

---

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

---

УДК 616.681-006.884-091.8-092.18-078:57.083.3

СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ ПОТАПОВ, ДАР'Я ІГОРІВНА ГАЛАТА,  
ОКСАНА МИКОЛАЇВНА ПЛІТЕНЬ, НАТАЛІЯ ІВАНІВНА ГОРГОЛЬ

*Харківський національний медичний університет*

### МОРФОЛОГІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НЕОПЛАЗІЇ ГЕРМІНОГЕННИХ КЛІТИН *IN SITU* У ГЕРМІНОГЕННИХ ПУХЛИНАХ ЯЄЧКА

Неоплазія герміногенних клітин *in situ* (GCNIS) належить до пренеопластичних процесів у герміногенних пухлинах яєчок і відіграє важливу роль у канцерогенезі даних пухлин. Проведено імуногістохімічне дослідження особливостей проліферативно-апоптотичних процесів, стану екстрацелюлярного матриксу, міжклітинної адгезії та неоангіогенезу в GCNIS. Показано, що вже на стадії GCNIS визначаються зміни в експресії металопротеїназ (MMP-1, MMP-3, MMP-9), що свідчить про деградацію екстрацелюлярного матриксу, яка зростає в динаміці пухлинної прогресії. Вивчення міжклітинної адгезії в GCNIS за допомогою маркерів E-cadherin і  $\beta$ -catenin показало її часткову втрату. Також встановлено превалювання проліферації над апоптозом у клітинах GCNIS. Процеси новоутворення судин в GCNIS інтенсивні і відбуваються переважно шляхом васкулогенезу.

**Ключові слова:** неоплазія герміногенних клітин *in situ*, імуногістохімічне дослідження.

За весь період вивчення герміногенних пухлин яєчок (ГПЯ) для визначення попереднього пренеопластичного процесу в органі при цих пухлинах використовували різні терміни, включаючи «*carcinoma in situ* постпубертатного типу» [27], «інтратубулярна (внутрішньоканальцева) герміногенна неоплазія» [32], пізніше — «внутрішньоканальцева неоплазія герміногенних клітин, некласифікована» і «тестикулярна інтраепітеліальна неоплазія» (ТИН) [25].

Однак жоден із цих термінів, враховуючи неепітеліальну природу деяких ГПЯ і невизначеність слова «некласифікована», цілком не задовольняв дослідників. Тому введено (класифікація ВООЗ 2016 р., зі змінами) новий уніфікований термін: «неоплазія герміногенних клітин *in situ*» (GCNIS), який являє собою злиття термінів «*carcinoma in situ*» і «внутрішньоканальцева неоплазія герміногенних клітин, некласифікована». GCNIS належить до неопластичних подій, пов'язаних з герміногенними клітинами (ГК) ембріонального типу, що обмежені нішею сперматогенних стовбурових клітин [31].

Причини виникнення GCNIS і розвинення ГПЯ до кінця не з'ясовані, за винятком випадків розладів статевого розвитку з відомими генетичними

дефектами, що спричиняють недостатню вірилізацію гонад. Більшість пацієнтів з GCNIS або семіновою/несеміновою не мають відомих генетичних аномалій [12,28].

Гіпотеза про те, що клітини GCNIS розвиваються з примордіальних ГК, які не змогли диференціюватися в сперматогонії, підтверджується достовірними даними [16]. По-перше, клітини GCNIS морфологічно дуже схожі на ембріональні ГК [23]. По-друге, клітини GCNIS і ГК експресують одні і ті самі ембріональні маркери і мають тісні перетинання в профілях транскрипції [10], а також аналогічні епігенетичні особливості [11, 15]. По-третє, асоціація GCNIS з розладами сексуального розвитку/синдромом дисгенезії яєчок (включаючи крипторхізм, гіпоспадію, чоловіче безпліддя, порушення розвитку яєчок і ГПЯ) узгоджується з припущенням про те, що аномальний фетальний розвиток гонад є значущим патогенним фактором [16, 26].

Таким чином, причиною виникнення GCNIS і ГПЯ, ймовірно, є порушення в плюрипотентній програмі розвитку ембріональних ГК [24, 25].

Мета дослідження — встановити особливості проліферативно-апоптотичних процесів, стану екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), міжклітинної адгезії та ангіогенезу в GCNIS ГПЯ.

## МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження виконано на матеріалі 7 спостережень ГПЯ: по 1 випадку GCNIS в складі одноконтинентних: семіноми, пухлини жовткового мішка постпубертатного типу (ПЖМПТ), тератоми постпубертатного типу (ТПТ), ембріонального раку (ЕР) і 3 випадків GCNIS у складі змішаних ГПЯ (2 спостереження комбінації ЕР та ТПТ і 1 — ЕР та семіноми), а також історій хвороби пацієнтів, що проходили обстеження і лікування на базі Харківського обласного клінічного центру урології і нефрології ім. В. І. Шаповала.

Усі досліджені ГПЯ були розподілені за типом гістологічної будови відповідно до класифікації ВООЗ, а також патологічної рTNM класифікації [31], що є вкрай важливим, оскільки точне встановлення діагнозу і визначення стадії патологічного процесу є фундаментальними згідно з сучасними уявленнями [30].

