

© Е. Л. Куренков, Е. В. Игенбаева, Т. В. Узлова, 2019
УДК 611.018.13:618.145

Е. Л. Куренков¹, Е. В. Игенбаева², Т. В. Узлова²

АКТИВНОСТЬ ЯДРЫШКОВЫХ ОРГАНИЗАТОРОВ В КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЖЕНЩИН С НОРМАЛЬНЫМ МЕНСТРУАЛЬНЫМ ЦИКЛОМ

¹ Кафедра акушерства и гинекологии (зав. — проф. В. Ф. Долгушина), ² кафедра анатомии человека и оперативной хирургии (зав. — проф. Е. Л. Куренков), ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск

Цель — изучить структуру и активность ядрышковых организаторов в эпителиальных и стромальных клетках нормального эндометрия женщин репродуктивного возраста на разных стадиях менструального цикла с помощью гистохимической (аргентаффинной) реакции.

Материал и методы. Исследованы биоптаты нормального эндометрия от 30 женщин репродуктивного возраста. Для определения структуры и активности ядрышковых организаторов использовали гистохимическую (аргентаффинную) реакцию. Подсчитывали число ядрышек, интрануклеолярных и экстрануклеолярных аргентаффинных включений в клетках железистого, покровного эпителия и клетках собственной пластинки слизистой оболочки матки на разных стадиях менструального цикла.

Результаты. Во время фазы пролиферации в эпителиальных клетках и фибробластах стромы эндометрия активность ядрышковых организаторов повышалась, что свидетельствует о нарастании процессов биогенеза рибосом. На ранней и средней стадиях фазы секреции в клетках железистого и покровного эпителия биогенез рибосом замедлялся, в то время как в фибробластах стромы усиливался. От средней стадии фазы секреции к ее поздней стадии наблюдалось усиление биогенеза рибосом в эпителиальных клетках и фибробластах стромы эндометрия. В лимфоцитах и гистиоцитах стромы изменений активности ядрышковых организаторов с помощью методики Д. Крокера на разных стадиях менструального цикла не выявлено.

Выводы. Активность ядрышковых организаторов является информативным показателем для оценки функционального состояния эпителиальных и стромальных клеток слизистой оболочки матки на различных стадиях менструального цикла.

Ключевые слова: эндометрий, ядрышковые организаторы, менструальный цикл женщины

Методика определения активности ядрышковых организаторов широко используется для изучения процессов биогенеза рибосом в клетках различного типа [10–12, 14]. Активность ядрышковых организаторов оценивается по количеству и характеру распределения ассоциированных с ними аргентаффинных, т. е. способных окрашиваться нитратом серебра, белков С23 (нуклеолин) и В23 (нуклеофозмин), ответственных за активацию и контроль транскрипции с участием рибосомальных генов [2, 6, 8]. Одним из преимуществ данной методики является возможность оценки степени напряженности биогенеза рибосом в количественном эквиваленте. Определение активности ядрышковых организаторов представляет клинический интерес для изучения динамики изменений степени напряженности биогенеза рибосом в клетках эндометрия на протяжении нормального менструального цикла.

Цель исследования — изучить структуру и активность ядрышковых организаторов в эпителиальных и стромальных клетках нормального

эндометрия женщин репродуктивного возраста на разных стадиях менструального цикла с помощью гистохимической (аргентаффинной) реакции.

Материал и методы. Исследовали биоптаты эндометрия, полученные от 30 женщин репродуктивного возраста, находящихся на оперативном лечении в гинекологическом отделении клиники ЮУГМУ по поводу доброкачественных опухолей яичников, миомы матки (интерстициальная и субсерозная локализация) размером не более 5 см в диаметре. Все женщины имели регулярный менструальный цикл, не получали гормональное лечение, не имели признаков наружного генитального эндометриоза по данным лапароскопии. Средний возраст пациенток составил 34,5±6,9 года. Исследование проводили после письменного информированного согласия пациенток. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ЮУГМУ (протокол № 3 от 13.03.2017 г.).

Парафиновые блоки биоптатов эндометрия фиксировали в 10 % растворе формалина. В зависимости от фазы менструального цикла эндометрий был распределен на подгруппы: фаза пролиферации — ранняя стадия (А), средняя стадия (Б), поздняя стадия (В); фаза секреции — ранняя стадия (Г), средняя стадия (Д), поздняя стадия (Е). Для определения соответ-

Сведения об авторах.

