

**В.А.Туманский  
М.Д.Зубко**

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** гепатоцеллюлярный рак, экспрессия, p53, каспаза-3, Ki-67.

Надійшла: 04.09.2014

Прийнята: 23.09.2014

УДК: 616.36-006.6-091.8-078:57.089

## **ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНЫЙ РАК: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК**

*Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Исследование инвазивно-метастатических свойств опухолей и их раннее прогнозирование в биоптатах больных» (номер государственной регистрации 0114U000967).*

**Реферат.** С целью определения апоптотической и пролиферативной активности клеток гепатоцеллюлярной карциномы в трепанобиоптатах печени проведено иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии p53, каспазы-3 и Ki-67 у 53 больных гепатоцеллюлярным раком. Установлено, что в 62,26 % наблюдений в клетках гепатоцеллюлярной карциномы выявлялась гиперэкспрессия ядерного белка p53, в 20,75% наблюдений – высокий уровень экспрессии этого протеина и в 16,98 % случаев – низкий уровень экспрессии p53. В гепатоцеллюлярной карциноме преобладал умеренный уровень экспрессии Ki-67, наблюдавшийся у 66,04% больных, у 22,64% пациентов он был высоким и у 11,32% больных – низким; при этом Ki-67-иммунопозитивные клетки занимали 53,39±23,25% общей площади опухоли. Таким образом, гиперэкспрессия ядерного белка p53 в гепатоцеллюлярной карциноме ассоциируется со слабым и низким уровнем апоптоза опухолевых клеток, а также преимущественно с умеренным уровнем их пролиферации.

**Morphologia.** – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 57-60.

© В.А.Туманский, М.Д.Зубко, 2014

✉ tumanskiy@zsmu.zp.ua

**Tumanskiy V.A., Zubko M.D. Hepatocellular carcinoma: immunohistochemical characteristics of apoptosis and cell proliferation activity.**

**ABSTRACT. Background.** Hepatocellular carcinoma which takes about 85% of primary liver cancer, is the most aggressive and prognostically unfavorable tumor. Current information about the level of apoptosis and cell proliferative activity of HCC are contradictory. **Objective.** To determine the apoptotic and proliferative activity of hepatocellular carcinoma of the liver by the immunohistochemically level of p53, caspase-3 and Ki-67 expression. **Methods.** Trephine biopsies of 53 patients with hepatocellular carcinoma were studied. **Results.** It was found that in 62.26% of cases the hyperexpression of nuclear p53 protein in cells was detected, in 20.75% of cases - a high level of expression of this protein, and in 16.98% of cases - a low level of p53 expression. The average area of p53-immunopositive cells was 52,07±33,97%. Simultaneously, in 47.16% of hepatocellular carcinoma it was detected a weak level of cytoplasmic expression of caspase-3, in 26.42% of the patients moderate level of expression of caspase-3 by hepatocellular carcinoma cells was determined, pronounced expression of caspase-3 was detected in hepatocellular carcinoma cells 26, 42%. Caspase-3-immunopositive cells occupied 48,21±27,66% of the total area of hepatocellular carcinoma. It is established that in the hepatocellular carcinoma prevailed moderate level of expression of Ki-67, which was observed in 66.04% of patients, in 22.64% it was high and in 11.32% of cases – it was low. Immunopositive Ki-67 cells occupied 53,39±23,25% of the total area of the tumor. **Conclusion.** Hyperexpression of nuclear p53 protein in hepatocellular carcinoma was associated with weak and low level of apoptosis of tumor cells and moderate level of their proliferation.

**Key words:** hepatocellular cancer, expression of p53, caspase-3, Ki-67.

### **Citation:**

Tumanskiy VA, Zubko MD. [Hepatocellular carcinoma: immunohistochemical characteristics of apoptosis and cell proliferation activity]. *Morphologia*. 2014;8(3):57-60. Russian.

### **Введение**

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), составляющая около 85% первичного рака печени, является наиболее агрессивной и прогностически неблагоприятной опухолью [1] с низкими показателями продолжительности жизни больных [2].

