

УДК 616.015.348:616.699-078.73-091.7

© С.В. Базалицька, О.Д.Нікітін, Я.Л.Тарнавський, 2012.

## ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСУ УБІКВІТИНАЦІЇ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ ЧОЛОВІЧОЇ НЕПЛІДНОСТІ

**С.В. Базалицька, О.Д.Нікітін, Я.Л.Тарнавський***Державна установа «Інститут урології НАМН України», лабораторія патоморфології (зав. – проф., акад. АМН України А.М. Романенко), м. Київ.*

### FEATURES OF UBIQUITINATION PROCESS AT VARIOUS FORMS OF MALE INFERTILITY S.V. Bazalytska, O.D. Nikitin, Y.L. Tarnavsky

#### SUMMARY

Immunohistochemical features of expression of proteins 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 male infertility, testify to the raised maintenance of the damaged intracellular proteins in cells. The changes of Ubiquitin-proteasome system at the secretory form of male infertility testify to intensifying of ubiquitination process in Sertoli cells and about disturbance of these processes in interstitial endocrinocytes – Leydig cells, which carry out the basic regulating influence on spermatogenesis.

### ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА УБИКВИТИНАЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ С.В. Базалицкая, О.Д.Никитин, Я.Л.Тарнавский

#### РЕЗЮМЕ

Изучены иммуногистохимические особенности экспрессии протеина Ubiquitin в ткани яичка 28 больных при тяжелых формах мужского бесплодия - экскреторно-обтурационном и секреторном. Молекулярные особенности убиквитин-протеасомной системы, характерные для мужского бесплодия, свидетельствуют о повышенном содержании поврежденных внутриклеточных белков в клетках. При секреторной форме мужского бесплодия изменения убиквитин-протеасомной системы свидетельствуют об усилении процессов убиквитинации в клетках Сертоли и о нарушении этих процессов в интерстициальных эндокриноцитах – клетках Лейдига, которые осуществляют основное регулирующее влияние на процесс сперматогенеза.

**Ключові слова: чоловіча неплідність, протеїн Ubiquitin.**

Відкриття механізму внутрішньоклітинного розщеплення білків, що дістав назву убіквітин-опосередкованого, авторам якого - Аарону Чехановеру та Авраму Гершко у 2004 році було присуджено Нобелівську премію, дозволило встановити, що порушення системи внутрішньоклітинного убіквітин-протеасомного протеолізу відіграють значну роль в патогенезі багатьох захворювань людини: при спадкових хворобах, дистрофічно-дегенеративних захворюваннях, канцерогенезі, оскільки, система внутрішньоклітинного протеолізу задіяна в процесах розвитку та диференціації клітин, проліферації клітин, реакціях клітин на стрес та пошкодження, а також в процесі неоплазії [1]. Сучасними дослідженнями встановлено, що інактивація ubiquitin protein ligase, локалізованої в чоловічих статевих клітинах, призводить до блокування сперматогенезу та розвитку неплідності [2-4]. Враховуючи це, можна передбачити, що структурні та функціональні пошкодження компонентів убіквітин-протеасомної системи можуть відігравати значну роль в патогенезі чоловічої неплідності різної етіології.

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

#### МАТЕРІАЛИ І 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 користувались загальноприйнятою класифікацією [5]. При визначенні заключного діагнозу враховували дані морфологічного дослідження біоптату яєчка та результати гормональних досліджень. Згідно встановленого діагнозу пацієнтів було розподілено на три групи: 1 група - 11 хворих, у яких було встановлено діагноз екскреторно-обтураційної неплідності. Середній вік хворих - 33,6 років; 2 група - 12 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид. Середній вік хворих - 29,5 років; 3 група - 5 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності із синдромом «лише клітини Сертолі». Середній вік хворих - 28,5 років.

Для гістологічного дослідження біоптату тканини яєчка фіксували в рідині Буена і заливали в парафін. Із парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм, які фарбували гематоксилін-еозином.