Куренков Евгений Леонидович, кафедра акушерства и гинекологии, Игенбаева Елена Валерьевна (e-mail: bulba2606@mail.ru), Узлова Татьяна Васильевна, кафедра анатомии человека и оперативной хирургии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» (ЮУГМУ) Минздрава России, 454092, г. Челябинск. ул. Воровского, 64

ствия эндометрия фазы и стадии менструального цикла изготовили серийный набор гистологических срезов толщиной 5–7 мкм, который был окрашен гематоксилином — эозином. Из исследования исключали эндометрий с признаками гиперпластических изменений (гиперплазия, полипы эндометрия), остро и хронического воспаления.

Для определения активности ядрышковых организаторов изготовили другой набор серийных гистологических срезов, которые окрашивали 50 % коллоидным раствором нитрата серебра (ОАО «Аурат») по методу Д. Крокера (1983) [1]. Содержание ядрышек, а также интрануклеолярных, расположенных в ядрышке, и экстрануклеолярных, расположенных в карิโอплазме ядра, аргентаффинных включений (белков, ассоциированных с ядрышковыми организаторами, выявляемых серебрением) определяли в клетках железистого эпителия, покровного эпителия, а также в фибробластах, лимфоцитах и гистиоцитах стромы в каждой фазе и стадии менструального цикла. Анализировали по 250 эпителиальных клеток, по 400 клеток стромы эндометрия, по 10 лимфоцитов стромы и по 8 гистиоцитов стромы на отдельную стадию при увеличении 1000 с масляной иммерсией и зеленым светофильтром (рис. 1, 2).

Результаты подвергали статистической обработке с помощью программы SPSS7 (IBM). Для выявления значимости различий применяли критерий Манна—Уитни.

Результаты исследования. Установлено, что в клетках железистого и покровного эпителия, начиная от ранней стадии фазы пролиферации к ее средней стадии, происходит значимое увеличение числа ядрышек, интрануклеолярных включений, экстрануклеолярных включений и суммарного числа включений (табл. 1, 2).

От средней стадии фазы пролиферации к поздней стадии той же фазы менструального цикла в железистом эпителии увеличивается число

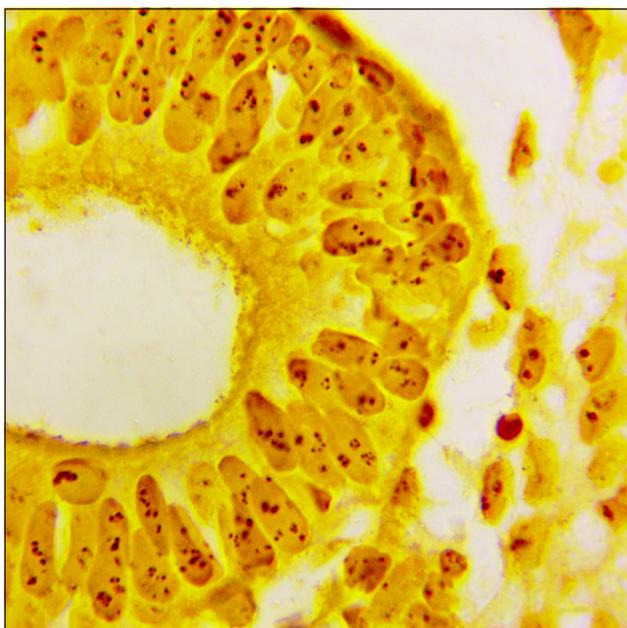


Рис 1. Эндометрий на средней стадии фазы пролиферации.

Железа. Аргентаффинная реакция с 50 % коллоидным раствором серебра. Ув. 1000

интрануклеолярных и экстрануклеолярных включений, а также их суммарное число. В покровном эпителии на поздней стадии фазы пролиферации по сравнению со средней стадией увеличивается число ядрышек, интра- и экстрануклеолярных включений, а также суммарное число включений.

В фибробластах стромы к средней стадии фазы пролиферации по сравнению с ее ранней стадией увеличивается число ядрышек, интра- и экстрануклеолярных включений, суммарное число включений. К поздней стадии фазы пролиферации в фибробластах увеличивается число ядрышек, интрануклеолярных включений и суммарное число включений.

