

В.О.Туманський
В.О.Шаврін

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: лімфома Ходжкіна, клітини Березовського-Штернберга-Рід, білки теплового шоку.

Надійшла: 16.01.2013
Прийнята: 24.02.2013

УДК: 616-006.44:616-018]-076

ЕКСПРЕСІЯ ПРОТЕЇНІВ ТЕПЛООВОГО ШОКУ ПРИ РІЗНИХ ВАРІАНТАХ КЛАСИЧНОЇ ЛІМФОМИ ХОДЖКІНА

Резюме. В роботі оцінена експресія протеїнів теплового шоку hsp60 та hsp90 у пухлинній тканині при різних варіантах класичної лімфоми Ходжкіна. Встановлено, що HRS-клітини та клітини мікрооточення при вивчених варіантах лімфоми Ходжкіна мають в цитоплазмі протеїни теплового шоку, що може забезпечувати стійкість пухлинної тканини до впливу зовнішніх та внутрішніх чинників. Експресія hsp60 і hsp90 в пухлинній тканині зростає від варіанта багатого лімфоцитами до змішаноклітинного та ретикулярного типу з виснаженням лімфоїдної тканини і найвища при більш злоякісному варіанті – саркомі Ходжкіна.

Морфологія. – 2013. – Т. VII, № 1. – С. 78-81.
© В.О.Туманський, В.О.Шаврін, 2013

Tumanskiy V.O., Shavrin V.O. Heat Shock proteins expression in different types of classical Hodgkin's Lymphoma. Summary. In the study estimation of heat shock proteins hsp60 and hsp90 expression in tumor tissue were conducted in lymphocyte rich, mixed cellularity and lymphocyte depleted (reticular type) variants of classical Hodgkins lymphoma. It was shown that HRS-cells and cellular microenvironment in the studied tumor tissues have in their cytoplasm heat shock proteins, what may cause resistance to inner and outer damage effects. Expression increases from lymphocyte rich to mixed cellularity and the most significant in tumor tissue of Hodgkin's sarcoma.

Key words: Hodgkin's lymphoma, HRS-cells, heat shock proteins.

Вступ

Лімфома Ходжкіна (HL) – поширене лімфо-проліферативне захворювання, що морфологічно характеризується наявністю у пухлинній тканині одно- та багатоядерних клітин Ходжкіна-Рід-Штернберга (HRS), розташованих серед скупчення непухлинних клітин та позаклітинного компоненту. Не зважаючи на те, що це захворювання добре піддається лікуванню (Bonadonna G. et al., 2005), зменшення токсичності лікування та уникнення вторинних пухлин після його проведення вимагає постійного удосконалення схем лікування і розробки таргетних препаратів. Саме з цих міркувань активно вивчаються процеси проліферації, апоптозу, а також чинники, що можуть зумовлювати резистивність пухлини до хіміотерапевтичного і променевого впливу.

Протеїни теплового шоку (HSP) – родина висококонсервативних білків, що присутні у всіх прокариотичних і еукаріотичних клітинах. Ці протеїни (шаперони) відповідають за процеси посттрансляційної модифікації білків у клітині, а також за відновлення стабільності протеїнів при різноманітних впливах на клітину, таких як температура, запалення, інфекційні впливи, радіація, гіпоксія тощо. Згідно молекулярної маси розрізняють підродина протеїнів теплового шоку від маленьких (HSP10) до великих (HSP100), також за локалізацією і функцією у клітинах. Велику увагу приділяють вивченню HSP90, що асоційо-

ваний з рецептором фактору некрозу пухлин (Felts S. et al., 2000). Також проведено багато досліджень цитоплазматичного та мембранного шаперону HSP60, кількість якого значно підвищується у пухлинних клітинах, резистивних до хіміотерапії (Soltys B., Gupta R., 1999). Існують дані, що HSP60 та HSP90 у великій кількості виявляються у клітинах пухлин, в тому числі лімфомі Ходжкіна (Hsu P., Hsu S., 1998, Jin S. et al., 2002, Schoof N. et al., 2009). Активно ведеться пошук сполук, що інгібують вищезазначені протеїни і підвищують чутливість пухлинних клітин до хіміотерапії і клітинної імунної відповіді (Böll V. et al., 2009). В більшості робіт дослідження експресії шаперонів проводились переважно на культурах пухлинних клітин Ходжкіна та Рід-Штернберга (HRS).

Експресія шаперонів у клітинах пухлинної тканини – HRS-клітинах і клітинах мікрооточення – вивчена недостатньо, дані, що існують, суперечливі (Hsu P., Hsu S., 1998).

Мета дослідження

Метою дослідження було вивчення експресії шаперонів hsp60, hsp90 у пухлинній тканині при різних варіантах класичної лімфоми Ходжкіна.