Наиболее важными биологическим характеристикам ГЦК, определяющими прогноз болезни, являются опухолевая трансформация генов печеночных клеток, нарушение соотношения между уровнями апоптоза и пролиферации опухолевых клеток, приобретение ими инвазивных и

метаэстатических свойств [3].

Ведущую роль в регуляции клеточной пролиферации и апоптоза играет природный (Wt) онкосупрессорный ген p53 и кодируемый им ядерный белок p53, который модулирует экспрессию генов, отвечающих за репарацию ДНК, деление клеток и апоптоз. При неправильном копировании во время митоза дочерней ДНК и невозможности ее восстановления ген p53 останавливает митоз и, подавляя фосфорилирование гена Rb циклином D1, активирует апоптоз клетки с мутантной ДНК [4]. По данным полногеномного секвенирования в гепатоцеллюлярной карциноме первое место по частоте (35,2%) занимают мутации в онкосупрессорном гене p53, кодирующем белок p53, на 2-м месте (15,9%) - мутации в гене CTNNB1, кодирующем  $\beta$ -катенин [5]. В связи с инактивацией мутантного гена p53 утрачивается p53-зависимый апоптоз и контроль над размножением измененных опухолевых клеток, продолжается пролиферация опухолевых клеток с другими активированными онкогенами, снижается также дифференцировка опухолевых клеток [6]. В обычных условиях белок p53 быстро деградирует и поэтому не выявляется иммуногистохимическими методами [7]. Мутации гена p53 приводят к увеличению времени полужизни нефункционирующего белка p53, который накапливается в ядре [8] и может быть выявлен иммуногистохимическими методиками. В патологоанатомической практике для определения апоптоза широкое распространение получило определение уровня экспрессии клетками фермента апоптотической деградации каспазы-3, а для определения митотического деления клеток - уровня экспрессии ядерного белка Ki-67, который выявляется в конце G1 фазы, в G2, S и M-фазах клеточного цикла с максимальной экспрессией в фазах G2 и M [9]. Современные сведения об уровне апоптоза и пролиферативной активности клеток ГЦК противоречивы. Stroescu C. и коллеги [10] положительную экспрессию p53 наблюдали в 68% случаев ГЦК, положительную экспрессию Ki-67 и PCNA установили в одинаковом количестве случаев - 63,8% [3]. Saftoiu A et al выявили положительную экспрессию p53 в 46,88%. Мосану Е. с соавторами [11] сообщают о том, что экспрессия Ki-67 была негативной в 22,5 % исследуемых ими случаев ГЦК. Persad R с сотрудниками [12] в 52% случаев ГЦК отмечали положительную экспрессию каспазы-3.

Таким образом, пролиферативная активность и уровень апоптоза клеток ГЦК изучены на сегодняшний день недостаточно.

**Цель работы** – иммуногистохимическими методами определить апоптотическую (p53, caspase-3) и пролиферативную (Ki-67) активность клеток гепатоцеллюлярного рака печени.

#### **Материалы и методы**

Проведено комплексное патогистологиче-

ское и иммуногистохимическое исследование биоптатов печени 53 пациентов, которые страдали ГЦК. Средний возраст больных ГЦК составил  $59,6 \pm 11,32$  года (26-73 года). В контрольной группе исследовали биоптаты печени 5 умерших от соматических заболеваний без клинико-биохимических и морфологических признаков поражения печени.

Столбики трепанобиоптатов печени фиксировали в забуференном 10% формалине и заливали в парафин. На ротационном микротоме HM-3600 (MICROM Laborgerate GmbH - Германия) изготавливали серийные срезы толщиной 3-4 мкм для их окраски гематоксилином и эозином, а также для ИГХ исследований.

В соответствии со стандартизованными протоколами в парафиновых срезах ткани печени, после температурного демаскирования антигенов и подавления активности эндогенной пероксидазы, проводились ИГХ исследования с использованием соответствующих первичных антител и системы визуализации DAKO EnVision+ System («DAKO», Дания) с диаминобензидином (DAB).