Для коректного і наочного порівняння імуногістохімічних (ІГХ) характеристик GCNIS усі спостереження досліджених ГПЯ були розділені за ступенем пухлинної прогресії. Так, керуючись рTNM класифікацією, були сформовані такі групи:

1. Група «0» була представлена виключно «чистими» ТПТ, які складались із добре диференційованих,

зрілих тканин. Пухлини даної групи відповідали стадії T1N0S0.

2. Група «1», у якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком, без інвазії в кровоносні або лімфатичні судини; при цьому пухлина могла вросати в білкову, але не у вагінальну оболонку, а метастази у регіонарні лімфатичні вузли і віддалені метастази були відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадії T1N0S0-2.

3. Група «2», у якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком з інвазією в кровоносні або лімфатичні судини, або пухлина проникала через білкову оболонку з ураженням вагінальної оболонки; при цьому були наявні метастази різного ступеня у регіонарні лімфатичні вузли, проте віддалені метастази були відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадіям T2N1-3S0-2.

4. Група «4» характеризувалась наявністю у пацієнта віддалених метастазів. При цьому метастази у регіонарні лімфатичні вузли могли бути відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадії T2-3N0-3S0-2.

Розподіл GCNIS відповідно до групи спостереження і гістотипу ГПЯ наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

GCNIS відповідно до групи спостереження і гістотипу ГПЯ

	Група			
	«0»	«1»	«2»	«4»
ПЖМПТ	-	n = 1	-	-
ЕР	-	-	-	n = 1
ТПТ	n = 1	-	-	-
Семінома	-	n = 1	-	-
Змішана ГПЯ (ЕР і семінома)	-	-	n = 1	-
Змішана ГПЯ (ЕР і ТПТ)	-	-	n = 1	n = 1

Матеріал для ІГХ дослідження фіксували в 10 % нейтральному формаліні протягом 24 год, заливали в парафін, готували зрізи товщиною 4×10–6 м, які наносили на високоадгезивні скельця «SUPER FROST PLUS» фірми «ДАКО» (Данія) і висушували при температурі 37°C протягом 18 годин. Демаскування було виконано методом кип'ятіння зрізів у цитратному буфері (рН 6,0). Для візуалізації первинних антитіл була застосована система детекції Ultra Vision Quanto Detection Systems HRP Polymer («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Як хромоген використовували DAB (діамінобензидин). Зрізи дозбарвлювали гематоксиліном Майєра і заключали в канадський бальзам. Для кожного маркера з метою виключення хибнопозитивних або помилкових результатів були застосовані контрольні дослідження, в яких використовували зрізи з тканин, що рекомендовані виробником антитіл для позитивного контролю. Крім того, кожне дослідження мало негативний контроль без додавання первинних антитіл.

Досліджували експресію таких ІГХ маркерів: Ki-67, Вах, Vcl-2 і p53 для оцінки проліферативно-апоптотичних процесів; E-cadherin і  $\beta$ -catenin для оцінки

міжклітинної адгезії; металлопротеїназ (ММП) ММП-1, ММП-3 і ММП-9 разом з їх тканинним інгібітором ТІМП-1 — для оцінки стану ЕЦМ; CD31 і CD34 досліджували для оцінки неангіогенезу і ступеня васкуляризації. Панель використаних первинних антитіл представлено в таблиці 2.

Для реалізації якісного та об'єктивного аналізу цифрових зображень була розроблена методика, яка дозволила з максимальною ефективністю проводити обробку зображень і отримувати більш точні та інформативні кількісні дані і поліпшити якість інтерпретації отриманих результатів (Патент України на винахід № 119922) [6].

Імуногістохімічно забарвлені гістологічні зрізи досліджуваних тканин реєстрували за допомогою мікроскопа Olympus BX-41TF (Японія) і цифрової фотокамери Olympus C3040-ADU (Японія). Отримані фотографії обробляли у програмному пакеті Matlab, використовуючи стандартні інструменти обробки цифрових зображень. Для морфометричного вимірювання відносної площі (S), яку займають імунопозитивні структури, у виділеній ділянці автоматично

## Панель первинних антитіл

№	Первинне антитіло	Клон	Виробник
1	Mo a-Hu Ki-67 Monoclonal Antibody	MIB-1	«DAKO», Данія
2	Rb a-Hu Bax Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
3	Mo a-Hu Bcl-2 Monoclonal Antibody	100/D5	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
4	Mo a-Hu p53 Monoclonal Antibody	DO-7	«DAKO», Данія
5	Rb a-Hu E-cadherin Monoclonal Antibody	EP700Y	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
6	Rb a-Hu beta Catenin Monoclonal Antibody	E247	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
7	Rb a-Hu MMP1 Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
8	Rb a-Hu MMP3 Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
9	Rba-HuMMP9 (92kDaCollagenaseIV) Polyclonal Antibody		«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
10	Mo a-Hu TIMP1 Monoclonal Antibody	102D1	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
11	Mo a-Hu CD31 Monoclonal Antibody	JC/70A	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США
12	Mo a-Hu CD34 Monoclonal Antibody	QBEND/10	«Thermo Fisher Scientific Inc.», США

