

Імуногістохімічні особливості експресії протеїну Ubiquitin у тканині яєчка хворих із різними формами чоловічої неплідності

С.В. Базалицька, А.М. Романенко

ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

Вивчені імуногістологічні особливості експресії протеїну Ubiquitin у тканині яєчка 28 хворих у разі тяжких форм чоловічої неплідності – екскреторно-обтураційної та секреторної. Виявлені молекулярні зміни убіквітин-протеасомної системи, характерні для секреторної форми чоловічої неплідності, які свідчать про порушення регуляції клітинного циклу та швидкості транскрипції в інтерстеціальних ендокриноцитах – клітинах Лейдига та про підвищений вміст пошкоджених внутрішньоклітинних білків у клітинах Лейдига та клітинах Сертолі у даних пацієнтів.

Ключові слова: чоловіча неплідність, протеїн Ubiquitin, клітини Лейдига, клітини Сертолі, імуногістохімічні дослідження.

Висока діагностична цінність молекулярних біомаркерів та успіхи таргентної терапії в лікуванні найскладніших захворювань зумовлюють актуальність дослідження молекулярних механізмів патогенезу важких форм чоловічої неплідності. Останнім часом стало відомо, що порушення внутрішньоклітинного убіквітин-протеасомного протеолізу відіграють важливу роль у патології багатьох захворювань людини, зокрема, при спадкових хворобах, дистрофічно-дегенеративних захворюваннях, канцерогенезі [1]. Результати нещодавно проведених досліджень свідчать, що інактивація ubiquitin protein ligase, локалізованої в чоловічих статевих клітинах, призводить до блокування сперматогенезу [2–4]. У зв'язку з цим, можна передбачити, що порушення убіквітин-протеасомного протеолізу може відігравати важливу роль у патогенезі чоловічої неплідності різної етіології.

Мета дослідження – вивчити імуногістохімічні особливості експресії протеїну Ubiquitin у тканині яєчка хворих із важкими формами чоловічої неплідності – екскреторно-обтураційною та секреторною.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджено матеріал 28 хворих із азооспермією, отриманий під час інцизійної біопсії, з наступним гістологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату. Для встановлення клінічного діагнозу форми неплідності використовували загальноприйнятну класифікацію [5]. Під час визначення заключного діагнозу враховували дані морфологічного дослідження біоптату яєчка та результати гормональних досліджень. Згідно з встановленим діагнозом пацієнтів було розподілено на дві групи:

1-ша група – 11 хворих, у яких було встановлено діагноз екскреторно-обтураційної неплідності. Середній вік хворих складав 33,6 року.

2-га група – 17 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності. Серед них: 12 хворих із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид; 5 пацієнтів із синдромом «лише клітини Сертолі». Середній вік хворих становив 29,5 року.

Для гістологічного дослідження біоптату тканини яєчка фіксували в рідині Буена і заливали в парафін. Із парафіно-

вих блоків виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм, які фарбували гематоксилін-еозином.

Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз здійснювався з використанням стандартного авідин-біотинового методу. Для ІГХ-дослідження біоптати фіксували у 12% формаліні, заливали в парафін і виготовляли зрізи. Після депарафінізації в ксилолі і дегідратації в батареї спиртів зрізи для блокади активності ендогенної пероксидази вміщували на 5 хв у 0,3% розчин перекису водню, розведеному на фосфатному буфері (рН 7,4). Після промивання дистильованою водою зрізи інкубували у мікрохвильовій печі за температури 98 °С в 0,1М цитратному буфері (рН 6,0) протягом 30 хв, потім негайно охолоджували. Далі зрізи преінкубували протягом 15 хв у 1% розчині конячого сироваткового альбуміну, розведеному на фосфатному буфері, після чого інкубували з первинними антитілами Ubiquitin в розведенні 1:800 протягом 18 год за температури 4 °С. Із вторинними мишачими моноклональними антитілами зрізи інкубували у вологій камері 30 хв за кімнатної температури. Авідин-біотиновий комплекс (АВС) (DAKO, Glostrup, Данія) готували за 30 хв до використання. Після того зрізи інкубували в АВС 30 хв за кімнатної температури. Кожний етап закінчувався триразовим промиванням по 5 хв у фосфатному буфері. У кінці зрізи проявляли 1–2 хв у 0,05% розчині діамінбензидину (DAB) (Sigma Chemicals, США), дофарбовували гематоксиліном та вміщували в канадський бальзам.

