

**МІЖКЛІТИННА АДГЕЗІЯ В ГЕРМІНОГЕННИХ ПУХЛИНАХ ЯЄЧКА***С.М. Потапов, О.М. Плітень, Д.І. Галата, О.В. Кривошанка*

Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

**Ключові слова:**

герміногенні пухлини яєчка, міжклітинна адгезія, імуногістохімічне дослідження.

Буковинський медичний вісник. Т.23, № 4 (92). С. 98-107.

**DOI:**

10.24061/2413-0737.XXIV.4.92.2019.96

**E-mail:**

pathomorphologist@gmail.com; pliten@ukr.net; daryagalata@gmail.com; doctorkrivoshapka@ukr.net

Герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ) – одна з головних причин онкологічної смертності у чоловіків молодого віку. Одним із факторів, що визначають прогноз у онкохворих, є визначення молекулярно-біологічних маркерів, які корелюють із поганим прогнозом.

**Мета роботи** – визначення стану міжклітинної адгезії в пухлині жовткового мішка постпубертатного типу (ПЖМПТ), тератомі постпубертатного типу (ТПТ), сперматоцитній пухлині (СП) і тератомі з малигнізацією соматичного типу (ТМСТ) яєчка.

**Матеріал і методи.** Дослідження виконано на матеріалі ГПЯ пацієнтів, що проходили лікування в Харківському обласному клінічному центрі урології і нефрології ім. В.І. Шаповала в 1998-2017 рр. Групи дослідження були сформовані відповідно до рТНМ класифікації ВООЗ. Для оцінки стану міжклітинної адгезії в ГПЯ досліджували відносну площу (S) і інтенсивність (L) експресії E-cadherin і  $\beta$ -catenin.

**Результати.** При зростанні пухлинної прогресії S експресії E-cadherin у ПЖМПТ і ТПТ поступово зменшувалась аж до повної редукації маркера. Дані зміни поєднувались зі збільшенням експресії  $\beta$ -catenin. При позитивній ПГХ реакції з E-cadherin і  $\beta$ -catenin в усіх досліджених гістотипах ГПЯ, замість «типової» мембранної локалізації, були наявними «гетерогенності» в забарвленні, які також розцінювались як втрата міжклітинної адгезії. Показники S та L експресії E-cadherin у СП були вище таких у відповідних групах досліджених ГПЯ, але локалізація маркера також була атиповою. Що стосується маркера  $\beta$ -catenin, то він мав показники S та L експресії на рівні середніх значень у ПЖМПТ, які, при цьому, вищі аналогічних показників у відповідній групі ТПТ. Розташування  $\beta$ -catenin атипове. У ТМСТ обох груп реакція з E-cadherin була або негативною, або маркер мав атипову локалізацію, як і при вивченні  $\beta$ -catenin.

**Висновки.** При зростанні пухлинної прогресії в пухлині жовткового мішка постпубертатного типу і тератомі постпубертатного типу відбувається втрата міжклітинної адгезії, що призводить до дисоціації пухлинних клітин, розвитку судинної інвазії і метастатичної хвороби.

**Ключевые слова:**

герминогенные опухоли яичка, межклеточная адгезия, иммуногистохимическое исследование.

Буковинский медицинский вестник. Т.23, № 4 (92). С. 98-107.

**МЕЖКЛЕТОЧНАЯ АДГЕЗИЯ В ГЕРМИНОГЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЯИЧКА***С.Н. Потапов, О.Н. Плитень, Д.И. Галата, А.В. Кривошанка*

Герминогенные опухоли яичка (ГОЯ) — одна из главных причин онкологической смертности у мужчин молодого возраста. Одним из факторов, определяющих прогноз у онкобольных, является определение молекулярно-биологических маркеров, которые коррелируют с плохим прогнозом.

**Цель работы** — определение состояния межклеточной адгезии в опухоли желточного мешка постпубертатного типа (ОЖМПТ), тератоме постпубертатного типа (ТПТ), сперматоцитной опухоли (СП) и тератоме с малигнизацией соматического типа (ТМСТ) яичка.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на материале ГОЯ пациентов, проходивших лечение в Харьковском областном клиническом центре урологии и нефрологии им. В.И. Шаповала в 1998–2017 гг. Группы исследования были сформированы в соответствии с рТНМ классификации

ей ВОЗ. Для оценки состояния межклеточной адгезии в ГОЯ исследовали относительную площадь (S) и интенсивность (L) экспрессии E-cadherin и  $\beta$ -catenin.

**Результаты.** По мере опухолевой прогрессии S экспрессии E-cadherin в ОЖМПТ и ТПТ постепенно уменьшалась вплоть до полной редукции маркера. Данные изменения сочетались с увеличением экспрессии  $\beta$ -catenin. При положительной ИГХ реакции с E-cadherin и  $\beta$ -catenin во всех исследованных гистотипах ГПЯ, вместо «типичной» мембранной локализации, были налицо «гетерогенности» в окраске, которые также расценивались как потеря межклеточной адгезии. Показатели S и L экспрессии E-cadherin в СП были выше таковых в соответствующих группах исследованных ГПЯ, но локализация маркера также была атипичной. Что касается маркера  $\beta$ -catenin, то он имел показатели S и L экспрессии на уровне средних значений в ПЖМПТ, которые, при этом, были выше аналогичных показателей в соответствующей группе ТПТ. Расположение  $\beta$ -catenin было атипичным. В ТМСТ обеих групп реакция с E-cadherin была или отрицательной, или маркер имел атипичную локализацию, как и при изучении  $\beta$ -catenin.

**Выводы.** По мере опухолевой прогрессии в ПЖМПТ и ТПТ происходит потеря межклеточной адгезии, приводящая к диссоциации опухолевых клеток, развитию сосудистой инвазии и метастатической болезни.

**Keywords:** testicular germ cell tumors, intercellular adhesion, immunohistochemical investigation.

Bukovinian Medical Herald. V.23, № 4 (92). P. 98-107.

