

Л.Г. Бучинська

І.П. Несіна

Н.І. Ткаченко

Л.З. Поліщук

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: ядерце, лімфоцити, рак тіла матки.

ОСОБЛИВОСТІ ЯДЕРЕЦЬ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК ТІЛА МАТКИ

Резюме. Проведено морфометричне дослідження забарвлених азотнокислим сріблом ядерць у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак тіла матки та проаналізовано залежність ядерцевих характеристик від наявності чи відсутності злоякісних новоутворень у родовадах хворих. За наявності онкопатології у родовадах встановлено достовірне збільшення площі ядер лімфоцитів та переважання вмісту найбільш активних форм ядерць, відзначено більш виражену гетерогенність лімфоцитів за дослідженими характеристиками. Отримані результати свідчать про підвищений рівень біосинтетичних процесів у лімфоцитах периферичної крові хворих цієї групи.

ВСТУП

Рак тіла матки належить до мультифакторних захворювань, формування яких різною мірою зумовлено як чинниками навколишнього середовища, так і генетичними факторами. Останні включають феномен нестабільності геному соматичних немалігнізованих клітин, що є одним із критеріїв ризику виникнення пухлин. Найбільш адекватною моделлю для вивчення геному людини є лімфоцити периферичної крові (ЛПК), які знаходяться переважно в одній фазі клітинного циклу (G_0), у звичайних умовах не діляться, легко піддаються культивуванню і об'єктивно відображають генетичний гомеостаз організму.

При цитогенетичному дослідженні ЛПК хворих на рак тіла матки виявлено достовірне збільшення кількості аберацій хромосом порівняно з таким у здорових осіб, причому ці зміни були більш виражені у пацієнток, родоводи яких обтяжені онкопатологією [1, 2]. Поряд з вивченням структурних особливостей хромосом ЛПК важливим є аналіз функціонального стану цих клітин у хворих онкологічного профілю. Однією з ключових структур, що визначає функціональний стан клітини, є ядерце [3, 4]. Кількість ядерць, їх форма, розмір та структура корелюють з проліферативним потенціалом клітини, ступенем диференціювання та плоідністю ядра [5–8]. Морфологічні характеристики ядерця, детерміновані рівнем експресії рибосомних генів, активність яких може бути оцінена при забарвленні азотнокислим сріблом, дають можливість використовувати цей метод для виявлення і відповідно для оцінки функціонального стану ядерць [7, 9].

Метою роботи є морфометричне дослідження ядерць ЛПК хворих на рак ендометрія залежно від наявності онкопатології в їх родовадах.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріалом для дослідження були ЛПК 14 хворих на рак тіла матки віком від 41 до 68 років, які

перебували на лікуванні у відділенні онкогінекології Інституту онкології АМН України. На хворих заповнювали спеціально розроблені клініко-генеалогічні карти, в які вносили анамнестичні дані пацієнток, результати клінічного обстеження та інформацію про наявність у членів родини онкозахворювань. ЛПК пацієнток культивували згідно зі стандартною методикою [10]. Стан ядерць оцінювали в препаратах, забарвлених нітратом срібла за методом W.M. Howell, D.A.Black [11]. Аналіз препаратів проводили за допомогою цитологічного аналізатора «Інтеграл-2МТ», на якому обчислювали площу (мкм^2), периметр (мкм) і коефіцієнт форми ядер та здійснювали кількісну оцінку ядерць. Остання включала кількість окремих типів Ag-забарвлених ядерць на ядро [12] та відсоток лімфоцитів з виділеними типами ядерць. У кожному препараті аналізували до 100 ядер. Отримані результати дослідження піддавали статистичній обробці. Достовірними вважали зміни при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За даними клініко-генеалогічного обстеження хворі на рак тіла матки були розподілені на дві групи. До 1-ї групи віднесено 8 хворих без онкопатології у родовадах, до 2-ї — 6 пацієнток, у сім'ях яких у 2–3 родичів першого або другого ступеня спорідненості спостерігались злоякісні пухлини різного генезу. У 6 родичів першого ступеня спорідненості (батько, мати, сестри, брати) було виявлено рак шийки та тіла матки, легені, нирки, травного тракту та шкіри. В анамнезі 7 родичів другого ступеня спорідненості (тітки, дядьки, бабусі, дідусі) відзначено рак матки, молочної залози та травного тракту.

