

Т.Н. ТУГАНОВА, Л.С. БОЛГОВА,  
О.И. АЛЕКСЕЕНКО, М.Г. МАХОРТОВА

Институт онкологии АМН Украины, Киев

## КАЧЕСТВЕННЫЕ И СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РЕГИОНОВ ХРОСОМ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



*На Ag-положительном пункционном материале 50 больных с диагнозом железистого рака молочной железы проведено качественное дифференцированное исследование и подсчет 44 404 основных морфофункциональных типов ядрышек. Показано соответствие различных по степени активности морфофункциональных типов ядрышек и внеядрышковых аргентофильных гранул степени пролиферативной активности, злокачественной трансформации и дистрофических изменений опухолевых клеток.*

© Т.Н. ТУГАНОВА, Л.С. БОЛГОВА, О.И. АЛЕКСЕЕНКО,  
М.Г. МАХОРТОВА, 2005

**Введение.** Применяемая в последние годы высокоспецифичная и в достаточной мере объективная методика серебрения кислых негистоновых белков позволяет не только выявлять ядрышкообразующие регионы хромосом, но и определять степень их активности, непосредственно связанную со структурой и функциональным состоянием исследуемых клеток [1—15]. Экспрессия аргентофильных белков, ассоциированных с областями ядрышковых организаторов, значительно повышена в злокачественных новообразованиях по сравнению с клетками и тканями в норме, различными диспластическими, пролиферативными процессами и доброкачественными опухолями [1—8, 14—17]. Ряд авторов указывают на суперэкспрессию аргентофильных белков в активно пролиферирующих клетках злокачественных опухолей [6, 7, 14, 15, 17]. О степени проявления аргирофилии ядер в зависимости от пролиферации эпителия молочной железы и наличии признаков злокачественности опухолевых клеток в литературе нет единого мнения. Так, одни авторы считают, что высокое содержание аргентофильных белков является объективным маркером низкодифференцированных и активно пролиферирующих клеток при раке молочной железы, при этом экспрессия аргентофильных белков коррелирует с прогнозом у больных раком молочной железы — риском развития отдаленных метастазов и генерализации процесса [12, 13, 18, 19], другие авторы не обнаруживают связи между экспрессией аргентофильных белков и степенью дифференцировки клеток опухоли [20]. В приведенных в литературе данных отражается общая тенденция увеличения количества аргентофильных гранул (АГ) при злокачественных процессах в молочной железе, подчеркивается диагностическая ценность определения экспрессии аргентофильных гранул при раке молочной железы [21]. В единичных работах показана попытка изучения некоторых морфофункциональных типов ядрышек, которые формируются и выявляются на основе определенной топографии аргентофильных гранул [5, 10].

Работа предпринята с целью изучения структурных особенностей проявления ядрышкообразующих регионов хромосом рака

молочной железы на основе исследования особенностей распределения (топографии), размерных градаций аргентофильных гранул, качественного типирования основных морфофункциональных типов ядрышек, выявляемых при световом микроскопировании.

**Материал и методы.** Проведено исследование цитологических препаратов Ag-положительного пункционного материала 50 больных с диагнозом железистого рака молочной железы. На основании качественного дифференцирования и количественного подсчета аргентофильных гранул, особенностей их распределения определено абсолютное, процентное, общее и среднее содержание различных по степени активности морфофункциональных типов ядрышек, а также количество и характер распределения внеядрышковых аргентофильных гранул (ВАГ).

Исследование ядрышкообразующих регионов хромосом проведено на основании изучения цитограмм пункционного материала больных в возрасте от 35 до 71 года, преобладавал возрастной диапазон от 47 до 63 лет; средний возраст больных — 53,3 года.

Изучение характера распределения АГ и их размерных градаций проведено в 3750 ядрах клеток железистого рака молочной железы преимущественно умеренной степени дифференцировки. При этом исследовано 44 404 основных морфофункциональных типов ядрышек. Изучены также топография, размерная градация и процентное соотношение АГ в ядрышках нуклеолонемного типа для выявления процентного содержания высокоактивных ядрышек переходного, нуклеолонемно-компактного типа.

Для выявления ядрышкообразующих регионов хромосом в архивных цитологических препаратах применяли модифицированный метод окраски серебром по Howell W., Black D. [22]. Исследование ЯОР и морфофункциональное типирование ядрышек проводили в соответствии с классификацией П.В. Челидзе, О.В. Зацепиной (1988 г.) при последовательном 900- и 1440-кратном увеличении иммерсионной оптической системы светового микроскопа МБИ-15-2.