обчислювалось співвідношення кількості пікселів цифрового зображення ділянки імунопозитивної реакції до загальної кількості пікселів у зображенні, визначене у %. За значеннями яскравості кольорних RGB-каналів у кожному пікселі вихідного зображення розраховували допоміжні кольорні координати CIE XYZ, а потім — кольорні координати CIE Lab. Таким чином, вихідному цифровому зображенню відповідав тривимірний масив кольорних координат CIE Lab, однією з яких є світлість (L), значення котрої можуть коливатись у межах від 0 до 100. При цьому L = 0 – 40 відповідає сильному рівню інтенсивності експресії маркера, L = 40 – 50 — середньому, L = 50 – 100 — слабкому. S та L експресії маркерів вивчалась у 30 випадково обраних полях зору мікроскопа Olympus BX-41TF при збільшенні  $\times 200$  ( $3,12 \times 10^{-7}$  м<sup>2</sup>) у кожному спостереженні.

Проліферативна активність була досліджена шляхом підрахунку відсотка імунопозитивно забарвлених пухлинних клітин (з використанням моноклональних антитіл Mo a-Hu Ki-67, Clone MIB-1, «DAKO», Данія) у стандартизованому полі зору мікроскопа Olympus BX-41TF (Японія) при збільшенні  $\times 400$  ( $7,5 \times 10^{-8}$  м<sup>2</sup>) з визначенням індексу проліферації (ІП). У кожному спостереженні аналізували по 20 полів зору з використанням такої формули:

$$\text{ІП} = \frac{\text{кількість Ki-67-імунопозитивних клітин}}{\text{загальна кількість клітин}} \times 100$$

Рівень проліферації пухлинних клітин визначали за ядерною експресією Ki-67 [13]. Наявність 0–5 % імунопозитивних клітин відповідає 0 балів (низький рівень проліферативної активності), 6–25 % — 1 балу

(низький рівень проліферативної активності), 26–50 % — 2 балам (помірний рівень проліферативної активності), 51–75 % клітин — 3 балам (помірний рівень проліферативної активності), 76–100 % — 4 балам (високий рівень проліферативної активності).

Щільність судин (ЩС) як відображення ступеня васкуляризації визначали шляхом підрахунку кількості мікросудин у стандартизованому полі зору мікроскопа Olympus BX-41TF (Японія) при збільшенні  $\times 200$  ( $3,12 \times 10^{-7}$  м<sup>2</sup>). Для виявлення мікросудин використовували маркер ендотеліальних клітин Mo a-Hu CD34 Monoclonal Antibody, Clone QBEND/10, «Thermo Fisher Scientific Inc.», США. У кожному спостереженні аналізували по 20 полів зору.

Статистична обробка даних здійснювалася за допомогою пакета статистичного аналізу Тріал-версії STATISTICA 13.3 EN. Описова статистика представлена традиційно як середне  $\pm$  похибка середнього ( $M \pm m$ ). Усі статистичні гіпотези, в тому числі про значимість відмінностей центральних тенденцій у групах, перевірялися при довірчій ймовірності 95 % ( $p < 0,05$ ) [3].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При мікроскопічному дослідженні GCNIS можна було ідентифікувати на забарвлених гематоксином і еозином препаратах: атипів клітини, що вистилали сім'яні каналці та іноді формували цілі клітинні шари, за розмірами були більшими за клітини інтактних каналців, мали чіткі межі та зазвичай прозору цитоплазму. Ядра теж великі, округлі з одним або декількома гіперхромними ядерцями (див. рис. 1, А кол. вкл.).

У сумнівних випадках GCNIS визначали за допомогою PAS-фарбування (див. рис. I, Б кол. вкл.). Іноді ділянки GCNIS співіснували з інтактними ділянками.

Проліферація, як відомо, є процесом, який відображає онкотрансформацію, ступінь злоякісності пухлини та пухлинну прогресію. Для її визначення використовують один із найбільш специфічних маркерів — Ki-67 [9]. Доведено також, що ПІ у пухлині служить незалежним прогностичним показником виникнення рецидиву, загальної та безрецидивної виживаності, а також передбачуваним чинником для визначення чутливості до хіміо- і променевої терапії [7].

При вивченні проліферативно-апоптотичних процесів у клітинах GCNIS визначалась інтрануклеарна реакція з Ki-67. Наприклад, в осередках GCNIS в однокомпонентній ПЖМПТ, яка належала до групи «1», середня S експресії Ki-67 склала  $3,01 \pm 0,11$  %, а L експресії маркера знаходилась на помірному рівні ( $44,43 \pm 0,27$  од.) (див. рис. I, В кол. вкл.). При цьому ПІ склав  $21,48 \pm 9,18$  %, що відповідало низькому рівню проліферативної активності.

У спостереженні двокомпонентної змішаної ГПЯ групи «2», де переважною складовою був EP, який поєднувався з ТПТ, в клітинах GCNIS реакція з Ki-67 мала високу інтенсивність ( $26,03 \pm 0,32$  од.), а середня S, зайнята імунопозитивними клітинами, склала  $6,16 \pm 0,19$  % (див. рис. I, Г кол. вкл.). Значення ПІ у даному спостереженні ( $79,99 \pm 8,95$  %) відповідало високому рівню проліферативної активності.

