

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЯДРЫШЕК В КЛЕТКАХ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ЦЕРУМИНАЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗ КОШЕК.

Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины.
Бокарев А.В., Лаковников Е. А., Стекольников А. А., Белов М. В.

В работе представлены данные исследования гистологической структуры и клеточной морфологии доброкачественных и злокачественных новообразований церуминальных желез наружного слухового прохода у кошек. Гистологический метод исследования позволяет проводить различие только между доброкачественными и злокачественными формами, но не выявляет различий в морфологии между их неметастазирующими и метастазирующими вариантами. Цитологический метод диагностики данных новообразований при окраске красителем «Диф-Квик» не всегда позволяет выявлять морфологические отличия между клетками аденомы, аденокарциномы без признаков метастазирования и аденокарциномы с признаками метастазирования. Результаты цитологического исследования аргентофильных белков ядрышка дают четкое различие между доброкачественной аденомой, в которой доминируют ядрышки компактного типа, и злокачественным вариантом опухоли, содержащим нуклеонные ядрышки, но не выявляет различий между неметастазирующими новообразованиями и метастазирующими. В то же время дифференциальное окрашивание РНК по Браше показало, что ядрышки в клетках метастазирующей аденокарциномы обладают значительно более высокой пиронинофильностью, т.е. содержат гораздо большее количество рРНК, чем ядрышки в клетках аденокарциномы без признаков метастазирования. Цитологическое исследование биоптатов опухоли с использованием методов АгЯОР и Браше, может быть использовано для предоперационной диагностики степени злокачественности новообразований церуминальных желез кошек с целью дальнейшего планирования тактики фармакологического и хирургического лечения.

Ключевые слова и сокращения: опухоль, рак, церуминальные железы, клетка, ядро, ядрышко, Браше, пиронин, организаторы ядрышка (ЯОР), аргентофильные белки организаторов ядрышка (АгЯОР), рибонуклеиновая кислота (РНК), рибосомальная рибонуклеиновая кислота (рРНК).

Введение.

Опухоли церуминальных желез являются распространенной патологией слухового прохода у кошек и составляют 1 % - 2 % от всех кошачьих опухолей. Породная и половая принадлежность не являются причиной повышенной заболеваемости данной патологией. Но, как отмечает большинство исследователей, наиболее часто от неё страдают старые животные (15). Считается, что фактором риска для заболевания опухолями церуминальных желез является хронический отит, особенно сопровождающийся гиперпластическими процессами в наружном слуховом проходе и в самой церуминальной железе (14, 16). На начальной стадии заболевания клинические признаки не яв-

ляются специфическими и внешне выглядят как острый гнойно-гемморагический или хронический отит. В более поздние сроки течения заболевания опухоль непосредственно визуализируется в наружном слуховом проходе. В запущенных случаях, со стороны пораженного уха увеличены регионарные лимфатические узлы, что не всегда свидетельствует о злокачественности опухоли и ее метастазировании, а может быть обусловлено лимфаденитом. Клинические признаки поражения центральной нервной системы (вестибулярные нарушения, атаксия, паралич лицевого нерва, эписетус), так же могут встречаться, но могут быть обусловлены как метастатическим поражением ЦНС, так и осложнениями гнойного отита (менингит и менингоэнцефалит) (14, 18, 19, 23). Опухоли церуминальный желез кошек более чем в 65% бывают злокачественными и составляют 27% от всех злокачественных опухолей кожи. Не менее чем в 50% случаев, на момент первичной диагностики, уже имеются регионарные метастазы (15, 21). Но при внешнем осмотре невозможно сделать правильное заключение о доброкачественности опухоли. Как показывает практика, даже маленькие новообразования размером до 3 – 5 мм могут оказаться высоко злокачественными, а крупные образования размером более 10 мм – доброкачественными. Гистологический диагноз, поставленный уже после операции, лишь в малой степени влияет на тактику лечения и его исход (16). В то же время, крайне важно, еще до оперативного вмешательства, иметь объективные данные о биологических свойствах опухоли, которые, в свою очередь, могут быть взяты за основу при планировании предоперационной химиотерапии и уровня хирургического радикализма (20). Один из способов получения таких данных - это исследование морфофункциональных свойств ядрышка и районов организаторов ядрышка (ЯОР) в мазках отпечатках опухолевых клеток.