Сложность восприятия и интерпретации ядрышкообразующих регионов хромосом определяет содержание гранул условно абсолютным, визуально воспринимаемым числовым выражением, что, однако, не препятствует оценке количественного содержания аргентофильных белков (AgNORS) в качестве объективного показателя степени пролиферации и малигнизации исследуемых клеток [3].

Полученные показатели проведенных и статистически обработанных исследований ядрышкообразующих регионов хромосом представлены на рисунках и в таблицах.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Общее количество исследованных морфофункциональных типов ядрышек в пункционном материале больных с диагнозом рак молочной железы подсчитано в 3750 ядрах и составило 44 404, из них высокоактивных ядрышек компактного типа — 214 (0,5 %), нуклеолонемных — 6605 (14,8 %), малоактивных кольцевидных — 6517 (14,7 %), неактивных микроядрышек — 31 068 (70 %) (рис. 1—3).

Наиболее часто выявляются показатели процентного содержания компактных ядрышек, равные 0,3 % (12 больных), реже — 0,4 % (8 больных) и 0,6 % (7 больных); в материале остальных больных данные показатели распределились со следующей частотой: 0,5 % (6 больных); 0,2 % (5 больных); 0,8 % (5 больных); 0,9 % (4 больные); 0,7 % (2 больные) и 0,1 % (1 больная). Максимальные показатели процентного содержания нуклеолонемных ядрышек находились в диапазоне от 20,0 до 22,2 % у 4 больных, минимальные — от 10,0 до 13,9 % у 17 больных. Преобладающими были показатели средних значений — от 14,0 до 17,8% у 29 больных.

Таким образом, в спектре показателей процентного содержания высокоактивных ядрышек выявлено значительное преобладание ядрышек нуклеолонемного типа.

Диапазон показателей процентного содержания малоактивных кольцевидных ядрышек несколько шире. В нем преобладает спектр показателей средних значений от 14,0 до 19,2 % у 24 больных, минимальные показатели варьируют от 9,6 до 13,9 % у 22

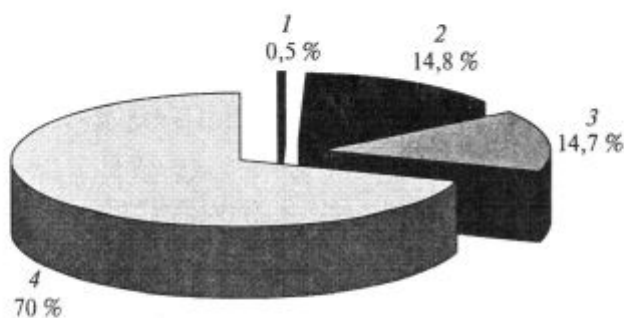


Рис. 1. Показатели процентного содержания основных морфофункциональных типов ядрышек в опухолевых клетках рака молочной железы: 1 — компактные ядрышки; 2 — нуклеолонемные ядрышки; 3 — кольцевидные ядрышки; 4 — микроядрышки

