

Д.Д. Зербіно  
С.В. Федевич  
В.І. Ковалишин

Львівський національний  
медичний університет  
імені Данила Галицького, Львів,  
Україна

## СВІТЛОКЛІТИННИЙ РАК НИРКИ РІЗНИХ СТУПЕНІВ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ: ОСОБЛИВОСТІ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ПУХЛИННИХ КЛІТИН

**Ключові слова:** світлоклітинний рак нирки, пухлинна клітина, гіалінова глобула, гранула глікогену, ліпідна крапля, мітохондрії.

**Мета:** проаналізували у порівняльному плані ультраструктурну організацію пухлинних клітин (ПК) світлоклітинного раку нирки (СКРН) різних ступенів диференціації. **Об'єкт і методи:** матеріалом слугували післяопераційні біоптати периферичної та центральної частин пухлин: високодиференційованого СКРН (G1) — 5; раку середнього ступеня диференціації (G2) — 5; раку низького ступеня диференціації (G3) — 6 випадків. **Контроль:** біоптати ниркової кори елімінованих нірок (їх частин та цілих органів) хворих на СКРН; біоптати ниркової кори статевозрілих білих щурів. **Метод:** трансмісійної електронної мікроскопії. **Результати:** в альвеолах, тубулах і ацинусах СКРН різних ступенів диференціації містяться ПК високої, низької та середньої електронної щільності з переважанням останніх у СКРН G1. Контрольні дослідження дали можливість виявити, що ультраструктурна організація ПК середньої електронної щільності СКРН G1 є близькою до такої високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефрона ниркової кори свавців в нормі та високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефрона ниркової кори хворих на СКРН G1. **Висновки:** ПК середньої електронної щільності пухлин високодиференційованого (G1) СКРН порівняно із клітинами пухлин середнього (G2) та низького (G3) ступенів диференціації СКРН мають найбільш «нормалізовану» ультраструктуру.

### ВСТУП

Для пухлинних клітин (ПК) світлоклітинного раку нирки (СКРН) людини притаманне формування та накопичення в цитоплазмі (ЦТ) гіалінових глобул (ГГ), «гіалінізованих» включень, гранул глікогену (ГР), ліпідних крапель (ЛК), аутофагосом (АФС), тілець Маллорі, вакуолей [1–5]. Відомо також про накопичення в ЦТ ПК СКРН холестерину та його ефірів, нейтральних ліпідів і глікогену [6]. За даними імуногістохімічних досліджень, ПК, що насичені білком р62 ГГ [7], розглядаються дослідниками як можливі предиктори прогнозу у хворих на СКРН [2]. За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) було продемонстровано значні нагромадження щільних гранул  $\alpha$ -глікогену у ЦТ електронно-світливих епітеліальних клітин тубул нефронів щурів із розвинутим експериментальним діабетом [3]. Поява в епітеліальних клітинах нефронів щільних гранул  $\alpha$ -глікогену пов'язана з інтратубулярною дисплазією та є характерною ознакою пренеопластичних перетворень у тканині. Інші дослідники вказують, що у ЦТ клітин при СКРН проходить нагромадження характерних для цієї патології аномальних ГР [4]. На ультраструктурному рівні досліджено цитоплазматичні ГР, ЛК, з'єднувальні комплекси, десмосоми і мікрворсинки ПК СКРН різних ступенів диференціації (G1, G2, G3) [8].

Встановлено також, що пухлини високого ступеня диференціації (G1) містять ПК різної електронної щільності. У ПК високої (ПКВ) та середньої електронної щільності (ПКС) переважають генеративні процеси, у ПК низької електронної щільності (ПКН) — дегенеративні зміни [9]. Цими ж дослідниками виявлено в складі оптимально сформованих тубулярних структур пухлин поруч із ПКС нефрогенні мезенхімальні клітини (МК). МК та стовбурові клітини використовуються в аналізі й таргетній терапії не тільки раку нирки [10], а й широкого спектра ниркових захворювань [11].

Значні нагромадження ГР та ЛК у ЦТ ПК пов'язують із процесами гібернації [9], гліколізу [12] та глюконеогенезу [3]. За допомогою ТЕМ показано, що у первинних пухлинах СКРН ЦТ значної кількості клітин вщерть наповнена дрібними електронно-світливими ЛК, поодинокими мітохондріями (М) та ГР [5, 12]. Новим в аналізі ЛК є те, що такі цитоплазматичні включення морфологічно подібні до аналогічних структур адипоцитів і поєднані з білком MAP1S. Деградація таких ЛК в аутофаголізосомах ПК призводить до дефіциту MAP1S, що в свою чергу посилює розвиток пухлин і знижує показники виживаності хворих [13]. Присутність у ЦТ ПК СКРН поодиноких дрібних М (а відтак дефіцит сукцинатдегідрогенази) нова Ванкуверська класифіка-

ція раку нирки (2016) використовує як ключовий показник у діагностиці цієї патології [14].

Аутофагія відіграє подвійну роль у пригніченні ініціації та сприянні виживанню пухлин нирки. Це привертає інтерес до вивчення АФС та застосування антиаутофагії, як абсолютно нового підходу до лікування раку [15]. Візуалізація АФС за допомогою ТЕМ у клітинах, у тому числі й ракових, досі вважається золотим стандартом для вивчення аутофагії у тканинах [16, 17]. Аналіз ЦТ клітин ссавців, здійснений на ультраструктурному рівні, дав змогу виявити раніше невідомі видовжені та ізольовані мембранами АФС, що вміщують білок p62 та клони селективних електронношільних субструктур [18]. Оточуюча ПК строма розширена, дезорганізована, вміщує преципітати і коагуляти, склеротизована та васкуляризована. Показано провідну роль внутрішньопухлинного ангиогенезу в забезпеченні життєдіяльності ПК [19, 20]. Окремі ПК або групи ПК і клітин строми перебувають на етапах дезорганізації, гібернації, апоптозу, некрозу [21]. Запальні цитокіни, прокоагуляційні ліпіди і протеїни та тканинний фактор (пухлинний прокоагулянт), що секретуються із ЦТ ПК в строму, мають здатність активувати систему гомеостазу і брати участь у формуванні волокон фібрину та рості пухлини. Також ПК активізують фібринолітичну систему завдяки продукції активаторів плазміногену, що вносить вклад у протеолітичну деградацію пухлин [22]. У цілому, стан пухлин характеризується порушенням кровопостачанням, інтерстиціальною гіпертензією, гіпоксією, ацидозом, запаленням, неконтрольованою проліферацією клітин [23, 24] та має стосунок до стрес-ідукованої нейроендокринної динаміки організму [25].

В останні роки активно вивчається роль клітинних і неклітинних компонентів мікрооточення строми пухлин у формуванні претастатичних ніш та таргетній терапії [26]. Однак не існує однозначних даних про надходження стовбурових ПК: від нормальних стовбурових (прогеніторних) або від диференційованих клітин, які в ході мутацій набувають ознак, характерних для стовбурових ПК. Залишаються також нерозв'язаними питання утворення і стану претастатичних ніш у злоякісних пухлинах ще до виходу ПК у циркуляцію внутрішнього середовища організму [27, 28]. Попри значні досягнення у вивченні судинного ремоделювання в злоякісних пухлинах, до цього часу недостатньо вивчено процеси, пов'язані з клітинними трансформаціями у людини [29]. У низці клінік випробовуються нові підходи в персоналізованій таргетній терапії хворих онкологічного профілю, що засновані на нормалізації ПК СКРН [30, 31]. Із впровадженням нових підходів у терапії, що базуються на нормалізації ПК, на наш погляд, зростає потреба в поглибленому дослідженні ультраструктури верифікованих клітин СКРН відповідно до ступенів ядерних характеристик за S.A. Fuhrman та співавторами [32].