Матеріали та методи

Для дослідження було відібрано 15 парафінових блоків лімфатичних вузлів (4 зразки варіанту багатого лімфоцитами, 6 – змішаноклітинного і 5 зразків варіанту з виснаженням лімфоїдної

тканини, ретикулярного типу (саркома Ходжкіна)). Уражені лімфатичні вузли були отримані шляхом ексцизійної біопсії. Діагноз і варіант лімфоми Ходжкіна згідно існуючим критеріям (Swerdlow S.H. et al., 2008) встановлювався на світооптичному рівні, а також підтверджувався імуноморфологічним дослідженням.

Імунопероксидазні реакції проводили згідно стандартних протоколів (Key M., 2006). Використовували мишачі моноклональні антитіла проти протеїну теплового шоку hsp60 (клон LK-1) і hsp90 (клон 16F1) у розведеннях 1:100 і 1:500 відповідно. Демаскування антигенів проводили у 0,01M цитратному буфері (pH 6,0) за допомогою мікрохвильової печі після депарафінізації і промивки в дистильованій воді. Блокування ендогенної пероксидази здійснювалось у 3%-ному розчині H₂O₂ протягом 10 хвилин. Інкубація первинних антитіл проводилась протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у вологій камері. Візуалізація здійснювалась системою UltraVision Quanto Detection System (Thermo scientific), де в якості ферментної мітки використовується пероксидаза хріна, а хромогеном є діамінобензидин (DAВ Quanto Chromogen). Ядра після проведення імуногістохімічних реакцій дофарбовували гематоксиліном Майєра.

У кожному із зразків досліджували 10 полів зору з наявністю пухлинного росту при збільшенні $\times 400$. Клітини, позитивні у відношенні експресії маркерів, вивчали з використанням об'єктивів $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. Після підрахунку 200 гістологічно ідентифікованих об'єктів (клітин) обчислювали показники експресії за результатами всіх вивчених ділянок. При встановленому діагнозі до пухлинних клітин були віднесені одно- та багатоядерні клітини, що мали морфологію клітин Ходжкіна та Березовського-Штернберга-Рід, а також одно- та багатоядерні клітини

з ознаками виразної атипії. Клітини, що знаходились поміж пухлинних або оточували їх (до 5-7 шарів), відносили до елементів мікрооточення.

Результати та їх обговорення

Всі розглянуті варіанти класичної лімфоми Ходжкіна супроводжувались цитоплазматичною експресією шаперонів у клітинах Ходжкіна та Березовського-Штернберга-Рід, а також відмічались в мікрооточенні. Виразність реакції і кількість клітин, що фарбувались антигенами hsp60 та hsp90, коливались у широких межах.

При багатому лімфоцитами варіанті класичної лімфоми Ходжкіна цитоплазматична експресія в hsp60⁺ і hsp90⁺ HRS-клітинах ніжна дрібногранулярна. Відсоток позитивних на маркери діагностичних клітин був найменшим (34,81% та 73,41% відповідно). В клітинах мікрооточення спостерігалася аналогічна закономірність (табл. 1; рис. 1, 2).

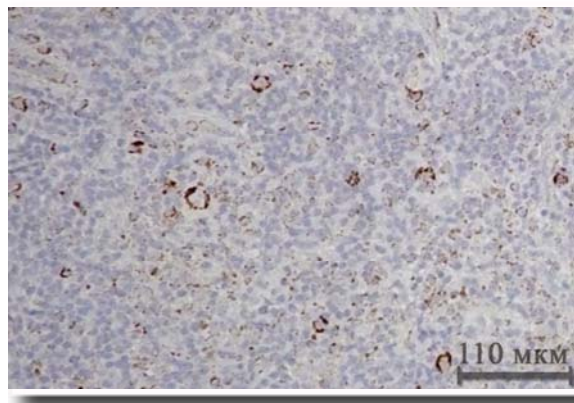


Рис. 1. Лімфома Ходжкіна, класична форма, варіант багатий лімфоцитами: експресія hsp60 HRS-клітинами та клітинами мікрооточення (імунопероксидазний метод).

Таблиця 1
Показники експресії шаперонів клітинами пухлинної тканини при різних клініко-морфологічних варіантах лімфоми Ходжкіна, М \pm m

Варіант лімфоми Ходжкіна (класична форма)	Клітини, що експресують, %			
	s+cy.hsp60		cy.hsp90	
	HRS	мікрооточення	HRS	мікрооточення
Багатий лімфоцитами (4 випадки)	34,81 \pm 5,43	14,05 \pm 2,71	73,41 \pm 6,11	10,53 \pm 1,83
Змішаноклітинний (6 випадків)	68,07 \pm 7,32	64,44 \pm 6,49	91,65 \pm 7,83	68,92 \pm 5,53
Виснаження лімфоїдної тканини, ретикулярний тип (5 випадків)	93,45 \pm 7,31	79,67 \pm 8,13	86,73 \pm 6,93	71,39 \pm 4,41
Всього (15 випадків)	65,44 \pm 6,69	52,72 \pm 5,78	83,93 \pm 6,96	50,28 \pm 3,92

Примітка. Локалізація експресії: s – мембранна, cy – цитоплазматична.