Для імуногістохімічного (ІГХ) дослідження біоптату фіксували у 12% забуференому формаліні,

заливали в парафін і виготовляли зрізи товщиною до 5 мкм. Зрізи інкубували з первинними антитілами Ubiquitin (DAKO, Glostrup, Данія) в розведенні 1:800. Наприкінці препарати проявляли 1-2 хвилини у 0,05% розчині діамінбензидину (DAB), дофарбовували гематоксиліном та заключали в канадський бальзам. Як позитивний контроль використовували зрізи тканин із відомим заздалегідь високим вмістом Ubiquitin. Ті ж зрізи служили як негативний контроль, але без обробки первинними антитілами. В кожному випадку для ІГХ дослідження аналізували 12-16 зрізів. Розповсюдженість та інтенсивність ІГХ реакції оцінювали за напівкількісним методом в балах [6]. Розповсюдженість 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 визначався за показниками імуногістохімічного коефіцієнту (ІГХК) від 0 до 9 балів, який одержували перемноженням оцінок розповсюдженості та інтенсивності забарвлення. Проводився статистичний аналіз отриманих результатів.

#### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні ІГХ експресії протеїну Ubiquitin в групі хворих на екскреторно-обтураційну неплідність із збереженим сперматогенезом в клітинах Сертолі спостерігалось слабе ядерне зафарбування (ІГХК:1-3) в 4 спостереженнях (45%), в шести випадках (55%) спостерігалось помірне ядерне зафарбування (ІГХК:4-6). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $5,1 \pm 0,45$ . Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі була слабою (ІГХК: 1-3) в усіх випадках (100%). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $2,7 \pm 0,09$  (таблиця 1).

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії, сперматоцити 1 і 2 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  $2,3 \pm 0,09$  та  $2,2 \pm 0,09$  відповідно. Необхідно зазначити, що зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю ІГХ експресії протеїну Ubiquitin (ІГХК: 0) в усіх випадках (100%).

В клітинах Лейдіга помірна ядерна експресія в 6 балів спостерігалась у 3 випадках (27%); в 6 спостереженнях (54,5%) виявлялось слабе ядерне зафарбування (ІГХК: 1-3) та в 2 спостереженнях (18%) ядерна експресія протеїну Ubiquitin була відсутня (ІГХК: 0). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $4,3 \pm 0,54$ . Слабка цитоплазматична експресія убіквітину (ІГХК: 2-3) визначалась в 9 випадках (81%) даної групи (Рис. 1) та була відсутня в 2 випадках (19%) (ІГХК: 0). Середнє значення ІГХК дорівнювало  $2,7 \pm 0,27$  (таблиця 1).

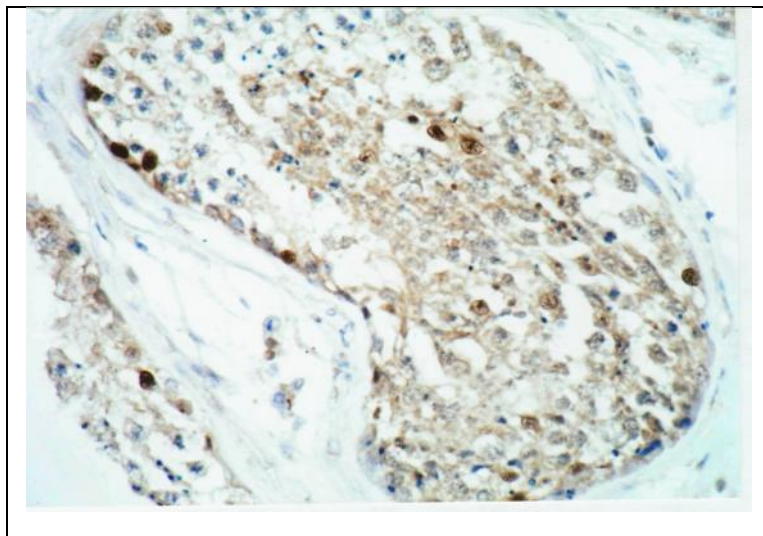


Рис. 1 – Екскреторно-обтураційна неплідність. Слабка ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin у клітинах сперматогенного шару. Помірна ядерна та слабка цитоплазматична експресія убіквітину в клітинах Сертолі та клітинах Лейдіга. Імуногістохімічна реакція. x 200.

