

Л.Д. Гуменюк
С.П. Меренцев

Інститут експериментальної
патології, онкології
і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України

Київська міська онкологічна
лікарня МОЗ України, Київ,
Україна

Ключові слова: рак шлунка,
гіпоксія-індукований фактор-1α
(ГІФ-1α), p53, виживаність.

ЕКСПРЕСІЯ ГІПОКСІЯ- ІНДУКОВАНОГО ФАКТОРА-1α ТА p53 У ТКАНИНІ РАКУ ШЛУНКА ЛЮДИНИ ТА ЇЇ КЛІНІЧНА ЗНАЧУЩІСТЬ

Резюме. У тканині раку шлунка (РШ) людини проведено імуногістохімічне визначення наявності експресії гіпоксія-індукованого фактора-1α (ГІФ-1α) та білка p53. Проаналізовано взаємозв'язки експресії досліджуваних білків з деякими клініко-патологічними характеристиками хворих та перебігом захворювання. Для ГІФ-1α(+)/p53(+)-пухлин характерним є нижчий ступінь диференціювання, вищий ступінь інфільтрації (категорія pT) та наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах порівняно з ГІФ-1α(-)/p53(-). Накопичення білка p53 зворотно корелює з виживаністю хворих на РШ. Одночасна експресія ГІФ-1α і p53 у пухлинах є фактором несприятливого прогнозу перебігу захворювання. Проте виживаність хворих з дуже високою експресією ГІФ-1α (>45% позитивних клітин) була кращою, порівняно з іншими ГІФ-1α позитивними групами.

ВСТУП

За питомою вагою серед основних нозологічних форм злоякісних новоутворень рак шлунка (РШ) займає друге місце в світі. Незважаючи на комбіновані підходи у лікуванні хворих на РШ, 5-річна виживаність становить лише 10–30% [1]. Україна належить до країн з високою захворюваністю на РШ [2].

Важливою характеристикою, що впливає на злоякісність та перебіг пухлинного процесу, є здатність пухлинних клітин до індукції чи супресії апоптозу. На сьогодні залишається предметом дискусії питання щодо про- та антиапоптичного впливу гіпоксії пухлин. При рості пухлини виникають ділянки дефектної мікроциркуляції, які позбавлені достатньої концентрації кисню, глюкози та інших поживних речовин. Такий дефіцит призводить до індукції апоптозу, який певною мірою зрівноважує проліферацію та обмежує ріст пухлини. Гіпоксія індукує експресію білка p53 і відповідно апоптоз іншим шляхом, ніж ДНК-пошкоджувальні агенти [3]. Хоча всі функції p53 на сьогодні остаточно не з'ясовані, відомо, що він може діяти як транскрипційний фактор для одних генів і як супресор для інших. Показана його роль у регуляції клітинної проліферації і в неопластичній пухлині [4].

Гіпоксія-індукований фактор-1α (ГІФ-1α) є головним регулятором адаптації пухлинних клітин до гіпоксичного стресу через індукцію ангіогенезу, еритропоезу, гліколізу, підтримку виживання клітини, інгібування апоптозу [5, 6].

Привертає увагу білок-білкова взаємодія ГІФ-1α та p53, яка призводить до стабілізації p53 та зниження рівня ГІФ-1α у результаті його убіквітинізації, опосередкованої MDM2 [4, 7]. Така стабілізація є певним внеском в апоптоз, опосередкований гіпоксією, який може в свою чергу призводити до селекції клонів клітин з втратою функції білка p53. Клональ-

на селекція пухлинних клітин, які здатні виживати за умов гіпоксичного мікрооточення, супроводжується зменшенням їх здатності до індукції апоптозу внаслідок мутацій p53 [4, 6, 7].

Мутації в консервативних кодонах p53 виявляють приблизно в половині різноманітних типів пухлин людини, зокрема раку товстої кишки, легені, стравоходу, шлунка, молочної залози, печінки, новоутвореннях головного мозку, пухлинах ретикулоендотеліальної та кровотворної тканини. Більше 90% виявлених мутацій стосуються структури центрального домена білка, який забезпечує його взаємодію зі специфічною послідовністю ДНК, а також відповідає за білок-білкові взаємодії [8]. Таким чином, у мутантного білка p53 не тільки втрачається транскрипційна активність, але й може зменшуватись здатність білок-білкової взаємодії з ГІФ-1α.

Наявність мутантного p53 у пухлинних клітинах позитивно корелює з прогресією і метастазуванням. Слід зазначити, що накопичення мутантного p53 зумовлює проангіогенні процеси, оскільки p53 дикого типу задіяний у стимулюванні деяких інгібіторів ангіогенезу та негативній регуляції експресії VEGF [4]. У свою чергу з накопиченням мутантного білка p53 пов'язана гіперекспресія ГІФ-1α [7], що призводить до підвищеної експресії VEGF та подальшого розвитку неоваскуляризації. Ці дані вказують на те, що інактивація білка p53 дикого типу в клітинах пухлини сприяє ангіогенезу через посилену відповідь на гіпоксію, опосередковану ГІФ-1α [4].