Таким образом, на протяжении фазы пролиферации в клетках эндометрия наблюдается повышение числа ядрышковых организаторов, что свидетельствует о нарастании активности процессов биогенеза рибосом в данных клетках.

При сравнении показателей активности ядрышковых организаторов в конце поздней стадии фазы пролиферации отмечалось снижение числа ядрышек, интра- и экстрануклеолярных включений, их суммарного числа, наблюдаемые к началу ранней стадии фазы секреции в клетках железистого, покровного эпителия и фибробластах стромы. На средней стадии фазы секреции по сравнению с ее ранней стадией в клетках железистого эпителия уменьшалось число ядрышек, интрануклеолярных включений и суммарное число включений. Одновременно в клетках покровного эпителия уменьшалось только число интрануклеолярных включений, а также суммарное число включений, а в фибробластах стро-

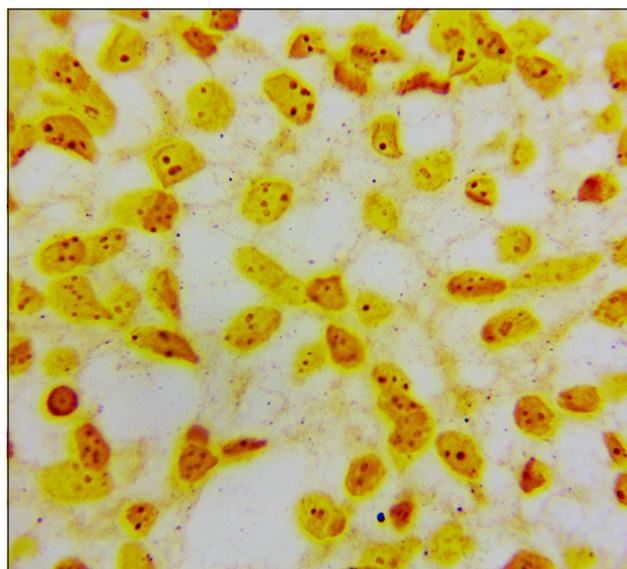


Рис 2. Эндометрий на средней стадии фазы пролиферации.

Собственная пластинка слизистой оболочки матки. Аргентаффинная реакция с 50 % коллоидным раствором серебра. Ув. 1000

Таблица 1

Число ядрышек, интрануклеолярных и экстрануклеолярных включений, интрануклеарных аргентаффинных гранул в эпителиальных клетках эндометрия ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Показатели	А	Б	В	Г	Д	Е
ЧЯЖЭ	1,94±0,058	2,80±0,056 [#]	2,98±0,070	2,26±0,062 [#]	2,00±0,041 [^]	2,94±0,058 [#]
ЧИВЖЭ	3,16±0,101	5,44±0,137 [#]	5,90±0,149*	4,10±0,122 [#]	3,29±0,070 [#]	5,60±0,100 [#]
ЧЭВЖЭ	0,16±0,026	0,15±0,025	0,31±0,030 [#]	0,06±0,017 [#]	0,03±0,011	0,20±0,029 [#]
СЧИВЖЭ	3,32±0,109	5,70±0,145 [#]	6,22±0,155 [^]	4,17±0,126 [#]	3,32±0,072 [#]	5,88±0,105 [#]
ЧЯПЭ	1,52±0,034	2,46±0,039 [#]	2,89±0,048 [#]	2,06±0,051 [#]	2,05±0,430	2,94±0,051 [#]
ЧИВПЭ	2,57±0,073	4,33±0,078 [#]	4,84±0,082 [#]	4,31±0,086 [#]	3,36±0,068 [#]	5,50±0,106 [#]
ЧЭВПЭ	0,03±0,010	0,14±0,025 [#]	0,24±0,027 [^]	0,08±0,018 [#]	0,08±0,017	0,42±0,038 [#]
СЧИВПЭ	2,60±0,077	4,46±0,081 [#]	5,08±0,091 [#]	4,40±0,093 [#]	3,44±0,07 [#]	5,92±0,114 [#]

Примечание. А, Б, В, Г, Д, Е — стадии фаз менструального цикла (пояснения в тексте — см. выше). ЧЯЖЭ — число ядрышек в клетке железистого эпителия эндометрия. В ядре клетки железистого эпителия: ЧИВЖЭ — число интрануклеолярных включений, ЧЭВЖЭ — число экстрануклеолярных включений, СЧИВЖЭ — суммарное число интрануклеарных включений, ЧЯПЭ — число ядрышек на клетку покровного эпителия эндометрия. В ядре клетки покровного эпителия: ЧИВПЭ — число интрануклеолярных включений, ЧЭВПЭ — число экстрануклеолярных включений, СЧИВПЭ — суммарное число интрануклеарных включений. Различия с показателем в аналогичной строке предыдущего столбца значимы: * при $p < 0,05$; [^] при $p < 0,005$; [#] при $p < 0,0001$.