Разом з тим робіт, які б висвітлювали стан ПК СКРН різних ступенів диференціації на ультраструктурному рівні, вкрай мало.

Метою роботи було розкрити в порівняльному плані ультраструктурні особливості ПК СКРН людини високого, середнього та низького ступенів диференціації.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на базі урологічного відділення Львівської обласної клінічної лікарні, кафедри патологічної анатомії та судової медицини і лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. У рандомізований спосіб, на основі медичних карт стаціонарного хворого про встановлення клінічного діагнозу раку нирки, простежено (за інформованою згодою на участь у дослідженні кожного хворого) 16 пацієнтів, що були направлені на проведення хірургічного лікування та патогістологічне дослідження. Останнє ґрунтувалося на визначенні форми, складу і діаметра ядер ПК за допомогою мікроскопічної морфології парафінових зрізів, забарвлених гематоксиліном і еозином. Ядерні характеристики в системі гістологічної класифікації СКРН за S.A. Fuhrman та співавторами [32] забезпечують верифікацію діагнозу за ступенями диференціації (градації) G1, G2, G3, G4 [14, 33]. Проведений відповідно до наказу МОЗ України від 28.03.2016 р. № 247 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при раку нирки» аналіз протоколів патогістологічного дослідження дав можливість стратифікувати пацієнтів на три групи за ступенями диференціації пухлини: із СКРН G1 — 5 випадків (4 чоловіки віком 61–83 роки та 1 жінка віком 50 років); із СКРН G2 — 5 (3 чоловіки віком 43–66 років та 2 жінки віком 59 і 69 років); із СКРН G3 — 6 випадків (чоловіки віком 48–75 років).

Збір матеріалу провадили згідно з апробованими схемами патогістологічних досліджень нирково-клітинного раку [34]. Матеріалом для проведення ТЕМ СКРН слугували післяопераційні біоптати периферичної та центральної частин пухлин, для контролю — післяопераційні біоптати ниркової кори (макроскопічно «чистого» хірургічного краю нирки), що розміщувалися на відстані 1 см від краю СКРН, та елімінованих у процесі хірургічного лікування цих самих хворих частин нирок та цілих нирок. Також матеріалом для проведення контролю слугували біоптати ниркової кори 5 лабораторних статевозрілих білих шурів-самців (норма).

Для проведення ультрамікроскопічного дослідження матеріал фіксували за загальноприйнятою у ТЕМ методикою. Зафіксовані біоптати дегідрували в етанолі зростаючої концентрації, потім в ацетоні, після чого поміщали в суміш епону та аралдиту [35]. Ультратонкі зрізи готували за допомогою ультратонкого УМТП-3М, монтували на опорні

сітки та контрастували в розчинах уранілацетату [36] і цитрату свинцю [37]. Проконтрастовані ультратонкі зрізи вивчали та фотографували з використанням електронного мікроскопа УЭМВ-100К (Суми, Україна) за прискорюючої напруги 75 кВ.

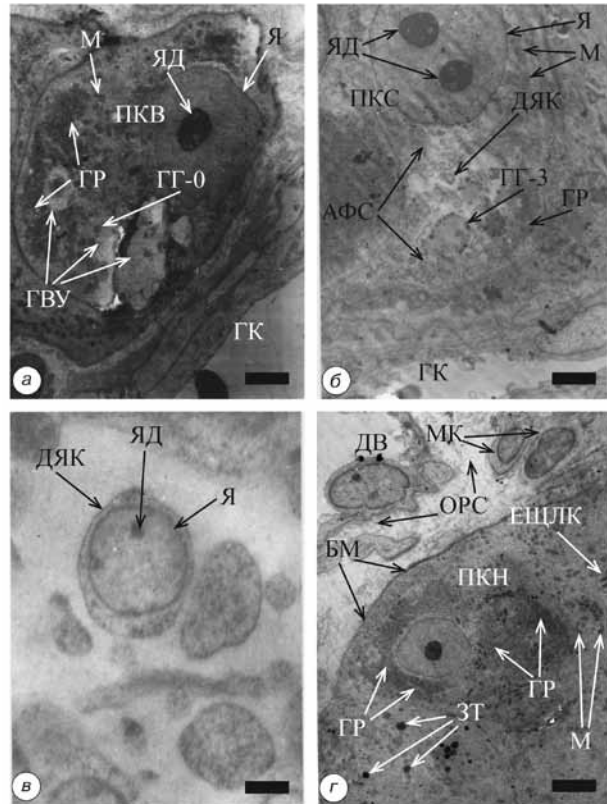
На ультраструктурному рівні в пухлинних альвеолах, тубулах і ацинусах периферичної і центральної частин СКРН диференціації G1, G2, G3 були досліджені різної щільності ПКВ, ПКС і ПКН. Як контроль досліджено ультраструктуру епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори хворих на СКРН різної диференціації та ультраструктуру епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори статевозрілих білих щурів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Електронномікроскопічне дослідження ультратонких зрізів периферичної частини пухлин СКРН G1 показало, що оптимально розвинуті пухлинні альвеоли і тубули є в оточенні базальних мембран (БМ) та вузьких прошарків строми. До складу таких альвеол і тубул входять ПКВ, ПКС і ПКН та поодинокі нефрогенні МК, що були описані раніше [9].

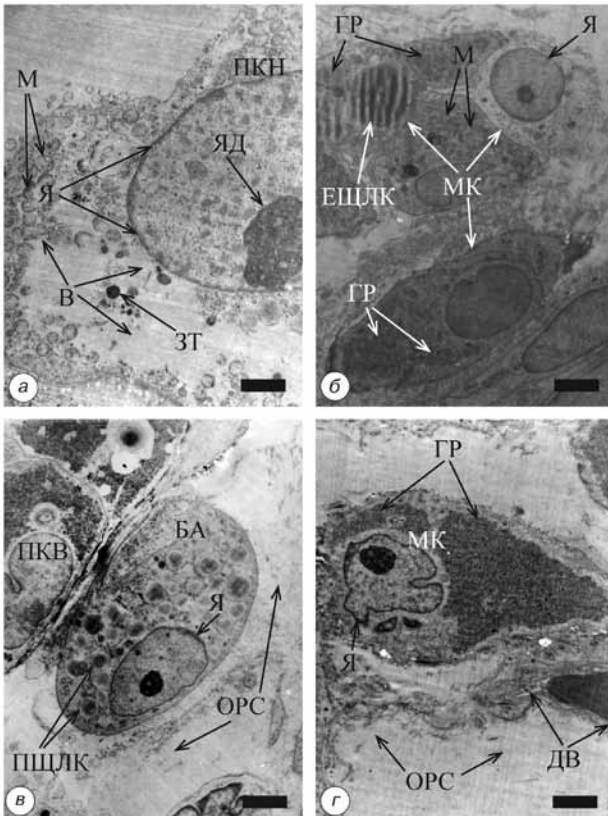
Центральна частина СКРН G1 представлена в основному частково або значною мірою дезорганізованими пухлинними альвеолами і тубулами (рис. 1, а, б, г), які ззовні обмежені БМ і у своєму складі містять переважно ПКС (рис. 1, б). Присутність БМ у складі стінок таких структурно-функціональних утворень підтверджує раніше зроблене припущення про те, що ступінь експресії окремих її компонентів може бути співвіднесений зі ступенем диференціювання ПК.