Як позитивний контроль використовували зрізи тканин із відомим заздалегідь високим вмістом Ubiquitin. Ті самі зрізи служили негативним контролем, але без оброблення первинними антитілами.

У кожному випадку для імуногістохімії аналізували 12–16 зрізів. Поширеність та інтенсивність ІГХ-реакції оцінювали за напівкількісним методом в балах [6]. Поширеність реакції або кількість забарвлених ядер чи цитоплазми клітин оцінювали від 0 до 3 балів за такими критеріями: 0 – відсутність клітин із видимим забарвленням, 1 – забарвлено менше 10% клітин, 2 – забарвлено більше 10%, але менше 50% клітин, 3 – рівномірно забарвлено більше 50% клітин клітинного шару. Інтенсивність забарвлення ядер або цитоплазми оцінювали за такими критеріями: 0 – відсутність видимого забарвлення, 1 – слабо забарвлені ядра або цитоплазма, 2 – помірно забарвлені ядра або цитоплазма, 3 – інтенсивно забарвлені ядра або цитоплазма. Загальний результат ІГХ-реакції визначали за показниками імуногістохімічного коефіцієнта (ІГХК) від 0 до 9 балів, який одержували перемноженням оцінок поширеності та інтенсивності забарвлення. Проводили статистичний аналіз отриманих результатів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час дослідження імуногістохімічної експресії протеїну Ubiquitin у групі хворих на екскреторно-обтураційну неплідність зі збереженим сперматогенезом у клітинах Сер-

толі спостерігалось слабке ядерне забарвлення (ІГХК:1-3) в 4 спостереженнях (45%), в шести випадках (55%) спостерігалось помірне ядерне забарвлення (ІГХК:4-6). Середнє значення ІГХК дорівнювало 5,1±0,45.

Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin у клітинах Сертолі була слабкою (ІГХК: 1-3) в усіх випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало 2,7±0,09.

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії, сперматоцити 1-го і 2-го порядку, сперматиди виявляли слабку ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну Ubiquitin в усіх спостереженнях (100%) даної групи, ІГХК при цьому становив 2–3 бали. Середнє значення ІГХК дорівнювало 2,3±0,09 та 2,2±0,09 відповідно. Необхідно зазначити, що зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю ІГХ-експресії протеїну Ubiquitin (ІГХК: 0) в усіх випадках (100%).

У клітинах Лейдіга помірну ядерну експресію в 6 балів спостерігали у 3 випадках (27%); у 6 спостереженнях (54,5%) виявляли слабке ядерне забарвлення (ІГХК: 1-3) та в 2 спостереженнях (18%) ядерна експресія протеїну Ubiquitin була відсутня (ІГХК: 0). Середнє значення ІГХК дорівнювало 4,3±0,54. Слабку цитоплазматичну експресію убіквітину (ІГХК: 2-3) визначали в 9 випадках (81%) даної групи (мал. 1) та її відсутність – в 2 випадках (19%) (ІГХК: 0). Середнє значення ІГХК дорівнювало 2,7±0,27 (таблиця).

У групі хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид (всього 12 пацієнтів) в клітинах Сертолі спостерігали помірне ядерне забарвлення (ІГХК:4-6) в усіх 12 спостереженнях (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало 5,8±0,17. Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі була слабкою (ІГХК:2-3) в 4 випадках (33,3%) та помірою (ІГХК:4-6) – у 8 випадках (66,7%). Середнє значення ІГХК дорівнювало 4,8±0,17.

