

УДК 616.36-006.4-091.8-074/.-078

В.А. Туманский, М.Д. Зубко

Запорожский государственный медицинский университет

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И АПОПТОЗА КЛЕТОК В ХОЛАНГИОЦЕЛЛЮЛЯРНОМ РАКЕ ПЕЧЕНИ

С целью определения апоптотической и пролиферативной активности клеток холангиоцеллюлярной карциномы (ХЦК) в трепанобиоптатах печени 36 больных проведено иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии p53, каспазы-3 и Ki-67. Установлено, что гиперэкспрессия ядерного белка p53 отмечалась в 41,73 % случаев, в 16,66 % случаев определялся высокий уровень этого протеина. Низкий уровень экспрессии p53 отмечался у 36,11 % больных ХЦК печени. У 5,5 % больных ХЦК экспрессия этого маркера в ядрах опухолевых клеток отсутствует. В ХЦК преобладал низкий уровень цитоплазматической экспрессии фермента апоптотической дегградации клеток каспазы-3, выявленный у 50 % больных. Умеренный и высокий уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3 был выявлен у равного количества пациентов – по 25 %. В то же время у пациентов, у которых отмечалась гиперэкспрессия p53, уровень экспрессии каспазы-3 был слабым или умеренным. Установлено, что в ХЦК преобладает умеренный уровень экспрессии Ki-67, выявленный у 50 % больных, у 22,22 % определяется высокий уровень экспрессии этого протеина, и еще у 22,22 % больных – низкий уровень экспрессии Ki-67, у 5,56 % больных экспрессия этого маркера не определялась.

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

Холангиоцеллюлярная карцинома (ХЦК) печени характеризуется агрессивным течением и значительными географическими различиями заболеваемости, которые коррелируют с распространенностью желчнокаменной болезни и глистных инвазий. В зависимости от региона заболеваемость холангиоцеллюлярным раком (ХЦР) варьирует от 1 до 7 случаев на 100 тыс. населения [1, 2]. В странах ЕС заболеваемость холангиоцеллюлярным раком печени составляет 0,9–1,3 на 100 тыс. населения в год [3]. Результаты лечения ХЦР печени остаются неутешительными. По литературным данным, вероятность пятилетней выживаемости больных колеблется от 26 до 35 % [4], двухлетняя выживаемость составляет 62,9 % [5]. Важной составляющей агрессивного течения ХЦК является приобретение опухолевыми клетками приоритетных свойств быстрого размножения и распространения в печени, в которых, наряду с другими особенностями, определенную роль играют изменения уровня клеточной пролиферации и апоптоза [6]. Уровень клеточной пролиферации в опухоли чаще всего определяется иммуногистохимическими методами по экс-

прессии клетками ядерного белка Ki-67, а уровень апоптоза в опухоли анализируется по ядерной экспрессии белка p53 и цитоплазматической экспрессии фермента каспаза-3. Литературные данные о пролиферативной и апоптотической активности клеток ХЦК малочисленны и противоречивы. По мнению разных авторов, экспрессия p53 иммуногистохимически определяется в 20–80 % случаев ХЦК [6–8]. X. Wang Zhang J. et al. [8] положительную экспрессию Ki-67 и p53 обнаружили в 96,7 и 53,3 % образцов ХЦК соответственно. Уровень экспрессии каспазы-3 в ХЦК пока не изучен.

Цель работы – иммуногистохимическими методами определить апоптотическую (p53, каспаза-3) и пролиферативную (Ki-67) активность клеток ХЦР печени.

Материал и методы. Проведено комплексное патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов печени 36 больных ХЦР. Средний возраст больных – (58,87±11,72) года (33–83 года). В контрольной группе исследовали биоптаты печени пяти умерших от соматических заболеваний без клинико-биохимических

© В.А. Туманский, М.Д. Зубко, 2015

и морфологических признаков поражения печени.

Столбики трепанобиоптатов печени фиксировали в забуференном 10%-ном 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 иммуногистохимических исследований. В соответствии со стандартизованными протоколами в парафиновых срезах ткани печени после температурного демаскирования антигенов и подавления активности эндогенной пероксидазы проводили иммуногистохимические исследования с использованием соответствующих первичных антител и системы визуализации DAKO EnVision+ System (DAKO, Дания) с диаминобензидином (DAB).