## INTERCELLULAR ADHESION IN TESTICULAR GERM CELL TUMORS

S.M. Potapov, O.M. Pliten, D.I. Halata, O.V. Kryvoshapka

Testicular germ cell tumors (TGCT) is one of the main causes of oncological mortality in young men. One of the factors determining the prognosis of cancer patients is the determination of molecular biological markers which correlate with a poor prognosis.

**The purpose of the work.** To determine the state of intercellular adhesion in testicular postpubertal-type yolk sac tumor (YSTPT), postpubertal-type teratoma (TPT), spermatocytic tumor (ST) and teratoma with somatic-type malignancy (TSTM).

**Material and methods.** The study was performed on the material of TGCT of patients who have been examined and treated at the Kharkiv Regional Clinical Center of Urology and Nephrology named after V.I Shapoval for the period covering 1998-2017. Groups of investigation were formed according to the pTNM classification of WHO. For assessment of the state of intercellular adhesion in TGCT the relative area (S) and intensity (L) of E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression were studied.

**Results.** During the tumorous progression S of E-cadherin expression in YSTPT and TPT was gradually decreasing right up to the complete reduction of this marker expression. These changes were combined with increasing of  $\beta$ -catenin expression. In the case of positive immunohistochemical reaction with E-cadherin and  $\beta$ -catenin in all investigated TGCT instead of the «typical» membrane localization there were «heterogeneities» which were also considered as a loss of intercellular adhesion. In ST the S and L of E-cadherin expression were higher than those in the corresponding groups of investigated TGCT but marker localization was also atypical. As for  $\beta$ -catenin, S and L of its expression were at the level of mean values in YSTPT and higher than analogous indexes in the corresponding group of TPT. Localization of  $\beta$ -catenin was atypical. In TSTM of both groups the reaction with E-cadherin was either negative or marker had an atypical localization.

The same situation was observed at investigation of  $\beta$ -catenin.

## Оригінальні дослідження

**Conclusion.** *In YSTPT and TPT at tumorous progression a loss of intercellular adhesion occurs what leads to the dissociation of tumor cells, development of vascular invasion and metastatic disease.*

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Вивчення значення молекулярно-біологічних маркерів для прогнозу, лікування і виживання хворих з основними локалізаціями раку» (номер державної реєстрації 0114U003394).

**Вступ.** В останні чотири десятиліття в усьому світі відзначено зростання захворюваності на герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ). При цьому, даний тип неоплазії є однією з головних причин онкологічної смертності у чоловіків молодого віку [1, 2], що зумовлює високу медичну і соціальну значимість цієї патології.

Серед несеміномних ГПЯ пухлина жовткового мішка постпубертатного типу (ПЖМПТ), тератома постпубертатного типу (ТПТ), сперматоцитна пухлина (СП) і тератома з малігнізацією соматичного типу (ТМСТ) у «чистому» вигляді є досить рідкісними пухлинами, але в той же час ПЖМПТ і ТПТ, як компоненти змішаної ГПЯ, трапляються доволі часто [3].

Головними факторами, що визначають прогноз у онкохворих, є ступінь диференціювання пухлини і стадія пухлинної прогресії. У той же час агресивність тих чи інших пухлин оцінюється не тільки цими характеристиками. Ціла низка молекулярно-біологічних маркерів вважаються показниками високого ризику пухлинної прогресії, які корелюють із поганим прогнозом. У цьому аспекті все більшу увагу привертають молекули міжклітинної адгезії E-cadherin і  $\beta$ -catenin, а також матриксні металопротеїнази (ММП), порушення синтезу яких свідчить про агресивність пухлини з високою ймовірністю метастазування і несприятливий прогноз захворювання [4, 5].

**Мета роботи** — встановити особливості стану міжклітинної адгезії в ПЖМПТ, ТПТ, СП і ТМСТ яєчка.

**Матеріал і методи.** Дослідження виконано на матеріалі дев'яти спостережень ПЖМПТ (у п'яти випадках ПЖМПТ була складовою змішаної ГПЯ), 16 спостережень ТПТ (у 13 випадках ТПТ була складовою змішаної ГПЯ), одна спостереження СП і два спостереження ТМСТ, а також історії хвороби пацієнтів, що проходили обстеження і лікування на базі Харківського обласного клінічного центру урології і нефрології ім. В. І. Шаповала з 1998 по 2017 рр.

Всі досліджені ГПЯ були розподілені за типом гістологічної будови відповідно до класифікації ВООЗ і патологічної pTNM класифікації [3], що є вкрай важливим, тому що точне встановлення діагнозу і стадіювання відповідно до сучасних уявлень є фундаментальними [6].

Для найбільш наочного порівняння імуногістохімічних характеристик (ІГХ) всі спостереження досліджених ГПЯ були розділені за гістотипом і ступенем пухлинної прогресії. Так, керуючись pTNM класифі-

кацією, були сформовані такі групи:

1. Група «0» представлена виключно «чистими» ТПТ, які склались із добре диференційованих, зрілих тканин. Пухлини даної групи відповідали стадії T1N0S0.

2. Група «1», при якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком, без інвазії в кровоносні або лімфатичні судини; пухлина могла вrostати 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 стадіям T1N0S0–2.

3. Група «2», при 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 в 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 в регіонарні лімфатичні вузли могли бути відсутні; сироваткові пухлинні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадіям T2–3N0–3S0–2.

Розподіл ГПЯ відповідно до групи спостереження наведений в таблиці 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 «DAKO» (Данія) і висушували при температурі 37 °С протягом 18 годин. Демаскування виконано методом кип'ятіння зрізів у цитратному буфері (pH 6,0). Для візуалізації первинних антитіл застосована система детекції Ultra Vision Quanto Detection Systems HRP Polymer («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Як хромоген використовували DAB (діамінобензидин). Зрізи дозобарвлювали гематоксиліном Майєра і заключали в канадський бальзам. Для кожного маркера з метою виключення хибнопозитивних або помилкових результатів 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.