Район ядрышкового организатора (ЯОР) – это участок хромосомной ДНК, кодирующей рибосомную РНК (рДНК) и представленный множественными (несколько сотен) копиями генов рРНК: на каждом из которых синтезируются высокомолекулярные РНК-предшественники, которые превращаются в ко-

роткие молекулы РНК, входящие в состав субъединиц рибосом (1, 2, 4). РНК, в частности рРНК может быть визуализирована в цитологических препаратах окраской пиронином по методу Браше. Для визуализации материала белковой или липопротеидной природы ассоциированный с ЯОР и принимающий участие в их функционировании, в рутинных гистологических и цитологических исследованиях применяется метод серебрения. Техника окрашивания коллоидным серебром для выявления белков, ассоциированных с ЯОР, высоко специфична и данный метод получил общепринятое название AgЯОР (1, 4, 8). Морфология ядрышка и число Ag-позитивных ЯОР в клетках, в нормальных условиях, генетически обусловлены и зависят от типа изучаемой ткани, уровня ее дифференцировки, уровня ее пролиферативной активности и фазы клеточного цикла (1, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9), но могут изменяться при адаптивной или патологической трансформации клеток или действии на клетки ряда биологически активных веществ (4, 5, 9, 10). Известно, что при трансформации нормальных клеток в опухолевые уровень экспрессии аргентофильных белков в них, меняется в сторону увеличения (6, 13, 17). Изменение уровня экспрессии ядрышковых аргентофильных белков обуславливает, в свою очередь, появление специфической морфологической картины, как самих ядрышковых организаторов, так и ядрышка в целом. Данная морфологическая картина может служить объективным маркером злокачественности и пролиферативной активности опухолевых клеток (4, 5, 7, 11, 22). Но она индивидуальна для опухолей определенного гистогенеза (5, 11, 12, 13, 17). Поэтому маркерные характеристики ядрышка и ЯОР для каждого конкретного гистогенетического варианта опухолей необходимо изучать индивидуально.

На светооптическом уровне, с диагностической целью ядрышки удобно делить на: компактные – крупные с плотной упаковкой аргентофильного материала, нуклеонемные – крупные с большим количеством четко визуализируемых аргентофильных гранул и микроядрышки - неоднородная группа к которой относят ядрышки крайне малых размеров (9).

Цели и задачи исследования.

- 1- Исследовать морфологические особенности ядрышка и ядрышковых организаторов, а так же интенсивность синтеза рРНК, в клетках опухолей церуминальных желез кошек в зависимости от их злокачественности и способности к метастазированию.
- 2- На основании полученных результатов дать рекомендации по цитологической диагностике и прогностике опухолей церуминальных желез у кошек.

Материал и методы исследования.

Всего в исследовании был использован материал от 17 животных, у 4 из которых была диагностирована (стандартным гистологическим методом) доброкачественные, а у 13 злокачественные опухоли церуминальных желез. У 6 животных со злокачественной аденокарциномой имели место метастазы в регионарные лимфатические узлы и слюнные железы. В качестве материала для исследования были использованы биоптаты опухолей церуминальных желез, взятые от больных кошек различного возраста, пола и породы. Из биоптатов готовили мазки отпечатки, которые фиксировали в метаноле 10 минут. Оставшийся материал фиксировали в 10 % формалине и использовали для приготовления гистологических препаратов. Обзорную цитологическую окраску препаратов проводили двухкомпонентным красителем «Диф-Квик». Окраску препаратов для визуализации в клетках аргентофильных ядрышковых белков проводили 25% раствором AgNO_3 , содержащим желатин (1 мг/мл) и муравьиную кислоту (0.5 мг/мл) в течение 40 минут при комнатной температуре. Окраску препаратов для визуализации в клетках РНК проводили метиловым зеленым - пиронином по Браше в течении 60 минут. После окраски, промывания и сушки, препараты исследовали методом светоптической микроскопии на микроскопе «ЛЮМАМ И1» с цифровой камерой «Micrometrics 500 CU». Гистологические препараты изучали при увеличении

