

В.А. Гуртовий<sup>1</sup>, І.С. Шпонька<sup>2</sup>, І.В. Біленький<sup>1</sup>, С.В. Антонюк<sup>3</sup>**Стабільність пухлинної тканини при лімфомі Ходжкіна**<sup>1</sup>Міська клінічна лікарня №4, м. Дніпропетровськ,<sup>2</sup>Дніпропетровська державна медична академія,<sup>3</sup>Міська клінічна лікарня №19, м. Дніпропетровськ**Ключові слова:** лімфома Ходжкіна, клітини Березовського-Штернберга-Рід, клітини мікрооточення, апоптоз, bcl-2, каспаза-3.

Здійснено оцінку проліферативної активності та ступеню стабільності пухлинної тканини та її складових при різних варіантах класичної форми лімфоми Ходжкіна морфологічними (світлова мікроскопія, імуногістохімічний, імунофлуоресцентний) і статистичними методами. Для цього вивчали експресію Ki-67, bcl-2 й активованої каспази (Casp3) клітинами пухлини та їх мікрооточення. Стабільність пухлинної тканини оцінювали за співвідношенням рівнів проліферації і блокади апоптозу до активації апоптозу в кожному з її компонентів. Визначено, що проліферативна активність пухлинної тканини в цілому і ступінь стабільності клітин пухлини підвищується разом зі зростанням імовірності несприятливого перебігу класичної форми лімфоми Ходжкіна. У свою чергу, несприятливий перебіг хвороби супроводжується кількісними та якісними змінами клітин мікрооточення, що неодмінно треба враховувати при розробці таргетної терапії, спрямованої саме на коригування характеристик реактивного мікрооточення. Пропонується вивчення показників «проліферативна активність» і «ступінь стабільності» пухлинної тканини на біопсійному та післяопераційному матеріалі, що дає змогу оцінити прогноз перебігу класичної форми лімфоми Ходжкіна і застосувати необхідну терапію.

**Стабільность опухолевой ткани при лимфоме Ходжкина**

В.А. Гуртовой, И.С. Шпонька, И.В. Беленький, С.В. Антонюк

Дана оценка пролиферативной активности и степени стабильности опухолевой ткани, а также ее составляющих при различных вариантах классической лимфомы Ходжкина морфологическими (световая микроскопия, иммуногистохимический, иммунофлуоресцентный) и статистическим методами. Для этого изучали экспрессию Ki-67, bcl-2 и активированной каспазы (Casp3) клетками опухоли и микроокружения. Стабильность опухолевой ткани оценивали по соотношению уровней пролиферации и блокады апоптоза к уровню активации апоптоза в каждом из ее компонентов. Установлено, что пролиферативная активность опухолевой ткани в целом и степень стабильности опухолевых клеток возрастает вместе с увеличением возможности неблагоприятного течения классической формы лимфомы Ходжкина. В свою очередь, неблагоприятный прогноз болезни сопровождается количественными и качественными изменениями клеток микроокружения, что необходимо учитывать при разработке таргетной терапии, направленной непосредственно на коррекцию характеристик микроокружения. Предлагается изучение показателей «пролиферативная активность» и «степень стабильности» опухолевой ткани на биопсийном и послеоперационном материале, что поможет оценить прогноз течения классической лимфомы Ходжкина и подобрать необходимое лечение.

**Ключевые слова:** лимфома Ходжкина, клетки Березовского-Штернберга-Рид, клетки микроокружения, апоптоз, bcl-2, каспаза-3.**Патология.** – 2011. – Т.8, №2. – С. 76–80**Stability of tumor tissue in Hodgkin lymphoma**

V.A. Gurtovyy, I.S. Shponka, I.V. Bilenky, S.V. Antonyuk

In the study proliferative activity and stability of Hodgkin lymphoma (HL) tumor tissue and its components were estimated by using morphologic (routine histology, immunohistochemistry, immunofluorescence) methods and statistical analysis. Expression of Ki-67, bcl-2 and cleaved caspase-3 were studied in tumor sells and nontumorous microenvironment cells of HL. Stability of tumor tissue was estimated by comparing of proliferation and apoptosis-blocking processes with apoptosis activation processes in each compotent of tumor. It was determined that proliferative activity of tumor tissue and stability of tumor cells higher in variants that have more unfavorable prognosis. At the same time quantitative and qualitative features of nontumorous microenvironment in tumor tissue of these variants must be taken into account in development of target chemotherapy that directed to the microenvironment. Investigation of HL tumor tissue proliferative activity and stability may be helpful in prognosis of clinical course and correction of chemotherapy regimens.

**Key words:** Hodgkin lymphoma, Reed-Sternberg cell, microenvironment, proliferation, apoptosis, bcl-2, caspase-3.**Pathologia.** 2011; 8(2): 76–80

Лімфома Ходжкіна (ЛХ) – одне з найбільш поширених лімфопроліферативних захворювань серед людей молодого віку в розвинутих країнах (А. Brauningер et al., 2006). Згідно сучасних уявлень, виділено дві форми – нодулярний тип лімфоїдного переважання і класичну лімфому Ходжкіна. В останній виділяють варіанти: з нодулярним характером склерозу, змішано-клітинний, лімфоїдного виснаження і лімфоїдного переважання (S.H. Swerdlow et al., 2008). Лімфома Ходжкіна супрово-

джується регіонарним або генералізованим ураженням лімфовузлів, вилочкової залози, селезінки. У поширеній стадії – паренхіматозних органів і кісткового мозку.