Для оцінки стану міжклітинної адгезії в ПЖМПТ, ТПТ, СП і ТМСТ досліджували експресію E-cadherin і  $\beta$ -catenin з використанням моноклональних антитіл Rb a-Hu E-cadherin Monoclonal Antibody, Clone EP700Y («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), Rb a-Hu beta Catenin Monoclonal Antibody, Clone E247 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Для реалізації якісного та об'єктивного аналізу

**Таблиця 1**  
**Розподіл герміногенної пухлини яєчка відповідно до групи спостереження**

	Група «0»	Група «1»	Група «2»	Група «4»	Всього
ПЖМПТ	-	n=4	n=3	n=2	n=9
ТПТ	n=3	n=6	n=7	-	n=16
СП	-	-	n=1	-	n=1
ТМСТ	-	n=1	-	n=1	n=2

цифрових зображень була розроблена методика, яка дозволила з максимальною ефективністю проводити обробку зображень і отримувати більш точні та інформативні кількісні дані і, тим самим, поліпшити якість інтерпретації отриманих результатів (Патент України на винахід № 119922) [7]. Дана методика дозволила отримувати значення відносної площі (S), яку займають імунопозитивні структури (%), а також 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.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакета статистичного аналізу тріал-версії STATISTICA 13.3 EN. Для порівняння центральних тенденцій у групах використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні [8, 9], оскільки обсяг вибірки в групах не перевищував 5 спостережень. Однак описові статистики представлені традиційно як середнє  $\pm$  похибка середнього (M $\pm$ m), оскільки для вибірки з 4–5 спостережень важко визначити медіану і квартилі. Всі статистичні гіпотези, у тому числі про значимість відмінностей центральних тенденцій в групах, перевірялися при довірчій імовірності 95% (p<0,05). Для оцінки зв'язків між показниками використовували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена [8].

**Результати дослідження та їх обговорення.** Кількісні дані експресії ПГХ маркерів, що відображають стан міжклітинної адгезії в ПЖМПТ, представлені

в таблиці 2.

У двох із чотирьох випадків ПЖМПТ групи «1» експресія E-cadherin не виявлена. В інших двох спостереженнях ПГХ реакція з антитілами до даного маркера була позитивною зі слабким рівнем L. Імунопозитивне забарвлення осередкове, нерівномірне, переважно цитоплазматичне, зрідка цитоплазматично-мембранне, а суто мембранна локалізація E-cadherin не виявлялась. У поодиноких пухлинних клітинах визначалось ядерне розташування E-cadherin. Також значною мірою представлені ділянки пухлинної тканини, в яких ПГХ реакція з антитілами до E-cadherin була негативною. Привертало увагу те, що в даному гістотипі ППЯ вже у групі «1» відзначалась виражена втрата міжклітинної адгезії, про що свідчила наявність осередків із повною редукцією експресії E-cadherin, а також описаних гетерогенностей у розташуванні даного маркера.

Вивчення маркера E-cadherin показало, що середня S його експресії в групі «0» невелика, а L — слабка. ПГХ реакція виявила осередкове нерівномірне забарвлення пухлинної тканини. Так, у зрілому хондріодному компоненті ТПТ визначалась переважно мембранна експресія E-cadherin з дуже невеликою кількістю імунопозитивних клітин, в яких розташування даного маркера було мембранно-цитоплазматичним. А в зрілому фіброзному компоненті експресія E-cadherin виявлялась у вкрай невеликій кількості клітин фібробластичного ряду і була цитоплазматичною або ядерно-цитоплазматичною. Мембранна локалізація даного маркера не виявлялась.

У групі «1» середня S експресії E-cadherin була достовірно меншою за таку в групі «0». При цьому, у 50% спостережень ТПТ, які представлені незрілими

**Таблиця 2**  
**Показники стану екстрацелюлярного матриксу та міжклітинної адгезії в пухлині жовткового мішка постпубертатного типу**

Показники	Група «1» (n1=4)	Група «2» (n2=3)	Група «2» і «4» (n2+4=5)	p
E-cadherin, S, %	0,4 $\pm$ 0,25	-	0,27 $\pm$ 0,24	p1(2+4)>0,05
E-cadherin, L, од.	-	-	-	-
$\beta$ -catenin, S, %	6,19 $\pm$ 0,14	7,18 $\pm$ 0,15	7,51 $\pm$ 0,22	p12=0,032 p1(2+4)=0,014
$\beta$ -catenin, L, од.	51,18 $\pm$ 0,49	49,5 $\pm$ 0,45	49,57 $\pm$ 0,27	p12=0,032 p1(2+4)=0,014

## Оригінальні дослідження

**Таблиця 3**  
**Показники стану екстрацелюлярного матриксу та міжклітинної адгезії в тератомі**  
**постпубертатного типу**

Показники	Група «0» (n0=3)	Група «1» (n1=6)	Група «2» (n2=7)	p
E-cadherin, S, %	5,62±0,25	2,33±1,04	-	p01=0,018
E-cadherin, L, од.	51,17±0,09	-	-	-
β-catenin, S, %	5,13±0,16	2,26±0,96	2,1±0,71	p01=0,018 p02=0,015 p12>0,05
β-catenin, L, од.	50,8±0,15	-	-	-

тканинними компонентами, ІГХ реакція з антитілами до E-cadherin була негативною. А в інших 50%, де ТПТ побудована виключно зі зрілих тканин, E-cadherin-імунопозитивні ділянки були наявні, а L була на межі помірного і слабого рівня. Розподіл E-cadherin-імунопозитивних клітин нерівномірний і переважав у хондродітному компоненті. При цьому, даний маркер мав переважно цитоплазматично-мембранну локалізацію. У фіброзній складовій пухлин E-cadherin-позитивні клітини характеризувались цитоплазматичним або ядерно-цитоплазматичним забарвленням, але також виявлялись і ділянки з повною редукцією експресії маркера.

У ТПТ групи «2», незалежно від ступеня зрілості тканинних складових, експресія E-cadherin не виявлена.

