

С.М. Потапов  
Д.І. Галата  
О.М. Плітень  
Р.В. Сидоренко  
О.М. Коляда

Харківський національний медичний університет

Надійшла: 29.10.2019

Прийнята: 03.12.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.4.34-42>

УДК: 616.681-006.884-092.18-078:57.083.3

## ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ МЕТАЛОПРОТЕІНАЗ В ГЕРМІНОГЕННИХ ПУХЛИНАХ ЯЄЧКА

Potapov S.M.  , Halata D.I. , Pliten O.M. , Sidorenko R.V. , Kolyada O.N.  Peculiarities of expression of metalloproteinases in testicular germ cell tumors.

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine



**ABSTRACT. Background.** Increasing of the testicular germ cell tumors (TGCT) incidence in combination with the young age of the patients attaches to this problem high medical and social importance. **Objective.** The aim of investigation was to establish peculiarities of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 expression in testicular postpubertal-type yolk sac tumor (YSTPT), postpubertal-type teratoma (TPT), spermatocytic tumor (ST) and teratoma with somatic-type malignancy (TSTM). **Methods.** YSTPT, TPT, ST and TSTM as well as medical histories of patients were studied. All TGCT were divided into groups according to the pTNM classification of WHO. Using antibodies to MMP-1, MMP-3, MMP-9 and TIMP-1 the state of extracellular matrix was investigated. Statistical data processing was performed using the statistical package "STATISTICA 13.3 EN trial version". **Results.** It is proved that MMP are involved in carcinogenesis starting with the early stages of tumor progression. A more expressive expression of MMP in YSTPT indicates its inclination for an aggressive course. It was identified that in patients with YSTPT and TPT who had vascular invasion, lymphogenous and distant metastases the relative area (S) and intensity (L) of expression of all investigated MMP (with the exception of S of MMP-3) were significantly higher than in patients without these signs of tumor aggressiveness. In ST the S of MMP-1 expression was lower than that in YSTPT and TPT, while the S of MMP-3 expression, on the contrary, was higher than the corresponding index in TPT, and was at the same level with the YSTPT. L of MMP-3 expression was at the border of moderate values. S of MMP-9 expression was greater than that in YSTPT and TPT, and its L was at a high level. In TSTM of group «4» S of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 expression was higher ( $p < 0,001$ ) than in TSTM of group «1». In all investigated TGCT reaction with TIMP-1 was negative. **Conclusion.** In YSTPT and TPT at transition from the initial to the late stages of tumor progression increasing of MMP synthesis, as well as a complete absence of TIMP-1 expression were detected. Increasing of MMP expression leads to the development of vascular invasion, as well as lymphogenous and distant metastases. Parameters of MMP expression may be independent factors in prognosis of metastasis and progression of TGCT.

**Key words:** testicular germ cell tumors, extracellular matrix, immunohistochemical investigation.

### Citation:


Potapov SM, Halata DI, Pliten OM, Sidorenko RV, Kolyada ON. [Peculiarities of expression of metalloproteinases in testicular germ cell tumors]. Morphologia. 2019;13(4):34-42. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.4.34-42>

 Potapov S.M. 0000-0002-5718-3341,  Halata D.I. 0000-0001-8850-8033

 Pliten O.M. 0000-0001-6376-9376,  Sidorenko R.V. 0000-0003-4844-7162

 Kolyada O.N. 0000-0003-2826-0667

 [pathomorphologist@gmail.com](mailto:pathomorphologist@gmail.com)

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

### Вступ

В останні десятиліття тенденція до зростання захворюваності на герміногенні пухлини яєчок (ГПЯ) відзначається в більшості країн світу. До того ж, цей тип новоутворення однією з головних причин онкологічної смертності у чоловіків

молодого віку, що зумовлює високу соціальну і медичну значимість даної патології [1, 2].

Серед ГПЯ пухлина жовткового мішка постпубертатного типу (ПЖМПТ), тератома постпубертатного типу (ТПТ), сперматоцитна пухлина (СП) і тератома з малігнізацією со-

матичного типу (ТМСТ) у вигляді однокомпонентних неоплазій є досить рідкісними новоутвореннями, але в той же час ПЖМПТ і ТПТ, як компоненти змішаної ГПЯ зустрічаються досить часто [3].

Крім питання діагностики пухлин, до першочергових завдань онкоморфології відноситься також оцінка прогнозу захворювання. Серед маркерів агресивності злоякісних пухлин і поганого прогнозу вважають матриксні металопротеїнази (ММР), які здатні руйнувати основні компоненти екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) і тим самим відіграють основну роль в міграції ракових клітин, що, відповідно, сприяє розвитку метастазів [4, 5].

#### Мета

Встановити особливості стану ЕЦМ в ПЖМПТ, ТПТ, СП і ТМСТ яєчка.

#### Матеріали і методи

Дослідження виконано на матеріалі 9 спостережень ПЖМПТ (в тому числі 5 випадків де ПЖМПТ була складовою змішаної ГПЯ), 16 спостережень ТПТ (в тому числі 13 випадків, де ТПТ була складовою змішаної ГПЯ), 1 спостереження СП і 2 спостережень ТМСТ, а також історій 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 у відповідності до сучасних уявлень є фундаментальними [6].