Результати цитометричного дослідження свідчать, що периметр ядер лімфоцитів достовірно збільшувався у хворих 2-ї групи ($44,1 \pm 0,04 \text{ мкм}$) порівняно з таким у хворих 1-ї групи ($41,0 \pm 0,04 \text{ мкм}$). Показники коефіцієнта форми ядер ядер коливались у межах

1,055–1,101, що свідчить про переважно округлу форму ядер в проаналізованій популяції клітин.

Площа досліджених ядер ЛПК у хворих 1-ї групи коливалась у межах 44,8–222,9 мкм², що в середньому дорівнювало $142,3 \pm 2,3$ мкм². В той самий час у хворих 2-ї групи діапазон коливань цього показника був більшим ($55,2$ – $299,3$ мкм²) і середнє значення площі ЛПК було достовірно вищим ($157,2 \pm 2,4$ мкм²), ніж у хворих 1-ї групи (таблиця).

Таблиця
Дані цитометричного дослідження ядер та кількість ядерців у ЛПК хворих на рак тіла матки (M ± m)

Група хворих	Кількість проаналізованих ядер	Середня площа ядер (чисельник та її коливання (знаменник), мкм ²)	Типи ядерців та їх середня кількість на ядро		
			Компактні ядерця	Кластери гранул	Дискретні гранули
1-ша	800	$142,3 \pm 2,3$ 44,8 – 222,9	$0,53 \pm 0,06$	$0,73 \pm 0,06$	$5,07 \pm 0,13$
2-га	600	$157,2 \pm 2,4^*$ 55,2 – 299,3	$0,89 \pm 0,08^*$	$0,87 \pm 0,11$	$2,93 \pm 0,14^*$

* $p < 0,05$ порівняно з хворими 1-ї групи.

Результати обчислення площі ядер лімфоцитів дозволили нам виділити дві групи клітин: малі та великі. Малі лімфоцити мають площу, меншу за $78,5$ мкм², а великі — площу, більшу за $78,5$ мкм². Такий розподіл лімфоцитів за розміром проведено згідно з даними літератури [13]. Слід зазначити, що у хворих на рак тіла матки вміст малих лімфоцитів становив 31,6%, а вміст великих був у 2 рази більшим і дорівнював 68,4%. Великих лімфоцитів було більше у пацієнтів обох груп: 63,8 і 74,5% відповідно, при цьому у 1-й групі співвідношення малих і великих лімфоцитів становило 1 : 1,8, а у 2-й групі — 1 : 3.

При цитологічному аналізі ЛПК враховували морфологію Ag-збарвлених ядерців і виділяли наступні їх форми: ядерця у вигляді щільних чорних плям — компактні ядерця; ядерця переважно великого розміру, в яких чітко виявлялись окремі чорні гранули, які прилягали одна до одної, — кластери гранул; ядерця у вигляді невеликих чорних точок — дискретні гранули. Ці типи ядерців згідно з даними літератури відображають рівень експресії рибосомних генів: компактні ядерця є найбільш активними, кластери гранул — помірно активними, а дискретні гранули — мало активними щодо синтезу рРНК [12].

Як свідчать отримані дані, кількість ЛПК з компактними ядерцями у хворих з обтяженим онкоанамнезом дорівнювала $51,5 \pm 2,8\%$, що було достовірно вище, ніж у хворих без такого, у яких цей показник становив $40,1 \pm 2,7\%$. Вміст клітин з кластерами гранул у двох групах був практично однаковим, а кількість клітин з дискретними гранулами у хворих з обтяженим анамнезом була достовірно менша, ніж у пацієнток без онкопатології у родоводах (рис. 1).

Крім цього, у ЛПК хворих 2-ї групи достовірно ($p < 0,05$) збільшувалась середня кількість компактних ядерців на ядро ($0,89 \pm 0,08$) порівняно з хворими 1-ї групи ($0,53 \pm 0,06$). Кількість ядерців у вигляді кластерів гранул також була більшою у ЛПК хворих 2-ї групи ($0,87 \pm 0,11$) у порівнянні з пацієнтками 1-ї групи ($0,73 \pm 0,06$), але ця різниця не була