Пролиферативную активность клеток ХЦК устанавливали непрямым иммунопероксидазным методом с использованием моноклональных антител Мо а-Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1 (DAKO, Дания). Уровень апоптоза клеток гепатоцеллюлярных карцином определяли моноклональными антителами Мо а-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP03 (Thermo Fisher Scientific Inc. – США) и Мо а-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 200, в каждом случае анализировали 200 клеток в трех полях зрения. Пролиферативную активность клеток опухоли определяли по ядерной экспрессии Ki-67 в баллах (B. Risberg et al.) [9]: 0 баллов = 0–5 % клеток с иммунопозитивными ядрами, 1 балл = 6–25 %, 2 бал-

ла = 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, 4 балла – как высокий уровень экспрессии. Уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3 расценивали как низкий при наличии 0–33 % иммунопозитивных клеток ХЦК, как умеренный при наличии 34–66 % иммунопозитивных клеток и как высокий при наличии 67–100 % иммунопозитивных клеток ХЦК (E. Joachim et al.) [10]. 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 ≥ 30 % таких клеток (Jian-Liu et al.) [11].

Полученные результаты статистически обрабатывали. Рассчитывали 95%-ный доверительный интервал среднего значения.

Результаты и их обсуждение. Иммуногистохимические исследования протеина p53, являющегося продуктом онкосупрессорного гена p53, показали, что у 41,73 % больных ХЦК в опухоли определялось ≥ 30 % [(63,75±20,19) %] p53-иммунопозитивных клеток, что свидетельствовало о гиперэкспрессии ядерного белка p53 в злокачественных клетках. Высокий уровень ядерной экспрессии p53, при котором в ХЦК наблюдалось от 10 до 29 % (20,47±3,53) p53-иммунопозитивных клеток, определялся у 16,66 % пациентов. У 36,11 % больных ХЦК уровень экспрессии p53 был низким, в опухоли выявлялось менее 10 % (5,54±0,39) клеток с иммунопозитивными ядрами (таблица), у 5,5 % больных экспрессия p53 в ядрах опухолевых клеток отсутствовала.

Характеристика экспрессии Ki-67, p53, каспазы-3 в опухоли у больных с холангиоцеллюлярной карциномой печени

Уровень экспрессии антигенов в клетках ХЦК	Количество больных с экспрессией в опухоли, %		
	протеина p53	каспазы-3	белка Ki-67
Гиперэкспрессия	41,73		
Высокий уровень	16,66	25	22,22
Умеренный уровень	–	25	50
Низкий уровень	36,11	50	22,22

Экспрессии протеина p53 в ядрах клеток перифокальной неопухолевогой ткани нами не выявлено. Это объясняется тем, что в норме ген p53 реагирует на появление в делящейся клетке мутантной ДНК остановкой клеточного цикла и стимуляцией апоптоза, а кодируемый им белок p53 имеет короткий период полураспада и поэтому иммуногистохимическими методами не обнаруживается в здоровой ткани. При мутации гена p53 в ядрах опухолевых клеток накапливается неактивный, мутантный протеин p53, определяемый иммуногистохимическими методами [12], при этом гиперэкспрессия протеина p53 свидетельствует о высокой степени инактивации онкосупрессорного гена p53 [13]. В связи с мутацией и инактивацией гена p53 падает своевременная апоптотическая элиминация опухолевых клеток с мутантной ДНК, снижается уровень их апоптоза, прекращается нормальная фенотипическая дифференцировка новых клеточных поколений в эпителий холангиол, нарастает неконтролируемая пролиферация опухолевых клеток с дефектной ДНК и прогрессирование ХЦР [6, 14].