Таблица 2

Число ядрышек, интрануклеолярных и экстрануклеолярных включений, интрануклеарных аргентаффинных гранул в клетках стромы эндометрия ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Показатели	А	Б	В	Г	Д	Е
ЧЯФС	1,55±0,032	2,56±0,036 [#]	2,86±0,043 [#]	2,10±0,038 [#]	2,24±0,039 [#]	2,95±0,046 [#]
ЧИВФС	2,11±0,044	3,94±0,062 [#]	4,58±0,084 [#]	3,24±0,048 [#]	3,37±0,062	4,71±0,840 [#]
ЧЭВФС	0,03±0,009	0,16±0,018 [#]	0,13±0,017	0,06±0,012 [#]	0,07±0,013	0,15±0,018 [#]
СЧИВФС	2,17±0,050	4,10±0,068 [#]	4,72±0,086 [#]	3,30±0,052 [#]	3,45±0,068	4,86±0,087 [#]
ЧЯЛС	1	1	1	1	1	1
ЧИВЛС	1	1	1	1	1	1
ЧЭВЛС	0	0	0	0	0	0
СЧИВЛС	1	1	1	1	1	1
ЧЯГС	1	1	1	1	1	1
ЧИВГС	1	1	1	1	1	1
ЧЭВГС	0	0	0	0	0	0
СЧИВГС	1	1	1	1	1	1

Примечание. А, Б, В, Г, Д, Е — стадии фаз менструального цикла (пояснения в тексте). ЧЯФС — число ядрышек в 1 фибробласте стромы эндометрия. В ядре фибробласта стромы: ЧИВФС — число интрануклеолярных включений, ЧЭВФС — число экстрануклеолярных включений, СЧИВФС — суммарное число интрануклеарных включений. ЧЯЛС — число ядрышек в лимфоците стромы эндометрия. В ядре лимфоцита: ЧИВЛС — число интрануклеолярных включений, ЧЭВЛС — число экстрануклеолярных включений, СЧИВЛС — суммарное число интрануклеарных включений. ЧЯГС — число ядрышек в гистиоците стромы эндометрия. В ядре гистиоцита: ЧИВГС — число интрануклеолярных включений, ЧЭВГС — число экстрануклеолярных включений, СЧИВГС — суммарное число интрануклеарных включений. Различия с показателем в аналогичной строке предыдущего столбца значимы: [#] при $p < 0,0001$.

мы — увеличение числа ядрышек, интрануклеолярных включений и суммарное число включений. Таким образом, от ранней стадии фазы секреции к средней степень напряженности биогенеза рибосом в клетках железистого и покровного эпителия снижалась, а в фибробластах стромы повышалась.

При сравнении показателей активности ядрышковых организаторов между средней стадией фазы секреции и ее поздней стадией в клетках

железистого, покровного эпителия и фибробластах стромы выявлено увеличение числа ядрышек, интра- и экстрануклеолярных включений, суммарного числа включений. Это свидетельствует о повышении степени напряженности биогенеза рибосом в данных клетках во время фазы секреции. В лимфоцитах и гистиоцитах стромы изменений активности ядрышковых организаторов на разных стадиях менструального цикла с помощью методики Д. Крокера не выявлено.

Обсуждение полученных данных. Известно, что процессы биогенеза рибосом в клетках эндометрия регулируются половыми стероидами [4]. Биологический смысл фазы пролиферации заключается в восстановлении толщины функционального слоя эндометрия благодаря активным процессам клеточного деления, которые стимулируются нарастающим количеством эстрогенов, секретируемых растущим и созревающим фолликулом. Эстрогены при взаимодействии с рецепторами активируют гормон-рецепторный комплекс, который перемещается в ядро, где связывается с акцепторными сайтами хромосом и инициирует транскрипцию генов, обеспечивающую синтез белков [3–5]. Повышение активности ядрышковых организаторов подтверждает нарастание активности биогенеза рибосом в клетках эндометрия в течение фазы пролиферации.