У тубулах центральної частини пухлин характерним є те, що ПКС вміщують великих розмірів яйцеподібної форми ядро (Я), що заповнене гомогенними масами ампліфікованого хроматину, серед яких містяться два електроннощільних ядереця (ЯД) (див. рис. 1, б). Присутність ампліфікованого хроматину та збільшеної кількості ЯД у складі Я ПКС може бути електронномікроскопічним тестом малігнізації такого роду клітин [38]. У базальнолатеральній частині ЦТ ПКС зосереджені незначні кількості ГР та поодинокі дрібні М, тоді як у базальній — значних розмірів АФС. У складі АФС містяться залишки ГГ 3-го типу (ГГ-3) та асоційовані з ними електроннощільні гранули малих розмірів (довжина ~ 0,21 мкм) і дрібні ядровмісні клітини (ДЯК) яйцеподібної форми (довжина ~ 0,63 мкм) (рис. 1, в). На нашу думку, виявлені нами АФС морфологічно аналогічні близьким похідним видовжених та ізольованих мембран АФС, що містять білок р62 та клони селективних електроннощільних субструктур ссавців. Базальні частини ЦТ ПКС тісно прилягають до стінки гемокапілярів, люмінальні поверхні ендотеліальних клітин яких утворені значною кількістю мікроворсинок. Присутність мікроворсинок у складі люмінальної поверхні ендотелі-



**Рис. 1.** Ультраструктура ПК центральної частини пухлин СКРН G1: а) ПКВ; б) ПКС, що містить АФС; в) фрагмент із рис. 1, б; ДЯК у складі АФС; г) ПКН у складі дезорганізованої пухлинної тубули. ГВУ — «гіалінізоване» внутрішньоклітинне утворення; ГГ-0 — гіалінова глобула зачаткова; ГК — гемокапіляр; ДВ — дрібна венула; ЗТ — залишкове тільце. Тут і далі: ЕЩЛК — електроннощільна ліпідна крапля; ОРС — основна речовина строми. Масштабні відрізки: а — 3,3 мкм; б — 2,5 мкм; в — 0,25 мкм; г — 5,0 мкм

альних клітин є ультрамікроскопічним доказом існування в тканинах циркуляторної гіпоксії [39]. Наші дані привертають увагу до результатів імуногістохімічних досліджень [40], згідно з якими ГГ у тканинах пухлин знаходяться в безпосередній близькості до тих ПК, які перебувають у стані проліферації, що змушує коло запитань щодо клітинної мінливості та фенотипічної гетерогенності [40]. З огляду на те що в АФС дрібні еукаріотичні клітини знаходяться в безпосередній близькості до залишків ГГ-3, можемо стверджувати про підвищену проліферативну активність ПКС. Показано, що роль аутофагії у ПК за умов гіпоксії зводиться не тільки до пригнічення, але й забезпечення пухлинного росту на основі процесів антиаутофагії [15]. Отримані нами дані свідчать, що в центральній частині СКРН G1 за участю ПКС та їх близького мікрооточення (в тому числі ДЯК і мікросудин) присутні ніші стовбурових клітин як обов'язкові первинні елементи преметастатичних ніш [28]. Візуалізовані високодиференційовані ПКС із великим Я та аутофагічною вакуолею, на нашу думку, можливо, є претендентами на роль стовбурових ПК. На можливі перебудови диференційованих клітин, які в ході мутацій набувають



**Рис. 2.** Ультраструктура центральної частини СКРН G1: а) ПКН, ЦТ якої в стані лізису, а дезорганізоване Я містить гіпертрофоване ЯД; б) скупчення оптимально розвинутих МК; в) бежевий адипоцит (БА), що прилягає до дезорганізованої пухлинної тубули; г) серцеподібної форми МК, ЦТ якої наповнена скупченнями дезорганізованих ГР. В — вакуолі; ДВ — дрібні венули; ПЩЛК — проміжної електронної щільності ліпідна крапля. Масштабні відмітки: а — 1,65 мкм; б — 5,0 мкм; в — 4,0 мкм; г — 4,0 мкм

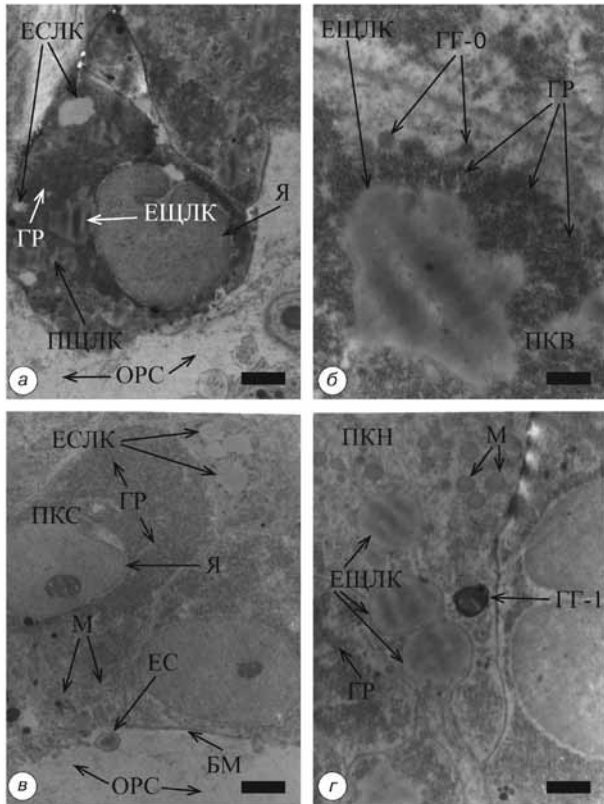
ознак, характерних для стовбурових ПК, вказують результати досліджень [10]. ПКВ мають неправильну форму та складаються із Я значних розмірів і ЦТ (див. рис. 1, а). ЦТ ПКВ гетероморфна, тут одночасно виявляються у близькому розміщенні локальні скупчення дезорганізованих М, ГР, ГГ. Треба відмітити, що ГГ (зачаткові, 1-го і 2-го типів) перебувають у стані лізису, а ЦТ наповнена продуктами їхнього розпаду у формі «гіалінізованих» внутрішньоклітинних утворень і може стосуватися поліплоїдії та анеуплоїдії клітин СКРН [34]. Ці дані вказують на потенційні можливості участі таких ПК у розвитку новотворення [4].