При порівнянні кількісних показників було встановлено, що S і L експресії Ki-67, а також ПІ в GCNIS ГПЯ групи «2» були достовірно вищими за аналогічні показники в GCNIS ГПЯ групи «1» ( $p < 0,001$ ).

В останні роки увага багатьох дослідників повернута до вивчення апоптозу, який асоціюють зокрема з патогенезом онкологічних захворювань [5]. І якщо в здоровій тканині існує баланс між процесами проліферації і загибелі клітини, то в пухлинній — виникає стійкість до індукції апоптозу [8].

Маркер апоптозу Вах був досліджений у двох випадках ГПЯ з осередками GCNIS. У першому, який належав до ТПТ групи «0», ІГХ-реакція була негативною, а в другому, який належав до групи «2» і був представлений двокомпонентною змішаною ГПЯ (комбінація EP і ТПТ), цитоплазматична експресія Вах була виявлена лише в окремих сім'яних каналцях. Середня S експресії Вах в даному спостереженні склала  $0,56 \pm 0,11$  % при слабкій L імунопозитивного забарвлення ( $52,83 \pm 0,35$  од.) (див. рис. II, А кол. вкл.). Експресія маркера антиапоптозу Bcl-2 в GCNIS двокомпонентної змішаної ГПЯ (комбінація EP і ТПТ) була відсутня (див. рис. II, Б кол. вкл.), як і у випадку ТПТ групи «0».

Таким чином, апоптотичні процеси в GCNIS, незалежно від групи дослідження, були вкрай незначними або повністю відсутніми, що в сукупності з даними щодо проліферації говорить про превалювання останньої.

Як відомо, мутації p53 можуть не тільки ініціювати канцерогенез та визначати його початкові етапи, але й виникати в процесі росту пухлини, що зумовлює

її агресивні властивості. Мутантний ген-супресор p53 визначається при багатьох злоякісних новоутвореннях [14, 17, 29], але в ГПЯ він буває мутований рідко [19], що свідчить про невисоку агресивність даних пухлин [21].

У нашій роботі експресія маркера p53 була досліджена в GCNIS двох змішаних двокомпонентних ГПЯ, які належали до групи «2» (комбінація EP і семіноми та EP і ТПТ), та одному спостереженні групи «4», що також було представлено змішаною двокомпонентною ГПЯ (комбінація EP і ТПТ). В усіх представлених випадках експресія маркера p53 не визначалась. Таким чином, оскільки в осередках GCNIS вказаних ГПЯ, які характеризувались наявністю метастазів, мутантний p53 не виявлявся, можна вважати його непричетним до канцерогенезу в даних пухлинах.

Загальновідомо, що MMP можуть сприяти ініціації, зростанню, міграції, ангіогенезу, селекції апоптоз-резистентних субпопуляцій, а також інвазії та метастазуванню [20].

При вивченні стану ЕЦМ в GCNIS ГПЯ експресія MMP-1 була досліджена в двох спостереженнях. У першому з них, що належав до однокомпонентної ПЖМПТ групи «1», експресія MMP-1 в GCNIS була відсутня (див. рис. II, В кол. вкл.). А в GCNIS однокомпонентного EP, який належав до групи «4», L експресії MMP-1 була помірною —  $48,07 \pm 0,36$  од., а S імунопозитивного забарвлення склала  $3,07 \pm 0,17$  %. При цьому експресія MMP-1 виявлялась лише у сім'яних каналцях, що були уражені GCNIS, а в інтактних каналцях реакція з даним маркером була негативною (див. рис. II, Г кол. вкл.). Таким чином, S експресії MMP-1 в GCNIS ГПЯ групи «4» була вищою за таку в GCNIS ГПЯ групи «1».

Маркер MMP-3 був досліджений у ділянках GCNIS трьох спостережень ГПЯ. Перше належало до однокомпонентної ПЖМПТ групи «1» і, на відміну від негативної ІГХ реакції з MMP-1 у тому самому випадку, реакція з MMP-3 в GCNIS мала помірну L експресії ( $41,76 \pm 0,24$  од.), а S імунопозитивного забарвлення склала  $3,99 \pm 0,15$  % (див. рис. III, А кол. вкл.). У другому випадку, який належав до змішаної двокомпонентної ГПЯ групи «2» (комбінація EP і семіноми), S експресії MMP-3 була  $4,56 \pm 0,11$  %, а L експресії ( $47,30 \pm 0,24$  од.) також знаходилась на помірному рівні (див. рис. III, Б кол. вкл.). Третє спостереження було представлено змішаною двокомпонентною ГПЯ (комбінація EP і ТПТ), але вже групи «4», і характеризувалось суттєвим збільшенням середньої S імунопозитивного забарвлення ( $14,94 \pm 0,16$  %) при збереженні помірного рівня L його експресії ( $43,03 \pm 0,12$  од.) (див. рис. III, В кол. вкл.).

