

## ПРОЦЕСИ УБІКВІТИНАЦІЇ В ПЕРИТУМОРАЛЬНІЙ ТКАНИНІ ХВОРИХ НА ГЕРМІНОГЕННІ ПУХЛИНИ ЯЄЧКА

С.В. Базалицька, А.М. Романенко, В.С. Сакало, А.В. Сакало

ДУ «Інститут урології НАМН України», м.Київ, Україна

**Вступ.** Зростання захворюваності на герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ), обумовлює актуальність вивчення на молекулярному рівні змін тканини яєчка, які є передраковими [1]. В останні роки було встановлено, що порушення внутрішньоклітинного убіквітин-протеасомного протеолізу відіграють важливу роль у патогенезі багатьох захворювань людини, зокрема, при спадкових хворобах, дистрофічно-дегенеративних процесах, чоловічій неплідності та канцерогенезі, оскільки система внутрішньоклітинного протеолізу задіяна в процесах розвитку та диференціації клітин, процесі проліферації, реакціях клітин на стрес та пошкодження, а також у процесі неоплазії [2]. Можна передбачити, що структурні та функціональні пошкодження компонентів убіквітин-протеасомної системи можуть відігравати значну роль і в канцерогенезі тестикулярної тканини.

**Мета дослідження.** Визначити особливості імунгістохімічної експресії протеїну Ubiquitin в перитуморальній тканині яєчка хворих на ГПЯ, які можна охарактеризувати як передракові.

**Матеріали та методи дослідження.** Обстежено 40 пацієнтів, яким була виконана орхіектомія в клініці онкоурології ДУ «Інститут урології НАМН України» протягом 2009–2012 рр. Середній вік хворих складав 27,6 року (від 17 до 59 років). Гістологічно вивчали перитуморальну тканину яєчка та пухлину. Згідно з гістологічною класифікацією герміногенних пухлин яєчка, прийнятою ВООЗ [3], семінома була виявлена у 19 пацієнтів, несеміномні пухлини – у 21 хворого, серед яких ембріональний рак (ЕР) – у 5, тератома – у 4, пухлина жовткового мішка (ПЖМ) – у 4 і пухлини змішаної будови – у 8 пацієнтів. Імунгістохімічне (ІГХ) дослідження здійснювалось з використанням стандартного авідин-біотинного методу, для чого біоптати фіксували у 12%-вому забуференому формаліні, заливали в парафін і виготовляли зрізи товщиною до 5 мкм. Зрізи інкубували з первинними антитілами Ubiquitin (ДАКО, Glostrup, Данія) в розве-

денні 1:800. Розповсюдженість та інтенсивність ІГХ реакції оцінювали за напівкількісним методом у балах [4] і оцінювали від 0 до 3 балів. Загальний результат ІГХ реакції визначався за показниками імунгістохімічного коефіцієнта (ІГХК) від 0 до 9 балів, який одержували перемноженням оцінок розповсюдженості та інтенсивності ІГХ забарвлення. Проводився статистичний аналіз отриманих результатів.

**Результати та їх обговорення.** Проведене морфологічне дослідження перитуморальної тканини яєчка показало, що лише в 2 спостереженнях звивисті сім'яні каналці не відрізнялись від нормальних незмінених та в 7 визначали нечисленні сім'яні каналці з ознаками збереженого пригніченого сперматогенезу, які розташовувались в оточенні сім'яних каналців із блокованим сперматогенезом. При дослідженні ІГХ експресії протеїну Ubiquitin в перитуморальній тканині у хворих із збереженим і пригніченим сперматогенезом в клітинах Сертолі спостерігалось виразне ядерне зафарбування (ІГХК: 7–9) в усіх дев'яти випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $7,2 \pm 0,04$ . Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі була помірною (ІГХК: 4-6) в усіх випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $5,7 \pm 0,09$ . Клітини сперматогенного епітелію – сперматоцити I і II порядку та сперматиди виявляли слабку (ІГХК: 1–3) (2 спостереження) та помірну (ІГХК: 4–6) (7 спостережень) ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну Ubiquitin. Середнє значення ІГХК дорівнювало для сперматид –  $3,3 \pm 0,09$  та  $4,2 \pm 0,09$  – відповідно; для сперматоцитів I і II порядку –  $3,9 \pm 0,09$  та  $5,2 \pm 0,09$  – відповідно. У сперматогоніях визначалась помірна (ІГХК: 5–6) (2 спостереження) та виразна (ІГХК: 7–8) ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin. Середнє значення ІГХК дорівнювало для сперматогоній –  $7,4 \pm 0,09$  та  $7,2 \pm 0,09$  – відповідно. Необхідно зазначити, що зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю імунгістохімічної експресії протеїну Ubiquitin (ІГХК:

0) в усіх випадках (100%). У клітинах Лейдіга слабка ядерна експресія в 2–3 бали спостерігалась у всіх 9 випадках (100 %). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $2,3 \pm 0,04$ . Цитоплазматична експресія убіквітину була помірною (ІГХК: 4–6) у 9 випадках (100%) даної групи. Середнє значення ІГХК дорівнювало  $5,7 \pm 0,07$  (табл. 1).

