



УКРАЇНА

(19) UA (11) 40230 (13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЦИТОГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ

(21) 2000105978

(22) 23.10.2000

(24) 16.07.2001

(33) UA

(46) 16.07.2001, Бюл. № 6, 2001 р.

(72) Болгова Лідія Севастіанівна, Туганова Тамара
Миколаївна, Танасійчук Ірина Сергіївна(73) Інститут онкології Академії медичних наук
України, UA(57) Спосіб цитогенетичної діагностики лімфопр-
ліферативних процесів, що включає кількісне ви-

значення ядерців лімфатичних клітин, який **відрізняється** тим, що при підвищеному вмісті компактних і компактно-нуклеолонемних ядерців (компактних - від $0,10 \pm 0,004$ до $0,39 \pm 0,002$ - від 1,3% до 4,6%; компактно-нуклеолонемних - від $(82,2 \pm 3,3)\%$ до $(88,8 \pm 2,1)\%$) діагностується злоякісний, а при низьких значеннях (компактних - 0; компактно-нуклеолонемних - від $(6,7 \pm 3,6)\%$ до $(17,6 \pm 7,0)\%$) - доброякісний лімфопрліферативний процес.

Винахід відноситься до медицини, зокрема, до онкології і стосується діагностики злоякісних та доброякісних лімфопрліферативних процесів (ЛПП).

В літературі відомі способи цитогенетичного дослідження рівня проліферації лімфоїдних клітин, показників розмежування доброякісних та злоякісних патологічних процесів, визначення прогнозу лімфопрліферативних захворювань (ЛПЗ) [1-3].

Автори провели дослідження, основним завданням якого було встановлення значення виявлення активності області ядерцевих організаторів (ЯОР) у диференційній діагностиці лімфом низького та високого ступеня злоякісності, в розмежуванні реактивної фолікулярної гіперплазії (РФГ) та фолікулярної центробластно-центроцитарної лімфоми і у визначенні прогнозу лімфом. Матеріалом для дослідження слугували 60 випадків ЛПЗ, у тому числі 51 випадок неходжкінської злоякісної лімфоми (НХЛ) і 9 - РФГ. Виявлення ЯОР проводили на парафінових зрізах з використанням методу забарвлення розчином нітрату срібла [4]. При цьому підрахування гранул срібла проводили під іммерсією при збільшенні $\times 1800$ у 100 клітинах. Підраховували середню кількість гранул срібла на одне ядро у кожному окремому випадку та їх середню кількість у кожній групі НХЛ. Проведені авторами дослідження встановили пряму залежність між активністю експресії ЯОР та ступенем злоякісності новоутворень, що дозволило їм розглядати активність ЯОР як критерій виявлення пухлин високого та низького ступеня злоякісності і визначення клінічного прогнозу ЛПЗ. Однак результати, які автори отримали при вивченні ЯОР на парафінових зрізах, не можуть бути співставлені з досліджен-

нями ядерцевих регіонів в цитологічних препаратах, оскільки різниця між гранулами візуалізованих на світлооптичному рівні аргірофільних білків, асоційованих із зонами ядерцевих організаторів (AgNORs), в цитологічних та гістологічних препаратах клітин однієї і тієї ж популяції незрівнянно велика [5].

Крім того, як відмічають самі автори, вивчений ними маркер має обмежене значення у диференційній діагностиці РФГ та фолікулярної центробластно-центроцитарної лімфоми.

Прототипом запропонованого "Способу цитогенетичної діагностики лімфопрліферативних процесів" можуть бути дослідження А.Ч. Дубровського [6] (Дубровский А.Ч., Клюкина Л.Б. Зоны организаторов ядрышка и митотическая активность неходжкинских лимфом // Архив патологии. - 1997. - Т. 59. - № 1. - С. 25-30), у яких проводилась кількісна оцінка аргентофільних гранул (АГ) у ядрах інтерфазних лімфоїдних клітин у цитологічних препаратах хворих з доброякісними та злоякісними гіперплазіями. Зони організаторів ядерців автори вивчали в пунктатах і мазках, відбитках з біопсованих лімфатичних вузлів із використанням забарвлення препаратів розчином азотнокислого срібла за методом D. Ploton et al. [4] і у модифікації авторів. Активність АГ досліджена авторами в циторамах 40 хворих НХЛ та 10 хворих з умовною нормою і РФГ. Кількісне визначення 3 основних типів АГ і характеру їх розподілу в ядрі проводили у 100 клітинах, використовуючи іммерсійне збільшення мікроскопа ($\times 800$); на основі одержаних даних розраховували середній вміст гранул на 1 клітину, представлені індивідуальні та сумарні цитогенетичні показники. В результаті проведених дослі-