MMP-9 було досліджено в GCNIS п'яти спостережень. Два з них належали до групи «1» і були представлені однокомпонентними семіномою і ПЖМПТ. Середня S експресії MMP-9 в GCNIS зазначених пухлин майже співпадали і склали ( $4,57 \pm 0,26$  % і  $4,43 \pm 0,25$  % відповідно), при цьому в GCNIS семіномою L експресії була слабкою ( $53,20 \pm 0,35$  од.), а в GCNIS в ПЖМПТ — помірною ( $47,46 \pm 0,36$  од.) (див. рис. III, Г кол. вкл.). Ще два випадки належали до групи «2»



і були представлені змішаними двокомпонентними ГПЯ. В одному з них, який поєднував компоненти EP і семіноми, середня S експресії MMP-9 була  $6,08 \pm 0,14$  %, а L забарвлення знаходилась на помірно рівні ( $44,27 \pm 0,34$  од.) (див. рис. IV, А кол. вкл.). В іншому спостереженні (комбінація EP і ТПТ) L експресії була сильною ( $30,95 \pm 0,32$  од.) при середній S експресії MMP-9  $8,26 \pm 0,38$  %. У групі «4» було досліджено GCNIS у випадку, який також був представлений змішаною двокомпонентною ГПЯ (комбінація EP і ТПТ). Порівняно з усіма попередніми дослідженими GCNIS, в даному спостереженні середня S експресії MMP-9 була найбільшою і склала  $16,95 \pm 0,29$  %, а L імунопозитивного забарвлення знаходилась на помірно рівні ( $43,15 \pm 0,18$  од.).

При порівнянні показників S експресії MMP-3 і MMP-9 було встановлено, що в GCNIS ГПЯ групи «4» вони перевищували такі в GCNIS ГПЯ групи «2» ( $p < 0,001$ ), які, в свою чергу, були вищими за аналогічні показники в GCNIS ГПЯ групи «1» ( $p < 0,01$ ). Зазначений факт дозволяє припустити, що в осередках GCNIS ГПЯ пізніх стадій пухлинної прогресії процеси деградації ЕЦМ більш виражені у порівнянні з такими в більш ранніх стадіях, що, можливо, пов'язано з наявністю в розвиненій пухлинній тканині так званого «пухлинного поля», яке причетне до неопластичної трансформації нормальних клітин у пухлинні.

У GCNIS усіх досліджених ГПЯ експресія ТІМР-1, тканинного інгібітора MMP, виявлена не була.

Маркери адгезії — E-cadherin і  $\beta$ -catenin — дозволяють досліджувати стан клітинних контактів, які визначають початок і подальший розвиток метастазування. Ослаблення клітинних контактів, які забезпечують молекули міжклітинної адгезії, розцінюється як ключовий механізм метастатичного процесу.

E-cadherin і  $\beta$ -catenin були досліджені в ділянках GCNIS п'яти спостережень ГПЯ. Незалежно від групи, експресія E-cadherin виявлена не була. В той же час експресія  $\beta$ -catenin визначалась в усіх досліджених випадках, але характеризувалась деякими відмінностями. Одне спостереження, яке належало до групи «1» (однокомпонентна ПЖМПТ), характеризувалось нерівномірністю розподілу  $\beta$ -catenin-імунопозитивного забарвлення — експресія визначалась лише в частині сім'яних каналців і мала при цьому виключно цитоплазматичну локалізацію (див. рис. IV, Б кол. вкл.). Середня S експресії  $\beta$ -catenin в даному випадку була дуже невеликою і склала  $0,55 \pm 0,05$  % при слабкій L імунопозитивного забарвлення ( $51,22 \pm 0,27$  од.).

Ще два спостереження належали до групи «2» і були представлені двокомпонентними змішаними ГПЯ, в одному з яких мало місце поєднання EP і семіноми, а в іншому — EP і ТПТ. У випадку, де складовими змішаної ГПЯ були EP і семінома, виявлялось нерівномірне, з осередками редукції, цитоплазматичне забарвлення, а мембранна локалізація  $\beta$ -catenin була відсутня (див. рис. IV, В кол. вкл.). У даному спостереженні середня S експресії  $\beta$ -catenin склала  $1,04 \pm 0,15$  %, а L була слабкою ( $50,44 \pm 0,31$  од.). В іншому випадку,

що належав до групи «2» (комбінація EP і ТПТ), середня S експресії  $\beta$ -catenin ( $5,37 \pm 0,17$  %) та L забарвлення ( $44,85 \pm 0,28$  од.) були значно більшими за такі в попередньому спостереженні даної групи. Переважала цитоплазматична локалізація маркера, але визначались ділянки з цитоплазматично-мембранним розташуванням  $\beta$ -catenin (див. рис. IV, Г кол. вкл.).

До групи «4» також увійшли два спостереження: однокомпонентний EP і змішана двокомпонентна ГПЯ (комбінація EP і ТПТ). У GCNIS обох спостережень L майже співпадала і була слабкою ( $54,16 \pm 0,26$  од. і  $55,80 \pm 0,53$  од. відповідно), а середня S експресії  $\beta$ -catenin склала  $1,45 \pm 0,14$  % і  $2,00 \pm 0,13$  % відповідно. При цьому в обох випадках розташування маркера було виключно цитоплазматичним, з досить великими осередками редукції експресії  $\beta$ -catenin (див. рис. V, А кол. вкл.).

Таким чином, наше дослідження свідчить про втрату міжклітинної адгезії в GCNIS ГПЯ, що підтверджується наявністю нетипового розташування E-cadherin і  $\beta$ -catenin у вигляді чергування ділянок імунонегативних та імунопозитивних клітин як з мембранним, так і з цитоплазматичним забарвленням. Трактують описаних змін співпадає з висновками інших дослідників [1].