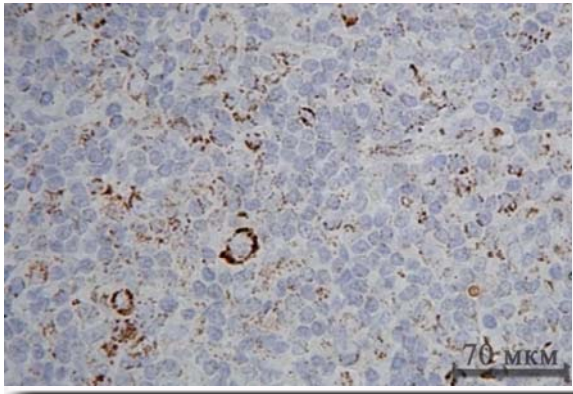


Рис. 2. Лімфома Ходжкіна, класична форма, варіант багатий лімфоцитами: експресія hsp90 HRS-клітинами та клітинами мікрооточення (імунопереоксидазний метод).

Варіанти змішаноклітинний та ретикулярний тип з виснаженням лімфоїдної тканини класичної лімфони Ходжкіна супроводжувалися найбільшим відсотком hsp60 і hsp90 позитивних клітин пухлини, який в деяких випадках досягав 100%. Останнє зустрічалося, коли мали перевагу атипів форми («лакунарні», «муміфіковані» і т.п.). Характер цитоплазматичного забарвлення значно інтенсивніший у вигляді зливних крупних гранул з формуванням «клітин – плям». У мікрооточенні також значно підвищився відсоток позитивних на маркери клітин. Експресія ніжна дрібногранулярна цитоплазматична або «dot like» мембранна (табл. 1; рис. 3-6).

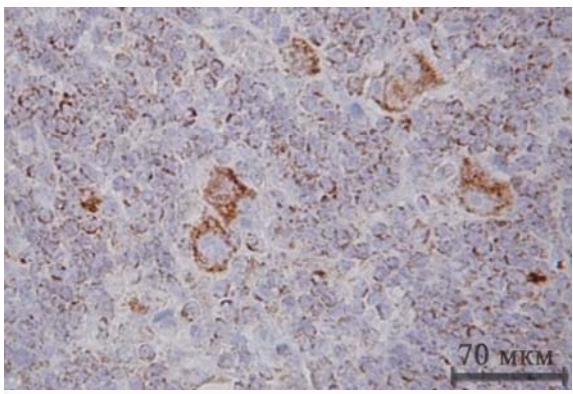


Рис. 3. Лімфома Ходжкіна, класична форма, змішаноклітинний варіант: експресія hsp60 HRS-клітинами та клітинами мікрооточення (імунопереоксидазний метод).

Підсумок

При класичній лімфомі Ходжкіна HRS-клітини та клітини мікрооточення мають протейни теплового шоку, що забезпечує стабільність пухлинної тканини до впливу зовнішніх чинників. Експресія антигенів hsp60 і hsp90 в пухлинній тканині зростає від варіанта багатого лімфоцитами до змішаноклітинного та ретикулярного

типу з виснаженням лімфоїдної тканини і найвища при більш злоякісному варіанті – саркомі Ходжкіна.

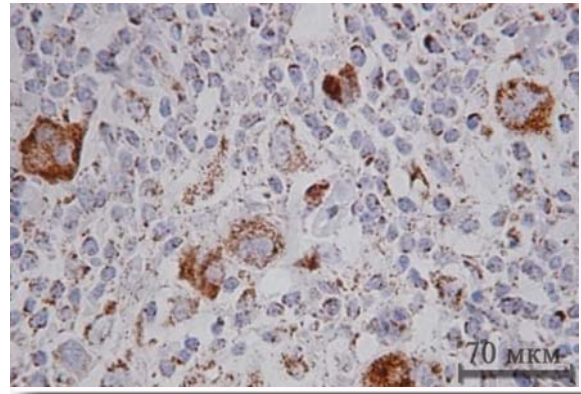


Рис. 4. Лімфома Ходжкіна, класична форма, змішаноклітинний варіант: експресія hsp90 HRS-клітинами та клітинами мікрооточення (імунопереоксидазний метод).