Морфологічний субстрат захворювання складається з пухлинних клітин Ходжкіна та/або Березовського-Штернберга-Рід (HRS-клітини), розташованих серед непухлинних реактивних клітин і позаклітинного компоненту. Пухлинні клітини мають назву діагностичних (hallmark cells) і складають приблизно 1% від загальної маси

пухлинної тканини (R. Kuppers, M. Hansmann, 2005).

Протягом двох століть змінюються погляди щодо походження ЛХ і пухлинних клітин. За сучасними уявленнями, пухлинні HRS-клітини, вірогідно, походять від пре-апоптотичних В-клітин гермінативних центрів лімфоїдних фолікулів, що частково втратили свої В-клітинні ознаки і можуть аберантно експресувати Т-клітинні маркери. Ці клітини виділяють велику кількість хемокінів (ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-13), а також мають рецептори до більшості з них, що свідчить про можливість аутокринної і паракринної регуляції проліферації пухлинних клітин і реактивного мікрооточення відповідно (R. Kuppers, M. Hansmann, 2005).

Вивченню процесів проліферації та апоптозу при лімфомі Ходжкіна приділяється багато уваги. Хоча пухлинні клітини експресують маркери проліферації (Ki-67, PCNA), у більшості з них спостерігаються лише abortивні мітози, чим і пояснюють наявність багатоядерних форм. Щодо блокування апоптозу у HRS-клітинах, молекулярно-біологічними дослідженнями з'ясовано декілька шляхів цього процесу (H. Mani, E.S. Jaffe, 2009):

а) через активацію транскрипції NFκB: автономним шляхом; зовні розташованими Т-клітинами; у разі інфікованості вірусом Епштейна-Барр; при інактивації інгібіторів цього фактора, наприклад, ІκВ;

б) інактивацією CD95-опосередкованого апоптотичного шляху;

в) експресією Х-зв'язаних інгібіторів апоптозу, а також c-IAP2;

г) порушення регуляції родини bcl-2 протеїнів;

г) блокування Fas-опосередкованої клітинної смерті через експресію FLICE-подібних протеїнів (c-FLIP).

Велику кількість досліджень присвячено вивченню експресії пухлинними клітинами проапоптотичних (каспаза-3) та антиапоптотичних молекул (bcl-2) з метою прогнозу захворювання. Прогноз поведінки різних варіантів пухлини одного гістогенетичного типу – важливе питання онкології з огляду розробки найбільш адекватних методів впливу на неї (D. Re et al., 2005, A. Sánchez-Aguilera et al., 2006, M. Vogler et al., 2009). У багатьох випадках такий прогноз пов'язаний зі ступенем виживаності й агресивності пухлинних клітин. Цей ступінь, у свою чергу, залежить від стабільності (співвідношення між процесами проліферації та руйнування) пухлинної структури в цілому та її складових – безпосередньо клітин пухлини і їх мікрооточення.

### Мета роботи

З'ясування перебігу лімфому Ходжкіна від ступеня стабільності пухлинної тканини. Для цього вивчали проліферативну активність діагностичних клітин і клітин мікрооточення, яку порівнювали з вираженістю процесів блокади та запуску апоптозу в них.

Досліджували варіанти, найбільш різні за своїми морфологічними, клінічними й прогностичними характеристиками (з лімфоїдним переважанням і ретикулярний тип лімфоїдного виснаження), а також варіант, що посідає

проміжне положення – змішанноклітинний. Існують публікації, у яких зазначені варіанти розглядаються як стадії прогресії єдиного патологічного процесу (А.И. Воробьев, А.М. Кременецкая, 2007, F.C. Eberle et al., 2009).

### Матеріали і методи дослідження

Для дослідження відібрано 20 зразків парафінових блоків лімфатичних вузлів, уражених оцінюваними варіантами класичної лімфому Ходжкіна. Тканину лімфовузлів отримано шляхом ексцизійної біопсії у 20 пацієнтів. Діагноз і варіант лімфому Ходжкіна, згідно існуючих критеріїв (S.H. Swerdlow et al., 2008), встановлювали на світлооптичному рівні, а також підтверджували імуноморфологічним дослідженням на базі відділу імуноморфології пухлин людини діагностичного центру медичної академії. Відібрано 6 зразків варіанту з лімфоїдним переважанням, 7 – змішанноклітинного варіанту і, відповідно, 7 – ретикулярного типу варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини.

Належність клітин до пухлинних оцінювали на світлооптичному рівні (гематоксилін-еозин), їх імунофенотип мав задовольняти умовам (CD15<sup>+</sup>CD30<sup>+</sup>), або (CD30<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>), або (CD30<sup>+</sup>EMA<sup>-</sup>) (А.И. Воробьев, А.М. Кременецкая, 2007, S.H. Swerdlow et al., 2008). При встановленому діагнозі до пухлинних також віднесено одно- та багатоядерні клітини з ознаками вираженої атипії.

Клітини, що знаходились поміж пухлинних або оточували їх (до 5–7 шарів), відносили до елементів мікрооточення.

Стабільність пухлинної тканини загалом та її компонентів оцінювали за експресією відповідних маркерів:

- проліферативна активність – за ядерною експресією Ki-67;
- блокада апоптозу – за цитоплазматичною експресією bcl-2;
- запуск апоптозу – за цитоплазматичною експресією активованої каспази (Casp3).

Парафінові зрізи завтовшки 4 мкм виготовляли за допомогою мікротому Microm HM 315 (Thermo scientific) та наклеювали на адгезивні (Superfrost<sup>®</sup> Plus) предметні скельця.