По результатам молекулярно-генетических исследований мутация гена p53 обнаруживается в 28–61 % ХЦК [6, 13]. A. Tannapfel et al. [6] обнаружили мутацию гена p53 в ХЦК у 37 % больных (у 15 из 41 обследованных пациентов), при этом положительная экспрессия белка p53 была установлена у 14 из 15 (93,33 %) больных с мутацией гена p53 в опухоли. Согласно S.A. Geller et al. [7], экспрессия p53 определяется более чем в 60 % ХЦК. Liu Xiao-Fang et al. [13] положительную экспрессию p53 установили в 52,8 % случаев ХЦР печени. Ряд исследователей обнаруживают взаимосвязь между гиперэкспрессией протеина p53 в холангиокарциноме, плохим ее прогнозом и уменьшением выживаемости больных [15, 16]. Другие авторы не находят связи между уровнем экспрессии p53 в холангиокарциноме и неблагоприятным прогнозом заболевания [17, 18] или говорят о независимой прогностической значимости экспрессии белка p53 в дистальной (внепеченочной) холангиокарциноме [19].

На сегодняшний день доказано, что Fas-индуцированный апоптоз опухолевых клеток ХЦК реализуется активацией каспазы-3 и -8 [20, 21].

По результатам иммуногистохимических исследований было установлено, что в 50 % случаев уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками был низким, при котором в опухоли обнаруживалось (17,22±5,33) % иммунопозитивных клеток, у 25 % пациентов в опухоли выявлено (47,22±10,57) % таких клеток, что соответствует умеренному уровню экспрессии каспазы-3. Выраженный уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3, при котором в опухоли было выявлено (85,55±12,12) % иммунопозитивных клеток, отмечался в 25 % случаев ХЦК. Это подтверждает сложившееся в онкопатологии положение о том, что высокая экспрессия белка p53, обусловленная мутацией и инактивацией гена p53, сопряжена со снижением уровня апоптоза опухолевых клеток.

Маркер клеточной пролиферации Ki-67 является одним из наиболее востребованных в онкопатологии для морфологического определения степени активности злокачественного новообразования. В результате проведенных нами иммуногистохимических исследований установлено, что усредненный уровень экспрессии Ki-67 в ядрах клеток ХЦК у обследованных больных составил (2,64±1,07) балла, при этом в опухолевой ткани в среднем определялось 24,56–58,75 % клеток с иммунопозитивными ядрами, что соответствовало умеренному уровню клеточной пролиферации ХЦК. При углубленном анализе выяснилась очень большая индивидуальная вариабельность уровня пролиферации клеток ХЦК у обследованных больных. У 50 % больных уровень экспрессии Ki-67 клетками ХЦК был умеренным (составлял 2–3 балла), у 22,22 % пациентов он был высоким (составлял 4 балла), у 22,22 % – низким (1 балл), у 5,56% больных очень слабая экспрессия этого маркера была ниже порога чувствительности иммуногистохимического метода и расценивалась как негативная. В окружающей опухоль строме определялось (19,87±5,72) % клеток с Ki-67-иммунопозитивными ядрами, что соответствовало низкому уровню клеточной пролиферации – 1 балл. Аналогичные данные были получены Xiao-Ping Tan et al. [22], которые установили, что Ki-67-иммунопозитивные клетки составляли в ХЦК (58,84±15,72) % и в окружающей неопухолевогой ткани (29,63±14,52) %.

Выводы

1. В клетках холангиоцеллюлярной карциномы печени у большинства больных определяется или гиперэкспрессия ядерного белка p53 (наблюдавшаяся у 41,73 % пациентов) или высокий уровень ядерной экспрессии этого протеина (отмеченный у 16,66 % пациентов). Низкий уровень ядерной экспрессии p53 в клетках холангиоцеллюлярной карциномы печени имеет место у 36,11 % больных, у 5,5 % больных экспрессия этого белка в ядрах опухолевых клеток отсутствует.

2. В холангиоцеллюлярной карциноме у 50 % больных отмечается низкий уровень экспрессии фермента апоптотической деграда-

ции клеток каспазы-3, у 25 % пациентов – умеренный уровень цитоплазматической экспрессии каспазы-3. Высокий уровень экспрессии каспазы-3 в клетках холангиоцеллюлярной карциномы выявлен у 25 % больных.