Снижение активности ядрышковых организаторов свидетельствует о переходе эндометрия в фазу секреции, которая регулируется прогестероном, обладающим свойством подавлять биогенез рибосом [4, 5]. В среднюю стадию фазы секреции наблюдается наименьшая активность ядрышковых организаторов в эпителиальных клетках эндометрия, что совпадает с наибольшей концентрацией прогестерона. В условиях ингибирующего действия прогестерона в фибробластах стромы наблюдается повышение количества ядрышек на средней стадии фазы секреции по сравнению с ранней стадией фазы пролиферации. На наш взгляд, это связано с процессами прецидуализации в собственной пластинке слизистой оболочки матки (эндометрии), в результате которых соединительнотканые клетки становятся более крупными, приобретают округлые формы и полигональные очертания. В их цитоплазме появляется гликоген. В межклеточном веществе стромы вокруг сосудов и под эпителием желез увеличивается количество протеогликанов [3]. На поздней стадии фазы секреции вместе со снижением концентрации прогестерона наблюдается повышение активности ядрышковых организаторов, что свидетельствует об активации процессов биогенеза рибосом, которые, по нашему мнению, обеспечивают подготовку клеток эндометрия к процессам запрограммированной клеточной гибели — апоптозу. При этом продуцируются белки-индукторы апоптоза, активируются рецепторы апоптоза, а также комплекс каспаз [7, 9, 13].

Вывод. Активность ядрышковых организаторов является информативным показателем для оценки функционального состояния эпителиальных и стромальных клеток слизистой оболоч-

ки матки на различных стадиях менструального цикла.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: Е. Л. К., Е. В. И., Т. В. У.

Сбор и обработка материала: Е. В. И.

Анализ и интерпретация данных: Е. Л. К., Е. В. И.

Написание текста: Е. Л. К., Е. В. И., Т. В. У.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крокер Д. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. М.: Мир, 1999. С. 261–279 [Crocker J. Molecular clinical diagnostics. Methods: per. s angl. / Ed. by S. Herrington, J. McGee. Moscow: Mir, 1999. P. 261–279. In Russ.].
2. Попков П.Н., Черепайкина А.М., Рябинин В.Е., Куренков Е.Л. Состояние активности ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс после индукции цирроза печени четырёххлористым углеродом и в динамике его лечения // Мед. наука и образцов. Урала. 2008. № 2. С. 66–68 [Popkov P.N., Cherepajkina A.M., Ryabinin V.E., Kurenkov E.L. State of activity of nucleolar organizers of hepatocytes of rats after induction of cirrhosis of liver by carbon tetrachloride and in dynamics of its treatment // Medicinskaya nauka i obrazovanie Urala. 2008. № 2. P. 66–68. In Russ.].
3. Топчиева О.И., Жемкова З.П., Прянишников В.А. Биопсия эндометрия. М.: Медицина, 1978. 232 с. [Topchieva O.I., Zhemkova Z.P., Pryanishnikov V.A. Endometrial biopsy. M.: Meditsina, 1978. 232 p. In Russ.].
4. Хмельницкий О.К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний. СПб.: СОТИС, 1994. 478 с. [Hmel'nitskiy O.K. Pathomorphological diagnosis of gynecological diseases. St. Petersburg: SOTIS, 1994. 478 p. In Russ.].
5. Яковлева И.А., Кукутэ Б.Г. Морфологическая диагностика предопухолевых процессов и опухолей матки по биопсиям и соскобам. Кишинев: Штиинца, 1979. 147 с. [Yakovleva I.A., Kukute B.G. Morphological diagnosis of precancerous processes and cancer by the uterine biopsies and swabs. Kishinev: Shtiintsa, 1979. 147 p. In Russ.].
6. Kobayakov D.S., Klimachev V.V., Avdalyan A.M., Bobrov I.P., Bychkova E.Y., Kruglova N.M., Lazarev A.F., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh L.M. Argrophilic proteins of nucleolar organizer regions and proliferative activity of cells in squamous cell carcinoma of the lung // Bull Exp. Biol. Med. 2014. Vol. 157, № 5. P. 677–682. doi: 10.1007/s10517-014-2642-6.
7. Korkmaz D., Bastu E., Dural O. et al. Apoptosis through regulation of Bcl-2, Bax and Mcl-1 expressions in endometriotic cyst lesions and the endometrium of women with moderate to severe endometriosis // J. Obstet. Gynaecol. 2013. Vol. 33, № 7. P. 725–728.
8. Mohamed Mahmoud S.A., El-Rouby D.H., El-Ghani S.F., Badawy O.M. Correlation between ploidy status using flow cytometry and nucleolar organizer regions in benign and malignant epithelial odontogenic tumors // Arch. Oral. Biol. 2017. Vol. 78. P. 94–99. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.015
9. Rogers P.A., Lederman F., Plunkett D., Affandi B. Bcl-2, Fas, and caspase 3 expression in endometrium from levonorgestrel