Імуногістохімічні реакції проводили згідно стандартних протоколів (С.В. Петров, Н.Т. Райхлин, 2004, М. Кей, 2006). Використовували моноклональні мишачі та кролячі антитіла (табл. 1). Після депарафінізації і промивки в дистильованій воді проводили демаскування антигенів у 0,01 М цитратному буфері (рН 6,0) за допомогою мікрохвильової печі. Блокування ендогенної пероксидази здійснювали у 3% розчині H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> протягом 10 хвилин. Інкубацію первинних антитіл у рекомендованих виробником розведень проводили протягом години за кімнатної температури у вологій камері. Візуалізацію здійснювали системою UltraVision LP Detection System (Thermo scientific), де в якості ферментної мітки використовується пероксидаза хрому, а хромогеном є діамінобензидин (DAB Plus Chromogen).

При багатокольорових імунофлуоресцентних дослі-

Таблиця 1

**Моноклональні антитіла, використані при імуногістохімічному дослідженні**

Антиген	Клон	Розведення
CD15	SPM490	1:50
CD30	HRS4, M 0751	1:100, 1:500
CD45	PD7/26 and 2B11	1:100
EMA	E29	1:300
Ki-67	SP6, MIB1	1:200, 1:1000

Таблиця 2

**Антитіла, використані при багатокольоровому імунофлуоресцентному дослідженні**

Суміші первинних антитіл, розведення	Суміш вторинних антитіл, розведення
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5AE1), 1:100 Ki-67 (MIB1), 1:1000	AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen), 1:50 AlexaFluor 568 goat anti-mouse IgG (Invitrogen), 1:50 DAPI (Sigma), 1:400
bcl-2 (8C8), 1:1000 Ki-67 (SP6), 1:200	

дженнях після демаскування антигенів і промивання у TRIS-буфері (pH 7,5) на кожний зі зрізів наносили суміш первинних антитіл, одне з яких обов'язково було проти ядерного антигену Ki-67 (мишаче MIB-1 або кроляче SP6), а друге – проти цитоплазматичного антигену (табл. 2). Інкубацію первинних антитіл проводили протягом 14 годин у вологій камері за температури +4°C. Після трьохкратного промивання у TRIS-буфері на кожний зі зрізів наносили суміш з антимишачих та антикролячих антитіл (Invitrogen) у розведенні 1:50, мічених флуоресцентною міткою AlexaFluor 568 і AlexaFluor 488 відповідно, а також DAPI (Sigma) у розведенні 1:400. Інкубацію проводили протягом 30 хвилин у темному місці у вологій камері за кімнатної температури. Зрізи промивали у буфері, підсушували, покривали середовищем Fluormount (Electron Microscopy Sciences) і покривним скельцем.

Аналіз при флуоресцентних дослідженнях проводили за допомогою мікроскопу Leica DM2500, що обладнаний

трьома флуоресцентними фільтрами, 10-мегапіксельною фотокамерою Leica D-Lux3. У кожному зі зразків досліджували 10 полів зору з наявністю пухлинного росту при збільшенні x400. Далі проводили статистичний аналіз отриманих даних (табл. 3, 4).

**Результати та їх обговорення**

**Лімфома Ходжкіна, класична форма, варіант лімфоїдного переважання**

Пухлинних клітин при цьому варіанті мало, розташовуються вони дифузно або утворюють невеликі скупчення (рис. 1а, б, в, кольор. вкладка 1). Більшість з них експресують Ki-67. Цитоплазматична експресія bcl-2 та активованої каспази (Casp3) незначна (рис. 2а, б, кольор. вкладка 1; табл. 3). Деякі клітини пухлини мали рецептори до обох маркерів –  $nKi-67^{+}cybcl^{+}$  (рис. 2а, кольор. вкладка 1).

У ділянках пухлинного росту перебувають переважно Т- і В-лімфоцити, менше полінуклеарних лейкоцитів.

Таблиця 3

**Показники стабільності клітин пухлини при різних клініко-морфологічних варіантах лімфоми Ходжкіна**

Варіант лімфоми Ходжкіна (класична форма)	% клітин пухлини, що експресують					
	$nKi-67$		$cybcl-2$		$cyCasp3$	
	у пухлинній тканині	від кількості клітин пухлини	у пухлинній тканині	від кількості клітин пухлини	у пухлинній тканині	від кількості клітин пухлини
лімфоїдне переважання	1,9 ± 0,05	67,7 ± 3,1	0,7 ± 0,01	3,3 ± 0,05	0,5 ± 0,01	9,6 ± 0,15
змішаноклітинний	13,6 ± 2,7	79,9 ± 2,2	1,1 ± 0,03	3,8 ± 0,04	0,8 ± 0,03	11,3 ± 0,4
виснаження лімфоїдної тканини, ретикулярний тип	36,8 ± 4,1	46,3 ± 3,4	41,5 ± 1,9	50,1 ± 5,0	0,05 ± 0,01	0,8 ± 0,05

Примітка: локалізація експресії: n – ядерна, cy – цитоплазматична.

Таблиця 4

**Показники стабільності клітин мікрооточення при різних клініко-морфологічних варіантах лімфоми Ходжкіна**

Варіант лімфоми Ходжкіна (класична форма)	% клітин мікрооточення, що експресують					
	$nKi-67$		$cybcl-2$		$cyCasp3$	
	у пухлинній тканині	від кількості клітин мікрооточення	у пухлинній тканині	від кількості клітин мікрооточення	у пухлинній тканині	від кількості клітин мікрооточення
лімфоїдне переважання	5,2 ± 0,2	7,7 ± 0,2	76,3 ± 3,0	79,8 ± 3,7	0,8 ± 0,02	0,5 ± 0,01
змішаноклітинний	10,1 ± 1,8	9,6 ± 0,9	47,9 ± 4,8	50,1 ± 2,5	3,6 ± 1,8	4,3 ± 0,9
виснаження лімфоїдної тканини, ретикулярний тип	1,2 ± 0,09	8,5 ± 0,3	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,09	6,2 ± 0,06	8,8 ± 0,05

Примітка: локалізація експресії: n – ядерна, cy – цитоплазматична.