При дослідженні β-catenin у групі «0» встановлено, що його середня S експресії невелика, а L — слабка. У зрілому хондродітному компоненті переважала мембранна експресія β-catenin, хоча зрідка визначалась і мембранно-цитоплазматична локалізація даного маркера (рис. 1, В). У сполучно-тканинному компоненті експресія β-catenin виявлялась у невеликій кількості клітин і мала цитоплазматичне або ядерно-цитоплазматичне розташування, а мембранна локалізація даного маркера була відсутня.

У групі «1» середня S експресії β-catenin достовірно менша за таку в групі «0». При цьому, у 50% випадків ТПТ, які містили незрілі тканинні компоненти, ІГХ реакція з антитілами до β-catenin, хоча і була позитивною, але виявлялась лише в поодиноких пухлинних клітинах і характеризувалась атиповою цитоплазматичною або ядерно-цитоплазматичною локалізацією маркера. В інших 50% ТПТ, які складались виключно зі зрілих тканин, експресія β-catenin була наявною, а розташування імунопозитивного забарвлення також було атиповим — цитоплазматичним або ядерно-цитоплазматичним. Мембранна локалізація β-catenin не виявлена.

У групі «2» S експресії β-catenin була достовірно меншою за аналогічний показник групи «0» і не відрізнялась від такої в групі «1». Аналіз експресії β-catenin виявив, що в трьох із семи випадків, до яких відносились ТПТ із незрілими тканинними компонентами,

позитивна ІГХ реакція представлена забарвленням лише поодиноких пухлинних клітин (рис. 1, Г). В інших ТПТ даної групи, які складались зі зрілих тканин, експресія β-catenin була більш значною і могла бути підрахована. Розташування маркера в усіх спостереженнях даної групи цитоплазматичне або ядерно-цитоплазматичне.

В єдиному спостереженні СП ІГХ реакція з антитілами до E-cadherin характеризувалась різномірним розподілом: визначались локуси з редукцією експресії маркера, ділянки з його атиповою цитоплазматичною, а в поодиноких клітинах — ядерно-цитоплазматичною локалізацією. При цьому, виявлялись осередки зі збереженим мембранним розташуванням E-cadherin, а також ділянки з його гіперекспресією (рис. 2, А). S експресії даного маркера становила 4,59±0,22%, а L знаходилась на високому рівні — 39,94±0,44 од. S експресії β-catenin становила 7,84±0,23%, а L забарвлення знаходилась на межі середнього і слабого рівня (50,22±0,24 од.). β-catenin, так само як і E-cadherin, у дослідженій СП виявлявся осередково у вигляді переважно цитоплазматичного забарвлення, хоча траплялись і ділянки зі збереженою мембранною локалізацією (рис. 2, Б).

Як було зазначено, ТМСТ була досліджена лише у двох випадках — по одному з групи «1» і «4». У спостереженні групи «1», де злоякісний компонент представлений фібросаркомою з міксоїдним компонентом, у переважній більшості полів зору, ІГХ реакція з антитілами до E-cadherin була негативною і виявлялась лише у рідкісних полях зору в поодиноких клітинах і мала слабку атипову ядерно-цитоплазматичну локалізацію. У другому випадку ТМСТ, який відносився до групи «4», S експресії E-cadherin була незначною, за рахунок розташування маркера лише в ділянках злоякісного компонента, і становила 1,04±0,15%, а L забарвлення була помірною — 44,96±1,37 од. Імунопозитивне забарвлення характеризувалось різномірним розподілом: визначались локуси з редукцією експресії E-cadherin, невеликі ділянки його мембранної експресії з осередками руйнування, а також атиповою ядерно-цитоплазматичною локалізацією і ділянками гіперекспресії (рис. 2, В). S експресії β-catenin у спостереженні групи «1» становила в середньому 3,44±0,46%, а L була слабкою (51,51±0,45 од.). Забарвлення було