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії, сперматоцити 1-го і 2-го порядку, сперматиди виявляли слабку ядерну та цитоплазматичну експресію протеїну Ubiquitin в усіх спостереженнях (100%) даної групи, ІГХК при цьому становив 1–3 бали. Середнє значення ІГХК в ядрі та цитоплазмі дорівнювало відповідно в сперматогоніях – 2,1±0,17 та 2,2±0,17; в сперматоцитах – 2,1±0,17 та 1,9±0,17; в сперматидях – 2,6±0,17.

У клітинах Лейдіга ядерна експресія протеїну Ubiquitin була відсутня (ІГХК: 0) в 9 спостереженнях (75%) та в 3 випадках (25%) була слабкою (ІГХК: 1-3). Середнє значення ІГХК дорівнювало 0,3±0,16. При цьому, в 6 випадках (50%) спостерігали слабке цитоплазматичне забарвлення (ІГХК: 2–3), в інших 6 спостереженнях (50%) – мало місце помірне цитоплазматичне забарвлення інтерстиційних ендокриноцитів (ІГХК: 4-6) (мал. 2). Середнє значення ІГХК дорівнювало 4,9±0,08 (таблиця).

У групі хворих на секреторну неплідність із синдромом «лише клітини Сертолі» (всього 5 пацієнтів) в клітинах Сертолі спостерігали помірне ядерне забарвлення (ІГХК: 4-6) в усіх спостереженнях (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало 5,9±0,4.

Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в суспензіях була помірою (ІГХК:6) в 3 випадках (60%) та вираженою в 2 спостереженнях (40%). Середнє значення ІГХК становило 7,4±0,6.

У клітинах Лейдіга ядерна експресія убіквітину була відсутня (ІГХК: 0) в 4 спостереженнях (80%), в 1 випадку (20%) визначали слабке ядерне забарвлення (ІГХК: 1). Середнє значення ІГХК дорівнювало 0,3±0,2. При цьому, в 4 випадках (80%) спостерігали помірне цитоплазматичне забар-

влення (ІГХК: 4-6) та в одному випадку (20%) визначали слабку цитоплазматичну експресію (ІГХК: 3) (мал. 3). Середнє значення ІГХК дорівнювало 5,6±0,6 (таблиця).

Таким чином, ІГХ-дослідження протеїну Ubiquitin виявило достовірне підвищення його цитоплазматичної експресії в клітинах Сертолі при секреторній неплідності та синдромі «лише клітини Сертолі» порівняно з екскреторно-обтураційною неплідністю; а також посилення цитоплазматичної експресії з одночасним зменшенням його ядерної експресії в інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдіга при секреторній формі чоловічої неплідності порівняно із екскреторно-обтураційною неплідністю.

Як відомо, обмін білків в клітині, як і інших речовин, в нормі позбавиться в динамічній рівновазі між процесами синтезу та розпаду – протеолізу. Процес деградації позаклітинних білків відбувається в лізосомах. Процес деградації внутрішньоклітинних білків відбувається іншим шляхом [1, 7, 8]. За відкриття механізму внутрішньоклітинного розщеплення білків, який дістав назву убіквітин-опосередкованого, у 2004 році ізраїльським ученим Аарону Чехановеру та Авраму Гершко було присуджено Нобелівську премію в галузі хімії.

Внутрішньоклітинні білки виконують певні закріплені за ними функції, а потім у визначений момент клітина має від них позбавитися. Це зумовлене тим, що, по-перше, подальша активність білка може пошкодити клітину; по-друге, необхідно синтезувати нові білки, а перевантаження цитоплазми поліпептидами призводить до апоптозу. Коли необхідність в певному білку відпадає, в клітині починає діяти механізм, який забезпечує зупинку функціонування та деградацію саме цього білка, в якому виділяють дві основні фази: 1) ковалентне приєднання поліубіквітинового ланцюга до білка, який підлягає деградації; 2) власне деградація білка в протеасомі. Поліубіквітиновий ланцюг, що приєднується, і є сигналом, який свідчить, що цей білок підлягає деградації, яка відбувається у великому білковому комплексі – протеасомі.

