некоторых случаях их следует дифференцировать с отдельно расположенными укрупненными ВАГ. От последних микроядрышки отличались более четкими контурами, правильной округлой формой и наличием в большинстве наблюдений периферической зоны просветления (рис. 2, а). Микроядрышки располагались преимущественно маргинально, особенно в тех случаях, когда их было больше шести в ядре. В клетках с небольшим количеством микроядрышек (до четырех) они располагались преимущественно в центральной части ядер.

Среднее содержание *кольцевидных* ядрышек (имеющих форму кольца с оптически светлой центральной зоной) в ядрах пролимфоцитов составило $2,25 \pm 0,166$. В подавляющем большинстве пролимфоцитарных ядер их количество колебалось от 1 до 3 и редко превышало 5 ядрышек на ядро (наличие 6 кольцевидных ядрышек в ядре отмечается в единичных случаях).

Для лимфоидных клеток ЛУ человека в норме характерно наличие нежных кольцевидных ядрышек с периферическим расположением пылевидной слабо различимой зернистости, что в большинстве наблюдений усложняло их визуализацию (рис. 2, б).

Наиболее морфологически гетерогенной является группа *нуклеолонемных типов* ядрышек, среди которых на цитологическом мате-

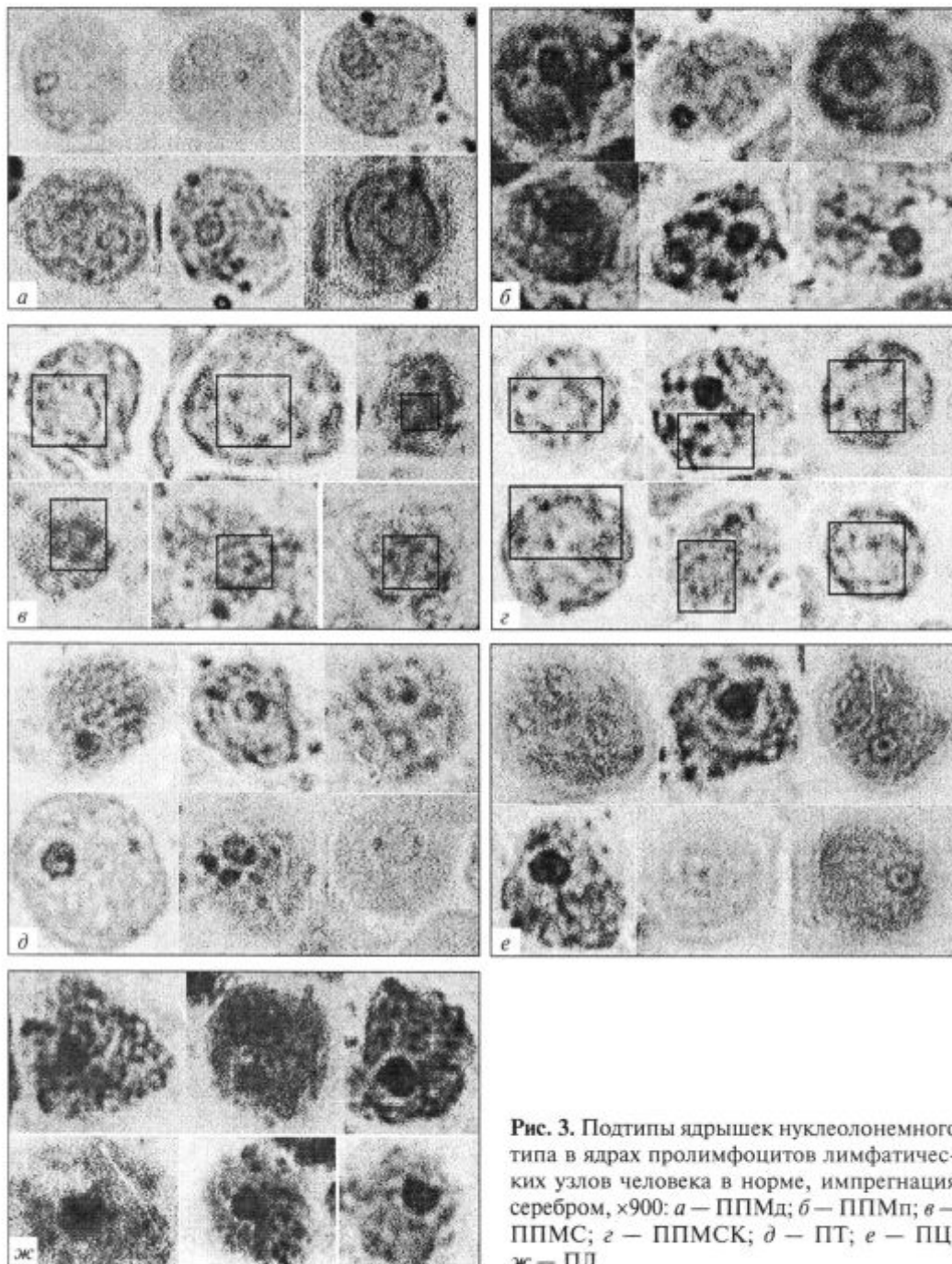


Рис. 3. Подтипы ядрышек нуклеолонемного типа в ядрах пролимфоцитов лимфатических узлов человека в норме, импрегнация серебром, $\times 900$: а — ППМ_д; б — ППМ_п; в — ППМС; г — ППМСК; д — ПТ; е — ПЦ; ж — ПЛ

риале ЛУ человека в норме нами были выделено семь подтипов.

К I подтипу отнесены нуклеолонемные ядрышки с преимущественно периферическим расположением пылевидных и мелких дискретных гранул (ППМ_д) (рис. 3, а). Размеры и форма ППМ_д ядрышек характеризовались

большим разнообразием, однако чаще они имели округлую или овальную форму, средние размеры и в большинстве своем прилегали непосредственно к ядерной оболочке. Указанный вариант нуклеолонемных ядрышек встречался в цитограммах ЛУ в норме наиболее часто. Так, количество ППМ_д составило $44,62 \pm$

$\pm 6,924$ % общего числа нуклеолонемных ядрышек.

II подтип отличался плотным расположением пылевидных и мелких АГ, образующих характерный ободок по периферии ядрышка (ППМ_п) (рис. 3, б). ППМ_п ядрышки характеризовались преимущественно правильно округлыми формами и в большинстве случаев локализовались в центральной части ядра. Данный подтип нуклеолонемного ядрышка определялся в цитограммах ЛУ человека в норме значительно реже предыдущего — $11,74 \pm 3,592$ %.