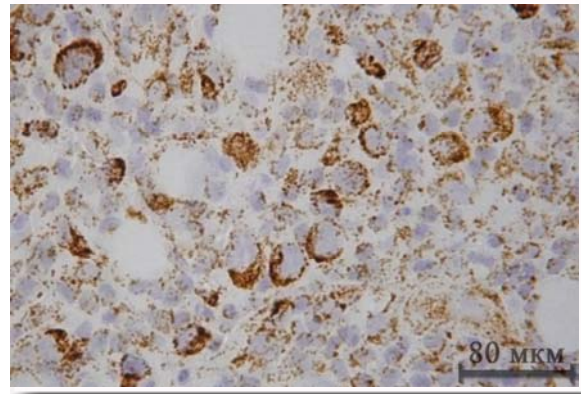


Рис. 5. Лімфома Ходжкіна, класична форма, ретикулярний тип варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини: експресія hsp60 HRS-клітинами та клітинами мікрооточення (імунопереоксидазний метод).

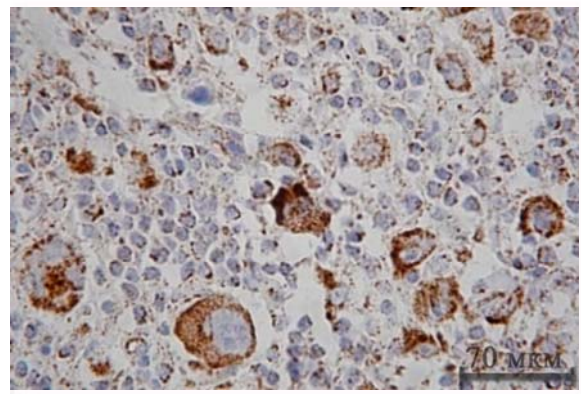


Рис. 6. Лімфома Ходжкіна, класична форма, ретикулярний тип варіанту з виснаженням лімфоїдної тканини: експресія hsp90 HRS-клітинами та клітинами мікрооточення (імунопереоксидазний метод).

Перспективи подальших досліджень пов'язані з вивченням експресії шаперонів у пу-

хлинній тканині при лімфопроліферативних захворюваннях.

Літературні джерела

Опухоли лимфатической системы: атлас [под ред. А. И. Воробьева, А. М. Кременецкой]. – М. : Ньюдиамед, 2007. – 297 с.

Expression of Heat Shock Protein 60 in Normal and Neoplastic Human Lymphoid Tissues / H. S. Jin, T. Yoshino, Z. Jin [et al.] // *J. Clin. Exp. Hematopathol.* – 2002. – Vol. 42, № 1. – P. 26-32.

Heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 (CNF2024) depletes NF-kappaB and sensitizes Hodgkin's lymphoma cells for natural killer cell-mediated cytotoxicity / B. Böll, F. Eltaib, K.S. Reiners [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15, № 16. – P. 5108-16.

HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin Lymphoma cells / N. Schoof, F. von Bonin, L. Trümper, D. Kube // *Cell Communication and Signaling.* – 2009. – Vol. 7, № 17. – P. 7-17.

Hsu P.-L. Abundance of Heat Shock Proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in Malignant Cells of Hodgkin's Disease / P.-L. Hsu, S.-M. Hsu // *Cancer*

Research. – 1998. – Vol. 58. – P. 5507-5513.

Key M. Immunohistochemical Staining Methods / M. Key. – Ojai, CA, USA : Bimedical Services, 2006. – 174 p.

Soltys B. J. Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: are they exported? / B. J. Soltys, R. S.Gupta // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – Vol. 24. – P. 174-177.

Survival in Hodgkin's disease patients – report of 25 years of experience at the Milan Cancer Institute / G. Bonadonna, S. Viviani, V. Bonfante [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 41. – P. 998-1006.

The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties / S. J. Felts, B. A. Owen, P. Nguyen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 3305-3312.

WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris [et al.]. – Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008. – 439 p.

Туманский В.А., Шаврин В.А. Экспрессия белков теплового шока при различных вариантах классической лимфомы Ходжкина.

Резюме. В работе проведена оценка экспрессии белков теплового шока hsp60 и hsp90 в опухолевой ткани при различных вариантах классической лимфомы Ходжкина. Установлено, что опухолевые клетки и клетки микроокружения при изученных вариантах лимфомы Ходжкина имеют в цитоплазме протеины теплового шока, что может обеспечивать устойчивость опухолевой ткани к внешним и внутренним воздействиям. Экспрессия hsp60 и hsp90 в опухолевой ткани увеличивается от богатого лимфоцитами варианта к смешанноклеточному и наиболее выражена при самом злокачественном варианте – саркоме Ходжкина.

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, клетки Березовского-Штернберга-Рид, белки теплового шока.