Утворення убіквітинового ланцюжка та приєднання його до білкового субстрату обслуговується спеціальною системою ферментів. Ця система включає три типи ферментів: E1-

Показники ІГХК експресії протеїну Ubiquitin в біоптатах яєчка у хворих із різними формами чоловічої неплідності

Показник	Екскреторно-обтураційна форма	Секреторна форма	Синдром «лише клітини Сертолі»
Сперматозоїди:			
ядро	0	-	-
цитоплазма	0	-	-
Сперматиди:			
ядро	2,3±0,09	2,6±0,17	-
цитоплазма	2,2±0,09	2,6±0,17	-
Сперматоцити:			
ядро	2,3±0,09	2,1±0,17	-
цитоплазма	2,2±0,09	1,9±0,17	-
Сперматогонії:			
ядро	2,2±0,09	2,1±0,17	-
цитоплазма	2,2±0,09	2,2±0,17	-
Клітини Сертолі:			
ядро	5,1±0,45	5,8±0,17	5,9±0,4
цитоплазма	2,7±0,09*,**	4,8±0,17*	7,4±0,6*,**
Клітини Лейдіга:			
ядро	4,3±0,54*,**	0,3±0,16*	0,3±0,2**
цитоплазма	2,7±0,27*,**	4,9±0,08*	5,6±0,6**

Примітки: *, ** – достовірно між групами; p<0,001.

фермент (активатор), E2-ферменти (кон'югатори або переносники), E3-ферменти (лігази) та є високоспецифічною і вибірковою за рахунок того, що побудована за принципом ієрархічного ускладнення [1,7]. Протеасома ж упізнає не субстрат, а саме полубіквітиновий ланцюжок, причому, зв'язки між убіквітином в ній мають бути лише за 48-м лізином (в молекулі убіквітину є також 11-й, 29-й та 63-й лізини). Це «впізнання» відбувається за типом утворення імунного зв'язку. Усі етапи процесу убіквітинізації білка АТФ-залежні. Кінцевою метою цього біологічного процесу є селективна модифікація білків-мішеней для наступного протеолізу.

Виявляється, що ланцюжок убіквітину «пришивається» до того білка, чия доля вже визначена, оскільки він несе в собі ознаки смерті – специфічні сигнали, які вмикають процес деградації. Саме ці сигнали впізнають специфічними убіквітин-лігазами, з якими субстратні білки зв'язуються перед убіквітинізацією. Тому ці білки є ключовими факторами в убіквітиновому протеолітичному каскаді: вони впізнають білок для зв'язування, що буде підлягати подальшій деградації [9].

Серед білків, які підлягають убіквітинзалежному протеолізу, можна перерахувати такі найважливіші субстрати: а) регулятори клітинного циклу; б) компоненти різних сигнальних шляхів; в) мутовані білки; г) білки, пошкоджені посттрансляційно. Отже, система внутрішньоклітинного протеолізу задіяна в таких важливих процесах, як розвиток та диференціація клітин, проліферація клітин, реакції клітин на стрес та пошкодження, а також у процесі неоплазії.

Поряд з описаною основною протеолітичною функцією, протеасоми мають і додаткові: процесинг і рефолдинг білків [9]. Суть процесингу полягає в тому, що шляхом часткового гідролізу змінюється структура білка, відкриваються його активні центри. Процес рефолдингу в протеасомі вивчали *in vitro*. З'ясувалось, що при рефолдингу протеасома може зв'язувати пошкоджені «розкручені» білки і заново їх «зкручувати».