джень авторами показана чітка залежність між рівнем проліферативної активності і ступенем злоякісної трансформації лімфоїдних клітин від кількості та розмірів АГ. Недоліком даного способу є те, що автори не відтворюють на своєму матеріалі диференціювання чотирьох основних активних і неактивних типів ядерець згідно із загальноприйнятою класифікацією вітчизняних авторів [7], а виділяють лише три типи розмірів АГ та їх розподілу у ядрі, не конкретизуючи у якому морфофункціональному типі ядерець досліджувалися дані гранули. Представлена авторами чітка залежність ступеня злоякісності ЛПП від кількості АГ не пояснює можливості зворотного співвідношення даних критеріїв, що, як ми пересвідчилися за результатами власних досліджень і даних літератури [3], має місце і є відображенням особливостей клінічної поведінки НХЛ у межах одного і того ж морфологічного варіанта.

Задача запропонованого "Способу цитогенетичної діагностики лімфопроліферативних процесів" - підвищення точності та ефективності диференційної цитоморфологічної діагностики доброякісних і злоякісних ЛПЗ методом цитогенетичного дослідження ядерного субстрату лімфоїдних клітин.

Поставлена задача досягається таким чином: проводиться чітка кількісна і якісна оцінка основних морфофункціональних варіантів ядерець, які виявляються при світловій мікроскопії.

У цитологічній діагностиці ЛПЗ подібний метод не застосовувався.

Дослідження активних форм ядерець проведено на гістологічно верифікованому матеріалі 2-х груп хворих ЛПЗ: 20 хворих з різними морфологічними підтипами НХЛ і 12 хворих з доброякісними ЛПП (табл. 1, 2). Об'єктом цитологічного дослідження були пунктати лімфатичних вузлів, шкребки, відбитки з видалених лімфатичних вузлів різної локалізації. Всі лімфограми попередньо досліджувались забарвленими за методом Паппенгейма. Для візуалізації і подальшого вивчення ядерцевого апарату використовували методику імпрегнації сріблом ядерцеутворюючих регіонів хромосом в інтерфазних клітинах за методом W. Howell і D. Black [8] та модифіковану нами методику для вивчення архівних препаратів. У кожному спостереженні проводився диференційований підрахунок чотирьох основних морфофункціональних типів ядерець (компактних, нуклеолонемних, кільцевидних та мікроядерець) на основі класифікації вітчизняних авторів [7]. У 100 ядрах лімфоїдних клітин вивчали топографію АГ нуклеолонемних ядерець для визначення кількості активних ядерець перехідного типу - компактно-нуклеолонемних, для яких була характерна центрально-периферична топографія АГ різного розміру. Дослідження проводили світловим мікроскопіюванням за допомогою мікроскопа МБИ-15-2 при $\times 900$ -, $\times 1440$ -кратному збільшенні імерсійної оптичної системи.

Встановлено, що на відміну від доброякісних ЛПП в НХЛ представлений повний набір морфофункціональних типів ядерець, що виявляються при світловій мікроскопії, з появою у 100% спостережень типових ядерець компактного типу, що є об'єктивною цитогенетичною особливістю НХЛ. Відсотковий вміст активних компактно-

нуклеолонемних типів ядерець при НХЛ становив від 68% до 90% (середній вміст - $82,2 \pm 3,3$) в малігнізованих лімфоцитах, від 50% до 99,2% (середній вміст - $84,4 \pm 4,4$) в малігнізованих пролімфоцитах, від 84% до 99,5% (середній вміст - $88,8 \pm 2,1$) в малігнізованих бластних клітинах. У той час, коли при доброякісних гіперплазіях відсотковий вміст компактно-нуклеолонемних ядерець варіював від повної відсутності до 50% (середній вміст - $6,7 \pm 3,6$) в лімфоцитах, до 60% (середній вміст - $11,7 \pm 5,3$) в пролімфоцитах, до 78% (середній вміст - $17,6 \pm 7,1$) в лімфобластах. Очевидно, що середній відсотковий вміст компактно-нуклеолонемних ядерець в малігнізованих лімфоїдних клітинах різного ступеня зрілості значно перевищує їх вміст в аналогічних клітинах при доброякісних ЛПП, що є об'єктивним, статистично вірогідним [9], диференційно-діагностичним цитогенетичним показником. Таким чином, вміст активних компактних і перехідних компактно-нуклеолонемних ядерець при НХЛ статистично вірогідно відрізняється від вмісту таких при доброякісних гіперплазіях.