Кількість плазмочитів і гістіоцитів змінюється в широких межах. Формування судин і наявність фіброзу цьому варіанту не притаманні.

Проліферативна активність серед клітин мікрооточення становить близько 7,7%, дуже мало  $_{cy}Casp3^{+}$ -клітин. Цитоплазматична експресія bcl-2, навпаки, дуже значна (рис. 2а, б, кольор. вкладка 1; табл. 4).

Отже, варіант лімфоїдного переважання класичної форми лімфому Ходжкіна супроводжується проліферативною активністю більшості клітин пухлини (67,7%) і незначними показниками запуску та блокади апоптозу (табл. 3).

Великий проліферативний потенціал і наявність  $_{n}Ki-67^{+}bcl^{+}$ -клітин свідчить про можливість гіпермутації генів і появи нових клонів пухлинних клітин, що перш за все мають більшу імовірність вижити.

У переважній кількості клітин мікрооточення блокований апоптоз (79,8%), незначна проліферативна активність і дуже малий ступінь активації апоптозу (табл. 4).

#### **Лімфома Ходжкіна, класична форма, змішанноклітинний варіант**

Згідно існуючих критеріїв, варіант виділяється значною кількістю дифузно розташованих пухлинних клітин, оточених лімфоцитами, плазмочитами, полінуклеарними лейкоцитами (переважно, нейтрофілами та еозинофілами), гістіоцитами та макрофагами в різних співвідношеннях (рис. 3а, б, в, кольор. вкладка 1). Можлива васкуляризація, незначний дифузний фіброз та поява вогнищ некрозу.

У порівнянні з лімфоїдним переважанням, при змішанноклітинному варіанті всі вивчені показники в клітинах пухлини збільшуються. Виділяються також  $_{n}Ki-67^{+}bcl^{+}$ -клітини (рис. 4а, б, кольор. вкладка 2; табл. 3).

У мікрооточенні кількість  $_{n}Ki-67^{+}$ -клітин трохи зростає, експресія цитоплазматичного bcl-2 в 1,5 рази зменшується, а наявність  $_{cy}Casp3$ -рецепторів більш ніж у 8 разів збільшується (рис. 4а, б, кольор. вкладка 2; табл. 4).

При ретельному вивченні в пухлинній тканині виявляються клітини, що одночасно експресують ядерний Ki-67 і цитоплазматичну Casp3. Цей феномен притаманний як клітинам пухлини, так і клітинам їх мікрооточення (рис. 4б, кольор. вкладка 1).

Отже, при змішанноклітинному варіанті класичної форми лімфому Ходжкіна клітинам пухлини відповідають не набагато більші значення проліферативної активності, блокади та запуску апоптозу, ніж у варіанті з лімфоїдним переважанням (табл. 3).

Суттєвіше змінюються показники клітин мікрооточення: незначне збільшення їх проліферативної активності супроводжується суттєвим зниженням блокади та значним підвищенням запуску апоптозу в них (табл. 4).

Наявність в пухлинній тканині  $_{n}Ki-67^{+}bcl^{+}Casp3^{+}$ -клітин імовірно пов'язана з напруженістю процесів проліферації та апоптозу, взаємним впливом клітин пухлини та мікрооточення.

#### **Лімфома Ходжкіна, класична форма, варіант з виснаженням лімфоїдної тканини, ретикулярний тип (саркома Ходжкіна)**

Цей варіант, як відомо, характеризується невеликою

кількістю клітин мікрооточення на кожну клітину пухлини. Серед мікрооточення переважають елементи сполучної тканини та гістіоцити, лімфоцитів мало. Формуються вогнища некрозів з абсцедуванням і накопичуванням полінуклеарів (рис. 5а, б, в, г, кольор. вкладка 2).

Саркома Ходжкіна відрізняється найбільшою проліферативною активністю пухлинної тканини серед розглянутих варіантів лімфому Ходжкіна. Проліферують переважно клітини пухлини, хоча їх проліферативний потенціал дещо зменшується (46,3%). Значно зростає експресія ними bcl-2 (приблизно у 14 разів), водночас різко падає наявність  $_{cy}Casp3^{+}$ -пухлинних клітин. Як і в попередніх варіантах, є  $_{n}Ki-67^{+}bcl^{+}$ -клітини (рис. 6а, б, кольор. вкладка 2; табл. 3).

Хоча клітин мікрооточення при саркомі Ходжкіна мало, їх проліферативна активність практично така ж, як і в інших досліджених варіантах. Однак експресія ними цитоплазматичного bcl-2 зменшується у 40 разів, у порівнянні з варіантом лімфоїдного переважання, а активованої каспази у 18 разів збільшується (рис. 6а, б, кольор. вкладка 2; табл. 4).

Отже, при ретикулярному типі варіанта з виснаженням лімфоїдної тканини проліферують, а також блоковані від запуску апоптозу близько половини клітин пухлини. Водночас, в апоптоз залучено менше 1% пухлинних клітин (табл. 3).

У мікрооточенні при збереженій проліферативній активності відзначається дуже низький показник блокади апоптозу і найбільш велика кількість клітин, залучених в апоптоз, серед розглянутих варіантів класичної форми лімфому Ходжкіна (табл. 4).

#### **Висновки**

Ядерна експресія маркера проліферації Ki-67 при розглянутих варіантах класичної форми лімфому Ходжкіна спостерігається як у клітинах пухлини, так і в клітинах їх мікрооточення.