У центральній частині пухлин зосереджені ПКН великих розмірів (див. рис. 1, з), по периферії інколи містяться профілі матеріалу, які нагадують лізовані фрагменти БМ. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення у ПКН зміщено у бік ЦТ. Остання представлена «стертими» профілями лізованих і атрофованих органел і включень, поодинокими дрібними електроннощільними залишковими тільцями. Присутність у складі ЦТ М зі «стертими» профілями може бути підтвердженням того, що ПК СКРН мають дефіцит сукцинатдегідрогенази [14]. Я яйце-

подібної форми вміщує дезорганізовані маси гетерохроматину і електроннощільні ЯД значних розмірів (рис. 2, а). Вказані групи ПК оточені широкими прошарками лізованої ОРС у стані набряку. ОРС містить фрагменти клітин, що відповідають морфологічним стандартам пошкоджень тканин, характерним для некрозу. Часто до дезорганізованих пухлинних тубул центральної частини пухлинних вузлів СКРН G1 прилягають скупчення МК середньої електронної щільності, ЦТ яких наповнена поодинокими, великими за розмірами ЕЩЛК, дрібними М, помірними кількостями ГР (рис. 2, б). Виявлені ЛК, можливо, є результатом внутрішньоклітинного *de novo* ліпонеогенезу [3] та морфологічно подібні до такого роду включень адипоцитів, що містять білок MAP1S як пухлиностабілізуючий фактор [13].

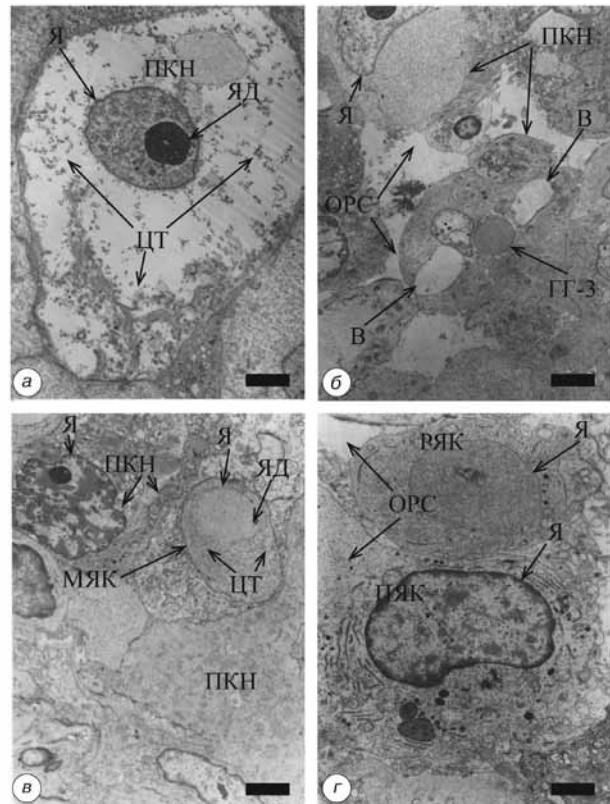
Відмічено також, що по периферії ділянок некрозу центральної частини таких пухлин містяться поодинокі еліпсоїдоподібної форми бежеві адипоцити (рис. 2, в) та серцеподібної форми МК (рис. 2, г). ЦТ бежевих адипоцитів заповнена ЛК проміжної електронної щільності. ЦТ МК серцеподібної форми нарисчена ГР, які є необхідними компонентами гліколізу за умов інтенсивного онкогенезу [3, 12]. Поява клітин із масивними скупченнями в ЦТ ГР може свідчити про процеси глюконеогенезу, що відбуваються при хворобах накопичення [3]. Виявлені значні пошкодження ПК і стромі відповідно до патофізіологічних критеріїв стану клітин, клітинних мембран та основної речовини сполучної тканини вказують на збільшену проникність обширних ділянок центральної частини СКРН G1 [41]. Частково дезорганізовані ділянки пухлин, як відомо, мають підвищені можливості для дисемінування ПК та неклітинних елементів в інші органи і системи організму [42].

Периферична частина СКРН G2 представлена пухлинними альвеолами та розширеними тубулами, частково обмеженими БМ. Присутність окремих фрагментів БМ у складі стінки дезорганізованих тубул може бути результатом катаболічної активності неопластичних епітеліальних клітин. Складовими таких тубул є ПКВ, ПКС та ПКМ. ЦТ ПКВ заповнена полями ГР, серед яких знаходяться ЛК різного розміру, неправильної форми, електроннощільні, із проміжними електронномікроскопічними характеристиками (рис. 3, а, б). Присутність ЛК різної електронної щільності, форми і розмірів у ЦТ ПК може вказувати на їхні трансдиференційні перебудови, подібно до того, як це проходить в адипоцитах за близьких локацій тканин білого і бурого жиру на ультраструктурному рівні та забезпечення метаболічного гомеостазу жирової тканини за умов стресу, гіпоксії і запалення [43]. У ЦТ ПКВ до периферичних ділянок скупчень ГР прилягають поодинокі зачаткові ГГ. Я таких клітин неправильної форми, наповнені гомогенними масами ампліфікованого хроматину, серед якого міститься невеликих розмірів електроннощільне ЯД.



**Рис. 3.** Ультраструктура периферичної частини СКРН G2: а) ПКВ, в якій електроннощільне Я оточене ЦТ, що вміщує скупчення ГР, електронноліпідні краплі (ЕСЛК), ЕЩЛК та проміжної електронної щільності ліпідні краплі (ПЩЛК); б) ЕЩЛК в оточенні ГР та зачаткових ГГ (ГГ-0) у ЦТ ПКВ; в) ПКС у складі частково дезорганізованої пухлинної тубули; г) ЕЩЛК, дрібні М, ГР та дезорганізована ГГ 1-го типу (ГГ-1) у ЦТ ПКН. ЕС — екзосома. Масштабні відрізки: а — 2,8 мкм; б — 1,0 мкм; в — 3,3 мкм; г — 2,0 мкм

ПКС мають форму близьку до циліндричної, базально-апикальну спрямованість та вміщують Я яйцеподібної форми (рис. 3, в), наповнене гомогенними масами ампліфікованого хроматину та невеликих розмірів частково атрофованим ЯД. Апикально-латеральні частини ЦТ цих клітин вміщують невеликі скупчення ГР, тоді як базальні — скупчення дрібних М, електроннощільних АФС, ендосом та екзосом. Скупчення поодиноких дрібних М в ПКС свідчить про дефіцит сукцинатдегідрогенази [14] та відображає локальні внутрішньоклітинні процеси, спрямовані на збереження органоспецифічних функцій. Присутність екзосом на поверхневих ділянках ЦТ може вказувати на секрецію такими ПК медіаторів міжклітинних комунікацій. Як правило, БМ у місцях, дотичних до таких частин клітин, відсутня, а пальцеподібні цитоплазматичні вирости та екзосоми занурені в ОРС. До ПКС часто прилягають гомологічні клітини значних розмірів, ЦТ яких вміщує скупчення ЛК проміжної електронної щільності в поєднанні з атрофованими зачатковими ГГ (ГГ-0), дрібними М, дрібними електроннощільними АФС. Для ПКН характерні наявність ЛК,