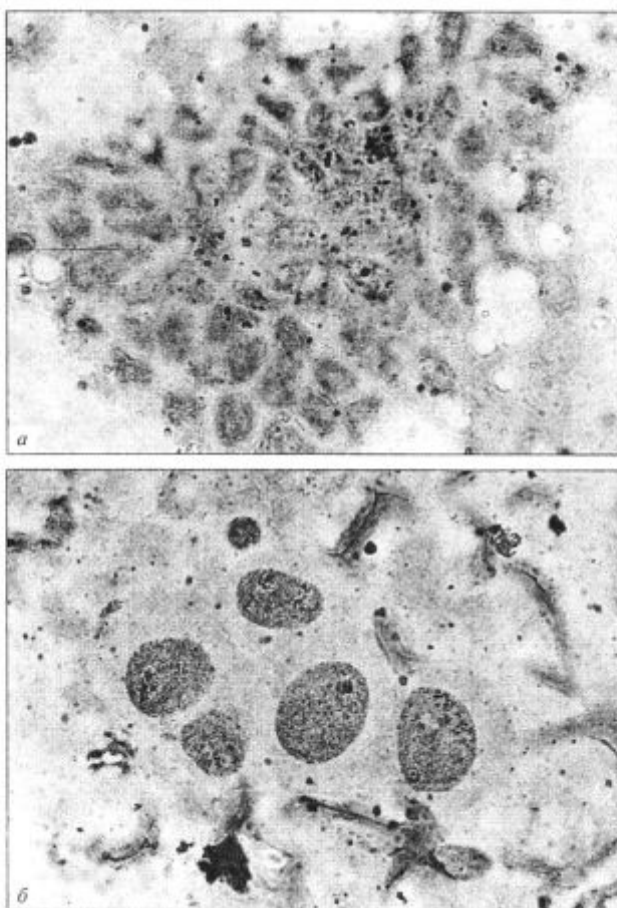


Рис. 2. Цитологический препарат умереннодифференцированного железистого рака. Основные морфофункциональные типы ядрышек (а), различные варианты высокоактивных ядрышек переходного типа (б). Окраска по Howell W., Black D. (модификация); а —  $\times 400$ ; б —  $\times 1000$

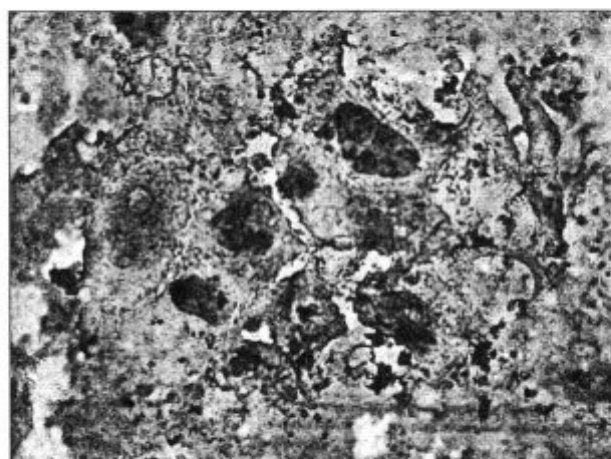


Рис. 3. Цитологический препарат умереннодифференцированного железистого рака молочной железы с резко выраженными дистрофическими изменениями. Морфофункциональные типы ядрышек, неравномерное распределение внеядрышковых аргентофильных гранул в виде бороздок и скоплений, маргинально. Окраска по Howell W., Black D. (модификация);  $\times 1000$

больных, максимальные — от 21,6 до 27,5 % выявлялись значительно реже (4 больных).

Наиболее высокими, отражающими степень выраженности дистрофических процессов в препаратах железистого рака молочной железы, оказались показатели процентного содержания неактивных микроядрышек, которые составили у преобладающего большинства больных от 60,3 до 77,3 % (47 больных), значительно реже — от 49,7 до 56,0 % у 3 больных и незначительно варьировали в пределах данных количественных значений.

Визуально воспринимаемое среднее содержание компактных ядрышек колебалось от  $0,02 \pm 0,004$  до  $0,14 \pm 0,006$  в одном ядре, при этом в группе исследованных больных средний показатель ( $M_{cp}$ ) составил  $0,057 \pm 0,002$ . Доминировал диапазон показателей компактных ядрышек в одном ядре от  $0,04 \pm 0,008$  до  $0,06 \pm 0,004$  у 27 больных, от  $0,08 \pm 0,008$  до  $0,11 \pm 0,012$  у 12 больных, от  $0,02 \pm 0,002$  до  $0,03 \pm 0,004$  у 9 больных. Относительно высокие показатели среднего содержания компактных ядрышек в пределах от  $0,11 \pm 0,008$  до  $0,14 \pm 0,006$  наблюдались всего у 2 больных.

Содержание ядрышек нуклеолонемного типа варьировало от  $1,22 \pm 0,001$  до  $2,21 \pm$

Таблица 1

## Характеристика аргентофильных гранул нуклеолонемных ядрышек в ядрах опухолевых клеток больных раком молочной железы

Характер исследуемого материала	Количество		Расположение аргентофильных гранул		Процентное содержание аргентофильных гранул					
	ядер	ядрышек	п	п+ц	п/т	м	с	ед.к	к	
Пунктаты опухолей молочной железы (n = 50)	3750	6605	24,70 ± 0,185	75,30 ± 0,148	4,18 ± 0,085	26,55 ± 0,102	38,90 ± 0,080	12,27 ± 0,095	18,10 ± 0,125	30,37 ± 0,110

Примечание. n — количество больных; п — периферическое расположение аргентофильных гранул; п + ц — сочетанное расположение аргентофильных гранул — периферическое и центральное; п/т — пылевидные, точечные аргентофильные гранулы; м — мелкие гранулы; с — средние гранулы; ед.к — единичные крупные гранулы; к — крупные гранулы.