Означені варіанти характеризуються різними проліферативними потенціалами як пухлинної тканини загалом, так її компонентів. Від варіанта з лімфоїдним переважанням через змішанноклітинний варіант до ретикулярного типу варіанта з виснаженням лімфоїдної тканини зростає експресія Ki-67 у пухлинній тканині. При більш доброякісному варіанті з лімфоїдним переважанням показник проліферативної активності в пухлині, перш за все, пов'язаний з мікрооточенням, а в більш злоякісному ретикулярному типі він залежить від клітин самої пухлини.

Ступінь стабільності клітин пухлини (співвідношення процесів проліферації і блокади апоптозу до процесу активації апоптозу) підвищується разом зі зростанням імовірності несприятливого перебігу захворювання. Найбільша вона при ретикулярному типі варіанта з виснаженням лімфоїдної тканини.

Ступінь стабільності клітин мікрооточення зменшується від варіанта з лімфоїдним переважанням до ретикулярного типу варіанта з виснаженням лімфоїдної тканини.

Вивчення показників «проліферативна активність» і «ступінь стабільності» пухлинної тканини на біопсій-

ному та післяопераційному матеріалі дає змогу оцінити прогноз перебігу класичної форми лімфоми Ходжкіна і, відповідно, застосувати необхідну терапію.

Несприятливий перебіг класичної форми лімфоми Ходжкіна супроводжується кількісними та якісними змінами клітин мікрооточення, що неодмінно треба враховувати при розробці таргетної терапії, спрямованої саме на коригування характеристик реактивного мікрооточення.

#### Література

1. Опухоли лимфатической системы: атлас / под ред. А.И. Воробьева, А.М. Кременецкой. – М.: Ньюдиамед, 2007. – 297 с.
2. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – Казань: Титул, 2004. – 456 с.
3. Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy / M. Vogler, D. Dinsdale, M.J.S. Dyer, G.M. Cohen // Cell Death and Differentiation. – 2009. – №16. – P. 360–367.
4. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential / D. Re, R. K. Thomas, K. Behringer, V. Diehl // Blood. – 2005. – №105. – P. 4553–4560.
5. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with newer insights into classification / H. Mani, E.S. Jaffe // Clin Lymphoma Myeloma. – 2009. – №9 (3). – P. 206–216.
6. Key M. Immunohistochemical Staining Methods / M. Key. – Ojai, CA, USA: Bimedical Services, 2006. – 174 p.
7. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma / A. Brauninger, R. Schmitz, D. Bechtel, C. Renne, Martin-Leo [et al.] // Int. J. Cancer. – 2006. – Vol. 118. – P. 1853–1861.
8. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell / R. Kuppers, M.-L. Hansmann // IJBCB. – 2005. – Vol. 37. – P. 511–517.
9. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma / A. Sánchez-Aguilera, C. Montalbán, P. de la Cueva, L. Sánchez-Verde [et al.] // Blood. – 2006. – №108. – P. 662–668.
10. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / [S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris et al.]. – Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008. – 439 p.

#### Відомості про авторів:

Гуртовий В.А., лікар-патологоанатом КЗ МБКЛ №4.

Шпонька І.С., д. мед. н., професор, зав. каф. патологічної анатомії і судової медицини ДДМА.

Біленький І.В., к. мед. н., лікар-патологоанатом КЗ МБКЛ №4.

Антонюк С.В., к. мед. н., лікар-патологоанатом, зав. патологоанатомічним відділенням КЗ МКЛ №19 (міський онкологічний центр).

#### Адреса для листування:

Гуртовий Вадим Анатолійович. 49102, м. Дніпропетровськ, вул. Ближня, 31. Тел.: (056) 756 01 09.

УДК 576.8.097.5

О.А. Шепель, Т.В. Блашків, Т.Ю. Вознесенська, Р.І. Янчій

## Вплив лінолевої кислоти та пірролідиндитіокарбамату на мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх кумулюсного оточення

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, м. Київ

**Ключові слова:** ооцит-кумулясні клітини, лінолева кислота.

Дослідження впливу активації та пригнічення транскрипційного ядерного фактора NF-κB на систему ооцит-кумулясні клітини є актуальним для встановлення його ролі у дозріванні ооцитів і розвитку розладів, що викликають безпліддя у жінок, а також для розробки нових методів впливу на клітини-мішені з використанням клінічної NF-κB-терапії.

**Мета роботи:** дослідження впливу інгібітора активації NF-κB пірролідиндитіокарбамату (ПДТК) на мейотичне дозрівання ооцитів мишей, життєздатність та апоптотичну й некротичну загибель клітин кумулюсного оточення ооцитів (ККОО), а також активатора NF-κB лінолевої кислоти (ЛК) на зміни електрокінетичних властивостей ядер і кількість гранул гетерохроматину, локалізованого навколо ядерної мембрани в ядрах кумулюсних і гранулярних клітин з малих, середніх і великих фолікулів мишей в умовах експериментальної мітохондріальної

дисфункції, індукованої окиснювальним стресом (гіпоксантин/ксантин-оксидаза).

Встановлено, що ПДТК пригнічує мейотичне дозрівання ооцитів, що підтверджується зменшенням кількості ооцитів, які відновили мейоз і сформували перше полярне тільце; а також знижує кількість живих ККОО переважно за рахунок кількості клітин, загиблих шляхом апоптозу. ЛК індукує дисфункцію ККОО і викликає клітинні зміни (електронегативність і морфологічні ознаки апоптозу ядер ККОО), що є критично ранніми подіями, характерними для окислювального стресу.

**Висновки:** враховуючи, що ооцити розвиваються у тісному взаємозв'язку з ККОО, можна припустити, що порушення активації NF-κB у кумулюсних клітинах негативно впливатиме на функціональний стан ооцитів та їх мейотичне дозрівання.