Для *III подтипа* нуклеолонемных ядрышек характерно наличие периферически расположенных пылевидных, мелких и средних гранул (ППМС), в то время как центральная часть ядрышка была полностью лишена зернистости (рис. 3, в). Процентное содержание ППМС ядрышек составило $24,00 \pm 3,171$.

ППМС и ППМ_д подтипы нуклеолонемных ядрышек обнаруживались практически во всех исследованных цитограммах ЛУ в норме.

IV подтип характеризовался по сравнению с предыдущей формой наличием одной или нескольких крупных гранул (ППМСК) (рис. 3, г). Нуклеолонемные ядрышки ППМСК подтипа часто имели достаточно крупные размеры, занимали около половины площади всего ядра и в большинстве случаев непосредственно контактировали с ядерной оболочкой. Среднее количество ППМСК составило $8,89 \pm 2,908$ %.

V подтип, названный нами как перстневидное (ПТ) ядрышко, характеризовался наличием нескольких (обычно около пяти) однотипных мелких, занимающих строго периферическое расположение, АГ и одной тяготеющей к центру крупной гранулой (рис. 3, д). В процентном соотношении перстневидные — наиболее редко встречающаяся форма нуклеолонемных ядрышек, их среднее количество составляло всего $2,08 \pm 0,608$ %. Перстневидные формы рассматривались нами как начальный этап образования *VI подтипа* нуклеолонемных ядрышек, характеризующегося как периферическим, так и центральным расположением гранул серебра (ПЦ). ПЦ вариант нуклеолонемных ядрышек, обнаруживающийся в ядрах лимфоидных клеток ЛУ человека в норме, характеризовался наличием в центральной части ядрышка всего одной (очень редко — двух) АГ крупного или

среднего размера (рис. 3, е). Процентное содержание указанного варианта нуклеолонемных ядрышек составило $5,23 \pm 1,534$.

VII подтип — пылевидные (ПЛ) ядрышки — проявлялся одновременно плотным периферическим и пылевидным центральным расположением аргентофильных гранул (рис. 3, ж). Для пылевидных ядрышек были характерны правильно округлая форма и низкий процент прилегания к ядерной оболочке. Их количество составило всего $3,61 \pm 2,206$ % общего числа нуклеолонемных ядрышек.