Таблица 2

## Характеристика внеядрышковых аргентофильных гранул в ядрах опухолевых клеток больных раком молочной железы

Характер исследуемого материала	Количество ядер	Количество гранул		Распределение внеядрышковых аргентофильных гранул								
		небольшое	умеренное	равномерное	неравномерное						б+м	с+б+м
					пс	рс	б	м	пс+б	пс+м		
Пункционный материал (n = 50)	3750	8,50 ± 0,322	91,50 ± 0,250	3,20 ± 0,120	3,30 ± 0,110	4,90 ± 0,212	48,90 ± 0,310	4,00 ± 0,075	8,20 ± 0,093	2,80 ± 0,075	21,70 ± 0,131	3,00 ± 0,050

Примечание. n — количество больных; пс — плотные скопления внеядрышковых аргентофильных гранул; рс — рыхлые скопления внеядрышковых аргентофильных гранул; б — расположение гранул в виде бороздок различной ширины; м — маргинальное расположение гранул (прерывистое и сплошное).

$\pm 0,016$  в одном ядре ( $M_{cp} = 1,80 \pm 0,030$ ). Среди нуклеолонемных ядрышек преобладали показатели среднего содержания от  $1,90 \pm 0,024$  до  $2,22 \pm 0,024$  у 23 больных, несколько реже — показатели от  $1,64 \pm 0,020$  до  $1,88 \pm 0,012$  у 18 больных и от  $1,22 \pm 0,010$  до  $1,49 \pm 0,030$  — в опухолевых клетках 9 пациенток.

Среднее содержание малоактивных ядрышек кольцевидного типа варьировало от  $1,19 \pm 0,024$  до  $2,44 \pm 0,030$  ( $M_{cp} = 1,74 \pm 0,014$ ). Основной спектр показателей кольцевидных ядрышек находился в диапазоне от  $1,52 \pm 0,018$  до  $1,89 \pm 0,018$  (34 больные). Относительно высокие показатели — от  $1,90 \pm 0,018$  до  $2,44 \pm 0,030$  выявлены у 11 больных и минимальные — от  $1,10 \pm 0,024$  до  $1,48 \pm 0,020$  — в цитологическом материале 5 пациенток. Среднее содержание неактивных микроядрышек варьировало от  $3,14 \pm 0,030$  до  $12,28 \pm 0,144$  ( $M_{cp} = 8,30 \pm 0,058$ ). При этом с приблизительно одинаковой частотой выявлялись диапазоны показателей от  $6,20 \pm 0,112$  до  $8,92 \pm 0,116$  в исследуемом материале 22 пациенток и от  $9,19 \pm 0,056$  до  $12,28 \pm 0,144$  — у 21 больной. Значительно реже (у 7 пациенток) отмечены показатели средних значений — от  $3,14 \pm 0,030$  до  $5,92 \pm 0,124$ .

Показатели всех выявляемых основных морфофункциональных типов ядрышек находились в широком диапазоне от  $3,16 \pm 0,106$  до  $15,92 \pm 0,243$ , показатель среднего содержания всех типов ядрышек на одно ядро в группе исследованных больных составил  $11,897 \pm 0,079$ .

Среди высокоактивных форм ядрышек преобладали нуклеолонемные варианты, умеренно варьирующие по величине и форме (рис. 2, а, б). Аргентофильные гранулы в них располагались в  $75,30 \pm 0,148$  % наблюдений периферически и центрально, образуя высокоактивные ядрышки нуклеолонемно-компактного, переходного типа (табл. 1). В нуклеолонемных ядрышках при этом доминировали АГ средних (С) размеров —  $38,90 \pm 0,080$  %. Крупные (К) гранулы в них составили  $30,37 \pm 0,110$  %, мелкие (М) —  $26,55 \pm 0,102$  %, точечные и пылевидные (Т, П) —  $4,18 \pm 0,085$  %. Показатели процентного со-