У групі хворих із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид, (всього 26 пацієнтів), у клітинах Сертолі спостерігалось виразне ядерне зафарбування (ІГХК: 7–9) в усіх 26 спостереженнях (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $7,8 \pm 0,07$ . Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі була помірною (ІГХК: 4–6) в 14 випадках (54%) та виразною (ІГХК: 7–9) – у 12 випадках (46%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $6,8 \pm 0,07$ . Клітини сперматогенного епітелію – сперматоцити 1 і 2 порядку та сперматиди виявляли помірну ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну Ubiquitin в усіх спостереженнях (100%) даної групи, ІГХК, при цьому, становив 4–6 балів. Середнє значення ІГХК в ядрі та цитоплазмі

дорівнювало відповідно в сперматоцитах –  $4,3 \pm 0,01$  і  $5,9 \pm 0,01$ ; в сперматидидах –  $3,6 \pm 0,07$  і  $4,6 \pm 0,07$ . Сперматогонії виявляли виразну ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну Ubiquitin в усіх спостереженнях (100%) даної групи, ІГХК, при цьому, становив 7–9 балів. Середнє значення ІГХК в ядрі та цитоплазмі дорівнювало відповідно в сперматогоніях –  $9,0 \pm 0,07$  і  $8,2 \pm 0,07$ . Атипові статеві клітини – TIN (testicular intratubular neoplasia), визначені в перитуморальній тканині у 23 хворих (60% спостережень) із блоком сперматогенезу, виявляли помірну ядерну експресію протеїну Ubiquitin у 4–6 балів у 18 спостереженнях (79%) та виразну ядерну експресію у 7–9 балів – у 5 випадках (19%) даної групи. Середнє значення ІГХК в ядрі атипових статевих клітин дорівнювало  $6,4 \pm 0,12$ . Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в атипових статевих клітинах була слабкою у 16 спостереженнях (68%) та помірною – у 7 випадках (32%) даної групи. Середнє значення ІГХК в цитоплазмі атипових статевих клітин дорівнювало  $3,6 \pm 0,17$ . У клітинах Лейдіга ядерна експресія протеїну Ubiquitin була відсутня (ІГХК: 0) в 22 спостереженнях

Таблиця 1

Показники ІГХК експресії протеїну Ubiquitin в перитуморальній тканині яєчка у хворих на ГПЯ

	Збережений сперматогенез (n=9)	Блок сперматогенезу (n=26)	Синдром «лише клітини Сертолі» (n=5)
Сперматозоїди:			
ядро	0	0	–
цитоплазма	0	0	–
Сперматиди:			
ядро	$3,3 \pm 0,09$	$3,6 \pm 0,17$	–
цитоплазма	$4,2 \pm 0,09$	$4,6 \pm 0,17$	–
Сперматоцити:			
ядро	$3,9 \pm 0,09^*$	$4,3 \pm 0,01^*$	–
цитоплазма	$5,2 \pm 0,09^*$	$5,9 \pm 0,01^*$	–
Сперматогонії:			
ядро	$7,4 \pm 0,09^*$	$9,0 \pm 0,07^*$	–
цитоплазма	$7,2 \pm 0,09^*$	$8,2 \pm 0,07^*$	–
Атипові статеві клітини (TIN) (n=23):			
ядро	–	$6,4 \pm 0,12$	–
цитоплазма	–	$3,6 \pm 0,17$	–
Клітини Сертолі:			
ядро	$7,2 \pm 0,04^*$	$7,8 \pm 0,07^* **$	$8,9 \pm 0,04^* **$
цитоплазма	$5,7 \pm 0,09^*$	$6,8 \pm 0,07^* **$	$8,4 \pm 0,06^* **$
Клітини Лейдіга:			
ядро	$2,3 \pm 0,04^* **$	$0,2 \pm 0,01^*$	$0,1 \pm 0,02^{**}$
цитоплазма	$5,7 \pm 0,07^*$	$6,9 \pm 0,16^* **$	$7,8 \pm 0,18^* **$

\*, \*\* – достовірно між групами;  $p \leq 0,001$

(83%), та в 4 випадках (17%) була слабкою (ІГХК: 1–3). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $0,2 \pm 0,01$ . При цьому, в 20 випадках (77%) спостерігалось помірне цитоплазматичне зафарбування (ІГХК: 4–6), в інших 6 спостереженнях (23%) – мало місце виразне цитоплазматичне зафарбування (рис. 1) інтерстиційних ендокриноцитів (ІГХК: 7–8). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $6,9 \pm 0,15$  (табл. 1).