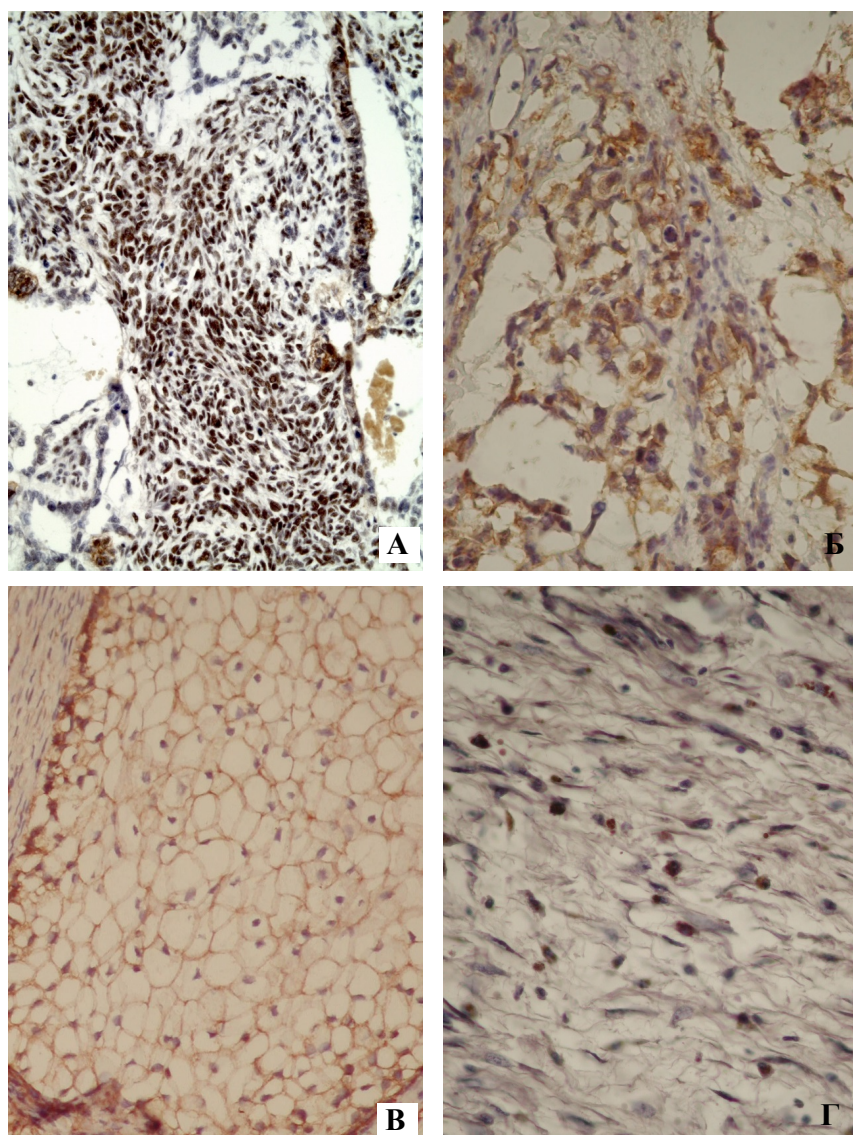


Рис. 1. А. Ядерна гіперекспресія E-cadherin у ПДП групи «4» ( $\times 200$ ). Б. Помірна, переважно цитоплазматична експресія  $\beta$ -catenin у ПДП групи «2» ( $\times 400$ ). В. Слабка мембранна експресія  $\beta$ -catenin у зрілому хондрійному компоненті ТПТ групи «0» ( $\times 400$ ). Г. Помірна ядерно-цитоплазматична експресія  $\beta$ -catenin у незрілому міксоїдному компоненті ТПТ групи «2». ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксином Майєра

рівномірним, переважно цитоплазматичним, а подекуди ядерно-цитоплазматичним. Визначались осередки редукції  $\beta$ -catenin. У випадку групи «4» S імунопозитивного забарвлення становила  $1,51 \pm 0,18\%$ , а L була на межі помірного і слабого значень —  $50,77 \pm 0,61$  од. Локалізація  $\beta$ -catenin — переважно цитоплазматична, а в окремих ділянках — цитоплазматично-мембранна. Також визначались осередки з повною втратою імунопозитивного забарвлення.

Аналіз S експресії E-cadherin у ПДП виявив, що вказаний показник, починаючи з ініціальних стадій пухлинної прогресії (група «1»), у 50% випадків мав малі значення, а в 50% спостережень ІГХ реакція з E-cadherin взагалі була негативною. У більш пізніх стадіях пухлинної прогресії (групи «2» і «4») разом лише в одному випадку S та L експресії E-cadherin могли бути підраховані, але мали низький рівень. В інших чотирьох спостереженнях ІГХ реакція з E-cadherin була або негативною, або виявлялась лише в поодиноких пухлинних клітинах.

Одночасно ІГХ дослідження E-cadherin у ТПТ вста-

новило, що S експресії вказаного маркера при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії поступово зменшувалась, демонструючи достовірні відмінності у вказаному параметрі в кожній із груп дослідження. Привертав увагу той факт, що достовірне зменшення S експресії E-cadherin у групі «1» відносно групи «0» відбувалось за рахунок того, що в ТПТ, які представлені незрілими тканинними компонентами, ІГХ реакція з антитілами до E-cadherin була негативною. В усіх спостереженнях групи «2», незалежно від ступеня зрілості тканинних складових, S експресії E-cadherin дорівнювала нулю за рахунок повної редукції даного маркера. Що стосується L експресії E-cadherin у ТПТ, то статистично вірно вона могла бути підрахована лише в групі «0», що унеможливило порівняльний міжгруповий аналіз даного показника.

Наведені результати про незначні експресії E-cadherin або її повній відсутності узгоджуються з даними інших авторів стосовно ключової ролі пригнічення активності або інактивації маркера E-cadherin у супресії інвазії та метастазуванні [10].

## Оригінальні дослідження

Також існує думка, що агресивний і метастатичний характер новоутворень різноманітних локалізацій зумовлений не тільки відсутністю або редукцією E-cadherin, а ще й поєднанням цих змін зі збільшенням експресії  $\beta$ -catenin [11]. Підвищена експресія  $\beta$ -catenin виявлена в більшості первинних пухлин товстої кишки, при цьому, високий рівень експресії  $\beta$ -катеніну достовірно корелював з внутрішньосудинною інвазією і наявністю метастазів [12]. Це також узгоджується з отриманими нами даними, оскільки S експресії  $\beta$ -catenin у ПЖМПТ при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії збільшувалась, а L експресії  $\beta$ -catenin в ПЖМПТ зі слабого рівня в групі «1» змінювалась на помірний у групах «2» і «4». Але в ТПТ S експресії  $\beta$ -catenin, на відміну від ПЖМПТ, при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії зменшувалась. Це відбувалось за рахунок того, що в ТПТ, які мали незрілі тканинні компоненти в складі, експресія  $\beta$ -catenin виявлялась лише в поодиноких пухлинних клітинах і, відповідно, була близькою до нульових значень. На такі особливості експресії вказаних маркерів вказують ряд досліджень [13]. Виходячи з отриманих даних стосовно особливостей експресії E-cadherin і  $\beta$ -catenin у ТПТ, маємо сміливість припустити, що даний гістотип ГПЯ є менш агресивним.

При позитивній ІГХ реакції, крім кількісної оцінки експресії E-cadherin і  $\beta$ -catenin, дуже важливо враховувати локалізацію і характер забарвлення. Наявність замість «типової» мембранної локалізації тих чи інших «гетерогенностей» у забарвленні (змішані ділянки імунонегативних та імунопозитивних клітин, як із мембранним забарвленням, так і з цитоплазматичним і/або ядерним) трактується як втрата міжклітинної адгезії [14].

Привертало увагу те, що в ПЖМПТ всіх досліджених груп експресія E-cadherin характеризувалась вкрай різноманітним атиповим розташуванням, а «чиста» мембранна локалізація не виявлялась зовсім, навіть у спостереженнях початкових стадій пухлинної прогресії. Також у ПЖМПТ при переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії осередкова мембранна і мембранно-цитоплазматична експресія  $\beta$ -catenin ставала менш значною і мала характер переривчастого і слабого за інтенсивністю забарвлення аж до повної її редукції з появою великих ділянок імунонегативних клітин.