x100 и x400, цитологические - при увеличении x900 и x1450. Оценку цитологических параметров проводили в не менее чем в 100 клетках каждого препарата. «Захват» полученных изображений, их архивирование и последующую обработку проводили на персональном компьютере при помощи программы «ScopPhoto 2.04.».

Результаты исследования.

Результаты исследования, представленные на Рис.-1 свидетельствуют о том, что гистологический метод диагностики даёт различия только между доброкачественными и злокачественными формами новообразований церуминальных желез, но не выявляет различий в морфологии между их неметастазирующими и метастазирующими вариантами.

Различия на уровне клеточной морфологии, при окраске красителем «Диф-Квик», выражены еще в меньшей степени. Клетки всех вариантов опухоли: доброкачественной аденомы церуминальной железы (Рис.1-Б), злокачественной аденокарциномы без признаков метастазирования (Рис.1-Г) и злокачественной аденокарциномы с признаками метастазирования (Рис.1-Е) имеют сравнимые размеры ядра и четко выраженные ядрышки. На препаратах злокачественной аденокарциномы с признаками метастазирования, с субъективной точки зрения, размер ядрышек несколько больше, но этого не достаточно для объективной дифференциальной диагностики.

Результаты цитологического исследования аргентофильных белков ядрышка визуализируют четкое различие между доброкачественными и злокачественными вариантами опухоли. В ядрах клеток доброкачественной аденомы церуминальной железы содержится одно-два компактных ядрышка средней величины, в которых за счет плотной упаковки, с трудом визуализируются (Рис.2-А(1)) или не визуализируются (Рис.2-А(2)) несколько крупных аргентофильных гранул.