Таблиця 1

## Показники ІГХК експресії протеїну Ubiquitin в біоптатах яєчка у хворих на різні форми чоловічої неплідності

Клітини яєчка	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**

Примітка: \*, \*\* - достовірно між групами;  $p \leq 0,001$ .

В групі хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид, (всього 12 пацієнтів), в клітинах Сертолі спостерігалось помірне ядерне зафарбування (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 і 2 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 та 2,6±0,17.

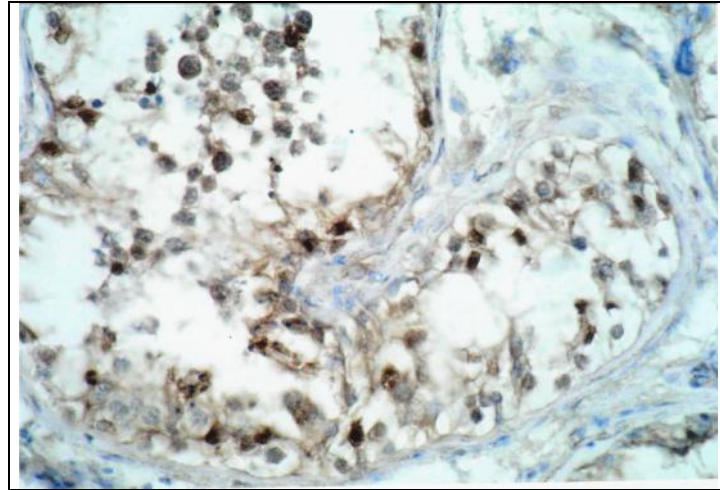
В клітинах Лейдіга ядерна експресія протеїну Ubiquitin була відсутня (ІГХК: 0) в 9 спостереженнях (75%), та в 3 випадках (25%) була слабкою (ІГХК: 1-3). Середнє значення ІГХК дорівнювало 0,3±0,16. При цьому, в 6 випадках (50%) спостерігалось слабок цитоплазматичне зафарбування (ІГХК: 2-3), в інших 6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

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

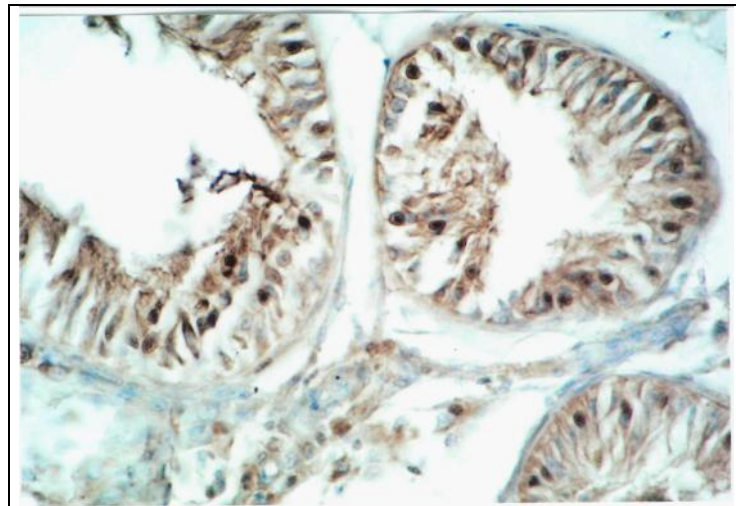
Цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в суспензіях була помірно (ІГХК:6) в 3 випадках (60%) та виразною в двох спостереженнях (40%). Середнє значення ІГХК становило 7,4±0,6.

В клітинах Лейдіга ядерна експресія убіквітину була відсутня (ІГХК: 0) в 4 спостереженнях (80%), в одному випадку (20%) визначалось слабок ядерне зафарбування (ІГХК: 1). Середнє значення ІГХК дорівнювало 0,3±0,2. При цьому, в 4 випадках (80%) спостерігалось помірне цитоплазматичне зафарбування (ІГХК: 4-6) та в одному випадку (20%) визначалась слабка цитоплазматична експресія (ІГХК: 3) (Рис. 3). Середнє значення ІГХК дорівнювало 5,6±0,6 (таблиця 1).