держания АГ в высокоактивных ядрышках нуклеолонемного типа были представлены в исследованном материале в количественном соотношении

$$C : K : M : T/P = 9 : 7 : 6 : 1.$$

Внеядрышковые аргентофильные гранулы выявлялись в ядрах исследованного материала в умеренном ( $91,50 \pm 0,250$  %) и небольшом ( $8,50 \pm 0,32$  %) количестве (табл. 2). В  $96,80 \pm 0,122$  % ядер АГ распределялись неравномерно (рис. 3). Преобладало расположение гранул в виде различной ширины бороздок ( $48,90 \pm 0,310$  %), часто — в виде сочетания широких и узких бороздок и маргинального расположения гранул ( $21,70 \pm 0,131$  %), реже — в виде плотных скоплений и варьирующих по ширине бороздок ( $8,20 \pm 0,131$  %), маргинального расположения ( $4,00 \pm 0,075$  %), рыхлых ( $4,90 \pm 0,212$  %) и плотных ( $3,30 \pm 0,110$  %) скоплений, сочетания скоплений, бороздок и маргинального расположения различной ширины и интенсивности ( $3,00 \pm 0,050$  %;  $2,80 \pm 0,015$  %). Относительно равномерно, дисперсно распределялись ВАГ в  $3,20 \pm 0,120$  % исследованных ядер опухолевых клеток.

Большой разброс показателей морфофункциональных типов ядрышек, часто с наслаивающимися или перекрещивающимися крайними и средними значениями в пределах исследуемой группы больных, проявляется, тем не менее, общей тенденцией роста количественных показателей, являющихся отражением степени пролиферативных и дистрофических процессов опухолевых клеток молочной железы.

Проведенные исследования основного спектра показателей морфофункциональных типов ядрышек в пункционном цитологическом материале железистого рака молочной железы выявили в ядрах опухолевых клеток в  $14,8$  % преобладание высокоактивных форм ядрышек нуклеолонемного типа, которые были образованы преимущественно сочетанием средних ( $38,90 \pm 0,080$  %), крупных ( $30,37 \pm 0,110$  %) и мелких ( $26,55 \pm 0,102$  %) аргентофильных гранул. Компактные ядрышки в небольшом количестве ( $0,5$  %) определялись при каждом проведен-

ном исследовании. Малоактивные кольцевидные ядрышки выявлялись в 14,8 % наблюдений. Наибольшие колебания отмечены в показателях среднего содержания неактивных вариантов — микроядрышек, что объясняется различной степенью выраженности дистрофических изменений опухолевых клеток исследуемой группы больных.

Таким образом, показатели морфофункциональных типов ядрышек отражают высокую пролиферативную активность злокачественных клеток рака молочной железы. Использование данных показателей в процессе цитологического исследования является источником дополнительной диагностической информации при идентификации карцином молочной железы.

**SUMMARY.** Qualitative differentiated study and calculation of 44404 main morphofunctional types of nucleoli has been performed on Ag-positive punctum specimens from 50 patients with glandular breast cancer. Accordance of different for their activity morphofunctional types of nucleoli and extranucleolar argentofil granules to proliferative activity rates, malignant transformation and dystrophic changes of tumor cells has been demonstrated.