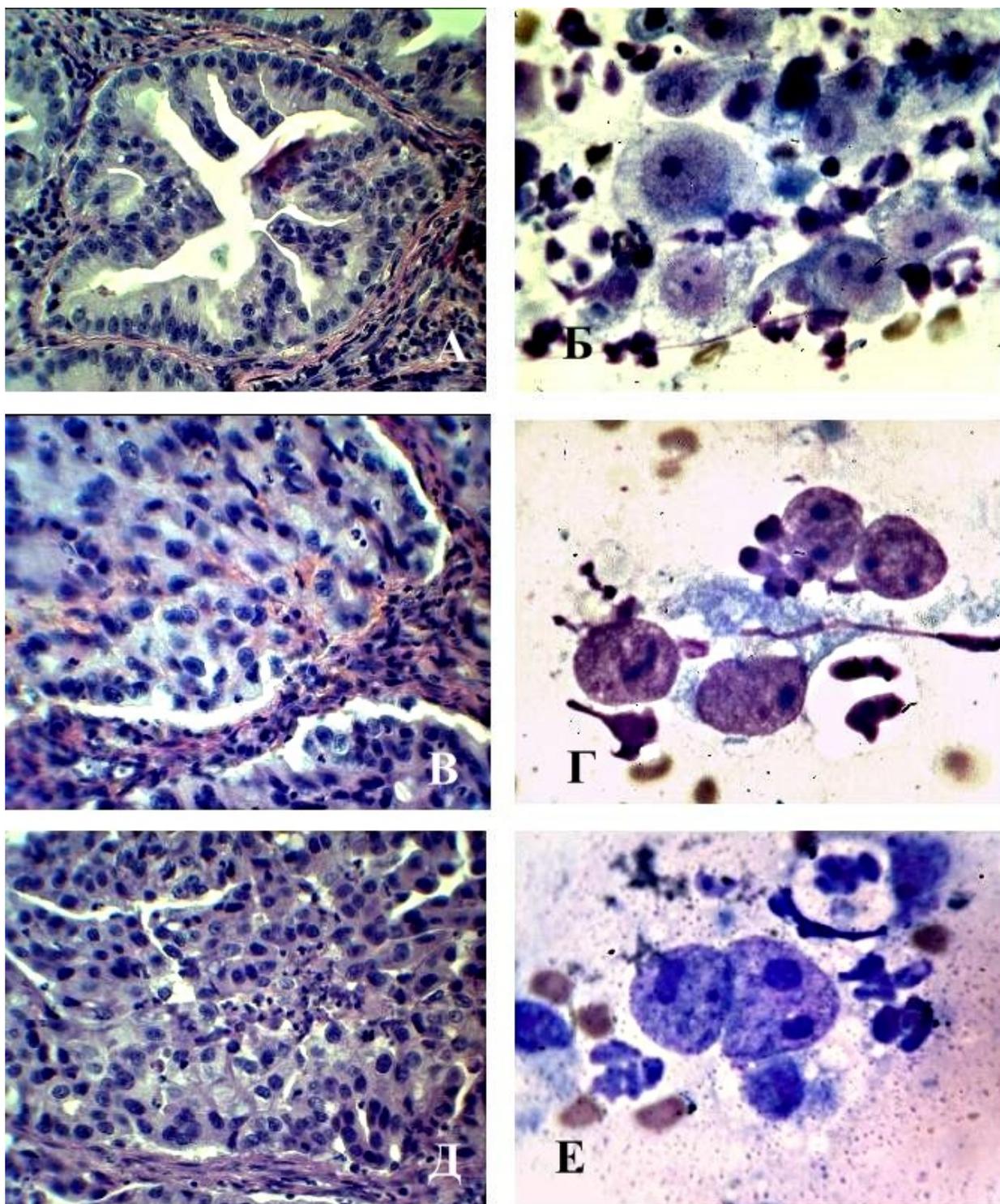


Рис.1 Гистоморфология и цитоморфология новообразований церумиальных желез наружного слухового прохода у кошек. А, Б – доброкачественная аденома. В, Г – злокачественная аденокарцинома без признаков метастазирования. Д, Е - злокачественная аденокарцинома с признаками метастазирования. (А, В, Д - увеличение X400. Б, Г, Е - увеличение X1450).