Для найбільш наочного порівняння імуногістохімічних характеристик (ІГХ) характеристик всі спостереження досліджених ГПЯ були розділені за гістотипом і ступенем пухлинної прогресії. Так, керуючись pTNM класифікацією, були сформовані наступні групи:

1. Група «0» була представлена виключно «чистими» ТПТ, які складались із добре диференційованих, зрілих тканин. Пухлини даної групи відповідали стадії T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>S<sub>0</sub>.

2. Група «1», при якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком, без інвазії в кровеносні 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 T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>S<sub>0-2</sub>.

3. Група «2», при якій пухлина була обмежена яєчком і його придатком з інвазією в кровеносні або лімфатичні судини, або пухлина проникла через білкову оболонку з ураженням вагінальної оболонки; при цьому були наявні метастази різного ступеня у регіонарні лімфатичні вузли, проте віддалені метастази були відсутні; сироваткові пух-

линні маркери мали різні значення. Пухлини даної групи відповідали стадіям T<sub>2</sub>N<sub>1-3</sub>S<sub>0-2</sub>.

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 стадіям T<sub>2-3</sub>N<sub>0-3</sub>S<sub>0-2</sub>.

Розподіл ГПЯ у відповідності до групи спостереження наведений в табл. 1.

Таблиця 1  
Розподіл ГПЯ у відповідності 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

Матеріал для ІГХ дослідження фіксували в 10% нейтральному формаліні протягом 24 год, заливали в парафін, готували зрізи товщиною 4×10<sup>-6</sup> 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 (pH 6,0). Для візуалізації первинних антитіл була застосована система детекції Ultra Vision Quanto Detection Systems HRP Polymer («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В якості хромогена використовували DAB (діамінобензидин). Зрізи дозобарвлювали гематоксиліном Майєра і заключили 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.

Для оцінки стану ЕЦМ в ПЖМПТ, ТПТ, СП і ТМСТ досліджували експресію ММР-1, ММР-3 і ММР-9 разом з їх тканинним інгібітором TIMP-1 з використанням моноклональних антитіл Mo a-Hu TIMP1 Monoclonal Antibody, Clone 102D1 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) і поліклональних антитіл Rb a-Hu MMP1 Polyclonal Antibody («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), Rb a-Hu MMP3 Polyclonal Antibody («ThermoFisherScientificInc.», США), Rb a-Hu MMP9 (92kDa Collagenase IV) Polyclonal Antibody («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

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, тим самим, поліпшити якість інтерпретації отриманих результатів (Патент України на винахід № 119922) [7]. Дана методика дозволила отримувати значення відносної площі (S) у %, 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  $\times 200$  ( $3,12 \times 10^{-7} \text{ m}^2$ ) у кожному спостереженні. S та L експресії маркерів вивчалась у 30 випадково обраних полях зору мікроскопа Olympus BX-41TF при збільшенні  $\times 200$  ( $3,12 \times 10^{-7} \text{ m}^2$ ) у кожному спостереженні.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакету статистичного аналізу тріал-

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

#### Результати та їх обговорення

Кількісні дані експресії ІГХ маркерів, що відображають стан ЕЦМ в ПЖМПТ, представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Показники стану ЕЦМ і міжклітинної адгезії в ПЖМПТ

Показники	Група «1» ( $n_1=4$ )	Група «2» ( $n_2=3$ )	Група «2» і «4» ( $n_{2+4}=5$ )	p
MMP-1, S, %	1,95 $\pm$ 0,26	6,5 $\pm$ 0,22	7,07 $\pm$ 0,37	$p_{12}=0,034$ $p_{1(2+4)}=0,014$
MMP-1, L, од.	50,25 $\pm$ 0,28	43,58 $\pm$ 0,18	42,65 $\pm$ 0,58	$p_{12}=0,034$ $p_{1(2+4)}=0,014$
MMP-3, S, %	11,53 $\pm$ 0,33	11,85 $\pm$ 0,25	12,57 $\pm$ 0,5	$p_{12} > 0,05$ $p_{1(2+4)} > 0,05$
MMP-3, L, од.	41,71 $\pm$ 0,35	40,21 $\pm$ 0,15	40,18 $\pm$ 0,09	$p_{12}=0,034$ $p_{1(2+4)}=0,014$
MMP-9, S, %	14,56 $\pm$ 0,64	20,03 $\pm$ 0,22	22,0 $\pm$ 1,23	$p_{12}=0,034$ $p_{1(2+4)}=0,014$
MMP-9, L, од.	49,54 $\pm$ 0,21	38,77 $\pm$ 0,33	38,0 $\pm$ 0,49	$p_{12}=0,034$ $p_{1(2+4)}=0,014$
TIMP-1, S, %	-	-	-	-
TIMP-1, L, од.	-	-	-	-

В групі «1» L експресії MMP-1 знаходилась на межі помірної та слабкої, а S імунопозитивних ділянок була незначною і характеризувалась нерівномірністю розподілу в пухлині (рис. 1 А). Оскільки група «4» була представлена лише двома спостереженнями, для коректного статистичного дослідження було вирішено об'єднати її з групою «2», яка також характеризувалась наявністю судинної інвазії та розвитком метастатичного процесу. Так, S та L експресії MMP-1 в спостереженнях груп «2» і «4» були достовірно більшими за такі в групі «1».