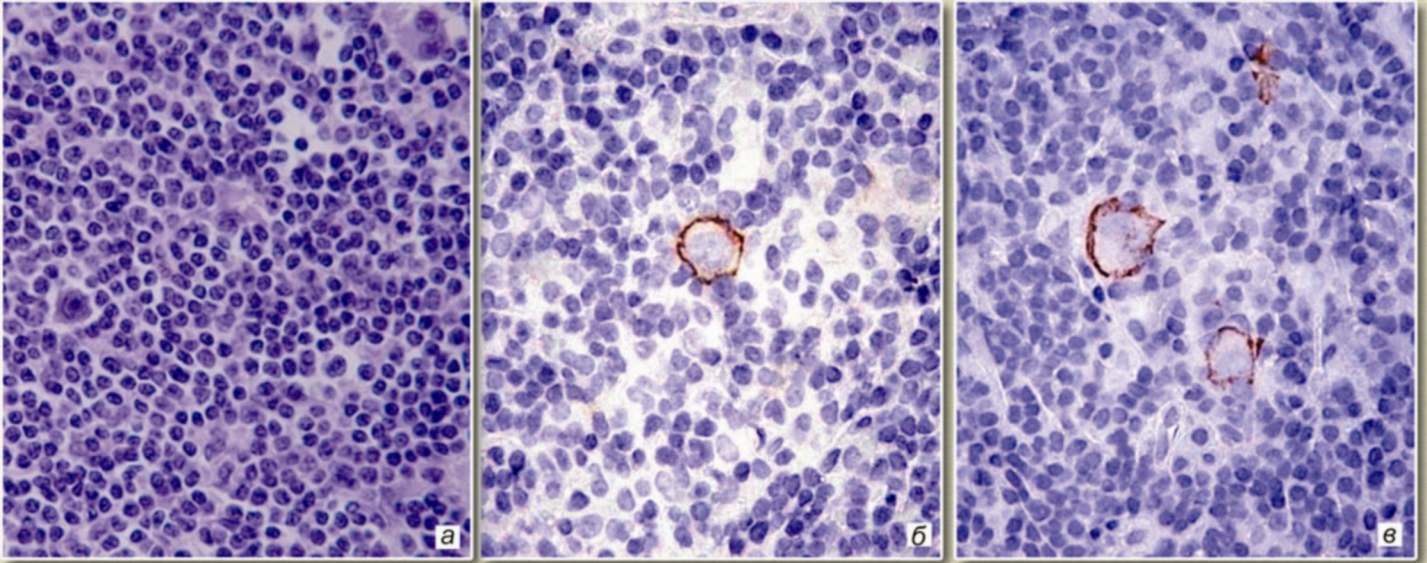


Рис. 1. Лімфома Ходжкіна, варіант лімфоїдного переважання: **а** – загальний вигляд (гемаксилін-еозин, х 400); **б** – мембранна та цитоплазматична експресія CD30 клітинами пухлини; **в** – мембранна та цитоплазматична експресія CD15 клітинами пухлини та гранулоцитами (імунопереоксидазний метод, х 400).

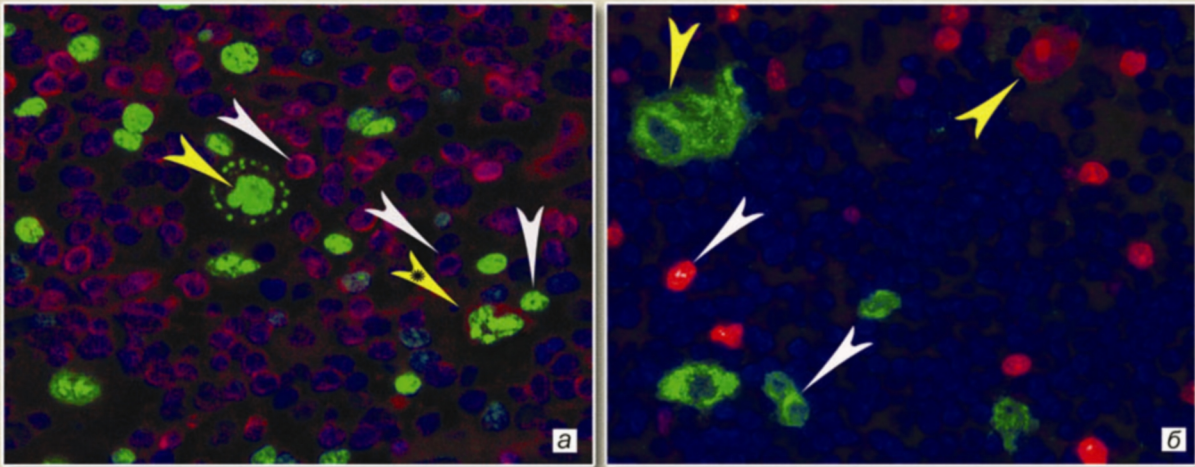


Рис. 2. Лімфома Ходжкіна, варіант лімфоїдного переважання (імунофлуоресцентний метод, подвійне імуномічення): **а** – pKi-67+ зелені клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), subcl+ червоні клітини мікрооточення (білі стрілки) та пухлини, pKi-67+subcl+ клітини пухлини (жовті стрілки з зірочкою), х 400; **б** – pKi-67+ червоні клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), cyCasp3+ зелені клітини пухлини (жовті стрілки) та клітини мікрооточення (білі стрілки), х 400.