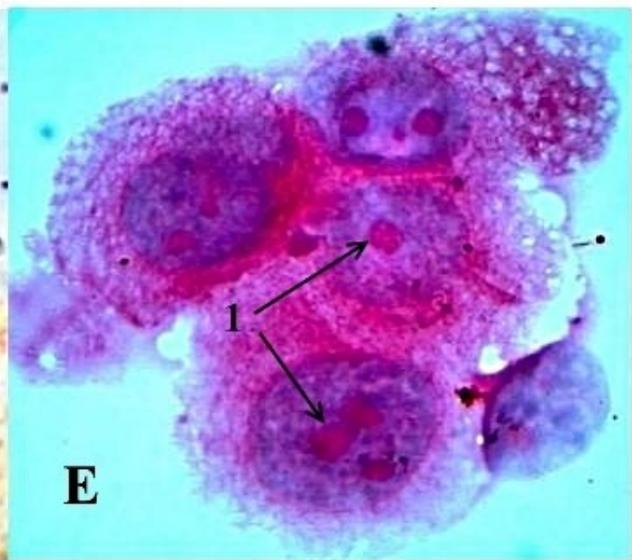
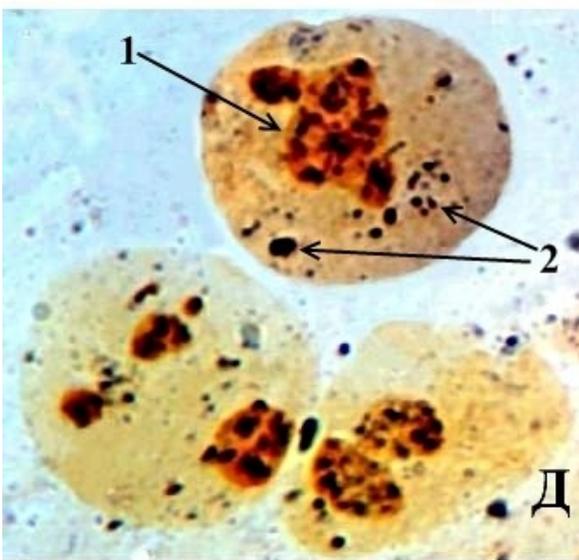
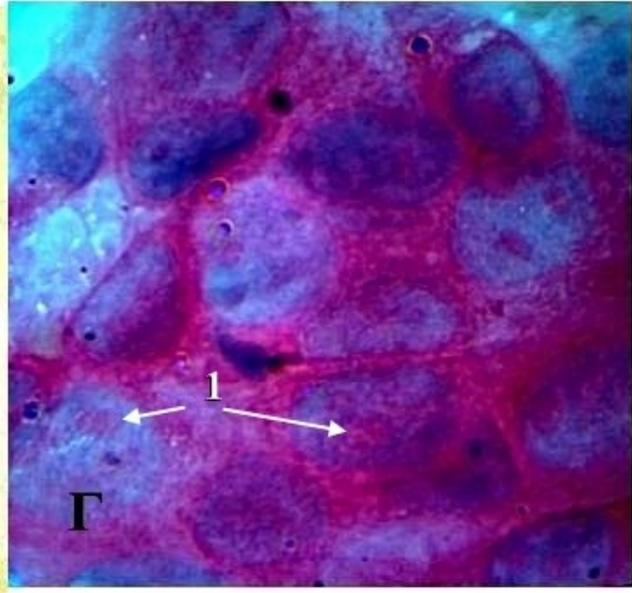
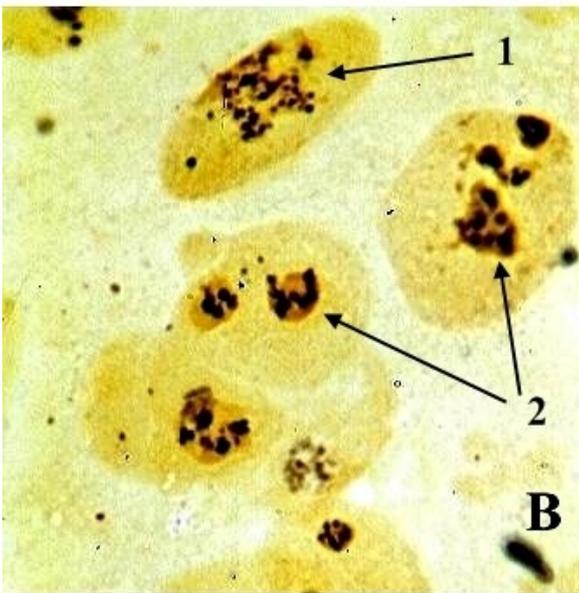
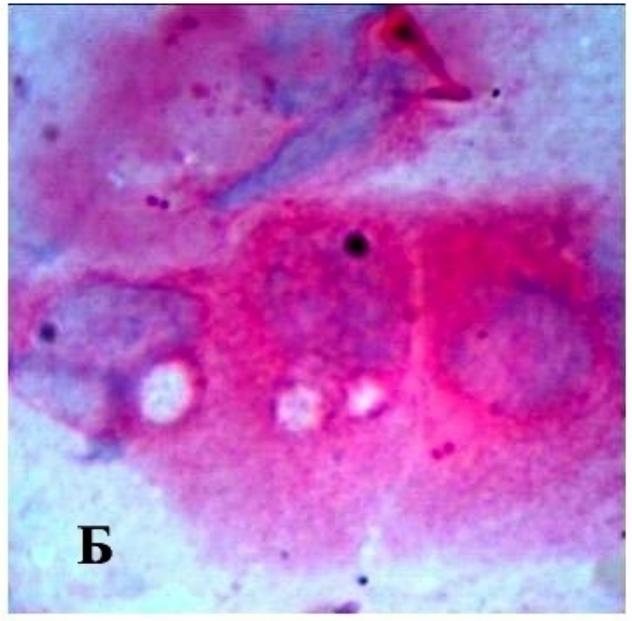
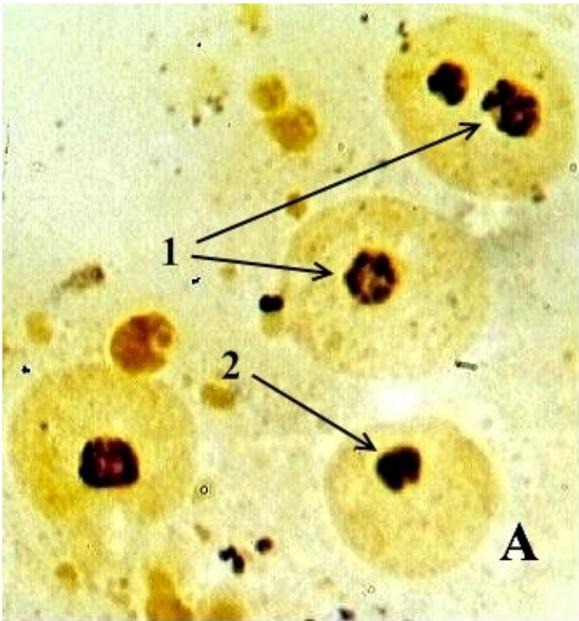