Технічний результат винаходу полягає у кількісній та якісній оцінці цитогенетичних показників лімфоїдних клітин різного ступеню зрілості для більш точної диференційної діагностики лімфаденопатій доброякісного і злоякісного характеру та проявляється наявністю у 100% спостережень при НХЛ типових активних ядерець компактного типу (від $0,10 \pm 0,004$ до $0,39 \pm 0,002$ - від 1,3% до 4,6%), при повній відсутності їх при доброякісних гіперплазіях; статистично вірогідно підвищеним відсотковим вмістом компактно-нуклеолонемних ядерець перехідного типу при НХЛ (від $(82,2 \pm 3,3)\%$ до $(88,8 \pm 2,1)\%$) порівняно з доброякісними гіперплазіями (від $(6,7 \pm 3,6)\%$ до $(17,6 \pm 7,0)\%$).

Приклад конкретного використання 1

Хворий Бейер А. В., 1988 р. н., історія хвороби № 1231, який знаходився на обстеженні в Українському НДІОР з 10.10.1993 по 17.10.1993. Захворів місяць тому, коли було помічене збільшення лімфатичних вузлів шиї. Проведена відкрита біопсія лімфатичного вузла шиї, зроблені відбитки для цитологічного дослідження. Цитологічне заключення № 4944 від 11.10.1993: лімфоїдні елементи з ознаками проліферації. Патогістологічне заключення № 17448/93 р.: реактивна фолікулярна гіперплазія. Клінічний діагноз - той самий.

Об'єктом цитологічного дослідження були відбитки з видалених лімфатичних вузлів шиї. Всі лімфограми попередньо досліджувались забарвленими за методом Паппенгейма. Для візуалізації і подальшого вивчення ядерцевого апарату використовували методику імпрегнації сріблом ядерцеутворюючих регіонів хромосом в інтерфазних клітинах за методом W. Howell і D. Black [8] та модифіковану нами методику для вивчення архівних препаратів. У кожному спостереженні проводився диференційований підрахунок чотирьох основних морфофункціональних типів ядерець (компактних, нуклеолонемних, кільцевидних та мікроядерець) на основі класифікації вітчизняних авторів [7]. У 100 ядрах лімфоїдних клітин вивчали топографію АГ нуклеолонемних ядерець для визначення кількості активних ядерець перехідного типу - компактно-нуклеолонемних, для яких була характерна центрально-периферична топографія АГ різного

розміру. Дослідження проводили світловим мікроскопіюванням за допомогою мікроскопа МБИ-15-2 при $\times 900$ -, $\times 1440$ -кратному збільшенні імерсійної оптичної системи.

Встановлено, що в ядрах проліферуючих лімфоїдних елементів різного ступеню зрілості представлений неповний набір основних морфологічних типів ядерців, що виявляються при світловій мікроскопії, - не визначаються типові ядерця компактного типу. Активні компактно-нуклеолонемні типи ядерців відсутні в ядрах лімфоцитів і пролімфоцитів, в ядрах лімфобластів вони склали 8%, в той час, як власне нуклеолонемні ядерця з відносно рівномірним периферичним розподілом переважно середніх та дрібних АГ визначалися в 92%.

Приклад конкретного використання 2

Хворий Бобелюк С.А., 1992 р. н., історія хвороби № 2675, який знаходився на обстеженні в Українському НДІОР з 6.05.1998 по 15.09.1998. Захворів 2 місяці тому, коли було помічене збільшення лімфатичних вузлів в області шиї, праворуч. Після звернення до лікаря дитину лікували з приводу лімфаденіту (антибіотики, сухе тепло) - без ефекту. Після неодноразового обстеження та симптоматичного лікування за місцем проживання 10.04.1998 у хірургічному відділенні міської лікарні міста Тернополя провели оперативне видалення шийного лімфатичного вузла, патогістологічне та цитологічне дослідження якого не виявили онкозахворювання, і хворий був виписаний із стаціонару. Через 1 тиждень почався інтенсивний ріст пухлини і хворий був направлений на консультацію в УНДІОР. Дитину непокоїли болі в області шиї праворуч, що іррадіювали в вухо, зуби, голову, утруднене ковтання, дихання. В області шиї праворуч визначалась щільна бугриста пухлина, що займала область від соскоподібного відростка до надключичної області. Шкіра над пухлиною - гіперемована. Консультативне цитологічне заключення № 404/6 пункту шийного лімфатичного вузла: на фоні крові визначаються лімфоїдні елементи, переважно незрілі, а також нейтрофільні лейкоцити в помірній кількості - підозра на лімфосаркому. 7.05.1998 хворому знову проведена відкрита біопсія шийного лімфатичного вузла. Цитологічне заключення № 1393 від 7.05.1998 Інституту експериментальної патології онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України: в мазках-відбитках видалених при біопсії лімфатичних вузлів - мономорфна популяція лімфоїдних бластів з інтенсивно-базофільною вакуолізованою цитоплазмою (типу L_3), поодинокі макрофаги. Заклучення: неходжкінська злоякісна лімфома, дифузна, беркітоподібна ($H3L$ L_3). Цитологічне заключення № 1861 від 8.05.1998 за матеріалом відбитків видаленого лімфатичного вузла: злоякісна неходжкінська лімфома, лімфобластна, високого ступеня злоякісності (L_2 за FAB-класифікацією).