3. В холангиоцеллюлярной карциноме преобладает умеренный уровень ядерной экспрессии Ki-67 опухолевыми клетками, выявленный у 50 % больных; у 22,22 % пациентов определяется высокий уровень экспрессии этого протеина, еще у 22,22 % больных – низкий уровень экспрессии Ki-67. У 5,56 % больных холангиоцеллюлярным раком очень слабая экспрессия Ki-67 опухолевыми клетками была ниже порога чувствительности иммуногистохимического метода.

Литература

1. Karaliotas Ch.C. Liver and Biliary Tract Surgery / Ch.C. Karaliotas, E. Broelsch, Nagy A. Habib // Springer Wien – New York, 2006. – 279 p.
2. D'Angelica Michael I. Resectable hilar cholangiocarcinoma: surgical treatment and long-term outcome / M.I. D'Angelica // Surg. Today. – 2004. – Vol. 34 (11). – P. 885–890.
3. Eckell F. Клинические рекомендации ESMO по диагностике, лечению и наблюдению при раке желчного пузыря и желчных протоков / F. Eckell, T. Brunner, S. Jelic // Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO). – М.: Изд. гр. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2010. – С. 103–109.
4. Eckell F. Biliary cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / F. Eckell, T. Brunner, S. Jelic // Ann. Oncol. – 2011. – Vol. 22 (suppl 6). – P. 40–44.
5. Хирургическое лечение первичного рака печени / Ю.Н. Патютко, И.В. Сагайдак, Е.С. Чугуев и др. // Практическая онкология. – 2008. – Т. 9, № 4. – С. 197–202.
6. Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver / A. Tannapfel, L. Weinans, F. Geissler, et al. // Digestive Diseases and Sciences. – 2002. – Vol. 45 (2). – P. 317–324.
7. Geller S.A. Primary and metastatic Malignant Tumors of the Liver / S.A. Geller, L.M. Petrovic // Biopsy Interpretation of the Liver; 2nd ed. – Lippincott Williams & Wilkins (LWW), 2009. – 416 p.
8. X. Wang Zhang J. Result of p53, Ki-67 protein expression in cholangiocarcinoma with in situ hybridization and immunohistochemistry methods / X. Wang Zhang J., Chen J. // Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. – 2000. – Vol. 22 (1). – P. 57–60.
9. Dissociated expression of Bcl-2 and Ki-67 in endometrial lesions: diagnostic and histogenetic implications / B. Risberg, K. Karlsson, V. Abeler, et al. // Int. J. Gynecol. Pathol. – 2002. – Vol. 21, № 2. – P. 155–160.
10. p21(WAF1/Cip1) protein expression in normal, hyperplastic and malignant endometrium. Correlation with hormone receptor status, C ERBB 2 oncoprotein, BCL 2 and other cell cycle related proteins (RB, p53, Ki-67, PCNA) / E. Ioachim, E. Kitsiou, A. Mitselou, et al. // Experim. Oncology. – 2003. – Vol. 25 (3). – P. 200–205.
11. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer / Jian Liu Wang, B.Y. Zheng, X.D. Li, T. Angström, et al. // Clin. Cancer Res. – 2004. – Vol. 10 (7). – P. 2407–2414.
12. Абраменко И.В. Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизации схем терапии / И.В. Абраменко, А.А. Фильченков // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49, № 1. – С. 21–30.
13. Correlation of p53 gene mutation and expression of p53 protein in cholangiocarcinoma / Xiao-Fang Liu, Zhang H., Zhu S.G., et al. // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 12 (29). – P. 4706–4709.