Рис.2 Визуализация аргентофильных белков и рРНК в ядрышках клеток доброкачественных и злокачественных новообразований церуминальных желез наружного слухового прохода у кошек. А, Б – доброкачественная аденома. В, Г – злокачественная аденокарцинома без признаков метастазирования. Д, Е - злокачественная аденокарцинома с признаками метастазирования. (А, В, Д - увеличение X1450. Б, Г, Е - увеличение X900).

В то же время, для злокачественной аденокарциномы характерны крупные преимущественно нуклеонемные (Рис.2-В(1)) или нуклеонемно-компактные (Рис.2-В(2)) ядрышки, в которых отчетливо визуализируется большое количество мелких аргентофильных гранул, которые, согласно современным представлениям, принято отождествлять с ядрышковыми организаторами (АгЯОР). В ядрах клеток метастазирующей злокачественной аденомы доминируют крупные нуклеонемные ядрышки (Рис.2-Д(1)), а так же присутствует большое количество мелких внеядрышковых аргентофильных включений (Рис.2-Д(2)).

Результаты исследования по цитологической визуализации РНК по Браше показали, что ядрышки в клетках метастазирующей злокачественной аденокарциномы обладают значительно более высокой пиронинофильностью (Рис.2-Е(1)), чем ядрышки в клетках злокачественной аденокарциномы без признаков метастазирования (Рис.2-Г(1)). Ядрышки в клетках доброкачественной аденомы при окраске пиронином, практически не визуализируются (Рис.2-Б).

Обсуждение полученных результатов.

Таким образом, данное исследование показало, что специфическая визуализация аргентофильных белков ядрышка в опухолевых клетках позволяет дифференцировать доброкачественные аденомы, в которых доминируют компактные ядрышки, от злокачественных аденокарцином, в которых присутствуют ядрышки преимущественно нуклеонемного типа с очень высоким уровнем экспрессии АгЯОР-белков. Однако, данный признак не позволяет проводить цитологическую дифференциацию неметастазирующей злокачественной аденокарциномы от метастазирующей, то есть высокий уровень экспрессии АгЯОР-белков в клетках первичных опухолей является необхо-

димым, но недостаточным морфологическим признаком возможного развития регионарных и отдаленных метастазов. Не смотря на то, что и неметастазирующая аденокарцинома, и метастазирующая аденокарцинома содержат сходные по морфологии нуклеонемные ядрышки, содержание в них РНК (рРНК) значительно отличается. Пиронин, связывающийся с РНК, хорошо выявляет ядрышки в метастазирующей аденокарциноме и слабо выявляет их в неметастазирующей. Вероятно, ядрышки последней принадлежат к псевдонуклеонемным, транскрипционная активность рРНК в которых ниже, а выход зрелых рибосом в цитоплазму выше, чем в типичных нуклеонемных ядрышках (9).