Патогістологічне заключення № 6940/1 від 19.05.1998: злоякісна лімфома, лімфобластна лімфосаркома з осередками беркітоподібної будови, дифузного характеру росту, з інфільтрацією прилеглої м'язової та жирової тканини.

Заклучний клінічний діагноз: лімфосаркома шиї праворуч, стадія 2, клінічна група 2.

Цитогенетичне дослідження.

Об'єктом цитогенетичного дослідження були відбитки з видаленого лімфатичного вузла шиї. Лімфограми попередньо досліджувались забарвленими за методом Паппенгейма. Для візуалізації і подальшого вивчення ядерцевого апарату використовували методику імпрегнації сріблом ядерцеутворюючих регіонів хромосом в інтерфазних клітинах за методом W. Howell і D. Black [8]. Проводився диференційний підрахунок чотирьох основних морфологічних типів ядерців (компактних, нуклеолонемних, кільцевидних та мікроядерців) на основі класифікації вітчизняних авторів [7]. У 100 ядрах лімфоїдних клітин вивчали топографію АГ нуклеолонемних ядерців для визначення кількості активних ядерців перехідного типу - компактно-нуклеолонемних, для яких була характерна центрально-периферична топографія АГ різного розміру. Дослідження проводили світловим мікроскопіюванням за допомогою мікроскопа МБИ-15-2 при $\times 900$ -, $\times 1440$ -кратному збільшенні імерсійної оптичної системи.

Встановлено, що в ядрах малігнізованих лімфобластів представлений повний набір морфологічних типів ядерців, що виявляються при світловій мікроскопії, з появою типових ядерців компактного типу ($0,48 \pm 0,10$ - 5,5%). Відсотковий вміст активних компактно-нуклеолонемних типів ядерців склав 88,5%. Дані цитогенетичного дослідження свідчать про злоякісний лімфопроліферативний процес.

Порівняння цитогенетичних даних хворих Бобелюк С.А., Бейер А. В. виявило суттєві відмінності у вмісті активних компактних і компактно-нуклеолонемних типів ядерців. Це дозволило з більшою точністю провести диференційну діагностику ЛПЗ, визначити характер патологічного процесу, що має суттєве значення для тактики лікування та ймовірного клінічного прогнозу.

Виявлені особливості прояву ЯОР ядер лімфоїдних клітин при НХЛ та доброякісних гіперплазіях можуть бути застосовані в якості об'єктивних цитогенетичних критеріїв та дозволять розширити можливості диференційної цитологічної діагностики ЛПЗ на рівні світлової мікроскопії.

Джерела інформації

1. 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 // Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - № 5. - С. 65.

2. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А., Тупицин Н.Н., Шолохова Е.Н. Ядрышковый организатор как маркер степени злокачественности и прогноза неходжкинских злокачественных лимфом // Архив патологии. - 1996. - Т. 58. - № 4. - С. 22-27.

3. Букаева А.И., Райхлин Н.Т., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А., Тупицин Н.Н., Шолохова Е.Н. Дифференциально-диагностическое и прогностическое значение активности области ядрышковых организаторов при неходжкинских злокачественных лимфомах // Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - № 10. - С. 37-38.

4. Ploton D., Menager M., Jeanneson P. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions at the optical level // *HistochemJ*, 1986, vol. 18, p. 5-14.

5. Дубенская Л.И., Баженов С.М. Белки, ассоциированные с зонами ядрышкового организатора: практическое применение в онкоморфологии и связь с биологическими особенностями опухоли // *Архив патологии*. - 1992. - Т. 54. - № 4. - С. 40-43.

6. Дубровский А.Ч., Клюкина Л.Б. Зоны организаторов ядрышка и митотическая активность не-

ходжкинских лимфом // *Архив патологии*. - 1997. - Т. 59. - № 1. - С. 25-30 (прототип).

7. Челидзе П.В., Зацепина О.В. Морфофункциональная классификация ядрышек // *Успехи современной биологии*. - 1988. - Т. 105. - № 2. - С. 252-266.