**РЕЗЮМЕ.** На Ag-позитивному пункційному матеріалі 50 хворих з діагнозом залозистого раку молочної залози проведено якісне диференційоване дослідження і підрахунок 44 404 основних морфофункціональних типів ядерць. Показано відповідність різних за ступенем активності морфофункціональних типів ядерць і позаядерцевих аргентофільних гранул ступеню проліферативної активності, злоякісної трансформації та дистрофічних змін пухлинних клітин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Боташева В.С.* Показатели активности ядрышковых организаторов при патологии щитовидной железы // *Арх. патологии.* — 2000. — **62**, № 1. — С. 21—24.
2. *Бучинская Л.Г., Полищук Л.З.* Районы ядрышкового организатора в клетках эндометрия при железистой гиперплазии и раке // *Эксперимент. онкология.* — 2001. — **23**, № 3. — С. 157—160.
3. *Бучинская Л.Г.* Экспрессия ядрышкообразующих регионов хромосом — новый цитогенетический маркер малигнизации / *Проблемы онкогенетики: научные и прикладные аспекты* : Материалы 3-й Междунар. науч.-практ. конф. // *Онкология.* — 2002. — **4**, приложение. — С. 8—9.
4. *Дубенская Л.И., Баженов С.М.* Белки, ассоциированные с зонами организатора: практическое применение в онкоморфологии и связь с биологическими особенностями опухоли // *Арх. патологии.* — 1992. — **54**, № 4. — С. 40—43.
5. *Лебекова Ж.Т., Шибанова А.И.* Определение активности ядрышкоорганизующих зон в дифференциальной диагностике заболеваний молочной железы // *Новости клин. цитологии России.* — 2000. — **4**, № 3/4. — С. 90—92.
6. *Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Баронин А.А. и др.* Экспрессия аргирофильных белков областей ядрышкового организатора как показатель степени зрелости, доброкачественности и злокачественности опухолей надпочечника // *Арх. патологии.* — 2002. — **64**, № 3. — С. 26—31.
7. *Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А. и др.* Значение аргирофильных белков областей ядрышковых организаторов как маркеров степени злокачественности анапластической крупноклеточной лимфомы и лимфомы Ходжкина // *Арх. патологии.* — 2004. — **66**, № 5. — С. 30—34.
8. *Туганова Т.Н., Болгова Л.С., Махортова М.Г., Алексеенко О.И.* Морфофункциональные типы ядрышек в цитологической диагностике фиброаденом и рака молочной железы // *Новости клин. цитологии России.* — 2004. — **8**, № 1/2. — С. 27—30.
9. *Упоров А.В., Цырлина Е.В., Пожарисский К.М.* Сравнительное изучение пролиферации (по выявлению антигена Ki-67) и активности ядрышковых организаторов клеток рака молочной железы // *Вопр. онкологии.* — 1998. — **44**, № 3. — С. 316—324.
10. *Фролова О.Е.* Морфофункциональная характеристика моноцитов. Значение исследования нуклеолярного аппарата (обзор литературы) // *Клин. лаб. диагностика.* — 1998. — № 10. — С. 3—8.
11. *Цыганков В.И., Мельникова Н.П., Могилева Г.Л., Выборов С.Г.* Морфотипы ядер железистого эпителия при доброкачественных и злокачественных заболеваниях молочных желез // *Клин. лаб. диагностика.* — 2004. — № 1. — С. 43—45.
12. *Aaltomaa S., Lipponen P., Syrjanen K.* Nucleolar organizer regions related to morphometry, flow cytometry, sex steroid receptor content, tumour histology and prognosis in female breast cancer // *Path. Res. Pract.* — 1993. — **189**. — P. 416—421.
13. *Ceccarelli C., Trere D., Santini D. et al.* AgNORs in Bre-

- ast tumors // *Micron*. — 2000. — **31**, № 2. — P. 143—149.
14. *Derenzini M., Betts V., Trere D. et al.* Diagnostic value of silver-stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumors // *Ultrastruct. Pathol.* — 1990. — **14**, № 3. — P. 233—247.
  15. *Derenzini M., Sirri V. et al.* Nucleolar organizer regions in tumor cells // *Cancer J.* — 1994. — **7**, № 2. — P. 71—77.
  16. *Derenzini M., Trere D.* AgNOR proteins as parameter of rapidity of cell proliferation // *Zbl. Pathol.* — 1994. — **140**, № 1. — P. 7—10.
  17. *Derenzini M., Trere D.* Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (AgNOR) // *Pathologica*. — 2001. — **93**, № 2. — P. 99—105.
  18. *Guski H., Hufnagl P., Kaufmann O. et al.* AgNOR analysis of atypical ductal hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast // *Anal. And Quant. Cytol. and Histol.* — 2000. — **22**, № 3. — P. 206—212.
  19. *Karmakar T., Radhika S., Gupta S.* Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOPs) in breast lesions — a study on fine needle aspirates // *Cytopathol.* — 1995. — **6**, № 1. — P. 5—13.
  20. *Rath-Wolson L., Hammel I., Halpern M. et al.* Nucleolar organizer regions in breast cytology material // *Acta Cytol.* — 1995. — **39**, № 5. — P. 852—857.
  21. *Lorenzato M., Abboud P., Lechki C. et al.* Proliferation assessment in breast cancer. A double staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry // *Micron*. — 2000. — **31**, № 2. — P. 151—159.
  22. *Болгова Л.С., Туганова Т.Н., Кузина И.С.* Модификация окраски по Howell W., Black D. на выявление ядрышкообразующих регионов хромосом при лимфопролиферативных заболеваниях. — НД — 26735. Рукопись депонирована в ГЦНМБ (Россия) 20.04.2001. WWW SCS MU. PSSi — 24.

Поступила 18.01.05