А в ТПТ групи «0» і «1», що склались виключно зі зрілих тканинних елементів, переважала мембранна і мембранно-цитоплазматична локалізація E-cadherin і  $\beta$ -catenin відповідно, але більшою мірою в хондріодному компоненті, у той час як у фіброзному вона була атиповою (цитоплазматичною або ядерно-цитоплазматичною).

Аналіз E-cadherin у СП показав, що хоча S та L експресії даного маркера і була вище середніх значень у відповідних групах досліджених ГПЯ, але локалізація E-cadherin була атиповою і характеризувалась значною гетерогенністю — переважали локуси з редукцією експресії маркера, ділянки з його цитоплазматичною, а в поодиноких клітинах — ядерно-цитоплазматичною

локалізацією. Також виявлені осередки гіперекспресії, але, при цьому, виявлялись ділянки зі збереженим мембранним розташуванням E-cadherin.

Що стосується  $\beta$ -catenin, то даний маркер мав значення S та L експресії на рівні середніх значень у ПЖМПТ та вище аналогічних показників у відповідній групі ТПТ. Розташування  $\beta$ -catenin було атиповим (переважно цитоплазматичним), але траплялись і ділянки зі збереженою мембранною локалізацією.

У ТМСТ групи «1» реакція з E-cadherin була негативною, а з  $\beta$ -catenin, хоча і була позитивною, але мала виключно атипову локалізацію. У ТМСТ групи «4» S експресії E-cadherin була переважно атиповою з наявністю ділянок гіперекспресії, а експресія  $\beta$ -catenin в даному спостереженні також характеризувалась атиповою локалізацією і наявністю осередків з повною редукцією маркера.

Також проаналізовано відмінності характеристик експресії E-cadherin і  $\beta$ -catenin залежно від гістотипу ГПЯ в межах однієї групи дослідження. Так, у групі «1» достовірних відмінностей у S експресії E-cadherin між ПЖМПТ і ТПТ не виявлено, а S експресії  $\beta$ -catenin в ПЖМПТ була достовірно вищою за таку в ТПТ ( $p < 0,01$ ). Порівняння значень L у ПЖМПТ і ТПТ було статистично некоректним.

Оскільки в ПЖМПТ і ТПТ групи «2» ІГХ реакція з E-cadherin була або відсутня, або виявлялась лише в поодиноких пухлинних клітинах, тобто S експресії наближалася до нуля, порівняльний аналіз даного показника між дослідженими гістотипами ГПЯ був неможливий. Аналіз експресії  $\beta$ -catenin в ГПЯ групи «2» показав, що S експресії даного маркера в ПЖМПТ була достовірно вищою за таку в ТПТ ( $p < 0,01$ ). При цьому різниці в L експресії  $\beta$ -catenin у даній парі ГПЯ виявити не було можливим.

Оцінка показників експресії досліджених ІГХ маркерів із використанням непараметричного коефіцієнта кореляції Спірмена встановила, що в ТПТ зі зростанням стадії пухлинної прогресії спостерігалися достовірні високі та дуже високі позитивні зв'язки між S та L експресії E-cadherin і  $\beta$ -catenin ( $r = +0,88$  і  $r = +0,93$  відповідно,  $p < 0,05$ ). У ПЖМПТ подібних кореляційних зв'язків не виявлено.

Таким чином, кореляційний аналіз у поєднанні з наведеними вище даними продемонстрував прогресуючу втрату міжклітинної адгезії, яка посилювалась зі зростанням пухлинної прогресії, що сприяло дисоціації пухлинних клітин і, як наслідок, інвазії і метастазуванню.

Також встановлено, що хворі на ПЖМПТ із судинною інвазією, а також лімфогенними та віддаленими метастазами, порівняно з пацієнтами без зазначених характеристик агресивності пухлини, мали достовірно вищі показники S і L експресії  $\beta$ -catenin (за винятком L  $\beta$ -catenin у пацієнтів з віддаленими метастазами). При цьому різниці в експресії E-cadherin не виявлено.

Що стосується ТПТ, то тут спостерігалась протилежна картина — у хворих із судинною інвазією і