Следует отметить, что выявление и определение количественного содержания нуклеолонемных, кольцевидных и микроядрышек, а также качественная и количественная характеристика предложенных нами подтипов нуклеолонемных ядрышек оказалось возможным во всех исследованных цитограммах ЛУ человека в норме.

Выводы. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о взаимодополняющем характере различных показателей активности ЯОР при оценке морфофункционального состояния лимфоидной клетки. Так, визуализирующиеся на светооптическом уровне особенности пространственной организации различных типов ядрышек обусловлены характером распределения, количественными и качественными параметрами аргентофильных гранул. Вместе с тем исследование характеристик АГ изолированно от изучения параметров морфофункциональных разновидностей ядрышек не дает полной достоверной информации об уровне активности ЯОР. Объективная оценка ЯОР хромосом лимфоидных клеток требует комплексного подхода, предусматривающего не только изучение распределения аргентофильных гранул, а также содержания различных типов ядрышек, но и более детального типирования нуклеолонемных ядрышек с выделением предложенных нами их семи подтипов. Проведенное исследование продемонстрировало, что подобный подход является наиболее оптимальным при оценке активности ядрышкообразующих регионов хромосом лимфоидных клеток человека в норме и может быть рекомендован в качестве контроля при изучении клеточного субстрата лимфатических узлов при патологических состояниях различного генеза.

SUMMARY. Comprehensive approach to study nucleolar organizer region activity rating in lymphoid cells of 87 human normal lymphatic nodes was proposed. Possibility of visualization of basic morphofunctional nucleolar types and different subtypes of nucleolonemal nucleoluses was demonstrated at light microscopy level basing on 7387 prolymphocyte nucleus research of argentophile granule allocation features and dimensions. Distribution index of extranucleolar argentophile granules was estimated. The complex of parameters of lymphoid cell nucleolar set can be used as control for study of different lymphoproliferative processes.