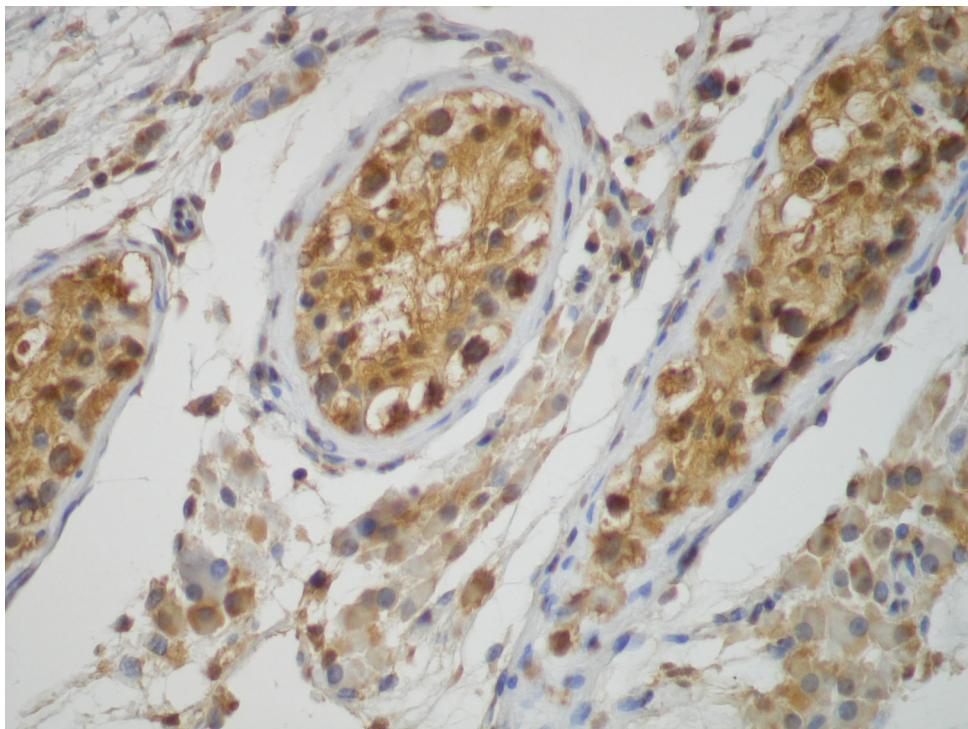
У хворих, в перитуморальній тканині яєчка яких виявлялись «лише клітини Сертолі» (всього 5 пацієнтів), в клітинах Сертолі спостерігалось виразне ядерне та цитоплазматичне зафарбування протеїну Ubiquitin (ІГХК: 7–9) в усіх спостереженнях (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $8,9 \pm 0,04$  та  $8,4 \pm 0,06$ , відповідно. В клітинах Лейдїга ядерна експресія убіквітину була відсутня (ІГХК: 0) в 3 спостереженнях (60%), в двох випадках (40%) визначалось слабе ядерне зафарбування (ІГХК: 1–2). Середнє значення – ІГХК дорівнювало  $0,1 \pm 0,02$ . При цьому, в 2 випадках (40%) спостерігалось помірне цитоплазматичне зафарбування (ІГХК: 4–6) та в 3 випадках (60%) визначалась виразна цитоплазматична експресія (ІГХК: 7–9). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $7,8 \pm 0,18$  (табл. 1).

### **Висновки.**

1. У результаті ІГХ дослідження встановлено, що в перитуморальній тестикулярній тканині в сім'яних каналцях із блоком сперматогенезу, які складають 95% спостережень, у сперматогоніях, сперматоцитах і сперматидах, а також в клітинах Сертолі відбувається посилення процесів убіквітинації, що свідчить про інтенсивні процеси протеолізу великої кількості пошкоджених внутрішньоклітинних білків у клітинах.