Пролиферативную активность клеток ГЦК устанавливали непрямым иммунопероксидазным методом с использованием моноклональных антител Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1 («DAKO», Дания). Уровень апоптоза клеток ГЦК определяли моноклональными антителами Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP03 («Thermo Fisher Scientific Inc.» – США) и Mo a-Hu p53 Protein (clon DO-7) («DAKO Cytomation», Дания). Результаты каждой иммуногистохимической реакции оценивали полуколичественным методом путем подсчета процента положительно окрашенных клеток в стандартизованном поле зрения микроскопа AxioPlan 2 (фирмы «Carl Zeiss» - Германия) при увеличении 200x, в каждом случае анализировали 200 клеток в 3 полях зрения. Пролиферативную активность клеток печени определяли по ядерной экспрессией Ki-67 в баллах (Risberg B. et al., 2002): 0 баллов = 0-5% клеток с иммунопозитивными ядрами, 1 балл = 6-25%, 2 балла = 26-50 %, 3 балла = 51-75%, 4 балла = 76-100% клеток с иммунопозитивными ядрами. При определении уровня экспрессии маркера Ki-67 0-1 балл оценивали как низкий уровень экспрессии, 2 и 3 балла - как умеренный уровень экспрессии, а 4 балла - как высокий уровень экспрессии. Уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3 расценивали как низкий при наличии 0-33% иммунопозитивных клеток печени, как умеренный - при наличии 34-66% иммунопозитивных клеток и как высокий - при наличии 67-100% иммунопозитивных клеток печени (Ioachim E. et al., 2003). Низкий уровень экспрессии p53 регистрировали при наличии <10% клеток с иммунопозитивными ядрами, высокий уровень - при наличии 11-29% иммунопозитивных клеток, а о гиперэкспрессии этого

маркера свидетельствовало наличие  $\geq 30\%$  таких клеток (Jian-Liu et. Al., 2004).

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № АХХR712D833214FAN5). Вычисляли среднее значение (M), среднее квадратическое отклонение ( $\sigma$ ), стандартную ошибку репрезентативности среднего значения (m), рассчитывали 95% доверительный интервал среднего значения.

#### Результаты и их обсуждение

Проведенные иммуногистохимические исследования показали, что в ГЦК преобладает гиперэкспрессия ядерного белка p53 в злокачественных клетках. Гиперэкспрессия p53 клетками ГЦК (т.е. наличие  $\geq 30\%$  иммунопозитивных клеток) была выявлена у 62,26% больных; у 20,75% пациентов определялся высокий уровень экспрессии этого ядерного белка, при котором в опухоли определялось 11-29% p53-иммунопозитивных клеток; у 16,98% больных уровень экспрессии p53 был низким, в опухоли выявлялось менее 10% клеток с иммунопозитивными ядрами: средняя площадь p53-иммунопозитивных клеток составляла  $52,07 \pm 33,97\%$ . Считается, что утрата функции гена p53 обычно происходит на поздних стадиях гепатоканцерогенеза за счет аллельных делеций хромосомного локуса 17p13, где расположен этот ген, или мутаций в четырех высоко консервативных участках ДНК-связывающего домена, что ведет к потере его ДНК-связывающей активности [6]. Мутации гена p53 приводят к накоплению в ядре нефункционирующего белка p53 [8], гиперэкспрессия которого в ядрах опухолевых клеток выявлена нами иммуногистохимическим методом. Мутации гена p53 ассоциированы с развитием инвазивного фенотипа гепатоцеллюлярной карциномы и значительно повышают вероятность ее метастазирования, так как подавление p53-зависимого апоптоза резко увеличивает жизнеспособность опухолевых клеток при их попадании в кровоток. На ранних стадиях гепатоканцерогенеза функциональная инактивация онкосупрессорного гена p53 может быть обусловлена его связыванием с белками гепатотропных вирусов В или С, при этом нарушается механизм активации каспаз в ответ на появление повреждений ДНК [8].