Роль ангиогенезу в розвитку, інвазії та метастазуванні злоякісних пухлин є загально визнаною. Однак вивчення механізмів утворення кровоносних судин, розробка методів оцінки пухлинного ангиогенезу, а також особливості застосування ІГХ-маркерів CD34 і CD31 для оцінки агресивності пухлини і прогнозу залишаються актуальними [4].

CD34 являє собою сіаломуцин, який експресується на гемопоетичних стовбурових клітинах, прогеніторних та ендотеліальних клітинах малих судин і на капілярних ендотеліальних клітинах, але відсутній у повністю диференційованих гемопоетичних клітинах; CD34 є високочутливим біомаркером для диференціювання ендотеліальних клітин, який широко вивчається при пухлинному ангиогенезі [18, 22].

ІГХ дослідження ангиогенезу в GCNIS було проведено в п'ятьох спостереженнях ГПЯ, одне з яких належало до однокомпонентної ПЖМПТ групи «1». Експресія CD34 в осередках, де ми спостерігали перехід GCNIS в інвазійну стадію, процес формування судин був особливо виразним. Уражені каналці були начебто «огорнуті» густою сіткою новоутворених капілярів, а поблизу завжди визначалися прогеніторні ендотеліальні клітини (див. рис. V, Б кол. вкл.).

Водночас навколо каналців, в яких GCNIS не демонструвала інвазивних властивостей, візуально кількість судин була значно меншою. Даний факт опосередковано доводить, що початкова стадія пухлинного процесу є, зазвичай, маловаскулярною, на відміну від більш пізніх стадій. Середня S експресії CD34 в даному випадку склала  $8,70 \pm 0,34$  %, а L забарвлення була сильною ( $39,11 \pm 0,23$  од.). ЩС була значною і склала  $137,35 \pm 1,93$  шт. у полі зору.

Наступні два спостереження належали до групи «2» і були представлені змішаними двокомпонентними

ГПЯ: комбінація EP і семіноми та EP і ТПТ. ЩС у даних спостереженнях склали  $90,35 \pm 1,62$  і  $52,50 \pm 1,01$  шт. у полі зору відповідно. В обох випадках L забарвлення відповідала помірному рівню ( $44,28 \pm 0,46$  од. і  $43,05 \pm 0,45$  од. відповідно), а показники S, зайнятої імунопозитивними ділянками, дещо відрізнялись і склали  $5,87 \pm 0,29$  % і  $4,40 \pm 0,26$  % відповідно. Візуально в осередках GCNIS, де пухлинні клітини виходили за межі стінки каналців, демонструючи перехід від неінвазивної до інвазивної стадії, ЩС зростала (див. рис. V, B кол. вкл.).

До групи «4» також увійшли два спостереження: змішана двокомпонентна ГПЯ (комбінація EP і ТПТ) і однокомпонентний EP. У GCNIS змішаної ГПЯ середня S експресії CD34 склали  $7,30 \pm 0,22$  % при помірній L забарвлення ( $43,32 \pm 0,33$  од.). А в однокомпонентному EP показники S та L експресії були найбільшими ( $13,07 \pm 0,21$  % і  $37,97 \pm 0,21$  од. відповідно). У даному спостереженні виявлялась розгалужена сітка новоутворених судин, серед яких визначались як судини середнього калібру, так і численні судини капілярного типу (див. рис. V, Г кол. вкл.).

Так, у кожному з досліджених GCNIS ГПЯ групи «2» S і L експресії CD34 були нижчими, ніж у GCNIS ГПЯ групи «1» ( $p < 0,01$ ). Так само S експресії CD34 в GCNIS ГПЯ групи «2» була меншою за таку в GCNIS ГПЯ групи «4» ( $p < 0,01$ ). Аналогічна картина спостерігалась при аналізі показника ЩС. Треба зауважити, що серед GCNIS усіх груп досліджених ГПЯ найбільші показники S і L експресії CD34, а також ЩС були в випадку, що належав до групи «4».