При порівнянні середньої S експресії MMP-3 в групах «1» та «2» і «4» достовірних відмінностей виявлено не було. Цитоплазматична експресія MMP-3 характеризувалась нерівномірністю розподілу в пухлинній тканині. При цьому L імунопозитивного забарвлення в групах «2» і «4» зростала по відношенню до групи «1», хоча в усіх групах знаходилась на помірному рівні.

Середня SMMP-9-імунопозитивних ділянок в

групі «1» була достатньо значною, при цьому, L даного маркера знаходилась на межі помірного та слабкого рівня. Розподіл фермента MMP-9 в ПЖМПТ груп «2» і «4» був рівномірним, а середня S та L імунопозитивного забарвлення були достовірно більшими, ніж аналогічні показники групи «1» (рис. 1 Б). Високий рівень експресії ферменту MMP-9 асоціювався з наявністю судинної інвазії.

ІГХ реакція з TIMP-1 була негативною в усіх досліджених групах.

Числові показники експресії ІГХ маркерів, що відображають стан ЕЦМ в ТПТ представлені в таблиці 3.

В ТПТ групи «0» S експресії MMP-1 була невеликою і мала вкрай слабку L забарвлення. При цьому експресія маркера була різномірною і залежала від виду тканинного компоненту. Так, MMP-1-імунопозитивні клітини були наявні в зрілих фіброзному і епітеліальному компонентах, а в хондродній складовій ТПТ даної групи експресія MMP-1

взагалі не визначалась. В спостереженнях групи «1» S експресії MMP-1 та L експресії даного маркера достовірно не відрізнялись від аналогічних показників попередньої групи. В групі «2» середня S експресії MMP-1, як і показник L, були достовірно більшими за такі в групах «0» і «1». В залежності від того, складалась ТПТ виключно зі зрілих

тканин або містила незрілі складові, S експресії MMP-1 та її L мали відмінності. В кожному окремому випадку ТПТ, яка складалась із добре диференційованих тканин, S та L експресії MMP-1 були меншими за такі в кожній окремій ТПТ, що містила незрілі тканини.

Таблиця 3

Показники стану ЕЦМ і міжклітинної адгезії в ТПТ

Показники	Група «0» (n <sub>0</sub> =3)	Група «1» (n <sub>1</sub> =6)	Група «2» (n <sub>2</sub> =7)	p
MMP-1, S, %	2,12±0,12	2,56±0,14	4,59±0,26	p <sub>01</sub> >0,05 p <sub>02</sub> =0,017 p <sub>12</sub> =0,003
MMP-1, L, од.	59,7±0,43	55,28±1,97	48,12±1,51	p <sub>01</sub> >0,05 p <sub>02</sub> =0,017 p <sub>12</sub> =0,035
MMP-3, S, %	4,17±0,28	4,04±0,1	6,66±0,28	p <sub>01</sub> >0,05 p <sub>02</sub> =0,017 p <sub>12</sub> =0,003
MMP-3, L, од.	59,63±0,56	55,54±1,9	48,2±1,51	p <sub>01</sub> >0,05 p <sub>02</sub> =0,017 p <sub>12</sub> =0,038
MMP-9, S, %	4,16±0,09	4,12±0,15	7,35±0,47	p <sub>01</sub> >0,05 p <sub>02</sub> =0,017 p <sub>12</sub> =0,003
MMP-9, L, од.	59,24±0,34	53,14±3,05	40,85±0,38	p <sub>01</sub> >0,05 p <sub>02</sub> =0,017 p <sub>12</sub> =0,003
TIMP-1, S, %	-	-	-	-
TIMP-1, L, од.	-	-	-	-

Вивчення маркера MMP-3 в групі «0» встановило, що середня S його експресії також була невеликою, а L – слабкою. В групі «1» показники середньої S експресії MMP-3 і його L достовірно не відрізнялись від відповідних значень групи «0». В периваскулярних ділянках пухлини, де мала місце ангіоінвазія, відмічалось посилення L імунопозитивного забарвлення. Що стосується випадків групи «2», то середня S експресії MMP-3, як і його L зростали і були достовірно більшими за такі в групах «0» і «1». При цьому, в кожній окремій ТПТ групи «2» з незрілими тканинними складовими показники середньої S та L експресії MMP-3 були вищими за такі в кожній окремій ТПТ, які складались виключно зі зрілих тканин (рис. 1 В).

Експресія MMP-9 в ТПТ групи «0» була нерівномірною і залежала від тканинних складових пухлини. MMP-9-імунопозитивні клітини були наявні в зрілих фіброзному і епітеліальному компонентах, а в хондрійному – експресія маркера взагалі не визначалась. Середня S, що була зайнята імунопозитивними клітинами, була невеликою, а L відповідала слабкому рівню. В групі «1» середня S та L експресії MMP-9 не відрізнялись від таких в групі «0». В зонах ангіоінвазії та посиленого неангіогенеза L експресії MMP-9 зростала. В групі

«2» відбувалось достовірне збільшення середньої S експресії MMP-9 та її L в порівнянні з групами «0» і «1». Як і при вивченні MMP-1 і MMP-3, зберігалась така ж сама закономірність: в кожному окремому спостереженні ТПТ групи «2» з незрілими ембріональними складовими показники S та L експресії MMP-9 були вищими за такі у кожному окремому випадку ТПТ, які складались виключно зі зрілих тканин (рис. 2 А).