Выводы.

1. В ядрах клеток доброкачественной аденомы цервикальных желез содержатся 1 – 2 компактных ядрышка круглой формы, в которых происходит относительно слабый (не визуализируемый окраской по методу Браше) синтез рРНК.
2. В ядрах клеток неметастазирующей злокачественной аденокарциномы цервикальных желез содержатся 1 – 3 нуклеонемных ядрышка неправильной формы, в которых происходит, относительно слабо визуализируемый окраской по методу Браше, синтез рРНК.
3. В ядрах клеток метастазирующей злокачественной аденокарциномы цервикальных желез содержатся 1 – 3 нуклеонемных ядрышка неправильной формы, в которых происходит, очень сильный (отчетливо визуализируемый окраской по методу Браше), синтез рРНК.

Практические предложения

Цитологическое исследование биоптатов методами AgЯОР и Браше может быть использовано для предоперационной диагностики степени злокачественности новообразований цервикальных желез кошек с прогностической целью, а так же с целью дальнейшего планирования тактики фармакологического и хирургического лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демин С. Ю., Стефанова В. Н. Дифференциация интерфазных ядрышковых организаторов в клетках эмбриональной почки свиньи (линия СПЭВ). Цитология. 2006. Том 48. № 4., стр 320 – 331.
2. Елисеев В.Г., Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология. Москва. Медицина. 1983., 590 стр.
3. Жарская О.О., Зацепина О.В. Динамика и механизмы реорганизации ядрышка в митозе. Цитология. Том 49, №5. 2 0 0 7. стр. 355 – 369.
4. Крокер Джен. Районы ядрышкового организатора и фибриллярные центры. Молекулярная клиническая диагностика (Методы). Под редакцией С. Херрингстона и Дж. Макги. Москва. Мир. 1999 год. Стр. 260-279.
5. Мамаев Н.Н., Мамаева С.Е. Структура и функция ядрышкообразующих районов хромосом: молекулярные, цитологические и клинические аспекты. Цитология. Том 34, № 10, 1992, стр – 3 – 25.
6. Поликар А. Элементы физиологии клетки. Ленинград. Издательство «Наука». 1976 г. 389 стр.
7. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов – маркеры скорости клеточной пролиферации. Архив патологии. № 3. Том 68. 2006 год. Стр. 47 – 51.
8. Робертис Э., Новинский В., Саэс Ф. Биология клетки. Москва. Мир. 1973 год. 488 стр.
9. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек. Успехи современной биологии. 1988., том 105., Вып. 2., Стр. 252 – 267.
10. Bauer NB, Zervos D, Moritz A. Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n = 101). Journal