Таким чином, ІГХ дослідження протеїну Ubiquitin виявило достовірне підвищення його цитоплазматичної експресії в клітинах Сертолі при секреторній неплідності та синдромі «лише клітини Сертолі», порівняно із 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.



**Рис. 2 – Секреторна неплідність. Помірна ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі. Імуногістохімічна реакція. x 200.**



**Рис. 3 – Секреторна неплідність – в просвітах каналців лише клітини Сертолі. Помірна ядерна та цитоплазматична експресія протеїну Ubiquitin в клітинах Сертолі. Відсутність ядерної експресії та помірна цитоплазматична експресія убіквітину в клітинах Лейдіга. Імуногістохімічна реакція. x 200.**

Серед білків, які підлягають убіквітин-залежному протеолізу, можна перерахувати такі найважливіші субстрати: а) регулятори клітинного циклу; б) компоненти різних сигнальних шляхів; в) мутовані білки; г) білки, пошкоджені посттрансляційно. Внутрішньоклітинні білки виконують певні, закріплені за ними функції, а потім у визначений момент клітині необхідно від них позбавитися. Це обумовлене тим, що, по-перше, подальша активність білку може пошкодити клітині; по-друге, необхідно синтезувати нові білки, а перевантаження цитоплазми поліпептидами веде до апоптозу. Коли необхідність в певному білку відпадає, в клітині починає діяти механізм, який забезпечує зупинку функціонування та деградацію саме цього білку, в якому виділяють дві основні фази: 1) ковалентне приєднання поліубіквітинового ланцюга до білку, який підлягає деградації; 2) власне деградація білку в протеасомі.

Поліубіквітиновий ланцюг, що приєднується, і являється 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-фермент (активатор), E2-ферменти (кон'югатори або переносники), E3-ферменти (лігази), та являється високо специфічною і вибірковою за рахунок того, що побудована за принципом ієрархічного ускладнення [1,7]. Протеасома ж впізнає не субстрат, а саме поліубіквітиновий 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 «впізнавання» відбувається за типом утворення імунного зв'язку. Всі етапи процесу убіквітинізації

білку АТФ-залежні. Кінцевою метою цього біологічного процесу є селективна модифікація білків-мішеней для наступного протеолізу.

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

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

Виявлені в нашому дослідженні особливості убіквітин-протеасомної системи, які характерні для різних форм чоловічої неплідності, свідчать про посилення процесів убіквітинації в клітинах Сертолі та порушення цих процесів в інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдига. Враховуючи життєво важливі функції, які виконує убіквітин-протеолізна система в клітині, стає очевидним, що структурні та функціональні пошкодження компонентів цієї системи лежать в основі розвитку чоловічої неплідності.

#### ВИСНОВКИ

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

2. Виявлені молекулярні зміни убіквітин-протеасомної системи, що характерні для секреторної форми чоловічої неплідності та синдрому «лише клітини Сертолі», порівняно із із екскреторно-обтураційною неплідністю. Ці зміни пов'язані із: а) посиленням активності протеасом – органел, які відповідають за внутрішньоклітинний протеоліз, процесінг і рефолдінг білків, що свідчить про підвищення вмісту пошкоджених

внутрішньоклітинних білків у клітинах Сертолі та клітинах Лейдига при цих формах чоловічої неплідності; б) зменшенням ядерної експресії протеїну Ubiquitin в клітинах Лейдига, що свідчить про порушення регуляції клітинного циклу та швидкості транскрипції в клітинах ендокринного компоненту яєчка.

3. Зміни убіквітин-протеолітичної системи у хворих на секреторну форму чоловічої неплідності свідчать про посилення процесу убіквітинації в клітинах Сертолі та порушення цього процесу в інтерстиційних ендокриноцитах – клітинах Лейдига, які здійснюють основний регулюючий вплив на процес сперматогенезу, що є основою розвитку чоловічої неплідності у цих пацієнтів.

#### 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., Grootegoed 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. - N15. - P.6346-6354.
5. Юнда И.Ф., Иванюта Л.И., Имшинецкая Л.П. Бесплодие в супружестве. – Киев: 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. A. Ciechanover. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life// *EMBO J.* - 1998. - V.17. - N24. - P.7151-7160.
8. Glickman M.H., Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* - N82. - 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.