Реакція з TIMP-1 в усіх досліджених групах була негативною.

В єдиному спостереженні СП, яке відносилось до групи «2», S експресії MMP-1 склала 2,73±0,32%, а L забарвлення була слабкою – 51,88±0,64 од. MMP-1-позитивні клітини виявлялись рівномірно по всій пухлинній тканині. Вивчення маркера MMP-3 встановило, що середня S його експресії склала 12,21±0,39%, а L хоча і була слабкою (50,26±0,36 од.), але знаходилась на межі з помірними значеннями даного показника (рис. 2 Б). S експресії MMP-9 була значною і склала 29,19±0,28%, а його L знаходилась на високому рівні (38,35±0,27 од.).

Реакція з TIMP-1 була негативною.



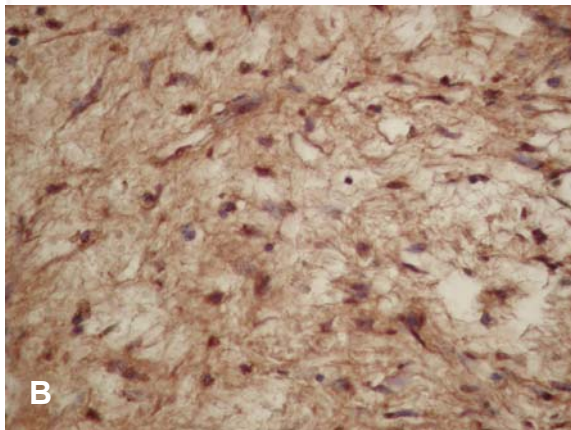
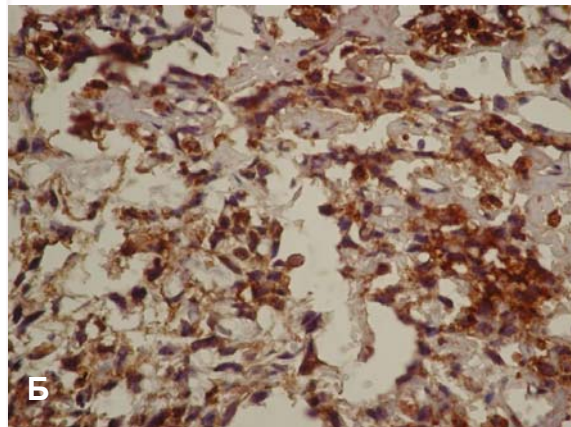
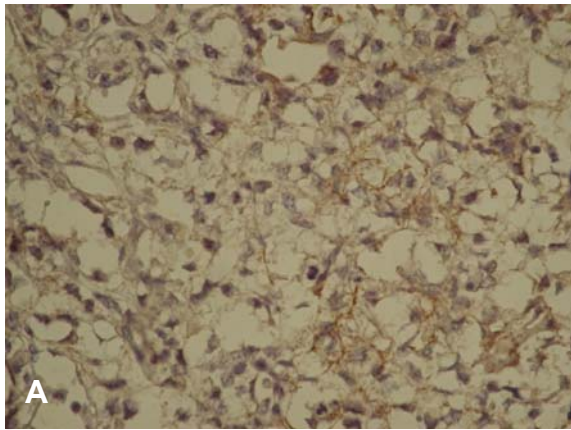


Рис. 1. А. Слабка експресія MMP-1 в ПЖМПТ групи «1». Б. Сильна експресія MMP-9 в ПЖМПТ групи «2». В. Помірна реакція з MMP-3 в ТПТ групи «2» (незрілий міксоїдний компонент). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.  $\times 400$ .

Як було зазначено раніше, ТМСТ була досліджена лише в двох випадках – по одному з групи «1» і «4». У спостереженні групи «1», де злоякісний компонент був представлений фібросаркомою з міксоїдним компонентом, S експресії MMP-1 складала  $3,87 \pm 0,45\%$ , а L забарвлення була низькою –  $53,37 \pm 0,31$  од. У випадку групи «4», де злоякісний компонент був представлений помірно диференційованою аденокарциномою, L експресії мар-

кера також була низькою –  $51,46 \pm 0,24$  од., але S експресії MMP-1 була вище ( $p < 0,001$ ) і складала  $8,32 \pm 0,28\%$ .