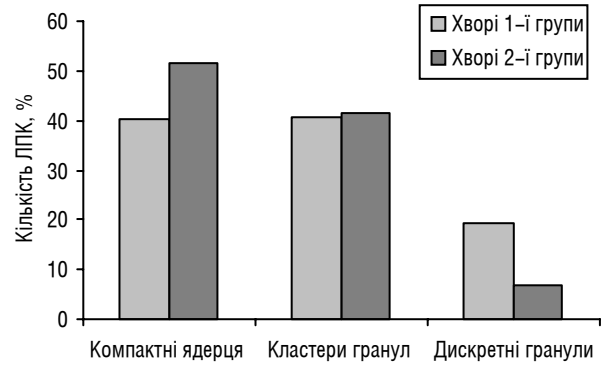


Рис. 1. Кількість ЛПК з різними типами ядерців у хворих на рак тіла матки

достовірною (див. таблицю). Аналіз середньої кількості ядерців у вигляді дискретних гранул свідчить, що цей тип ядерців переважав порівняно з іншими типами ядерців як у групі хворих з необтяженим онкоанамнезом, так і в групі хворих з онкопатологією у родоводі. Разом з тим у хворих 1-ї групи середня кількість дискретних гранул ($5,07 \pm 0,13$) була достовірно більшою ($p < 0,05$) за такі ж показники у хворих 2-ї групи ($2,93 \pm 0,14$).

Оскільки компактні ядерця є найбільш активними, то безперечно важливим є аналіз розподілу ЛПК за кількістю ядерців цього типу. Як видно з рис. 2, у хворих на рак тіла матки обох груп переважали клітини з одним компактным ядерцем. В той же час у хворих 2-ї групи спостерігалась виражена варіабельність ЛПК за кількістю ядерців, тобто достовірно збільшувалась число ЛПК з 2 і 3 ядерцями і з'являлись клітини, які містили 7 і 8 ядерців цього типу.

Таким чином, у хворих на рак тіла матки встановлено не тільки морфологічну, але й функціональну гетерогенність популяції стимульованих ЛПК з різною напруженістю транскрипційної активності ядерців.

У процесі бластної трансформації під впливом ФГА лімфоцити постійно перетворюються у великі клітини, і виділення проміжних стадій є умовним, при цьому популяція бластних клітин настільки ж різномірною морфологічно, як і вихідна фракція лімфоцитів. Тобто трансформовані клітини, які пройшли одну відстань на шляху від спокою до міто-

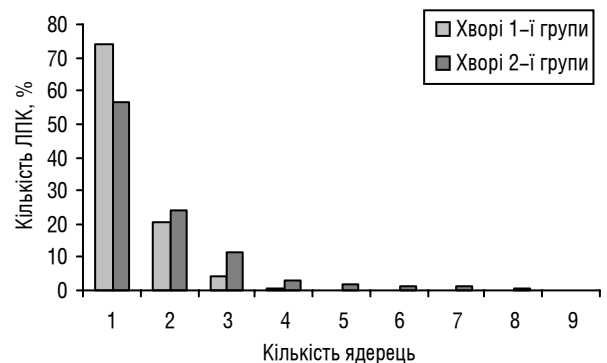


Рис. 2. Розподіл ЛПК хворих на рак тіла матки за кількістю компактних ядерців

зу, можуть бути подібними тільки в загальних рисах, а саме за морфометричними показниками [13].

Виявлене нами збільшення площі ядер з одночасним переважанням високоактивних компактних та кластерних ядерця у ЛПК хворих на рак ендометрія з онкопатологією у родоводі, можливо, обумовлено тим, що лімфоцити цих хворих більш чутливі до дії мітогенів (ФГА) і характеризуються більш високим рівнем біосинтетичних процесів. Підтвердженням останнього положення є також більш виражена у хворих 2-ї групи варіабельність кількості клітин за вмістом компактних ядерця, які є найбільш активними за синтезом рРНК.