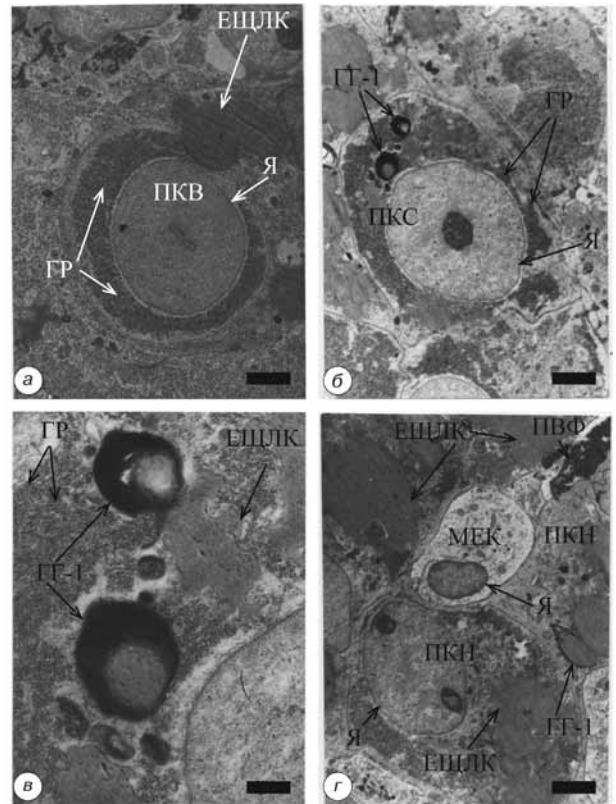
**Рис. 4.** Ультраструктура центральної частини СКРН G2: а) ПКН, у якій електроннощільне Я оточене лізованою електронноліпідною ЦТ; б) вакуолізовані та дезорганізовані ПКН в оточенні лізованої ОРС; в) невеликих розмірів електронноліпідної мало диференційована ядромісна клітина (МЯК); г) ядромісна клітина на ранньому (РЯК) та проміжному (ПЯК) етапах диференціації. В — вакуолі. Масштабні відрізки: а — 6,0 мкм; б — 6,7 мкм; в — 5,0 мкм; г — 2,5 мкм

дрібних М, дезорганізованих ГГ 1-го типу (ГГ-1) (рис. 3, г).

Центральна частина СКРН G2 представлена в основному дезорганізованими ацинусами. Вони вміщують полігональної форми електронноліпідні ПК (рис. 4, а), ЦТ яких майже повністю лізована. Тут також знаходяться клітини зі значним наповненням ЦТ дезорганізованими органелами та включеннями (рис. 4, б). Міжклітинні простори розширені та наповнені фрагментами ПК. В окремих клітинах, що вміщують великих розмірів вакуолі, поруч з атрофованим соматичним Я містяться ГГ-3 (див. рис. 4, б). У доступній літературі аналогічні структури ідентифіковані в ЦТ *Tetrahymena thermophila* як вегетативні мікронуклеуси еукаріотичних клітин [44]. Поруч із ПК, що вміщують ГГ-3, виявляються невеликих розмірів електронноліпідні мало диференційовані ядромісні клітини, ЦТ яких складається із гіалоплазми та розвинутої в ній мережі глобулярних і фібрилярних наноструктур (рис. 4, в). Відмічено наявність ядромісних клітин, які перебувають на ранніх та проміжних етапах диференціації (рис. 4, г). Поява у пухлині новосформованих невеликих

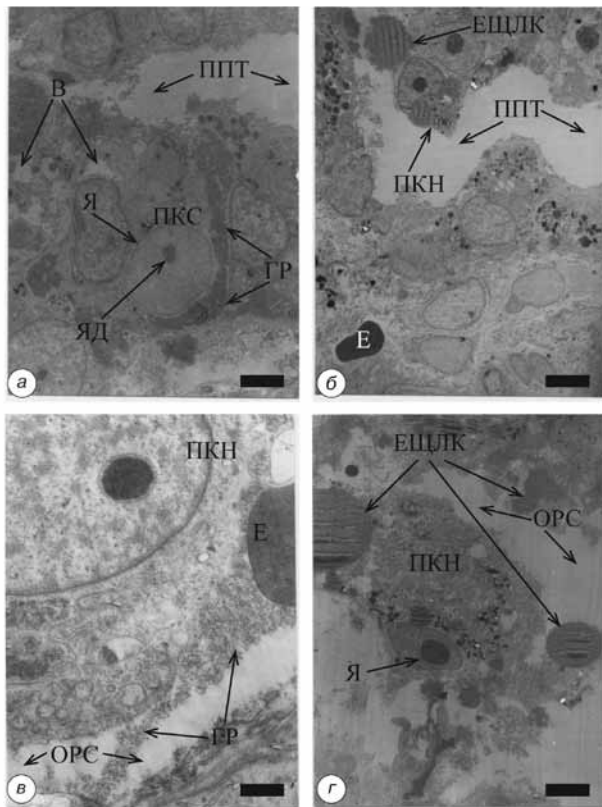
ликих розмірів ядровмісних клітин може бути ознакою проліферативного процесу, пов'язаного з ПК, що вміщують ГГ.

Периферична і більшою мірою центральна частини СКРН G3 представлені в основному гіпертрофованими тубулами і ацинусами, до складу яких входять поодинокі ПКВ та великі кількості ПКС і ПKN. У таких клітинах ядерно-цитоплазматичне співвідношення зміщене на користь дезорганізованої ЦТ. ПКВ мають велике ядерно-цитоплазматичне співвідношення (рис. 5, а); Я кулеподібної форми, насичене гомогенними масами ампліфікованого хроматину; ЦТ вщерть наповнена протяжними скупченнями ГР. ПКС містять Я кулеподібної форми, насичене розшарованими масами ампліфікованого хроматину з електроннощільним ЯД (рис. 5, б); ЦТ наповнена протяжними скупченнями ГР, до периферичних частин яких прилягають поодинокі дезорганізовані ГГ-1, поєднані з ЛК високої електронної щільності та неправильної форми (рис. 5, в). Для ПKN характерне еліпсоїдоподібне Я, яке вміщує два ЯД із гіпертрофованими фібрилярними центрами (рис. 5, г); ЦТ наповнена хаотично розміщеними масами гранул аномального глікогену та великих розмірів скупченнями ЛК високої електронної щільності. Поява в ЦТ ПКС та ПKN СКРН G3 гранул аномального глікогену може свідчити, на наш погляд, про часткову втрату такими клітинами органоспецифічності. Окремі ЛК високої електронної щільності мають форму, близьку до такої у ГГ-1, та покриті тонкою електроннощільною «капсулою» (див. рис. 5, г). Це може свідчити про ключову роль ГГ в продукції не тільки нейтральних ліпідів, але й їхніх похідних (зокрема, продуктів розпаду, що беруть участь у формуванні «гіалінізованих» внутрішньоклітинних утворень). У незначних кількостях до вищеописаних клітин прилягають новоутворені малих розмірів еукаріотичні клітини. В електронноосвітлій гіалоплазмі таких клітин виявляються дрібні М, первинні лізосоми, поодинокі канали гранулярної ендоплазматичної сітки. Останні поєднані із зовнішньою ядерною мембраною невеликого за розмірами Я, наповненого еухроматином. Міжклітинні простори в цій частині пухлин, що прилягають до новоутворених еукаріотичних клітин, наповнені скупченнями пучків волокон фібрину-полімера та протяжними ділянками основної речовини дуже низької електронної щільності (див. рис. 5, г). Тісне поєднання в складі дезорганізованого епітелію пухлини пучків волокон фібрину-полімера та основної речовини дуже низької електронної щільності може бути пояснено локальним насиченням її надфізіологічними концентраціями тромбіну і плазміну, що зумовлюють аномальну активацію коагуляційних і антикоагуляційних процесів [19]. У периферичній частині СКРН G3 знаходяться поодинокі тубули, просвіти яких розширені, а стінка складається із частково дезорганізованих ПКС циліндричної форми (рис. 6, а). Такі тубули об-