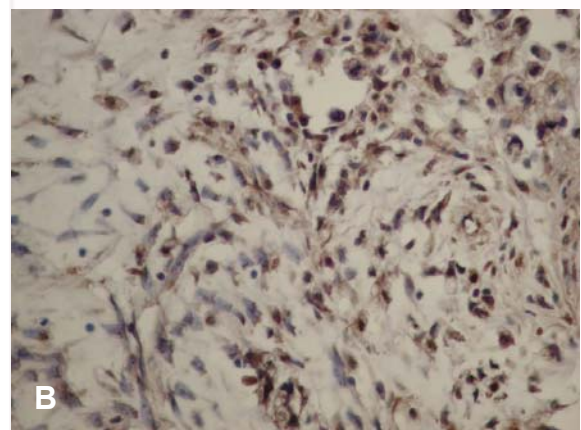
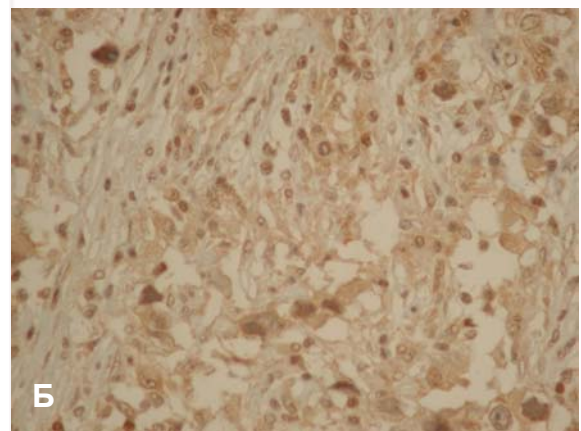
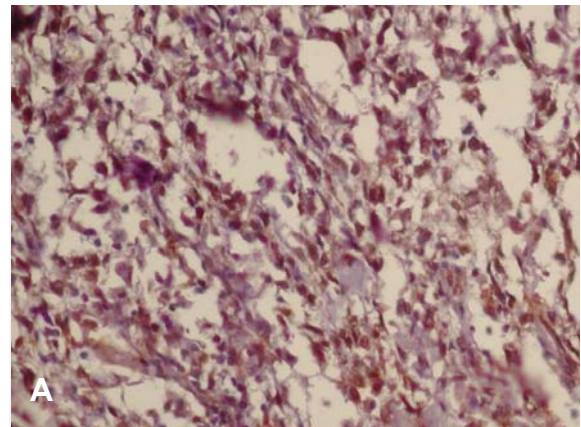


Рис. 2. А. Сильна реакція з MMP-9 в ТПТ групи «2» (незрілий фіброзний компонент) ( $\times 400$ ). Б. Слабка експресія MMP-3 в СП групи «2» ( $\times 400$ ). В. Помірна експресія MMP-9 в ТМСТ (фібросаркома) групи «1» ( $\times 200$ ). ІГХ метод, додаткове забарвлення гематоксилином Майєра.

Аналогічна картина спостерігалась і при аналізі ферментів MMP-3 і MMP-9 – S експресії даних маркерів була вище у спостереженні групи «4» ( $10,16 \pm 0,34\%$  і  $12,88 \pm 0,51\%$  відповідно) в порівнянні з випадком групи «1» ( $5,51 \pm 0,35\%$  і

8,64±0,44% відповідно) ( $p < 0,001$ ). Але, при цьому, якщо значення L ІГХ реакції з ММР-3 у випадках групи «1» і «4» знаходились на низькому рівні (54,21±0,35 од. і 51,95±0,35 од.), то з ММР-9 L збільшувалась до помірного рівня (43,29±0,27 од. і 45,44±0,23 од. відповідно) (рис. 2 В).

Експресія маркера ТІМР-1 виявлена не була.

Аналіз відмінностей кількісних характеристик експресії ММР в залежності від гістотипу ГПЯ в межах однієї групи дослідження (де це було статистично можливо) виявив, що S експресії ММР-1 в ПЖМПТ і ТПТ початкових стадій пухлинної прогресії (група «1») не мала достовірних відмінностей. Але, при цьому, L експресії ММР-1 була достовірно найбільшою в ПЖМПТ ( $p < 0,05$ ). Що стосується ММР-3 і ММР-9, то S та L експресії даних маркерів в ПЖМПТ групи «1» були достовірно вищими за такі в ТПТ відповідної групи ( $p < 0,05$ ).

При розгляді групи «2» було встановлено, що в ПЖМПТ S та L експресії всіх досліджених ММР (за виключенням L експресії ММР-3) були достовірно вищими за такі в ТПТ відповідної групи ( $p < 0,01$ ).

Аналіз ММР в дослідженій СП, показав, що S експресії ММР-1 була нижчою за середньогрупові значення в ПЖМПТ і ТПТ. Що стосується ММР-3, то тут ситуація дещо різнилась – S експресії вказаного маркера була вищою за відповідні середньогрупові значення в ТПТ, а з ПЖМПТ знаходились на одному рівні. А S експресії ММР-9 була більшою за таку в ПЖМПТ і ТПТ.

В спостереженні ТМСТ, яка належала до групи «1», S експресії ММР-1 перевищувала відповідні середньогрупові значення в ПЖМПТ і ТПТ. А S експресії ММР-3 і ММР-9 в даному випадку була меншою за середньогрупове значення в ПЖМПТ і більшою за таке в ТПТ. У випадку ТМСТ групи «4» S експресії ММР-1 була більшою, а ММР-9, навпаки нижчою за відповідні середньогрупові значення в ПЖМПТ. Звертало на себе увагу те, що

в усіх групах кожного дослідженого гістотипу ГПЯ S експресії ММР-9 перевищувала S експресії ММР-3, яка, в свою чергу, була вищою за S експресії ММР-1.