- of veterinary internal medicine (American college of Veterinary Internal Medicine). 2007 Sep-Oct;21(5):928-35.
11. David Vail , Laura Kravis , William Kisseberth , Gregory Ogilvie , Lynn Volk. Application of rapid CD3 immunophenotype analysis and argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) frequency to fine needle aspirate specimens from dogs with lymphoma. *Veterinary Clinical Pathology. Vet Clin Pathol.* 1997 ;26 (2):66-69.
 12. Duncan JR, Prasse KW. Cytology of canine cutaneous round cell tumors. *Vet Pathol* 1979; 16:673-679. 7
 13. Jelesijevi T, Jovanovi M. Quantitative and qualitative analysis of AgNOR in benign and malignant canine mammary gland tumors. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, Vol. 53. No. 5-6, 353-360, 2003.
 14. John C. Angus. Pathogenesis of otitis externa: understanding primary causes. *Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference* Jan. 8-12, 2005, Orlando, Florida. pp. 807 – 809.
 15. Kirpensteijn J. Aural Neoplasms. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1993;8:17-23.
 16. Kirpensteijn J. Treatment of Aural Neoplasia in Dogs and Cats. *Proceedings North American Veterinary Conference.* 11-Jan-2006. pp 672 – 676.
 17. Kravis LD, Vail DM, Kisseberth WC, Ogilvie GK, Volk LM. Frequency of argyrophilic nucleolar organizer regions in fine-needle aspirates and biopsy specimens from mast cell tumors in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1996 Oct 15;209(8):1418-20.
 18. Little CJL, Pearson GR, Lane JG: Neoplasia involving the middle ear cavity in dogs. *Vet Rec* 1989;124:54-57.
 19. London CA, Dubilzeig RR, Vail DM, et al: Evaluation of dogs and cats with tumors of the ear canal: 145 cases (1978-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1996;208:1413-1418.
 20. Maxey L. Wellman. Cytology and the Diagnosis of Neoplasia. *Oncology and hevatology proceedings of the 20th Waltham/osu symposium for the*

Treatment of Small Animal Diseases, Oct 16. Waltham Veterinary Hospital.
Waltham USA Inc., 1993Pp. 11 – 20.

21. Moisan PG, Watson GL: Ceruminous gland tumors in dogs and cats: A review of 124 cases. J Am Anim Hosp Assoc 1996;32:449-453.
22. Pascal Roussel and Daniele Hernandez-Verdun. Identification of Ag-NOR Proteins, Markers of Proliferation Related to Ribosomal Gene Activity. Experimental Cell Research. Volume 214, Issue 2, October 1994, Pages 465-472.
23. Simon Platt. Vestibular disease in dogs and Cats. Proceedings of the 33rd World Small Animal Veterinary Congress Dublin, Ireland – 2008. pp. 495 – 497.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF NUCLEOLUSES IN CELLS BENIGN AND MALIGNANT TUMOURS CERUMINOUS GLAND OF CATS.

The St.-Petersburg academy of veterinary medicine.
Bokarev A. V., Lakovnikov E.A., Stekolnikov A.A., Belov M. V.

In work the given researches of histological structure and cellular morphology of benign and malignant adenomas of ceruminous glands of an outside acoustic duct at cats are introduced. The obtained data have shown, that the histological method of diagnosis allows to see difference only between a benign and malignant adenoma, but does not tap differences in morphology between its not metastasizing and metastasizing variants. The cytologic method of diagnosis at colour by dye "diff-quick", at all does not tap morphological differences between cells of a good-quality adenoma, a malignant adenoma without metastasises and a malignant adenoma with metastasises. Results of cytologic research of argentophilic proteins of a nucleolus visualize legible difference between a benign adenoma in which nucleoluses of compact type dominate, and the malignant variant of a tumour keeping nucleolonemal nucleoluses. However, results of cytologic research of argentophilic proteins of a nucleolus do not tap differences between not metastasizing neoplasms and metastasizing. At the same time differential staining of RNA by methylic green pyronin has shown, that nucleoluses in cells of a metastasizing malignant adenoma have considerably higher pyroninophily. From what follows, that nucleoluses in cells of a metastasizing malignant adenoma contain much more quantity of a rRNA, than nucleoluses in cells of not metastasizing malignant adenoma. Staining of cytologic samples of tumour AgNO₃ and methylic green pyronin, can be utilised for preoperative diagnosis of a degree malignancies of adenomas of ceruminous glands of cats, with the purpose of the further planning tactics of pharmacological and surgical treatment.

Key words and reductions: a tumour, a cancer, ceruminous glands, a cell, a nucleus, a nucleolus, the Brachet, pyronin, organizers of nucleolus (ЯОП), argentophilic

proteins of organizers of a nucleolus (AgЯOP), ribonucleic acid (RNA), ribosomal RNA (rRNA).