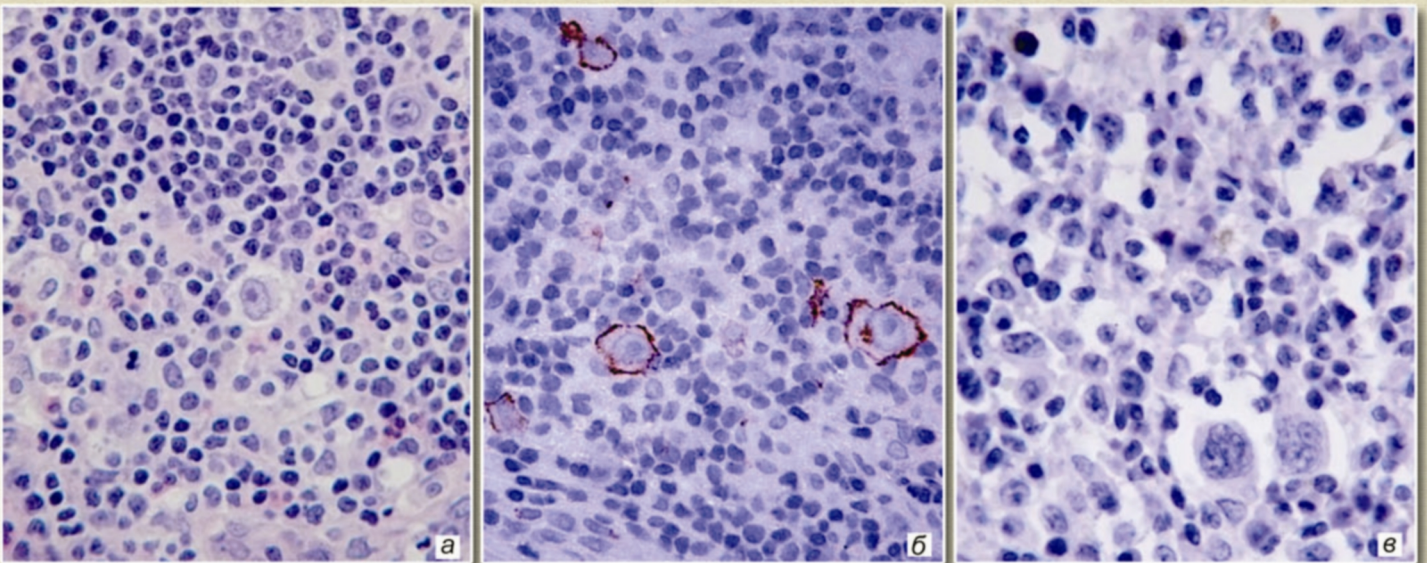


Рис. 3. Лімфома Ходжкіна, змішаноклітинний варіант: **а** – загальний вигляд (гемаксилін-еозин, х 400); **б** – мембранна та цитоплазматична експресія CD30 клітинами пухлини (імунопереоксидазний метод, х 400); **в** – відсутність експресії EMA клітинами пухлини (імунопереоксидазний метод, х 450).

(Рис. 1–3 до статті В.А. Гуртового, І.С. Шпоньки, І.В. Біленького, С.В. Антонюка «Стабільність пухлинної тканини при лімфомі Ходжкіна», с. 76–80)

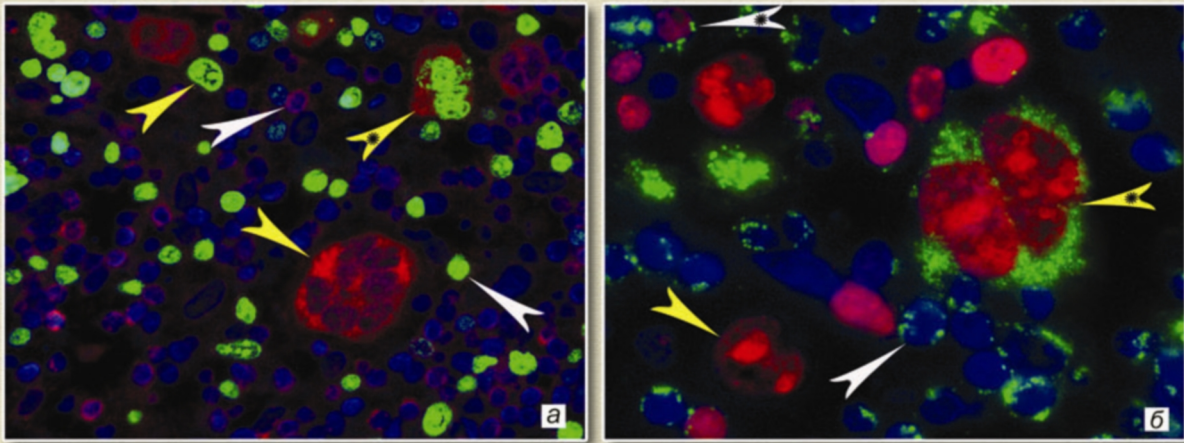


Рис. 4. Лімфома Ходжкіна, змішанноклітинний варіант (імунофлуоресцентний метод, подвійне імуномічення): **а** – pKi-67+ зелені клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), subcl+ червоні клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), pKi-67+subcl+ клітини пухлини (жовті стрілки з зірочкою), x 400; **б** – pKi-67+ червоні клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), suCasp3+ зелені клітини мікрооточення (білі стрілки) та пухлини, pKi-67+suCasp3+ клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), x 900.