Таким чином, в ПЖМПТ і ТПТ по мірі зростання стадії пухлинної прогресії відбувалось посилення синтезу ММР (за виключенням ММР-3 в ПЖМПТ), що доводить значну роль цих маркерів в пухлинній інвазії, а також в лімфо- і гемато-генному метастазуванні за рахунок руйнування ЕЦМ [10].

Проведене дослідження також доводить, що ММР-1, ММР-3 і, особливо, ММР-9 приймають участь в канцерогенезі починаючи з ранніх стадій пухлинної прогресії. При цьому, більш виразна експресія ММР в ПЖМПТ у зрівнянні з ТПТ говорить про схильність до більш агресивного перебігу даної пухлини, оскільки загальновідомо, що ММР можуть сприяти ініціації, росту, міграції, ангиогенезу, селекції апоптоз-резистентних субпопуляцій, а також інвазії та метастазуванню [11].

Також звертав на себе увагу той факт, що S та L експресії ММР не мали достовірних розбіжностей в ТПТ груп «0» і «1», тобто наявність більш агресивних гістотипів ГПЯ в складі змішаних пухлин не мала впливу на експресію ММР в їх тератомному компоненті.

Негативна реакція з ТІМР-1 в усіх спостереженнях досліджених ГПЯ узгоджується з літературними даними, які свідчать, що підвищення експресії ММР супроводжується зниженням експресії ТІМР [12].

Оцінка показників експресії досліджених ІГХ маркерів з використанням непараметричного коефіцієнта кореляції Спірмена встановила, що в ПЖМПТ і ТПТ по мірі зростання стадії пухлинної прогресії спостерігалися достовірні високі та дуже високі позитивні зв'язки між S та L експресії ММР-1, ММР-3 і ММР-9 ( $p < 0,05$ ) (табл. 4).

Таблиця 4

Взаємозв'язки показників ІГХ маркерів

Коефіцієнт кореляції Спірмена							
S експресии, %							
ПЖМПТ				ТПТ			
ІГХ маркери	ММР-1	ММР-3	ММР-9	ІГХ маркери	ММР-1	ММР-3	ММР-9
ММР-1	1,00	0,82	0,97	ММР-1	1,00	0,84	0,89
ММР-3	0,82	1,00	0,75	ММР-3	0,84	1,00	0,86
ММР-9	0,97	0,75	1,00	ММР-9	0,89	0,86	1,00
L експресии, ед.							
ІГХ маркери	ММР-1	ММР-3	ММР-9	ІГХ маркери	ММР-1	ММР-3	ММР-9
ММР-1	1,00	0,83	0,93	ММР-1	1,00	0,89	0,89
ММР-3	0,83	1,00	0,80	ММР-3	0,89	1,00	0,88
ММР-9	0,93	0,80	1,00	ММР-9	0,89	0,88	1,00

Таким чином, кореляційний аналіз в поєднанні з наведеними вище даними продемонстрував прогресуючу деградацію компонентів ЕЦМ по мірі зростання стадії пухлинної прогресії, що сприяло дисоціації пухлинних клітин і, як наслідок, інвазії і метастазуванню. При цьому, даний аналіз наглядно підтвердив односпрямованість процесу руйнування різних компонентів ЕЦМ.

Також було встановлено, що у хворих на ПЖМПТ, які мали судинну інвазію та лімфогенні метастази, показники S і L експресії всіх досліджених MMP (за винятком S MMP-3) були достовірно

більшими, ніж у пацієнтів без зазначених характеристик. Східна картина спостерігалась і у пацієнтів з віддаленими метастазами – показники S та L експресії MMP-1, MMP-3 і MMP-9 (за виключенням L MMP-3) у них були достовірно вищими за аналогічні у пацієнтів без віддалених метастазів (табл. 5).

Що стосується пацієнтів з ТПТ, котрі мали судинну інвазію та лімфогенні метастази, то і у них показники S і L експресії досліджених MMP були достовірно більшими, ніж у пацієнтів без цих ознак агресивності пухлини (табл. 5).

Таблиця 5

Зв'язок показників ІГХ маркерів з агресивністю ПЖМПТ і ТПТ

U критерій Манна-Уїтні							
ПЖМПТ							
		MMP-1, S, %	MMP-1, L, од.	MMP-3, S, %	MMP-3, L, од.	MMP-9, S, %	MMP-9, L, од.
Віддалені метастази	«+»	2	2	2	2	2	2
	«-»	7	7	7	7	7	7
	p	0,04	0,04	0,04	>0,05	0,04	0,04
Лімфогенні метастази	«+»	5	5	5	5	5	5
	«-»	4	4	4	4	4	4
	p	0,01	0,01	>0,05	0,01	0,01	0,01
Судинна інвазія	«+»	5	5	5	5	5	5
	«-»	4	4	4	4	4	4
	p	0,01	0,01	>0,05	0,01	0,01	0,01
ТПТ							
Лімфогенні метастази	«+»	7	7	7	7	7	7
	«-»	9	9	9	9	9	9
	p	0,001	0,01	0,001	0,01	0,001	0,001
Судинна інвазія	«+»	7	7	7	7	7	7
	«-»	9	9	9	9	9	9
	p	0,001	0,01	0,001	0,01	0,001	0,001

Наведене, без сумніву, доводить, що розвиток клініко-морфологічних ознак агресивного характеру ПЖМПТ і ТПТ, таких як судинна інвазія і розвиток метастатичної хвороби опосередковані збільшенням S та L експресії маркерів стану ЕЦМ (MMP-1, MMP-3 і MMP-9).