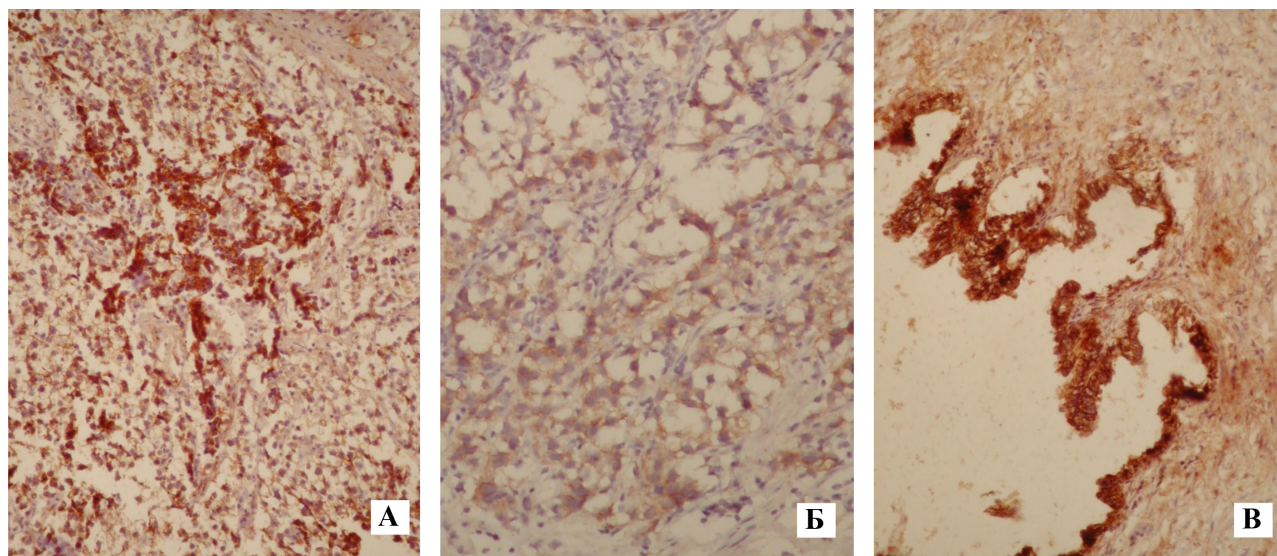


Рис. 2. А. Осередок гіперекспресії E-cadherin у СП групи «2» ( $\times 200$ ). Б. Слабка, переважно цитоплазматична, експресія  $\beta$ -catenin у СП групи «2» ( $\times 200$ ). В. Гіперекспресія і гетерогенність розподілу E-cadherin: мембранна з осередками руйнування, цитоплазматична і ядерна локалізація в ТМСТ (помірнодиференційована аденокарцинома) групи «4» ( $\times 200$ ). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра

Таблиця 4

**Зв'язок показників імуногістохімічних характеристик маркерів з агресивністю пухлини жовткового мішка постпубертатного типу і тератоми постпубертатного типу**

U критерій Манна-Уїтні					
ПЖМПТ					
		E-cadherin, S, %	E-cadherin, L, од.	$\beta$ -catenin, S, %	$\beta$ -catenin, L, од.
Віддалені метастази	«+»	2	2	2	2
	«-»	7	7	7	7
	p	>0,05	>0,05	0,04	>0,05
Лімфогенні метастази	«+»	5	5	5	5
	«-»	4	4	4	4
	p	>0,05	>0,05	0,01	0,01
Судинна інвазія	«+»	5	5	5	5
	«-»	4	4	4	4
	p	>0,05	>0,05	0,01	0,01
ТПТ					
		E-cadherin, S, %	E-cadherin, L, од.	$\beta$ -catenin, S, %	$\beta$ -catenin, L, од.
Лімфогенні метастази	«+»	7	7	7	7
	«-»	9	9	9	9
	p	0,01	0,01	>0,05	>0,05
Судинна інвазія	«+»	7	7	7	7
	«-»	9	9	9	9
	p	0,02	0,02	>0,05	>0,05

лімфогенними метастазами S і L експресії E-cadherin були достовірно меншими, ніж у пацієнтів без них, різниці в експресії  $\beta$ -catenin не було (табл. 4).

Наведене доводить, що розвиток клініко-морфологічних ознак агресивного характеру ПЖМПТ, таких

як судинна інвазія і розвиток метастатичної хвороби, опосередковані збільшенням S і L експресії  $\beta$ -catenin, а в ТПТ — зменшенням зазначених показників, але в експресії E-cadherin.



## Оригінальні дослідження

## Висновки

1. При переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії в пухлині жовткового мішка постпубертатного типу відбувається посилення експресії  $\beta$ -catenin (при вкрай слабкій експресії E-cadherin в усіх групах дослідження), а із прогресуванням тератоми постпубертатного типу відбувається зменшення S і L експресії маркера E-cadherin аж до повної його редукції, що в поєднанні з атипивною локалізацією даних маркерів (цитоплазматична і/або ядерна) відображає втрату міжклітинної адгезії.

2. Посилення експресії  $\beta$ -catenin у пухлині жовткового мішка постпубертатного типу та зменшення експресії E-cadherin у тератомі постпубертатного типу при зростанні стадії пухлинної прогресії призводить до розвитку судинної інвазії, а також метастатичної хвороби.

3. Показники експресії E-cadherin і  $\beta$ -catenin можуть бути незалежними факторами прогнозу метастазування і прогресії в пухлині жовткового мішка постпубертатного типу і тератоми постпубертатного типу.

**Перспективи подальших досліджень** у цьому напрямку. Планується дослідження процесів васкуляризації в ГПЯ.

## Список літератури

1. Немцова МВ, Андреева ЮЮ. Молекулярно-генетические и клинико-морфологические аспекты герминогенных опухолей яичка. *Онкоурология*. 2015;1:12-19.
2. Бурова ЕА, Буланов АА, Трякин АА, Федянин МЮ, Тюляндин СА, Матвеев ВБ. Лечение семиномы яичка I стадии. *Онкоурология*. 2010;3:7-11.
3. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93-105.
4. Зубко МД. Характеристика уровня экспрессии E-кадгерина и  $\beta$ -катенина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени. *Патологія*. 2015;2(34):64-70.
5. Ozgüven BY, Karaçetin D, Kabukçuoğlu F, Taşkin T, Yener Ş. Immunohistochemical study of E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression in colorectal carcinomas. *Pol J Pathol*. 2011;62(1):19-24.
6. Lobo J, Costa AL, Vilela-Salgueiro B, Rodrigues Â, Guimarães R, Cantante M, et al. Testicular germ cell tumors: revisiting a series in light of the new WHO classification and AJCC staging systems, focusing on challenges for pathologists. *Hum Pathol*. 2018 Dec;82:113-24.
7. Потапов СМ, Марковський ВД, Кулішова НЄ, винахідники; Харківський національний медичний університет, патентовласник. Спосіб кількісної оцінки рівня світлості та відносної площі експресії маркерів при імуногістохімічному дослідженні тканин. Патент України № 119922. 2019 Серп 27.
8. Кобзарь АИ. Прикладная математическая статистика. Москва: Физматлит; 2012. 816 с.
9. Runyon RP. Nonparametric Statistics: A Contemporary Approach (Addison-Wesley series in statistics). Addison-Wesley Publishing Co; 1977. 218 p.
10. Bex G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec;1(6):a003129.
11. Машуков АА. Молекулярно-генетические особенности рака желудка: обзор литературы. *Вісник морської медицини*. 2016;4:161-69.
12. Перевошиков АГ, Делекторская ВВ, Головков ДА. Молекулы межклеточной адгезии как факторы инвазии и метастазирования при раке толстой кишки. *Молекулярная медицина*. 2007;1:50-4.
13. Андреева ЮЮ. Морфологические и молекулярно-биологические факторы прогноза рака мочевого пузыря [автореферат]. Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена Росмедтехнологий; 2009. 53 с.
14. Шпонька ІС, Ковтуненко ОВ, Пославська ОВ, Березнюк ДВ, Тимчук СМ. Аналіз маркерів міжклітинної адгезії у хворих на плоскоклітинний рак орофарингеальної ділянки. *Буковинський медичний вісник*. 2012;16(1):104-09.