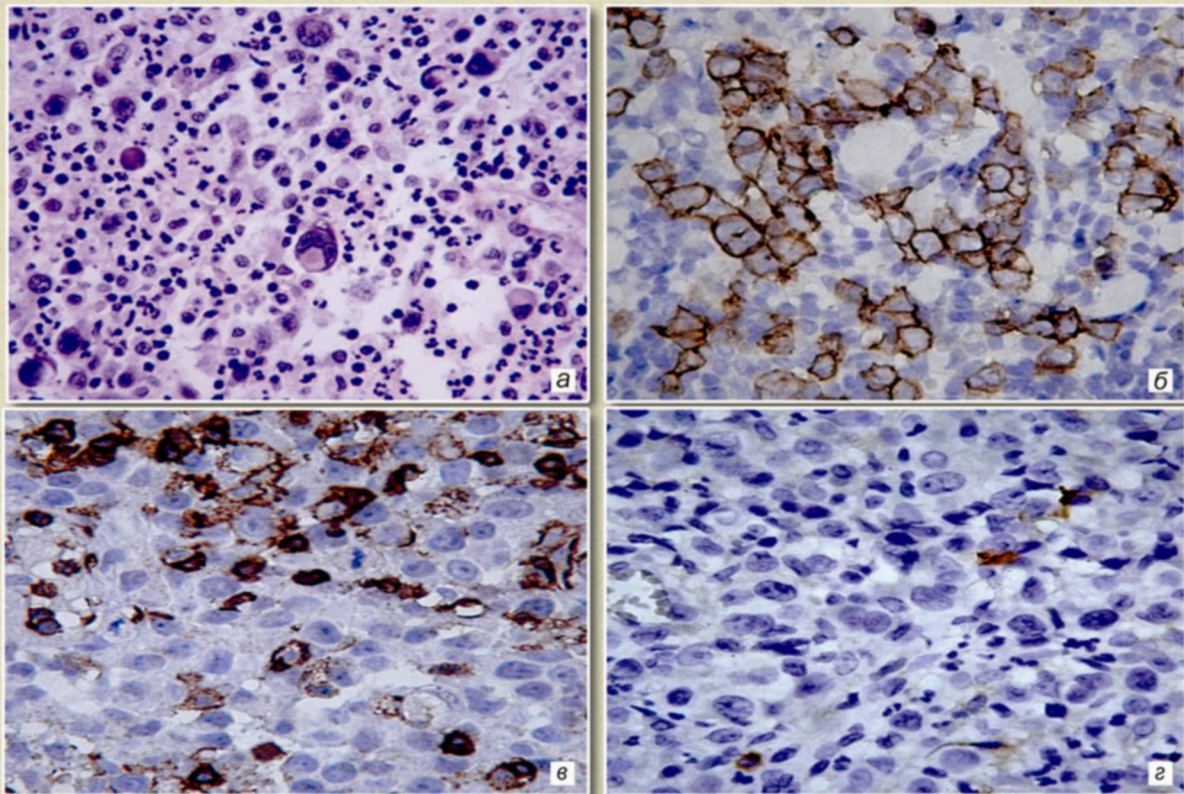


Рис. 5. Лімфома Ходжкіна, варіант з виснаженням лімфоїдної тканини, ретикулярний тип (саркома Ходжкіна): **а** – загальний вигляд (гематоксилін-еозин, x 250); **б** – мембранна та цитоплазматична експресія CD30 клітинами пухлини (імунопероксидазний метод, x 300); **в** – відсутність експресії CD45 клітинами пухлини (імунопероксидазний метод, x 400); **г** – відсутність експресії EMA клітинами пухлини (імунопероксидазний метод, x 400).

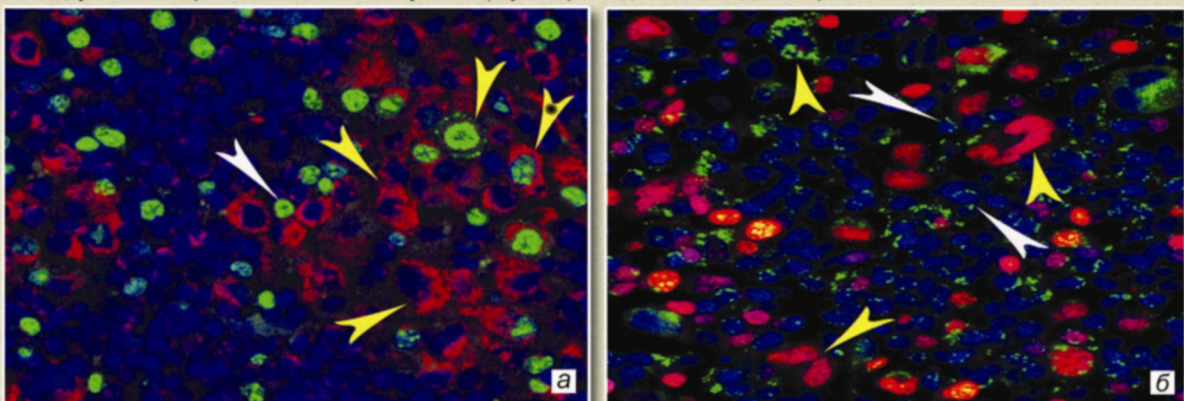


Рис. 6. Лімфома Ходжкіна, варіант з виснаженням лімфоїдної тканини, ретикулярний тип (саркома Ходжкіна) (імунофлуоресцентний метод, подвійне імуномічення): **а** – pKi-67+ зелені клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення (білі стрілки), subcl+ червоні клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення, pKi-67+subcl+ клітини пухлини (жовті стрілки з зірочкою), x 400; **б** – pKi-67+ червоні клітини пухлини (жовті стрілки) та мікрооточення, suCasp3+ зелені клітини пухлини (жовті стрілки) та клітини мікрооточення (білі стрілки), x 400.

(Рис. 4–6 до статті В.А. Гуртового, І.С. Шпоньки, І.В. Біленького, С.В. Антонюка «Стабільність пухлинної тканини при лімфомі Ходжкіна», с. 76–80)