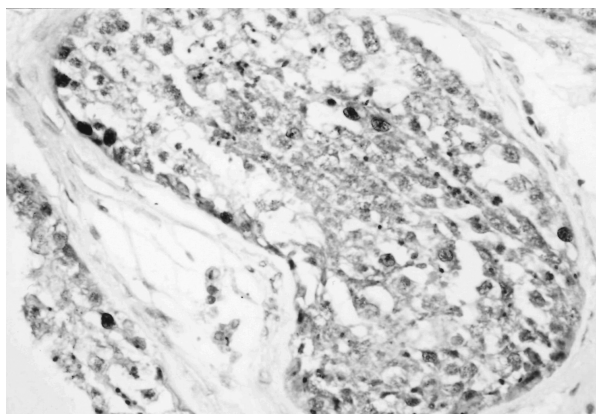
Ураховуючи життєво важливі функції, які виконує убіквітин-протеасомна система в клітині, стає очевидним, що структурні та функціональні пошкодження компонентів цієї системи є основою розвитку багатьох захворювань.

У проведеному нами дослідженні при секреторній формі чоловічої неплідності в клітинах Сертолі та інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдіга яєчка виявлені молекулярні зміни убіквітин-протеасомної системи, пов'язані з посиленням активності протеасом – цитоплазматичних органел, що відповідають за внутрішньоклітинний протеоліз, процесинг і рефолдинг внутрішньоклітинних білків. Зазначені особливості убіквітин-протеасомної системи є характерними для секреторної форми чоловічої неплідності та свідчать про порушення регуляції клітинного циклу і швидкості транскрипції та підвищений уміст пошкоджених білків в клітинах яєчка при цій формі чоловічої неплідності.

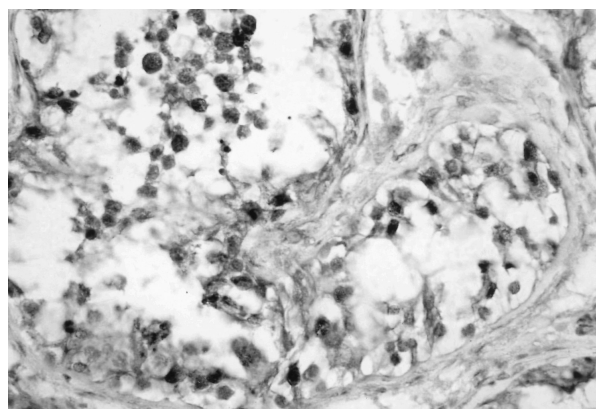
ВИСНОВКИ

1. Дослідження протеїну Ubiquitin виявило статистично достовірне підвищення його цитоплазматичної експресії в клітинах Сертолі, а також посилення цитоплазматичної експресії з одночасним зменшенням його ядерної експресії в клітинах Лейдіга при секреторній формі чоловічої неплідності порівняно з екскреторно-обтураційною неплідністю.

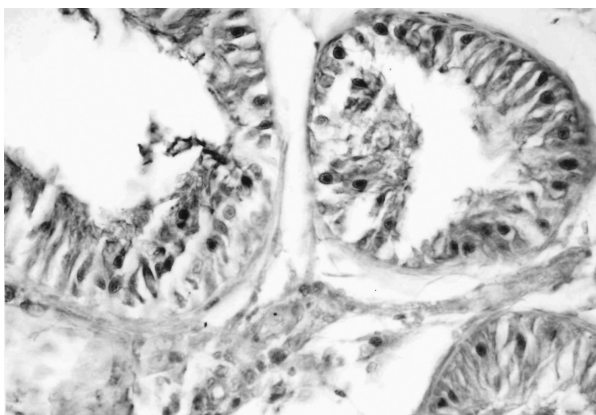
2. Виявлені молекулярні зміни убіквітин-протеасомної системи, що характерні для секреторної форми чоловічої неплідності. Ці зміни пов'язані із: а) підвищенням активності протеасом – органел, що відповідають за внутрішньоклітинний протеоліз, процесинг і рефолдинг внутрішньоклітинних



Мал. 1. Екскреторно-обтураційна неплідність. Слабка ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin у клітинах сперматогенного шару. Помірна ядерна та слабка цитоплазматична експресія убіквітину в клітинах Сертолі та клітинах Лейдіга. Імунопереоксидазний АВС-метод. × 200