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Аналіз маркерів міжклітинної адгезії у хворих на плоскоклітинний рак орофарингеальної ділянки* / І. С. Шпонька, О. В. Ковтуненко, О. В. Пославська та ін. // Буковин. мед. вісн. — 2012. — Т. 16, № 1. — С. 104–109.
2. *Логинова Н. П.* Влияние гипоксии на процесс васкулогенеза в тимусах у детей первого года жизни / Н. П. Логинова, В. А. Четвертных, Г. А. Хромцова, Г. А. Даракчан // *Соврем. проблемы науки и образования*. — 2015. — № 5.
3. *Кобзарь А. И.* Прикладная математическая статистика. — [2-е изд., испр.] / А. И. Кобзарь. — М. : Физматлит, 2012. — 816 с.
4. *Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте* / Н. А. Нефедова, О. А. Харлова, Н. В. Данилова и др. // *Архив патологии*. — 2016. — Т. 78, № 2. — С. 55–62.
5. *Пальцев М. А.* Молекулярная медицина: достижения и перспективы / М. А. Пальцев // *Молекуляр. медицина*. — 2004. — № 4. — С. 3–12.
6. *Пат. 119922 Україна*, МПК G 01 N 21/00. Спосіб кількісної оцінки рівня світлості та відносної площі експресії маркерів при імуногістохімічному дослідженні тканин / С. М. Потапов, В. Д. Марковський, Н. Є. Кулішова (Україна); Харків. нац. мед. ун-т. — № a201710743; заявл. 06.11.17; опубл. 27.08.19, Бюл. № 16.
7. *Пожариский К. М.* Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / К. М. Пожариский, Е. Е. Леенман // *Архив патологии*. — 2000. — № 5. — С. 3–11.
8. *Райхлин Н. Т.* Регуляция и проявление апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Н. Т. Райхлин, А. Н. Райхлин // *Вопр. онкологии*. — 2002. — № 48. — С. 159–171.
9. *Шацева Т. А.* Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функции / Т. А. Шацева, М. С. Мухина // *Вопр. онкологии*. — 2004. — № 2. — С. 157–163.
10. *Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte* / S.B. Sonne, K. Almstrup, M. Oalgaard et al. // *Cancer Res*. — 2009. — Vol. 69 (12). — P. 5241–5250.
11. *Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells* / K. Almstrup, J.E. Nielsen, O. Mlynarska et al. // *Br. J. Cancer*. — 2010. — Vol. 103 (8). — P. 1269–1276.
12. *c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma* / K. Biermann, F. Goke, D. Nettersheim et al. // *J. Pathol.* — 2007. — Vol. 213 (3). — P. 311–318.
13. *Dissociated expression of Bcl-2 and Ki-67 in endometrial lesions: diagnostic and histogenetic implications* / B. Risberg, K. Karlsson, V. Abeler et al. // *Int. J. Gynecol. Pathol.* — 2002. — Vol. 21 (2). — P. 155–60.

У GCNIS тих спостережень, де проводилось дослідження маркера CD34, також вивчався і CD31. Незалежно від стадії пухлинної прогресії та гістотипу ГПЯ у жодному з випадків експресія даного маркера виявлена не була.

Отримані дані свідчать про достатньо активний ангиогенез на початкових стадіях пухлинної прогресії, який у подальшому стає менш інтенсивним, а далі знов починає зростати. Однак для виявлення чітких закономірностей ангиогенезу необхідно подальше дослідження з використанням більшої кількості матеріалу, оскільки експресія CD34 і CD31 у пухлинних судинах є дуже варіабельною [4].

Існують відомості, що CD31-позитивне забарвлення ендотеліальних клітин реєструється переважно у великих судинах і рідко — в капілярах [2]. Виходячи з цього, негативна реакція з CD31 в GCNIS, як в початковій неінвазивній стадії пухлинної прогресії, може бути пояснена превалюванням процесів васкулогенезу з утворенням судин капілярного типу і відсутністю судин крупного калібру, а також незрілістю ендотеліальних клітин.

## ВИСНОВКИ

Проведене дослідження свідчить, що вже в преінвазивній стадії ГПЯ (GCNIS) визначаються деградація ЕЦМ, яка є більш виразною в пізніх стадіях пухлинної прогресії, втрата міжклітинної адгезії та превалювання проліферативних процесів над апоптотичними, а також відбувається активний неоангиогенез з превалюванням васкулогенезу.