#### Висновки

1. При переході від початкових до більш пізніх стадій пухлинної прогресії в ПЖМПТ і ТПТ відбувається посилення синтезу MMP-1, MMP-3 і MMP-9 у поєднанні з повною відсутністю експресії їх тканинного інгібітору TIMP-1.

2. Посилення експресії MMP-1, MMP-3 і MMP-9 призводить до розвитку судинної інвазії, а також лімфогенних і віддалених метастазів.

3. Показники експресії MMP-1, MMP-3 і

MMP-9 можуть бути незалежними факторами прогнозу метастазування і прогресії ПЖМПТ і ТПТ.

#### Перспективи подальших досліджень

Планується дослідження процесів васкуляризації в ГПЯ.

#### Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

#### Джерела фінансування

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).



## Літературні джерела References

1. Nemtsova MV, Andreyeva YuYu. [Testicular germ cell tumors: Molecular genetic and clinicomorphological aspects]. *Cancer Urology*. 2015;11(1):12-9. Russian.
2. Loran OB, Bogdanov AB, Ivkin EV, Sokolov EA, Metelyov AYU. [Radical and testicular-sparing surgery for testicular malignancy]. *Russian Journal of Surgery*. 2014;1:25-30. Russian.
3. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs (4th edition)*. Lyon: IARC; 2016. 356 p.
4. Sneeggen M, Schink KO, Stenmark H. Tumor suppression by control of matrix metalloproteinase recycling. *Mol Cell Oncol*. 2019 Aug 14;6(6):e1646606. doi: 10.1080/23723556.2019.1646606. PubMed PMID: 31692886.
5. Gershteyn ES, Kushlinskiy NE. [Clinical prospects of tumor-associated proteases and their tissue inhibitors investigation in oncologic patients]. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2013;68(5):16-27. Russian.
6. Lobo J, Costa AL, Vilela-Salgueiro B, Rodrigues Â, Guimarães R, Cantante M, Lopes P, Antunes L, Jerónimo C, Henrique R. 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;82:113-24. doi: 10.1016/j.humpath.2018.07.016. PubMed PMID: 30041024.
7. Potapov SM, Markovskiy VD, Kullshova NE, inventors; Kharkiv national medical university. Method of quantitative estimation of lightness and relative area of markers expression at immunohistochemical investigation of tissues. Ukrainian patent UA119922. 2019Aug27. Int.Cl. G01N 21/00 (2006.01) G01N 21/62 (2006.01). Ukrainian.
8. Kobzar AI, author; *Prikladnaya matematicheskaya statistika. Dlya inzhenerov i nauchnykh rabotnikov*. FIZMATLIT, 2012. 816 p. Russian.
9. Runyon RP. *Nonparametric Statistics: A Contemporary Approach* (Addison-Wesley series in statistics). Addison-Wesley Publishing Co; 1977. 218 p.
10. Thakur V, Bedogni B. The membrane tethered matrix metalloproteinase MT1-MMP at the forefront of melanoma cell invasion and metastasis. *Pharmacol Res*. 2016;111:17-22. doi: 10.1016/j.phrs.2016.05.019. PubMed PMID: 27221755.
11. Deryugina EI, Quigley JP. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol*. 2015;44:94-112. doi: 10.1016/j.matbio.2015.04.004. PubMed PMID: 25912949.
12. Mao JH, Guo H, Si N, Qiu L, Guo LF, Sun ZS, Xiang Y, Yang XH, Zhao WG, Zhang WC. Regulating effect of MMP-9 and TIMP-1 in pituitary adenoma invasion. *Genet Mol Res*. 2015 Dec 16;14(4):17091-8. doi: 10.4238/2015.December.16.9. PubMed PMID: 26681056.

### Потапов С.М., Галата Д.І., Плітень О.М., Сидоренко Р.В., Коляда О.М. Особливості експресії металопротеїназ в герміногенних пухлинах яєчка.