Одним из ключевых эффекторных ферментов апоптоза является каспаза-3, завершающая окончательную дезинтеграцию погибающей клетки [14]. По результатам проведенных нами иммуногистохимических исследований в ГЦК преобладал слабый уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками, который был отмечен у 47,16% больных. Умеренный уровень экспрессии каспазы-3 клетками ГЦК был установлен у 26,42% больных, выраженный уровень цитоплазматической экспрессии

каспазы-3 клетками ГЦК выявлен у 26,42%. Наиболее вероятно это обусловлено тем, что инактивация онкосупрессорного гена p53 в ГЦК снижает контроль над размножением измененных опухолевых клеток и нарушает механизм активации каспаз в опухолевых клетках с аномальной ДНК [8]. Установлено, что каспаза-3 иммунопозитивные клетки в среднем занимали  $48,21 \pm 27,66\%$  общей площади ГЦК. В то же время у пациентов, у которых отмечалась гиперэкспрессия p53, уровень экспрессии каспазы-3 был слабым либо умеренным.

Нами установлено, что площадь, занимаемая Ki-67-иммунопозитивными клетками, составляла  $53,39 \pm 23,25\%$  общей площади клеток гепатоцеллюлярного рака. При этом уровень экспрессии Ki-67 клетками гепатоцеллюлярного рака у 22,64% (n=12) пациентов был высоким (4 балла), 66,04% (n=35) больных был умеренным (2-3 балла) и 6 случаях (11,32 %) уровень экспрессии Ki-67 был низким (1 балл). Средний уровень экспрессии составил  $2,77 \pm 0,92$  балла. J. Koskinas с соавторами [15] также показали, что в очагах опухолевой ткани экспрессия Ki-67 выше, чем в окружающей ткани печени, и индекс клеточной пролиферации возрастает с увеличением степени злокачественности опухоли.

Таким образом, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы из-за мутаций гена p53 преобладает ядерная гиперэкспрессия и высокая экспрессия белка p53, которая ассоциирована с низким и умеренным уровнем апоптоза опухолевых клеток, а также преимущественно с умеренным и высоким уровнем их пролиферации. Эти изменения способствуют быстрой прогрессии гепатоцеллюлярной карциномы.

#### Выводы

1. В гепатоцеллюлярной карциноме преобладает гиперэкспрессия ядерного белка p53, выявленная у 62,26% больных, у 20,75% пациентов определяется высокий уровень экспрессии этого протеина, у 16,98 % больных – низкий уровень экспрессии p53.

2. В гепатоцеллюлярной карциноме отмечается преимущественно низкий уровень экспрессии каспазы-3, имеющая место у 47,16% больных; умеренный и высокий уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3 выявлен соответственно у 26,42% и 26,42% пациентов.

3. У 66,04 % больных гепатоцеллюлярной карциномой отмечается умеренный уровень экспрессии Ki-67 и пролиферации опухолевых клеток, у 22,64% пациентов имеет место высокий уровень пролиферативной активности клеток опухоли, у 11,32% больных - низкий уровень экспрессии Ki-67 клетками гепатоцеллюлярного рака печени.

**Перспективы дальнейших исследований** связаны с уточнением иммуногистохимических характеристик гепатоцеллюлярного рака печени.