**Рис. 5.** Ультраструктура периферичної частини СКРН G3: а) ПКВ, у якій електроннощільне Я оточене ЦТ, що вміщує скупчення ГР; б) ПКС, в ЦТ якої містяться ГГ-1 в оточенні ГР; в) фрагмент із рис. 5, б. Скупчення ГР, ГГ-1 та ЕШЛК; г) у ЦТ ПKN дезорганізовані ЕШЛК та ГГ-1, що покриті тонкою електроннощільною «капсулою». МЕК — малих розмірів електронноосвітла еукаріотична клітина; ПВФ — пучок волокон фібрину-полімера. Масштабні відрізки: а — 2,5 мкм; б — 2,5 мкм; в — 0,6 мкм; г — 2,5 мкм

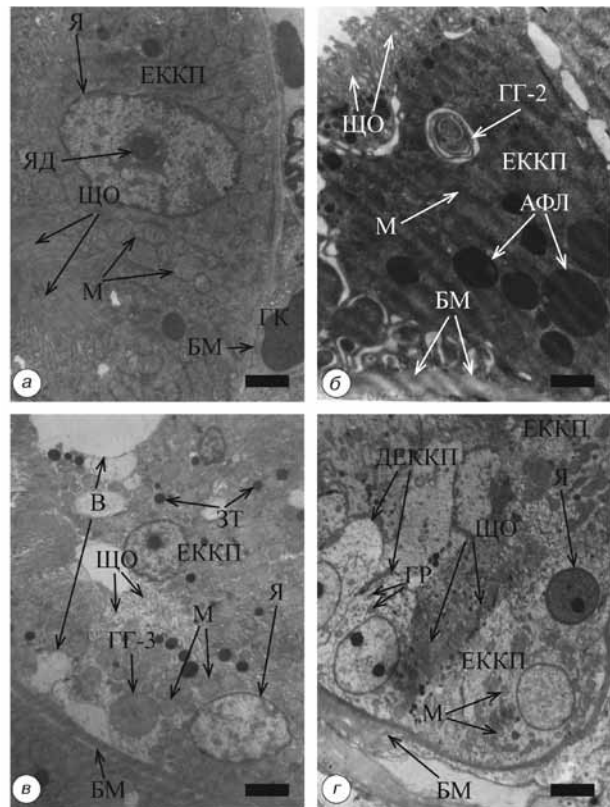
межені фрагментами БМ, а їх апоптотично змінені ПК перебувають у прямому контакті з основною речовиною розширеної строми, яка наповнена клітинами різного роду, в тому числі й МК, та ремодульованим мікроциркуляторним руслом як обов'язковою ланкою бластомогенезу. Присутність поодиноких фрагментів дезорганізованих БМ може свідчити про експресію неопластичних процесів. Протяжні об'єднання клітин і неклітинних утворень строми, що прилягають до великих ділянок некрозу пухлини, у літературі асоціюють із преметастатичними нішами [27, 28]. Було зауважено, що до ділянок некрозу прилягають дезорганізовані тубули, до складу яких входять ПК близької до циліндричної форми високого ступеня диференціації, а їх апікальна ЦТ насичена ЕШЛК дуже великих розмірів (рис. 6, б). Ультраструктура останніх морфологічно аналогічна жировим включенням білих адипоцитів [45]. Ділянки некрозу представлені обширними полями дезорганізованої ОРС, в якій хаотично розміщені ПК на різних етапах розпаду та їх фрагменти, в тому числі поля ГР (рис. 6, в). Характерною особливістю лізованих фрагментів ПК є те, що вони містять різ-



**Рис. 6.** Ультраструктура центральної частини СКРН G3: а) ПКС у складі дезорганізованої пухлинної тубули; б) великих розмірів ЕЩЛК у складі дезорганізованої ПКН пухлинної тубули; в) протяжне скупчення ГР та еритроцит (Е) у складі дезорганізованої ОРС; г) у ділянці некрозу пухлини на етапах розпаду ПКН та ЕЩЛК. В — вакуолі; ППТ — просвіт пухлинної тубули. Масштабні відрізки: а — 6,5 мкм; б — 6,5 мкм; в — 1,3 мкм; г — 6,5 мкм

ного розміру ЕЩЛК, вакуолі та великі Я з ЯД значних розмірів, дуже високої електронної щільності, компактним, кулястої форми (рис. 6, г). Візуалізовані Я у фрагментах некротизованих ПК та в складі клітин дезорганізованих тубул пухлин низького ступеня диференціації (G3) дають підставу стверджувати, що ці клітини значною мірою піддані не тільки апоптозу, але й некрозу. Апоптотично змінені ПК дезорганізованих тубул, близько розташовані до ремодульованого мікроциркуляторного русла, на наш погляд, піддані епітеліально-мезенхімальній трансформації та є складовими преметастатичних ніш, а віддалені — некрозу.

Зазначимо, що зачаткових ГГ в ПК СКРН (G3) не виявлено, що суттєво відрізняє їх від гомологічних клітин середнього (G2) та високого ступенів (G1) диференціації пухлин, де такі утворення присутні. Відповідно до того, що ГГ вміщують білок p62, який є регулятором клітинного росту, бере участь у аутофагії й деградації лізосом та сприяє клітинній загибелі [2], припускаємо, що відсутність зачаткових ГГ у клітинах пухлин низького ступеня диференціа-



**Рис. 7.** Ультраструктура: а) високодиференційованої епітеліальної клітини каналця проксимального відділу нефрона ниркової кори (ЕККП) білого шура; б) аутофаголізосоми (АФЛ), ГГ 2-го типу (ГГ-2) та М у ЦТ високодиференційованої ЕККП хворого на СКРН G1; в) дезорганізованої ЦТ ЕККП хворого на СКРН G2, яка вміщує ГГ-2, гіпертрофовані М та вакуолі (В); г) дезорганізованих ЕККП та дедиференційованих ЕККП (ДЕККП) хворого на СКРН G3. ГГ — гемокапіляр; ЗТ — залишкове тільце; ШО — щіточкова облямівка. Масштабні відрізки: а — 2,2 мкм; б — 2,0 мкм; в — 5,0 мкм; г — 5,0 мкм

ції (G3) призводить до їх неконтрольованого росту. Наростання присутності дезорганізованих ЛК, морфологічно аналогічних жировим включенням білих адипоцитів, найбільшою мірою проявляється у ЦТ ПК СКРН G3. Деградація такого роду ЛК в аутофаголізомах ПК призводить до дефіциту MAP1S, що посилює розвиток пухлин і знижує виживаність хворих [13]. На нашу думку, такі перетворення найбільш інтенсивні в носіїв СКРН G3.

Контрольні ТЕМ-дослідження ниркової кори лабораторних статевозрілих шурів показали, що в складі стінки каналців проксимального відділу нефронів в основному містяться високодиференційовані середньої електронної щільності епітеліальні клітини. Їхньою характерною ознакою є виражена базально-апикальна спрямованість, присутність в базальній частині пальцеподібних, наповнених М виростів, а апикальній — системи мікрворсинок у вигляді щіточкової облямівки. Я таких клітин яйцеподібне, вміщує в основному еухроматин та великих розмірів ЯД (рис. 7, а). Така високоспеціалізована організація клітин каналців проксималь-

ного відділу нефронів у нормі не тільки ефективно забезпечує їх фізіологічні функції, але й є першою мішенню в розвитку СКРН.