## References

1. Nemptsova MV, Andreeva YY. Molekulyarno-geneticheskiye i kliniko-morfologicheskiye aspekty germinogenykh opukholey yaichka [Testicular germ cell tumors: Molecular genetic and clinicomorphological aspects]. *Cancer Urology*. 2015;11(1):12-19. (in Russian).
2. Burova EA, Bulanov AA, Tryakin AA, Fedyanin MYu, Tyulyandin CA, Matveyev VB. Lecheniye seminomy yaichka I stadii [Treatment for stage I testicular seminoma]. *Cancer Urology*. 2010;3:7-11. (in Ukrainian).
3. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93-105.
4. Zubko MD. Kharakterystyka urovnia ekspressyy E-kadheryna y  $\beta$ -katenyna v hepatotseliuliarnom y kholanhyotseliuliarnom rake pecheny. [Characteristics of the expression level of E-Cadherin and  $\beta$ -Catenin in hepatocellular and cholangiocellular liver carcinoma]. *Patolohiia*. 2015;2(34):64-70.
5. Ozgüven BY, Karaçetin D, Kabukçuoğlu F, Taşkin T, Yener Ş. Immunohistochemical study of E-cadherin and  $\beta$ -catenin expression in colorectal carcinomas. *Pol J Pathol*. 2011;62(1):19-24.
6. Lobo J, Costa AL, Vilela-Salgueiro B, Rodrigues Â, Guimarães R, Cantante M, et al. Testicular germ cell tumors: revisiting a series in light of the new WHO classification and AJCC staging systems, focusing on challenges for pathologists. *Hum Pathol*. 2018 Dec;82:113-24.
7. Potapov SM, Markovskiy VD, Kullshova NE, vynakhidnyky; Kharkivskiy natsionalnyi medychniy universytet, patentovlasnyk. Sposib kilkisnoi otsinky rivnia svitlosti ta vidnosnoi ploskhi ekspresii markeriv pry imunohistokhimichnomu doslidzhenni tkany. Patent Ukrainy №119922. 2019 Serp 27.
8. Kobzar AI. Prikladnaya matematicheskaya statistika. Dlya inzhenerov i nauchnykh rabotnikov [Applied Mathematical Statistics: for engineers and scientists]. Moscow: Fizmatlit, 2012. 816 p. (in Russian).
9. Runyon RP. Nonparametric Statistics: A Contemporary Approach (Addison-Wesley series in statistics). Addison-Wesley Publishing Co; 1977. 218 p.
10. Bex G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Dec;1(6):a003129.
11. Mashukov AA. Molekulyarno-geneticheskiye osobennosti raka zheludka: obzor literatury [A new view on molecular genetic features of stomach cancer: literature review]. *Vestnik morskoy meditsiny*. 2016;4:161-69. (in Russian).
12. Perevoshchikov AG, Delektorskaya VV, Golovkov DA. Molekuly mezh kletchnoy adgezii kak faktory invazii i metastazirovaniya pri rake tolstoy kishki [Molecules of intercellular adhesion as factors of invasion and metastasis in colon cancer]. *Molecular medicine*. 2007;1:50-54. (in Russian).
13. Andreyeva YuYu. Morfologicheskiye i molekulyarno-biologicheskiye faktory prognoza raka mochevogo puzryra [dissertatsiya]. Moskva: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy onkologicheskiy

- institut im. P.A. Gertsena Rosmedtekhologii; 2009. 64 s. (in Russian).
14. Shponka IS, Kovtunenکو AV, Poslavskaya AV, Bereznyuk DV, Timchuk SN. Analiz markerov mezhkletchnoy adgezii

u bolnykh ploskokletchnym rakom orofaringealnoy oblasti [Analysis of markers of intercellular adhesion in patients with planocellular cancer of the oropharyngeal area]. Bukovinian Medical Herald. 2012;16(1):104-09. (in Ukrainian).

#### **Відомості про авторів**

Потапов С. М. — к.мед. н., доцент кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, м. Харків, Україна.

Плітень О. М. — к.мед. н., доцент кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, м. Харків, Україна.

Галата Д. І. — к.мед. н., доцент кафедри патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, м. Харків, Україна.

Кривошапка О. В. — к.мед. н., доцент кафедри фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету, м. Харків, Україна.

#### **Сведения об авторах**

Потапов С. Н. — к.мед. н., доцент кафедры патологической анатомии Харьковского национального медицинского университета, г. Харьков, Украина.

Плитень О. Н. — к.мед. н., доцент кафедры патологической анатомии Харьковского национального медицинского университета, г. Харьков, Украина.

Галата Д. И. — к.мед. н., доцент кафедры патологической анатомии Харьковского национального медицинского университета, г. Харьков, Украина.

Кривошапка А. В. — к.мед. н., доцент кафедры фармакологии и медицинской рецептуры Харьковского национального медицинского университета, г. Харьков, Украина.

#### **Information about the authors**

Potapov S. M. — MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

Pliten O. M. — MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

Halata D. I. — MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

Kryvoshapka O. V. — MD, PhD, Associate Professor, Department of Pharmacology and Medical Prescription, Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine.

*Надійшла до редакції 22.11.2019*

*Рецензент — проф. Давиденко І.С.*

*© С.М. Потапов, О.М. Плітень, Д.І. Галата, О.В. Кривошапка, 2019*