## Литературные источники References

1. Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist*. 2010;15:5-13. doi: 10.1634. PMID: 21115576
2. Kolosov AE, Zhuravlev VA. [Hepatocellular carcinoma and prognosis for patients]. St Petersburg: Kirov; 2002. 144 p. Russian.
3. Stroescu C, Dragnea A, Ivanov B, Pechianu C, Herlea V, Sgarbura O, Popescu A, Popescu I. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2008 Dec;17(4):411-7. PMID: 19104702.
4. Tumanskiy VA. [Selective death of specialized cells]. *Patologia*. 2005;2(1):10-8. Russian
5. Kan Z, Zheng H, Liu X, Li S, Barber TD, Gong Z, Gao H, Hao K, Willard MD, Xu J, Hauptschein R, Rejto PA, Fernandez J, Wang G, Zhang Q, Wang B, Chen R, Wang J, Lee NP, Zhou W, Lin Z, Peng Z, Yi K, Chen S, Li L, Fan X, Yang J, Ye R, Ju J, Wang K, Estrella H, Deng S, Wei P, Qiu M, Wulur IH, Liu J, Ehsani ME, Zhang C, Loboda A, Sung WK, Aggarwal A, Poon RT, Fan ST, Wang J, Hardwick J, Reinhard C, Dai H, Li Y, Luk JM, Mao M. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res*. 2013;23:1422-33.
6. Nishida N, Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Curr Genomics*. 2011 Apr;12(2):130-7. doi: 10.2174/138920211795564359. PMID: 21966251.
7. Abramenko IV, Filchenkov AA. [Estimation of apoptosis parameters in cancer diagnostics, prognosis and treatment schemes optimization]. *Problems in oncology*. 2003; 49(1):21-30. Russian.
8. Lazarevich NL. [Molecular mechanisms of hepatic tumors progression]. *Usp Biol Khim*. 2004;44:365-418. Russian.
9. Gluzman DF, editor. [Tumors' diagnostic immunohistochemistry]. Kyiv: Morion; 2003. 193 p. Russian.
10. Saftoiu A, Ciurea T, Georgescu C, Banita M, Comanescu V, Rogoveanu I, Gorunescu F, Georgescu I. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *J Cell Mol Med*. 2003 Oct-Dec;7(4):436-46. PMID: 14754512.
11. Mocanu E, Broasca V, Severin B. Ki-67 expression in hepatocellular carcinoma developed on a liver cirrhosis. *ARS Medica Tomitana*. 2012;(1):33-7. DOI: 10.2478/v10307-012-0006-x.
12. Persad R, Liu C, Wu TT, Houlihan PS, Hamilton SR, Diehl AM, Rashid A. Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol*. 2004 Jul;17(7):861-7. PMID: 15098015.
13. Ozturk M, Arslan-Ergul A, Bagislar S, Senturk S, Yuzugullu H. Senescence and immortality in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2009 Dec 1;286(1):103-13. doi: 10.1016/j.canlet.2008.10.048. PMID: 19070423.
14. Tumanskiy VA, Shebeko YuA. [Pathogen-induced apoptosis of hepatocytes in chronic viral hepatitis: molecular mechanisms and microscopic diagnostics]. *Patologia*. 2008;5(3):29-33. Russian.
15. Koskinas J, Petraki K, Kavantzias N. Hepatic expression of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein in HBV or HCV cirrhosis in relation to dysplastic liver cell changes and hepatocellular carcinoma. *Viral Hepatitis*. 2005;№12(6):635-41.

**Туманський В.О., Зубко М.Д. Гепатоцелюлярний рак: імуногістохімічна характеристика апоптозу і проліферативної активності клітин.**

**Реферат.** З метою визначення апоптотичної і проліферативної активності клітин гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) в трепанобіоптатах печінки проведено імуногістохімічне дослідження рівня експресії p53, каспаз-3 і Ki-67 у 53 хворих гепатоцелюлярним раком. Встановлено, що в 62,26% спостережень в клітинах ГЦК виявлялася гіперекспресія ядерного білка p53, в 20,75% спостережень - високий рівень експресії цього протеїну і в 16,98% випадків - низький рівень експресії p53; середня площа p53-імунопозитивних клітин становила 52,07±33,97. Одночасно в ГЦК переважав слабкий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 пухлинними клітинами, виявлених у 47,16% хворих, помірний рівень експресії каспази-3 клітинами ГЦК був встановлений у 26,42% пацієнтів, виражена експресія каспаз-3 клітинами ГЦК виявлена у 26,42%; каспаза-3-імунопозитивні клітини займали 48,21±27,66 % загальної площі ГЦК. Встановлено, що в ГЦК переважав помірний рівень експресії Ki-67, що спостерігався у 66,04% хворих, у 22,64% пацієнтів він був високим і у 11,32% хворих - низьким; при цьому Ki-67-імунопозитивні клітини займали 53,39±23,25% загальної площі пухлини. Таким чином, гіперекспресія ядерного білка p53 в ГЦК асоціюється зі слабким і низьким рівнем апоптозу пухлинних клітин, а також переважно з помірним рівнем їх проліферації.

**Ключові слова:** гепатоцелюлярний рак, експресія, p53, каспаза-3, Ki-67.