РЕЗЮМЕ. Подано комплексний підхід до оцінки активності зон ядерцевих організаторів на матеріалі лімфатичних вузлів 87 людей в нормі. На підставі дослідження особливостей розподілу та розміру аргентофільних гранул в 7387 ядрах пролімфоцитів продемонстрована можливість візуалізації на рівні світлової мікроскопії основних морфофункціональних типів ядерця, а також різних підтипів ядерця нуклеолонемного типу. Дано характеристику розподілу аргентофільних гранул позаядерцевої локалізації. Запропонований комплекс параметрів ядерцевого апарату лімфоїдних клітин можна використовувати як контроль при дослідженні різноманітних лімфопроліферативних процесів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубровский А.Ч., Клякина Л.Б. Зоны организаторов ядрышка и митотическая активность неходжкинских лимфом // *Арх. патологии.* — 1997. — **59**, № 1. — С. 25–30.
2. Иконникова О.А., Ленская Р.В., Зацепина О.В. и др. Феномен Ag-негативности ядрышковых организаторов клеток костного мозга и крови у детей с острым лимфобластным лейкозом // *Эксперим. онкология.* — 1990. — **12**, № 4. — С. 40–43.
3. Крокер Д. Показатели клеточной пролиферации при злокачественных лимфомах с особым рассмотрением ядрышкообразующих районов // *Гематология и трансфузиология.* — 1990. — № 11. — С. 28–34.
4. Лебедева Н.Б., Меркулова И.Б., Гаврилова Т.Н., Зубрихина Г.Н. Ядрышкообразующие районы лимфоидных элементов костного мозга и периферической крови у больных неходжкинскими лимфомами в стадии лейкемизации // *Клин. лаб. диагностика.* — 1997. — № 5. — С. 65.
5. Лебедева Н.Б., Зубрихина Г.Н., Меркулова И.Б., Гаврилова Т.Н. Проллиферативная активность лейкоэмических клеток костного мозга при лимфопролиферативных заболеваниях низкой степени злокачественности // *Клин. лаб. диагностика.* — 1998. — № 9. — С. 39.
6. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А., Тупицын Н.Н., Шолохова Е.Н. Ядрышковый организатор как маркер степени злокачественности и прогноза неходжкинских злокачественных лимфом // *Арх. патологии.* — 1996. — **58**, № 4. — С. 22–27.
7. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А. Значение аргирофильных белков области ядрышковых организаторов в формировании опухолевого фенотипа неходжкинских злокачественных лимфом, их дифференциальной диагностике и в определении прогноза // *Гематология и трансфузиология.* — 2000. — **45**, № 3. — С. 52–55.
8. Репетун А.Н., Маркочев А.Б., Шуст В.Ф. Прогностическое значение митотической активности, средней площади ядра и активности ядрышковых организаторов при неходжкинских злокачественных лимфомах // *Гематология и трансфузиология.* — 1998. — **43**, № 4. — С. 29–31.
9. Туганова Т.Н., Болгова Л.С., Алексеев О.И. Цитогенетические показатели в дифференциальной диагностике пролимфоцитарных лимфом и доброкачественных лимфопролиферативных заболеваний // *Онкология.* — 2003. — № 1. — С. 14–18.
10. Туганова Т.Н., Болгова Л.С. Основные морфофункциональные типы ядрышек бластных клеток при неходжкинских лимфомах и доброкачественных гиперплазиях // *Цитология и генетика.* — 2002. — **36**, № 3. — С. 51–57.
11. Туганова Т.Н. Гранулярный аппарат нуклеолонемных ядрышек незрелых лимфоидных клеток при лимфопролиферативных заболеваниях // *Клин. лаб. диагностика.* — 2003. — № 7. — С. 23–24, 33–34.
12. Болгова Л.С., Лобода В.И., Туганова Т.Н. Ядрышковые организаторы в процессе малигнизации бронхиального эпителия // *Цитология и генетика.* — 1998. — **32**, № 1. — С. 79–82.
13. Smetana K. et al. Malignancy: The number of nucleoli and main nucleolar types in lymphoblasts of children suffering from acute lymphoid leukemia // *Hematol.* — 1999. — **4**(3). — P. 231–236.
14. Дубенская Л.И., Баженов С.М. Белки, ассоциированные с зонами ядрышкового организатора: практическое применение в онкоморфологии и связь с биологическими особенностями опухолей // *Арх. патологии.* — 1992. — **54**, № 4. — С. 40–42.
15. Бучинская Л.Г., Полищук Л.З., Ганина К.П. Морфофункциональные особенности ядрышек при железистой гиперплазии и раке эндометрия // *Цитология и генетика.* — 1992. — **26**, № 3. — С. 3–7.
16. Погорелов В.М. Оценка Ag-положительных ядрышкообразующих районов хромосом в нуклеолах интерфазных злокачественных клеток // *Гематология и трансфузиология.* — 1990. — № 11. — С. 38–39.
17. Crocker J., Paramjit N. Nucleolar organizer regions in lymphomas // *J. Pathol.* — 1987. — **151**. — P. 111–118.
18. Howell W., Black D. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer // *Experientia.* — 1980. — **36**. — P. 1014–1015.
19. Болгова Л.С., Туганова Т.Н., Кузина И.С. Модификация окраски по Howell W., Black D. на выявление ядрышкообразующих регионов хромосом

- при лимфопролиферативных заболеваниях. №Д-26735, Рукопись депонирована в ГЦНМБ (Россия). 20.04.01.
20. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // Усп. соврем. биологии. — 1988. — **105**, № 2. — С. 252–266.
 21. Зацепина О.В., Сметана К. Электронно-микроскопическое исследование локализации Ag-белков в ядрышках лимфоцитов человека // Цитология. — 1985. — **27**, № 11. — С. 1228–1233.
 22. Зацепина О.В. Локализация ДНК в ядрышках клеток млекопитающих // Цитология. — 1992. — **34**, № 5. — С. 34–39.
 23. Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е. Структура и функция ярышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты // Цитология. — 1992. — **34**, № 10. — С. 3–25.
 24. Crocker J. Nucleolar organizer regions // Curr. Top. Pathol. — 1990. — **82**. — P. 91–149.
 25. Ploton D. Structure and molecular organization of nucleolus // Zbl. Pathol. — 1994. — **140**, № 1. — P. 3–6.
 26. Маршак Т.Л., Дунгенова Р.Е., Бродский В.Я. Транскрипционная активность ядрышек и содержание в них аргентофильных белков // Цитология. — 1993. — **35**, № 10. — С. 83–84.

Поступила 10.02.04