8. Howell W., Black D. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protectiv colloidal developer // *Experientia*, 1980, vol. 36, p. 1014-1015.

9. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала. - 1990. - 17с.

Таблица 1

Відсоткове співвідношення топографії аргентофільних гранул нуклеолонемних ядерців в злоякісних неходжкінських лімфомах

№ п/п	Прізвище хворого	Типи малігнізованих лімфоїдних клітин					
		Лімфоцити		Пролімфоцити		Лімфобласти	
		п*	п+ц**	П	п+ц	п	п+ц
Лімфоцитарна лімфома							
1	Б-ко	17 22	83 78	16	84	-	-
Лімфоцитарно-пролімфоцитарна, дифузна							
2	Ц-ка	12	88	12	88	-	-
3	Л-рь	10	90	11	89	-	-
4	К-ко	16	84	13	87	-	-
5	Щ-на	16	84	17	83	-	-
Пролімфоцитарна лімфома							
6	Н-ков	-	-	11	89	-	-
Пролімфоцитарна лімфома, дифузна							
7	С-ка	-	-	13,4	86,6	-	-
8	С-ко	-	-	0,8	99,2	-	-
9	С-в	-	-	10	90	-	-
10	К-к	-	-	32	68	-	-
Бластні форми неходжкінських лімфом							
Імунобластна лімфома							
11	К-ша	-	-	-	-	10	90
Лімсфобластна лімфома, дифузна							
12	Г-ша	-	-	-	-	16	84
13	Я-к	-	-	-	-	16	84
Лімфобластна лімфома							
14	Б-л	-	-	-	-	0,5	99,5
15	Б-к	-	-	-	-	11,5	88,5
16	Кож-к	-	-	-	-	14	86
17	Х-н	-	-	-	-	10	90
Неходжкінські лімфоми без визначення морфологічного підтипу							
18	Ков-к	32	68	50	50	-	-
19	С-на	-	-	3	97	-	-
20	І-ко	-	-	17	83	-	-
Середній вміст							
		<u>17,8±3,3</u> 32-10	<u>82,2±3,3</u> 90-60	<u>16,0±4,4</u> 50-0,8	<u>84,0±4,4</u> 99,2-50	<u>11,2±2,1</u> 18-0,5	<u>88,8±2,1</u> 99,5-82

п* - периферичний розподіл аргентофільних гранул.

п+ц** - поєднання периферичного і центрального розміщення аргентофільних гранул.

Відсоткове співвідношення топографії аргентофільних гранул нуклеолонемних ядерців при доброякісних гіперплазіях

№ п/п	Прізвище хворого	Типи лімфоїдних клітин					
		лімфоцити		Пролімфоцити		лімфобласти	
		п*	п+ц*	П	п+ц	п	п+ц
Лімфоїдна гіперплазія							
1	В-ко	100	-	100	-	100	-
Гіперплазія лімфатичного вузла							
2	П-ва	100	-	80	20	90	10
Реактивна фолікулярна гіперплазія							
3	Б-р	100	-	100	-	92	8
Лімфопроліферативний процес							
4	Н-ра	100	-	100	-	100	-
Хронічний лімфаденіт							
5	Ю-ва	100	-	100	-	100	-
Хронічний гіперпластичний лімфаденіт							
6	П-в	100	-	99	1	83	17
Хронічний гіперпластичний лімфаденіт з осередками абсцедування							
7	М-к	50	50***	40	60***	80	20***
Хронічний лімфаденіт							
8	К-ль	78	22***	100	-	100	-
Хронічний гіперпластичний процес							
9	Ко-ль	100	-	100	-	100	-
Продуктивний туберкульозний лімфаденіт							
10	Ка-бе	100	-	100	-	50	50***
Продуктивний лімфаденіт							
11	Г-ц	100	-	100	-	-	-
Гранульоматозний епітеліоїдноклітинний лімфаденіт з наявністю багатоядерних клітин типу Пирогова- Лангханса							
12	Ч-ль	91	9	40	60	22	78***
Середній вміст		<u>93,2±4,5</u> 100-50	<u>6,7±3,6</u> 50-9	<u>88,3±5,4</u> 100-40	<u>11,7±5,3</u> 60-1	<u>82,4±7,0</u> 100-22	<u>17,6±7,0</u> 78-8

п* - периферичний розподіл аргентофільних гранул.

п+ц** - поєднання периферичного і центрального розміщення аргентофільних гранул.

*** - поодинокі середні та пилеподібні гранули в центрі нуклеолонемних типів ядерців.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22