ТЕМ-дослідження ниркової кори хворих на СКРН G1 виявили, що зміни каналців проксимального відділу нефронів були подібні до перебудов епітелію каналців проксимального відділу нефронів у старих ссавців чи при токсичних нефропатіях, які супроводжуються в окремих каналцях процесами гіперплазії (метаплазії, анаплазії, дисплазії) [46]. За впливу стресорів значне місце в субклітинних перебудовах ниркової кори займають процеси дедиференціації, які направлені на трансформацію високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів у стовбурові плюрипотентні, аналогічні ембріональним клітинам [47]. Поодинокі, частково збережені каналці проксимального відділу нефронів ниркової кори складаються зі стінки та розширеного просвіту. До складу зазначених стінок каналців входять БМ; субепітеліальний шар; високодиференційовані епітеліальні клітини із порушеною базально-апикальною спрямованістю. Характерною ознакою таких епітеліальних клітин є присутність в ЦТ ГГ 2-го типу, кулеподібних М, значної кількості АФС та частково дезорганізованої щітчастої облямівки (рис. 7, б). Паралельно проведені ультраструктурні дослідження ниркової кори хворих на СКРН G2 та G3 показали, що на фоні морфологічних змін, притаманних для ниркової кори хворих на високодиференційованих СКРН G1, у перших присутні незначні кількості каналців проксимального відділу нефронів, які частково зберігають типове для цього роду структурно-функціональних утворень архітектоніку. Так, у хворих на СКРН G2 дезорганізована ЦТ епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори вміщує гіпертрофовані М низької електронної щільності, ГГ кулеподібної форми, вакуолі, залишкові тільця та фрагменти лізованої щітчастої облямівки (рис. 7, в). Для хворих на СКРН G3 характерна присутність у каналцях проксимального відділу нефронів ниркової кори поруч із дезорганізованими високодиференційованими епітеліальними клітинами дедиференційованих, електронно світла ЦТ яких містить ГГ, поодинокі дрібні М та Я, наповнені ампліфікованим хроматином. Просвіти каналців проксимального відділу нефронів звужені та заповнені масами електронно щільного матеріалу, в окремих ділянках якого проглядаються залишки зруйнованої щітчастої облямівки епітеліальних клітин (рис. 7, г).

Контрольні дослідження дали можливість встановити, що ультраструктурна організація ПКС СКРН високого ступеня диференціації (G1) є близькою до такої у високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори ссавців у нор-

мі та високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори хворих на високодиференційований (G1) СКРН.

## ВИСНОВКИ

1. Периферична частина СКРН G1 вміщує оптимально розвинуті пухлинні альвеоли і тубули, до складу яких входять ПКВ, ПКН та високодиференційовані ПКС з переважанням останніх.

2. У центральній частині СКРН G1 присутні поодинокі високодиференційовані ПКС, що містять великих розмірів АФС в поєднанні із ДЯК.

3. Для ділянок некрозу як периферичної, так і центральної частин СКРН G2 характерними є ПКН полігональної форми, ЦТ яких майже повністю лізована, а Я вміщує електронно щільне гіпертрофоване ЯД.

4. Ділянки центральної частини СКРН G2 насичені ПКН, у складі ЦТ яких містяться вакуолі, ГГ-3 та невеликих розмірів електронно світлі малодиференційовані ядровмісні клітини. Прилегла до таких клітин ОРС містить невеликих розмірів ядровмісні клітини на ранньому і проміжному етапах диференціації.

5. У ПК СКРН G3 відсутні зачаткові ГГ, тоді як їхня ЦТ наповнена дезорганізованими ГГ-1 та ЕЩЛК, що структурно аналогічні до таких у білих адипоцитах.

6. Контрольні дослідження дали можливість виявити, що ультраструктурна організація ПКС СКРН G1 є близькою до такої високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори ссавців в нормі та високодиференційованих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефронів ниркової кори хворих на високодиференційований СКРН G1.

7. ПКС СКРН G1, у порівняльному плані з аналогічними ПК СКРН середнього (G2) та низького (G3) ступенів диференціації, мають найбільш «нормалізовану» ультраструктуру.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Eyden B, Banerjee SS, Ru Y, *et al.* The ultrastructure of human tumours: applications in diagnosis and research. Heidelberg, 2013. 680 p.

2. Gao Ch, D'Angelis ChA, Qin J, *et al.* Hyaline globules in epithelial neoplasm of kidney. NASD Med Sci 2013; 6 (1): 41–3.

3. Ribback S, Cigliano A, Kroeger N, *et al.* PI3K/AKT/mTOR pathway plays a major pathogenetic role in glycogen accumulation and tumor development in renal distal tubules of rats and men. Oncotarget 2015; 6 (15): 13036–48.

4. Tan X, He S, Han Y, *et al.* Establishment and characterization of clear cell renal cell carcinoma cell lines with different metastatic potential from chinese patients. Cancer Cell Int 2013; 13: 20.

5. Yu M, Wang H, Zhang J, *et al.* Expression of CIDE proteins in clear cell renal cell carcinoma and their prognostic significance. Mol Cell Biochem 2013; 378: 145–51.