Мал. 2. Секреторна неплідність. Помірна ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі. Імунопереоксидазний АВС-метод. × 200



Мал. 3. Секреторна неплідність – в просвітах каналців лише клітини Сертолі. Помірна ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin у клітинах Сертолі. Відсутність ядерної експресії та помірна цитоплазматична експресія убіквітину в клітинах Лейдіга. Імунопереоксидазний АВС-метод. × 200

білків в клітинах Лейдіга та клітинах Сертолі; б) зменшенням ядерної експресії протеїну Ubiquitin в клітинах Лейдіга, що впливає на регуляцію клітинного циклу, швидкості транскрипції та апоптоз.

3. Молекулярні особливості убіквітин-протеасомної системи у хворих на секреторну форму чоловічої неплідності свідчать про порушення регуляції клітинного циклу та швидкості транскрипції в інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдіга та про підвищений вміст пошкоджених внутрішньоклітинних білків у клітинах Лейдіга та клітинах Сертолі у зазначених пацієнтів.

Иммуногистохимические особенности экспрессии протеина Ubiquitin в ткани яичка больных с различными формами мужского бесплодия
С.В. Базалицкая, А.М. Романенко

Исучены иммуногистохимические особенности экспрессии протеина Ubiquitin в ткани яичка 28 больных при тяжелых формах мужского бесплодия – экскреторно-обтурационном и секреторном.

Выявлены молекулярные изменения убиквитин-протеасомной системы, характерные для секреторной формы мужского бесплодия, которые свидетельствуют о нарушении регуляции клеточного цикла и скорости транскрипции в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига и о повышенном содержании поврежденных внутриклеточных белков в клетках Лейдига и клетках Сертоли у данных пациентов. *Ключевые слова: мужское бесплодие, протеин Ubiquitin, клетки Лейдига, клетки Сертоли, иммуногистохимические исследования.*

Immunohistochemical features of expression of protein Ubiquitin in testicular tissue of patients with various forms of male infertility
S.V. Bazalitska, A.M. Romanenko

Immunohistochemical features of expression of protein Ubiquitin in testicular tissue of 28 patients with serious forms of male infertility – excretory-obstructive and secretory are studied.

The molecular changes of Ubiquitin-proteasome system characteristic for the secretory form of male infertility are revealed, which testify to the disturbance of regulation of cellular cycle and the rate of transcription in interstitial endocrinocytes – Leydig cells, and about the raised maintenance of the damaged intracellular proteins in Leydig cells and Sertoli cells in such patients.

Key words: male infertility, protein Ubiquitin, Leydig cells, Sertoli cells, immunohistochemistry.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ciechanover A. The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – Vol. 31. – N 2. – P. 474–485.
2. Ng J.M., Vrieling H., Sugawara K., Ooms M.P., Grootegeed J.A., Vreeburg J.T., Visser P., Beems R.B., Gorgels T.G., Hanaoka F., Hoeijmakers J.H., van der Horst G.T. Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – Vol. 22. – N 4. – P. 1233–1245.
3. Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone // *Microsc. Res. Tech.* – 2003. – Vol. 61. – N 1. – P. 88–102.
4. Bedard N., Hingamp P., Pang Z., Karaplis A., Morales C., Trasler J., Cyr D., Gagnon C., Wing S.S. Mice lacking the UBC4-testis gene have a delay in postnatal testis development but normal spermatogenesis and fertility // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25. – N 15. – P. 6346–6354.
5. Юнда И.Ф., Иванюта Л.И., Имшинецкая Л.П. Бесплодие в супружестве. – К.: Здоровья. – 1990. – 464 с.
6. 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. – Vol. 22. – P. 265–270.
7. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life// *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – N 24. – P. 7151–7160.
8. Glickman M.H., Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* – N 82. – 2002. – P. 373–428.
9. Turner G., Du F., Varshavsky A. Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature.* – V. 405. – 2000. – P. 579–582.