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Зростання захворюваності на герміногенні пухлини яєчка (ГПЯ) в поєднанні з молодим віком пацієнтів надає даній проблемі високу медичну і соціальну значимість. **Метою** роботи було встановити особливості експресії MMP-1, MMP-3, MMP-9 і TIMP-1 в пухлині жовткового мішка постпубертатного типу (ПЖМПТ), тератомі постпубертатного типу (ТПТ), сперматоцитній пухлині (СП) і тератомі з малігнізацією соматичного типу (ТМСТ) яєчка. **Методи.** Були досліджені ПЖМПТ і ТПТ, СП і ТМСТ, а також історії хвороби пацієнтів. Всі ГПЯ були розподілені на групи у відповідності до рTNM класифікації ВООЗ. За допомогою антитіл до MMP-1, MMP-3, MMP-9 і TIMP-1 вивчали стан екстрацелюлярного матриксу. Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою пакету статистичного аналізу тріал-версії STATISTICA 13.3 EN. **Результати.** Доведено, що MMP приймають участь в канцерогенезі вже на ранніх стадіях пухлинної прогресії. Більш виразна експресія MMP в ПЖМПТ свідчить про її схильність до агресивного перебігу. Встановлено, що у хворих на ПЖМПТ і ТПТ, які мали судинну інвазію, лімфогенні віддалені метастази, показники відносної площі (S) та інтенсивності (L) експресії всіх досліджених MMP (за винятком показника S MMP-3) були достовірно більшими, ніж у пацієнтів без цих ознак агресивності пухлини. В СП показник S експресії MMP-1 був нижчим за такий в ПЖМПТ і ТПТ, а показник S експресії MMP-3, навпаки, був вищим за відповідний в ТПТ, а з показником ПЖМПТ знаходився на одному рівні. L експресії маркера MMP-3 були на межі помірних значень. S експресії MMP-9 виявилась більшою за таку в ПЖМПТ і ТПТ, а його L знаходилась на високому рівні. В ТМСТ групи «4» S експресії MMP-1, MMP-3 і MMP-9 були вищими ( $p < 0,001$ ), ніж в ТМСТ групи «1». В усіх ГПЯ виявлена негативна реакція з TIMP-1. **Підсумок.** При переході від початкових до пізніх стадій пухлинної прогресії в ПЖМПТ і ТПТ відбувається посилення синтезу MMP у поєднанні з повною відсутністю експресії TIMP-1. Збільшення експресії MMP призводить до розвитку судинної інвазії, а також лімфогенних і відда-



лених метастазів. Показники експресії ММР можуть бути незалежними факторами прогнозу метастазування і прогресії ГПЯ.

**Ключові слова:** герміногенні пухлини яєчка, екстрацелюлярний матрикс, імуногістохімічне дослідження.

**Потапов С.Н., Галата Д.И., Плитень О.Н., Сидоренко Р.В., Коляда О.Н. Особенности экспрессии металлопротеиназ в герминогенных опухолях яичка.**

**РЕФЕРАТ. Актуальность.** Рост заболеваемости герминогенными опухолями яичка (ГОЯ) в сочетании с молодым возрастом пациентов придает данной проблеме высокую медицинскую и социальную значимость. **Целью** работы было установить особенности экспрессии ММР-1, ММР-3, ММР-9 и TIMP-1 в опухоли желточного мешка постпубертатного типа (ОЖМПТ), тератоме постпубертатного типа (ТПТ), сперматоцитной опухоли (СО) и тератоме с малигнизацией соматического типа (ТМСТ) яичка. **Методы.** Были исследованы ОЖМПТ и ТПТ, СО и ТМСТ, а также истории болезни пациентов. Все ГОЯ были разделены на группы в соответствии с рTNM классификацией ВОЗ. С помощью антител к ММР-1, ММР-3, ММР-9 и TIMP-1 изучали состояние экстрацеллюлярного матрикса. Статистическую обработку цифровых данных осуществляли с помощью пакета статистического анализа триал-версии STATISTICA 13.3 EN. **Результаты.** Доказано, что ММР принимают участие в канцерогенезе уже на ранних стадиях опухолевой прогрессии. Более выразительная экспрессия ММР в ОЖМПТ свидетельствует о ее склонности к агрессивному течению. Установлено, что у больных ОЖМПТ и ТПТ, которые имели сосудистую инвазию, лимфогенные и отдаленные метастазы, показатели относительной площади (S) и интенсивности (L) экспрессии всех исследованных ММР (за исключением показателя S ММР-3) были достоверно больше, чем у пациентов без этих признаков агрессивности опухоли. В СО показатель S экспрессии ММР-1 был ниже таковой в ОЖМПТ и ТПТ, а показатель S экспрессии ММР-3, напротив, был выше соответствующего в ТПТ, а с показателем ОЖМПТ находился на одном уровне. L экспрессии маркера ММР-3 была на границе умеренных значений. S экспрессии ММР-9 оказалась больше таковой в ОЖМПТ и ТПТ, а его L находилась на высоком уровне. В ТМСТ группы «4» S экспрессии ММР-1, ММР-3 и ММР-9 были выше ( $p < 0,001$ ), чем в ТМСТ группы «1». Во всех ГОЯ обнаружена негативная реакция с TIMP-1. **Выводы.** При переходе от начальных до поздних стадий опухолевой прогрессии в ОЖМПТ и ТПТ происходит усиление синтеза ММР в сочетании с полным отсутствием экспрессии TIMP-1. Увеличение экспрессии ММР приводит к развитию сосудистой инвазии, а также лимфогенных и отдаленных метастазов. Показатели экспрессии ММР могут быть независимыми факторами прогноза метастазирования и прогрессии ГОЯ.

**Ключевые слова:** герминогенные опухоли яичка, экстрацеллюлярный матрикс, иммуногистохимическое исследование.