6. **Drabkin HA, Gemmill RM.** Cholesterol and the development of clear cell renal cell carcinoma. *Curr Opin Pharmacol* 2012; **12** (6): 742–50.
7. **Aishima S, Fujita N, Mano Y, et al.** p62<sup>+</sup> Hyaline inclusions in intrahepatic cholangiocarcinoma associated with viral hepatitis or alcoholic liver disease. *Am J Clin Pathol* 2010; **134**: 457–65.
8. **Kim G, Rajasekaran SA, Thomas G, et al.** Renal clear-cell carcinoma: an ultrastructural study on the junctional complex. *Histol Histopathol* 2005; **20**: 35–44.
9. **Федевич С, Поспішіль Ю, Кияк Ю та ін.** Ультраструктура гіалінових глобул туморозного вузла при високодиференційованому (G 1) світлоклітинному раку нирки. В: Праці НТШ Мед науки, Т 41, Львів, 2015: 84–91.
10. **Peired AJ, Sisti A, Romaqnan P.** Renal cancer stem cells: characterization and targeted therapies. *Stem Cells Int* 2016; **2016**: 12 p.
11. **Peired AJ, Sisti A, Romaqnan P.** Mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease: a review of clinical evidence. *Stem Cells Int* 2016; **2016**: 22 p.
12. **Nilsson H, Lindren D, Fosberg AM, et al.** Primary clear cell renal carcinoma cells is play minimal mitochondrial respiratory to glycolytic inhibition by 3-Bromopyruvate. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1585.
13. **Xu G, Jiang Y, Xiao Y, et al.** Fast clearance of lipid droplets through MAP1S-activated autophagy suppresses clear cell renal cell carcinomas and promotes patients survival. *Oncotarget* 2016; **7** (5): 6255–65.
14. **Moch H, Cubilla A, Humphrey P, et al.** The 2016 WHO classification of tumors of the urinary system and male genital organs. Part A: Renal, penile, and testicular tumors. *Eur Urol* 2016; **70** (1): 93–103.
15. **Janji B, Viry E, Moussay E, et al.** The multifaceted role of autophagy in tumor evasion from immune surveillance. *Oncotarget* 2016; **7** (14): 17591–607.
16. **Munoz LE, Lauber K, Schiller M, et al.** The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010; **6** (5): 280–89.
17. **Schläfli AM, Berezowska S, Adams O, et al.** Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem* 2015; **59** (2481): 137–44.
18. **Kishi-Hakura C, Koyama-Honda I, Itakura E, et al.** Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci* 2014; **127**: 4089–102.
19. **Зербіно ДД, Баргій ММ, Дядик ОО та ін.** Судинна патологія нирок. Вінниця: Нова книга, 2015. 456 с.
20. **Зербіно ДД, Баргій ММ, Боднар ЯЯ та ін.** Патоморфологія та гістологія (атлас). Вінниця: Нова книга, 2016. 800 с.
21. **Delahunt B, McKenney JK, Lohse CM, et al.** A novel grading system for clear cell renal cell carcinoma incorporating tumor necrosis. *Am J Surg Pathol* 2013; **37** (3): 311–22.
22. **Kim HK, Song KS, Park YS, et al.** Elevated levels of circulating platelet microparticles. VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003; **39** (2): 184–91.
23. **Coussens LM, Werb Z.** Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420** (6917): 860–67.
24. **Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, et al.** Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* 2004; **427** (6976): 695.
25. **Denaro N, Tomasello L, Russi EG.** Cancer and stress: what's matter from epidemiologist and oncologist point of view? *J Cancer Therp Res* 2014; **3**: 3–11.
26. **Бережная НМ, Чехун ВФ.** Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. I. Роль клеточных компонентов стромы в развитии опухоли. *Онкология* 2016; **18** (1): 6–11.
27. **Бережная НМ, Чехун ВФ.** Физиологическая система соединительной ткани и онкогенез. II. Экстрацеллюлярный матрикс и метастазирование. *Онкология* 2016; **18** (3): 164–76.
28. **Sainz JrB, Carron E, Vallespinos M, et al.** Cancer stem cells and macrophages: implications in tumor biology and therapeutic strategies. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 9012369.
29. **Farnsworth RH, Lackmann M, Achen MG, et al.** Vascular remodeling in cancer. *Oncogene* 2014; **33** (27): 3496–505.
30. **Li J, Kluiiver J, Osinga J, et al.** Functional studies of primary tubular epithelial cells indicate a tumor suppressor role of SETD2 in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma* 2016; **18** (6): 339–46.
31. **Lobo NC, Gedye C, Apostols AJ, et al.** Efficient generation of patient-matched malignant and normal primary cell cultures from clear cell renal cell carcinoma patients: clinically relevant models from research and personalized medicine. *BMC Cancer* 2016; **16**: 485.
32. **Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C.** Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; **6**: 655–63.
33. **Романенко АМ, Непомнящий ВВ, Забарко ЛБ.** Епітеліальні пухлини нирки: сучасна міжнародна гістологічна класифікація. *Урологія* 2002; **4**: 48–54.
34. **Чердынцева ТМ, Бобров ИП, Климачев ВВ и др.** Размер опухолевого узла и гистологическое строение перитуморозной зоны рака почки. *Фундаментальные исследования* 2013; **7**: 188–93.
35. **Glauert AM.** Fixation, dehydration and embedding of biological specimens: Practical methods in electron microscopy. North-Holland: American Elsevier, 1975. 207 p.
36. **Reynolds ES.** The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biology* 1963; **17**: 208–12.
37. **Stempac JG, Ward RT.** An improved staining method for electron microscopy. *J Cell Biology* 1964; **22**: 697–701.
38. **Liao L, Testa JR, Yanq H.** The role of chromatin-remodelers and epigenetic modifiers in kidney cancer. *Cancer Genet* 2015; **208** (5): 206–14.
39. **Gstalter C, Ader I, Cuvillier O.** FTY720 (Fingolimod) inhibits HIF1 and HIF2 signaling, promotes vascular remodeling, and chemosensitizes in renal cell carcinoma animal model. *Mol Cancer Ther* 2016; **15** (10): 1–10.
40. **Чехун ВФ, Шербан СД, Савцова ЗД.** Гетерогенность опухоли — динамическое состояние. *Онкология* 2012; **14** (1): 4–12.
41. **Pacurari M, Qian Y, Fu W, et al.** Cell permeability migration, and reactive oxygen species induced by multiwalled carbon nanotubes in human microvascular endothelial cells. *J Toxicol Environ Health A* 2012; **75** (3): 129–47.
42. **Williams KC, Wong E, Leong HS, et al.** Cancer dissemination from a physical sciences perspective. *Converged Sci Phys Oncol* 2016; **2** (2): 023001.
43. **Bezpalko L, Gavrilyuk E, Zayachkivska O.** Impact of prenatal exposure to obesogenic environment on later-life brown and white adipocytes and liver outcomes. In: *Proc Shevchenko Sci Soc. Medicine, Lviv, 2015*; **41**: 33–52.
44. **Wloga D, Strzyzewska-Jowko I, Gaertig J, et al.** Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila*. *Eucaryotic Cell* 2008; **7** (8): 1373–86.
45. **Zancanaro C, Carmielli VP, Moretti C, et al.** An ultrastructural study brown adipose tissue in pre-term human newborns. *Tissue Cell* 1995; **27** (3): 339–48.
46. **Ward JM, Stevens JL, Konishi N, et al.** Vimentin metaplasia in renal cortical tubules of preneoplastic, neoplastic, aging, and regenerative lesions of rats and humans. *Am J Pathol* 1992; **141** (4): 955–64.
47. **Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, et al.** Stimulus triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 2014; **505** (7485): 641–7.

## CLEAR CELL RENAL CARCINOMA OF DIFFERENT GRADES OF DIFFERENTIATION: PECULIARITY OF TUMOR CELLS ULTRASTRUCTURE

*D.D. Zerbino, S.V. Fedevych, V.I. Kovalyshyn*

**Summary.** *Aim:* is to reveal in comparative plan ultrastructural organization of tumor cells (TC) of clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) of different grades of differentiation. **Object and methods:** material for conducting transmission electron microscopic researches was postoperative biopsies of peripheral and central parts of tumors in CCRCC at highly differentiated cancer (G1) — 5 cases; at an average grade of differentiation (G2) — 5 cases; at low grade of differentiation (G3) — 6 cases. The control studies: 1) the biopsies of renal cortex of eliminated parts of the kidney with tumor and the whole kidney with tumor in these patients in CCRCC; 2) biopsies of renal cortex of sexually mature white rats. **Results:** it was detected that the high, low and average electron density of the TC with the predominance of the last are present in alveoli, tubules and acini of different grades of differentiation at CCRCC in tumors of highly differentiated (G1) at CCRCC. The control studies made it possible to re-

veal that the ultrastructural organization of epithelial cells with an average electronic density of tumors with a high grade of differentiation (G1) at CCRCC is close to that of epithelial cells with a high grade of differentiation of proximal part of renal cortex of control mammals and epithelial cells of proximal part of renal cortex of tumors with a high grade of differentiation (G1) in patients at CCRCC. **Conclusions:** the ultrastructure of tumoral cells with an average electronic density of tumors with a high grade of differentiation (G1) at CCRCC is a more «normalized» in comparative plan than the same epithelial cells with the average (G2) and the low (G3) grades of differentiation at CCRCC.

**Key Words:** clear cell renal cell carcinoma, tumoral cell, hyaline globule, glycogen granule, lipid drop, mitochondria.

### Адреса для листування:

Федевич С.В.

79010, Львів, вул. Пекарська, 69

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

E-mail: solomiya.fedevych@gmail.com

Одержано: 10.07.2017