14. *Expression of CD44 protein in renal cell carcinomas: association with p53 expression* / V. Zolota, A.C. Tsamandas, M. Melachrinou et al. // *Urol Oncol.* — 2002. — Vol. 7 (1). — P. 13–17.
15. *Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance* / H. Wermann, H. Stoop, A.J. Gillis et al. // *J. Pathol.* — 2010. — Vol. 221 (4). — P. 433–442.
16. *Gonadal maldevelopment as risk factor for germ cell cancer: towards a clinical decision model* / Y. G. Van der Zwan, K. Biermann, K. P. Wolffenbuttel et al. // *Eur. Urol.* — 2015. — Vol. 67. — P. 692–701.
17. *Heterogeneity of ovarian cancer: relationships among histological group, stage of disease, tumor markers, patient characteristics, and survival* / M. Pieretti, C. Hopenhayn-Rich, N. H. Khattar et al. // *Cancer Invest.* — 2002. — Vol. 20 (1). — P. 11–23.
18. *Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis* / J. Mazibrada, M. Rittà, M. Mondini et al. // *Gynecol. Oncol.* — 2008. — Vol. 108 (1). — P. 112–120.
19. *Jones R. H. New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success* / R. H. Jones, P. A. Vasey // *Eur. J. Cancer.* — 2003. — Vol. 39 (2). — P. 147–56.
20. *Lynch C. C. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication* / C. C. Lynch, L. M. Matrisian // *Differentiation.* — 2002. — Vol. 70 (9–10). — P. 561–73.
21. *Meta-analysis of clinical significance of p53 protein expression in patients with osteosarcoma* / J. Wu, A. Guo, Q. Li, D. Wang // *Future Oncol.* — 2017. — Vol. 13 (21). — P. 1883–1891.
22. *Neoangiogenesis in cervical cancer: Focus on CD34 assessment* / C. Ancuța, E. Ancuța, F. Zugun-Eloae, E. Carasevici // *Rom. J. Morphol. Embryol.* — 2010. — Vol. 51 (2). — P. 289–294.
23. *Nielsen H. The fine structure of possible carcinoma-in-situ in the seminiferous tubules in the testis of four infertile men* / H. Nielsen, M. Nielsen, N.E. Skakkebaek // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* — 1974. — Vol. 82 (2). — P. 235–248.
24. *Relevance of microRNAs in normal and malignant development, including human testicular germ cell tumours* / L. H. Looijenga, A. J. Gillis, H. Stoop et al. // *Int. J. Androl.* — 2007. — Vol. 30 (4). — P. 304–314.
25. *Reuter V. E. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors* / V. E. Reuter // *Mod. Pathol.* — 2005. — Vol. 18 (2). — P. 51–60.
26. *Rijlaarsdam M. A. An oncofetal and developmental perspective on testicular germ cell cancer* / M. A. Rijlaarsdam, L. H. Looijenga // *Semin. Cancer Biol.* — 2014. — Vol. 29. — P. 59–74.
27. *Skakkebaek N. E. Possible carcinoma-in-situ of the testis* / N. E. Skakkebaek // *Lancet.* — 1972. — Vol. 2 (7776). — P. 516–517.
28. *Somatic KIT mutations occur predominantly in seminoma germ cell tumors and are not predictive of bilateral disease: report of 220 tumors and review of literature* / J. Coffey, R. Linger, J. Pugh et al. // *Genes Chromosomes Cancer.* — 2008. — Vol. 47 (1). — P. 34–42.
29. *Soussi T. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis* / T. Soussi, K. Dehouche, C. Bérout // *Hum Mutat.* — 2000. — Vol. 15 (1). — P. 105–13.
30. *Testicular germ cell tumors: revisiting a series in light of the new WHO classification and AJCC staging systems, focusing on challenges for pathologists* / J. Lobo, A. L. Costa, B. Vilela-Salgueiro et al. // *Hum. Pathol.* — 2018. — Vol. 82. — P. 113–124.
31. *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours* / H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey et al. // *Eur Urol.* — 2016. — Vol. 70 (1). — P. 93–105.
32. *Ulbright T. M. Germ cell neoplasms of the testis* / T. M. Ulbright // *Am. J. Surg. Pathol.* — 1993. — Vol. 17 (11). — P. 1075–1091.

Стаття надійшла до редакції 29.10.2019.

С. Н. ПОТАПОВ, Д. И. ГАЛАТА, О. Н. ПЛИТЕНЬ, Н. И. ГОРГОЛЬ

Харьковский национальный медицинский университет

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕОПЛАЗИИ ГЕРМИНОГЕННЫХ КЛЕТОК IN SITU В ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧКА

Неоплазия герминогенных клеток *in situ* (GCNIS) относится к пренеопластическим процессам в герминогенных опухолях яичек и играет важную роль в канцерогенезе данных опухолей. Проведено иммуногистохимическое исследование особенностей пролиферативно-апоптотических процессов, состояния экстрацеллюлярного матрикса, межклеточной адгезии и неоангиогенеза в GCNIS. Показано, что уже на стадии GCNIS определяются изменения в экспрессии металлопротеиназ (MMP-1, MMP-3, MMP-9), что свидетельствует о деградации экстрацеллюлярного матрикса, которая возрастает в динамике опухолевой прогрессии. Изучение межклеточной адгезии в GCNIS с помощью маркеров E-cadherin и  $\beta$ -catenin показало ее частичную потерю. Также установлено преобладание пролиферации над апоптозом в клетках GCNIS. Процессы новообразования сосудов в GCNIS являются интенсивными и происходят преимущественно путем васкулогенеза.

**Ключевые слова:** неоплазия герминогенных клеток *in situ*, иммуногистохимическое исследование.

S. POTAPOV, D. HALATA, O. PLITEN, N. HORHOL

*Kharkiv National Medical University*

## MORPHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF GERM CELL NEOPLASIA IN SITU IN TESTICULAR GERM CELL TUMOURS

Germ cell neoplasia *in situ* (GCNIS) refers to pre-neoplastic processes in testicular germ cell tumors and plays an important role in the carcinogenesis of these tumors. Immunohistochemical study of the peculiarities of proliferative and apoptotic processes as well as state of extracellular matrix, intercellular adhesion and neoangiogenesis in GCNIS was carried out. It was shown that already at the GCNIS stage the changes in expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-3, MMP-9) are determined what indicates degradation of the extracellular matrix which increases in the dynamics of tumorous progression. Analysis of intercellular adhesion in GCNIS using markers E-cadherin and  $\beta$ -catenin showed its partial loss. The predominance of proliferation over apoptosis in GCNIS cells was also established. Processes of vascular neoformation in GCNIS are intense and occur mainly through vasculogenesis.

**Keywords:** germ cell neoplasia *in situ*, immunohistochemical investigation.

### Контактна інформація:

Потапов Сергій Миколайович

канд. мед. наук, доцент кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету

пр. Науки, 4, м. Харків, 61022, Україна

тел.: +38 (063) 709-51-93, (057) 707-73-33

E-mail: pathomorphologist@gmail.com

ORCID: 0000-0002-5718-3341