14. The tumor suppressor p53: cancer and aging / Z. Feng, W. Hu, G. Rajagopal, A.J. Levine // *Cell Cycle*. – 2008. – Vol. 7 (7). – P. 842–847.
15. Results of resection for hilar cholangiocarcinoma with analysis of prognostic factors / R. Havlik, E. Sbisà, A. Tullo [et al.] // *Hepatogastroenterology*. – 2000. – Vol. 47 (34). – P. 927–931.
16. p53 overexpression and K-ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer / S.A. Ahrendt, A. Rashid, J.T. Chow, et al. // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* – 2000. – Vol. 7 (4). – P. 426–31.
17. Microsatellite alterations in liver fluke related cholangiocarcinoma are associated with poor prognosis / T. Limpaboon, K. Krissadarak, B. Sripa, et al. // *Cancer Lett.* – 2002. – Vol. 181 (2). – P. 215–222.
18. 14-3-3sigma negatively regulates the cell cycle, and its down-regulation is associated with poor outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma / Y. Kuroda, S. Aishima, A. Taketomi, et al. // *Hum. Pathol.* – 2007. – Vol. 38 (7). – P. 1014–1022.
19. Distal bile duct carcinoma: prognostic factors after curative surgery. A series of 112 cases / Q. Cheng, X. Luo, B. Zhang, et al. // *Ann. Surg. Oncol.* – 2007. – Vol. 14 (3). – P. 1212–1219.
20. Apoptosis and tumorigenesis in human cholangiocarcinoma cells. Involvement of Fas/APO-1 (CD95) and calmodulin / G. Pan, S.M. Vickers, A. Pickens, et al. // *Am. J. Pathol.* – 1999. – Vol. 155 (1). – P. 193–203.
21. IFN-gamma upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma / E.Y. Ahn, G. Pan, S.M. Vickers, J.M. McDonald // *Int. J. Cancer.* – 2002. – Vol. 100 (4). – P. 445–451.
22. Upregulated expression of Mina53 in cholangiocarcinoma and its clinical significance / Xiao-Ping Tan, Qing Zhang, Wei-Guo Dong, et al. // *J. Oncology Letters.* – 2012. – Vol. 3 (5). – P. 1037–1041.

В.О. Туманський, М.Д. Зубко

ІМУНОГІСТОХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ТА АПОПТОЗУ КЛІТИН В ХОЛАНГІОЦЕЛЮЛЯРНОМУ РАКУ ПЕЧІНКИ

З метою визначення апоптотичної та проліферативної активності клітин холангіоцелюлярної карциноми (ХЦК) у трепанобіоптатах печінки 36 хворих проведено імуногістохімічне дослідження рівня експресії p53, каспази-3 та Ki-67. Встановлено, що гіперекспресія ядерного білка p53 визначалася в 41,73 % випадків, у 16,66 % випадків мав місце високий рівень цього протеїну. Низький рівень експресії p53 визначався у 36,11 % хворих на ХЦК печінки. У 5,5 % хворих на ХЦК експресія цього маркера в ядрах пухлинних клітин була відсутньою. У ХЦК переважав низький рівень цитоплазматичної експресії ферменту апоптотичної деградації клітин каспази-3, виявлений у 50 % хворих. Помірний і високий рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 був виявлений у рівній кількості пацієнтів – по 25 %. У той же час у пацієнтів, у яких визначалася гіперекспресія p53, рівень експресії каспази-3 був слабким або помірним. Встановлено, що в ХЦК переважає помірний рівень експресії Ki-67, виявлений у 50 % хворих, у 22,22 % пацієнтів визначається високий рівень експресії цього протеїну, ще у 22,22 % хворих – низький рівень експресії Ki-67, і у 5,56 % хворих експресія цього маркера не визначалася.

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

V.A. Tumanskiy, M.D. Zubko

IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF PROLIFERATIVE ACTIVITY AND APOPTOSIS IN CHOLANGIOCELLULAR LIVER CANCER

To determine the apoptotic and proliferative activity of cholangiocellular carcinoma (CCC) in trephine biopsy of the liver in 36 patients the immunohistochemically level of p53, caspase-3 and Ki-67 expression were studied. There was found that in 41.73% of cases the hyperexpression of nuclear p53 protein in cells was detected, in 16.66% of cases – a high level of expression of this protein, and in 36.11% of cases – a low level of p53 expression. In CCC predominant cytoplasmic expression of low levels of enzyme degradation of apoptotic cells caspase-3 was detected in 50% of patients, moderate and high cytoplasmic expression of caspase-3 was detected in an equal number of patients – 25%. At the same time in patients with marked overexpression of p53, the expression of caspase-3 was mild or moderate. It is established that in the CCC prevailed moderate level of expression of Ki-67, which was observed in 50% of patients, in 22.22% it was high and in 22.22% of patients – it was low and in 5.56% of patients the expression of this marker has not been determined.

Key words: cholangiocellular cancer, the expression, p53, caspase-3, Ki-67.

Поступила 17.02.15