- implant users with and without breakthrough bleeding // *Hum. Reprod.*. Update. 2000. Vol. 15, suppl.3. P. 152–161.
10. Seifi S., Shafiqh E., Allaie A. Quantitative and qualitative analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions in follicular cyst, keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma // *J. Cancer Res Ther.* 2011. Vol. 7, № 3. P. 280–285. doi: 10.4103/0973-1482.87017
 11. Selvi B., Demirtas H., Eroz R., Imamoglu N. Reduction of the argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis with age in buccal epithelial cells of healthy individuals // *Aging. Clin. Exp. Res.* 2015. Vol. 27, № 2. P. 201–208. doi: 10.1007/s40520-014-0263-6
 12. Sowmya G.V., Nahar P., Astekar M., Agarwal H., Singh M.P. Analysis of silver binding nucleolar organizer regions in exfoliative cytology smears of potentially malignant and malignant oral lesions // *Biotech. Histochem.* 2017. Vol. 92, № 2. P. 115–121. doi: 10.1080/10520295.2017.1283055
 13. Taniguchi F., Kaponis A., Izawa M. et al. Apoptosis and endometriosis // *Front. Biosci (Elite Ed)*. 2011. Vol. 1, № 3. P. 648–662.
 14. Zillner K., Komatsu J., Filarsky K. et al. Active human nucleolar organizer regions are interspersed with inactive rDNA repeats in normal and tumor cells // *Epigenomics*. 2015. Vol. 7, № 3. P. 363–378.

Поступила в редакцию 15.06.2018
Получена после доработки 22.03.2019

ACTIVITY OF NUCLEOLAR ORGANIZERS IN ENDOMETRIAL CELLS OF WOMEN WITH NORMAL MENSTRUAL CYCLE

Ye. L. Kurenkov¹, Ye. V. Igenbayeva², T. V. Uzlova²

Objective — to examine the structure and the activity of the nucleolar organizing regions in epithelial and stromal cells

of normal endometrium in women of reproductive age at different stages of the menstrual cycle by histochemical (argentaffin) reaction.

Materials and methods. Biopsy specimens of normal endometrium from 30 women of reproductive age were studied. Histochemical (argentaffin) reaction was performed to determine the activity of the nucleolar organizing regions. The number of nucleoli, intranucleolar and extranucleolar argentaffin inclusions were counted in cells of glandular and surface epithelium and in the cells of the lamina propria of the uterine mucosa at different stages of the menstrual cycle.

Results. During the proliferative phase, the activity of the nucleolar organizers increased in the epithelial cells and endometrial stromal fibroblasts, which indicates an increase in the activity of ribosomal biogenesis processes. In the early and middle secretory phase ribosomal biogenesis decelerated in the cells of the glandular and surface epithelium and increased in stromal fibroblasts. From the middle to late secretory phase an increased ribosomal biogenesis was observed in epithelial cells and endometrial stromal fibroblasts. No changes in the activity of the nucleolar organizers were demonstrated by J. Crocker's technique in stromal lymphocytes and histiocytes at various phases of the menstrual cycle.

Conclusions. The activity of nucleolar organizers is an informative indicator for assessing the functional state of epithelial and stromal cells of the endometrium at various phases of the menstrual cycle.

Key words: *women's menstrual cycle, endometrium, nucleolar organizers*

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, ² Department of Human Anatomy and Operative Surgery, South Ural State Medical University, 64 Vorovskogo St., Chelyabinsk 454092, Russia