Враховуючи той факт, що матеріальною основою організації та функціонування ядерця є ядерцеутворювальні райони (ЯУР) хромосом [3, 5], то можна вважати, що виявлені зміни відображають підвищений рівень експресії рибосомних генів у соматичних клітинах хворих на рак ендометрія. Ці дані узгоджуються з результатами проведених нами досліджень з вивчення особливостей ЯУР хромосом ЛПК жінок, хворих на рак ендометрія, при якому встановлено достовірне збільшення активності ЯУР хромосом 13, 21 і 22 акроцентричних хромосом у ЛПК хворих на рак тіла матки у порівнянні з контролем [14]. Така відмінність у показниках, ймовірно, зумовлена реактивацією «мовчазних» копій рибосомних генів [15] під впливом підвищеного вмісту естрогенів у крові хворих на рак тіла матки, що відіграє провідну роль у патогенезі захворювання. На наш погляд, встановлений підвищений рівень активності рибосомних генів у ЛПК хворих на рак тіла матки, в родах яких спостерігаються онкозахворювання, зумовлений не тільки комплексною дією — гіперестрогенією та підвищеною здатністю ЛПК до відповіді на проліферативні стимули, але й особливостями ЯУР, що відносяться до гетерохроматинових районів хромосом. Останні надають геному структурну і функціональну динамічність, яка, за нашими даними, більш виражена в ЛПК пацієнток з обтяженим онкоанамнезом, що є ще одним підтвердженням існування нестабільності геному соматичних немалігнізованих клітин хворих на рак.

ЛІТЕРАТУРА

1. Поліщук ЛЗ, Несіна ІП, Неспрядько СВ, Воробйова ЛЛ. Клінічні та біологічні особливості раку ендометрія у хворих менопаузального періоду. Педіатрія акушер гінекол 1998; (1): 157–9.
2. Поліщук ЛЗ, Налескіна ЛА, Бучинська ЛГ, Несіна ІП. Роль генетичної нестабільності у розвитку злоякісних новоутворень. В: Шляхи та перспективи розвитку експериментальної онкології в Україні. Київ: ДІА, 2001: 35–45.
3. Бучинская ЛГ, Полищук ЛЗ, Ганина КП. Морфофункциональные особенности ядрышек при железистой гиперплазии и раке эндометрия. Цитол генет 1992; 26: 3–7.
4. Зацепина ОВ. Трехмерная организация и транскрипция рибосомных генов в ядрышке. Цитология 1997; 39: 60–1.

5. Мамаев НН. Структурная организация и экспрессия рибосомных генов в физиологических и патологических условиях. Цитология 1997; 39: 80.

6. Штейн ГИ, Кудрявцев БН. Морфометрическое исследование окрашенных серебром ядрышек в одноядерных и двухядерных гепатоцитах крысы. Цитология 1997; 39: 775–83.

7. Nagami H, Tamura K, Kin S, et al. Nucleolar organizer regions in invasive ductal carcinoma of the pancreas: quantitative and qualitative evaluation in predicting biologic potential and prognosis. J Exp Clin Cancer Res 1996; 15: 71–6.

8. Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, et al. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. Cancer 1996; 77: 164–71.

9. Trere D. AgNOR staining and quantification. Micron 2000; 31: 127–31.

10. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, et al. Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exper Cell Res 1960; 20: 613–6.

11. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1-step method. Experientia 1980; 36: 1014–5.

12. Van Der Elst J, Deleener A, Verschaevae L, et al. Comparison of metaphase and interphase nucleolar activity in HeLA-CCL2 cells and PHA-stimulated human lymphocytes. Cancer Genet Cytogenet 1984; 13: 209–25.

13. Линг НР. Стимуляция лимфоцитов. М.: Медицина, 1971. 287 с.

14. Бучинская ЛГ, Полищук ЛЗ, Ганина КП. Особенности функционирования ядрышкообразующих районов хромосом у больных раком эндометрия. Цитол генет 1995; 29: 32–7.

15. Вейко НН, Ляпунова НА, Богуш АИ, Спитковский ДМ. Рибосомные гены человека содержат в транскрибируемой области белки, прочно связанные с ДНК. Мол биол 1998; 32: 629–34.

PECULIARITIES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE NUCLEOLI IN PATIENTS WITH CORPUS UTERI CANCER

L.G. Buchinska, I.P. Nesina,
N.I. Tkachenko, L.Z. Polischuk

Summary. A morphometric investigation of Ag-stained nucleoli of peripheral blood lymphocytes in patients with corpus uteri cancer depending on the presence or absence of tumors in their pedigrees was carried out. Patients with oncopathology in families showed a considerable increase in the size of lymphocyte nucleoli, predominance of the contents of the most active nucleolus forms, and more pronounced heterogeneity of nucleolar characteristics of lymphocytes. These findings testify to a higher level of biosynthetic processes in lymphocytes of this group of patients.

Key Words: nucleolus, lymphocytes, corpus uteri cancer.

Адреса для листування:

Бучинська Л.Г.

Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького 30022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: lubov@onconet.kiev.ua