2. На фоні цих процесів, в 60% спостережень у каналцях із блокованим сперматогенезом з'являються атипові статеві клітини (TIN), які відрізняються від нормальних клітин сперматогенезу іншим характером експресії протеїну Ubiquitin – мають достовірно нижчі ІГХ показники ядерної та цитоплазматичної експресії протеїну Ubiquitin.

3. В спостереженнях із блоком сперматогенезу, включаючи синдром «лише клітини Сертолі», в інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдїга, які здійснюють регулюючий вплив на процеси сперматогенезу, спостерігається порушення процесів убіквітинації у вигляді посилення цитоплазматичної експресії та майже повного зникнення ядерної експресії протеїну Ubiquitin.



**Рис. 1.** Перитуморальна тканина яєчка. Сім'яні каналці із блоком сперматогенезу. Виразна ядерна та помірна цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі та сперматогоніях. Атипові статеві клітини з помірною ядерною та слабкою цитоплазматичною експресією. Відсутність ядерної експресії та помірна цитоплазматична експресія убіквітину в клітинах Лейдїга. Імунопероксидазний АВС–метод, х 200

4. Визначені особливості експресії протеїну Ubiquitin в перитуморальній тканині яєчка хворих на ГПЯ можна охарактеризувати як передракові, які свідчать про важливу

роль структурних та функціональних порушень компонентів убіквітин-протеолітичної системи в процесах канцерогенезу тестикулярної тканини.

### Список літератури

1. Рак в Україні, 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюлетень: Національний канцер-реєстр України (Видання № 14). – Київ, 2013.
2. Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – V. 31, N 2. – P. 474–485.
3. *Histological typing of testis tumours, second edition* // Mostofi F.K., Sesterhenn I.A., Sobin L.H., Springer // Berlin, 1998.
4. Malmstrum P.U., Busch C., Norben B.J., Andersson B. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma // *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 1998. – V. 22. – P. 265–270.

### Реферат

#### ПРОЦЕССЫ УБИКВИТИНАЦИИ В ПЕРИТУМОРАЛЬНОЙ ТКАНИ БОЛЬНЫХ С ГЕРМИНОГЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ЯИЧКА

С.В. Базалицкая, А.М. Романенко,  
В.С. Сакало, А.В. Сакало

С целью определения особенностей иммуногистохимической экспрессии протеина Ubiquitin в перитуморальной ткани яичка, которые можно охарактеризовать как предраковые, обследованы 40 пациентов с герминогенными опухолями яичка (ГОЯ). В перитуморальной тестикулярной ткани в наблюдениях с нарушением сперматогенеза, которые составляют 95%, выявлено: усиление в семенных канальцах процессов убиквитинации, свидетельствующее об интенсивных процессах протеолиза большого количества поврежденных внутриклеточных белков; появление атипичных половых клеток (ТИН), которые отличаются от нормальных клеток сперматогенеза достоверно более низкими показателями ядерной и цитоплазматической экспрессии протеина Ubiquitin; а также нарушение процессов убиквитинации в клетках Лейдига в виде усиления цитоплазматической экспрессии и почти полного исчезновения ядерной экспрессии протеина Ubiquitin. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли структурных и функциональных нарушений компонентов убиквитин-протеолитической системы в процессах канцерогенеза тестикулярной ткани.

**Ключевые слова:** протеин Ubiquitin, герминогенные опухоли яичка, ТИН.

### Summary

#### UBIQUITINATION PROCESSES IN PERITUMORAL TISSUE OF PATIENTS WITH TESTICULAR GERM CELL TUMORS

S.V. Bazalitska, A.M. Romanenko,  
V.S. Sakalo, A.V. Sakalo

For the purpose of definition of features immunohistochemical expression of protein Ubiquitin in peritumoral testicular tissue, which can be characterised as precancerous changes, the 40 patients with testicular germ cell tumors (TGCT) are investigated. In peritumoral testicular tissue in patients with disturbance of spermatogenesis, which make 95%, it is taped: intensifying in seminiferous tubules of ubiquitination processes, testifying about intensive proteolysis of considerable quantity of the damaged intracellular proteins, occurrence of atypical germ cells (TIN), which differ from normal spermatogenesis cells authentically lower of nuclear and cytoplasmatic expression of protein Ubiquitin, and also disturbance of ubiquitination processes in Leydig cells in the form of intensifying of a cytoplasmatic expression and total disappearance of a nuclear expression of protein Ubiquitin. The received results testify to the important role of structural and functional disturbances of ubiquitin-proteolysis system components in carcinogenesis processes of testicular tissue.

**Keywords:** protein Ubiquitin, testicular germ cell tumors, TIN.