Особливості взаємозв'язків експресії ГІФ-1α і p53 та їх вплив на перебіг захворювання у хворих на РШ мало досліджені. Метою роботи було імуногістохімічне (ІГХ) виявлення експресії ГІФ-1α та p53 у тканині РШ, аналіз кореляції експресії досліджуваних білків з клініко-патологічними характеристиками хворих та оцінка їх прогностичного значення.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хворі. У роботі були використані операційні зразки пухлин 100 хворих (68 — чоловіків, 32 — жінок) на РШ, які попередньо не отримували протипухлинної терапії і знаходилися на лікуванні в Миській онкологічній лікарні МОЗ України (Київ). Пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях. Середній вік пацієнтів становив $61 \pm 9,6$ року (мінімальний — 31 рік, максимальний — 79). За гістологічною структурою пухлини ідентифіковані як аденокарциноми (69) та недиференційований рак (31).

ІГХ-методи. ІГХ-дослідження експресії ГПФ-1 α та p53 було проведено з використанням відповідних МкАТ на парафінових зрізах пухлинної тканини. Зрізи товщиною 4–5 мкм депарафінували у ксилолі та регідратували у серії спиртів, після чого препарати занурювали у дистильовану воду. Ендогенну пероксидазу блокували 3% водним розчином H_2O_2 . В якості субстрат-хромогену використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідроклорид (ДАБ). Після виявлення активності пероксидази препарати дофарбовували гематоксилином Мейєра протягом 2–3 хв. Експресію ГПФ-1 α виявляли, використовуючи Catalyzed Signal Amplification (CSA) system («Dako Cytomation», Denmark) та МкАТ проти ГПФ-1 α (IgG2b, клон H1alpha67-sup, «Abcam», UK) [1 : 1000]. Для ІГХ-виявлення білка p53 застосовували полімер-пероксидазний метод (EnVision+/HRP, «Dako Cytomation», Denmark). Як первинні антитіла використовували МкАТ проти p53 (IgG2b, клон DO-7, «DakoCytomation», Denmark) [1 : 50]. Для негативного контролю використовували IgG2b («Dako Cytomation», Denmark). У ролі позитивного контролю слугували МкАТ проти цитокератинів (Clone MNF116, «Dako Cytomation», Denmark). Слід зазначити, що МкАТ клоно DO-7 реагують як з білком дикого, так і мутантного типу. На відміну від білка p53 дикого типу (період напіврозпаду до 20 хв), мутантний білок p53 є більш стабільним (період напіврозпаду до 24 год), що призводить до його накопичення переважно в ядрі і можливості виявлення ІГХ-методом [10].

Оцінку результатів ІГХ-дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа (збільшення $\times 400$). Застосовували наступні критерії оцінки: пухлинні клітини класифікували як позитивні, якщо після виконання ІГХ-реакції було виявлено ядерне забарвлення; результати ІГХ-забарвлення ГПФ-1 α та p53 оцінювали напівкількісним методом: у кожному препараті підраховували ≈ 1000 клітин і визначали відсоток p53- та ГПФ-1 α -позитивних клітин; пухлину вважали негативною (–) за експресією ГПФ-1 α та p53, якщо в тканині пухлини була відсутня ядерна реакція з відповідними антитілами або кількість забарвлених клітин була $< 10\%$; і позитивною (+), якщо спостерігали ядерне забарвлення в $\geq 10\%$ пухлинних клітин.

Статистичні методи. Статистичну обробку даних проводили з використанням методів варіаційної та кореляційної статистики із застосуванням пакету

прикладних програм «STATISTICA 6.0». Для визначення наявності статистичної залежності між ознаками використовували таблиці спряженості 2×2 (χ^2).

Вживаність хворих визначали методом Kaplan — Meier, розбіжності між кривими вживаності аналізували log-rank-тестом. Результати вважали достовірними при рівні вірогідності $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Експресію ГПФ-1 α та p53, виявлену ІГХ-методом, спостерігали у ядрах клітин (рис. 1). 93% пухлин хворих на РШ були ГПФ-1 α -позитивні; у 7% відзначено відсутність експресії ГПФ-1 α . Кількість ГПФ-1 α -позитивних клітин варіювала в межах 5,1–71,5%, медіана — 26%. Негативна експресія p53(–) була встановлена у 20%, позитивна (+) — у 80% випадків. Кількість клітин, що експресували p53, варіювала від 1 до 70%, медіана — 23%.

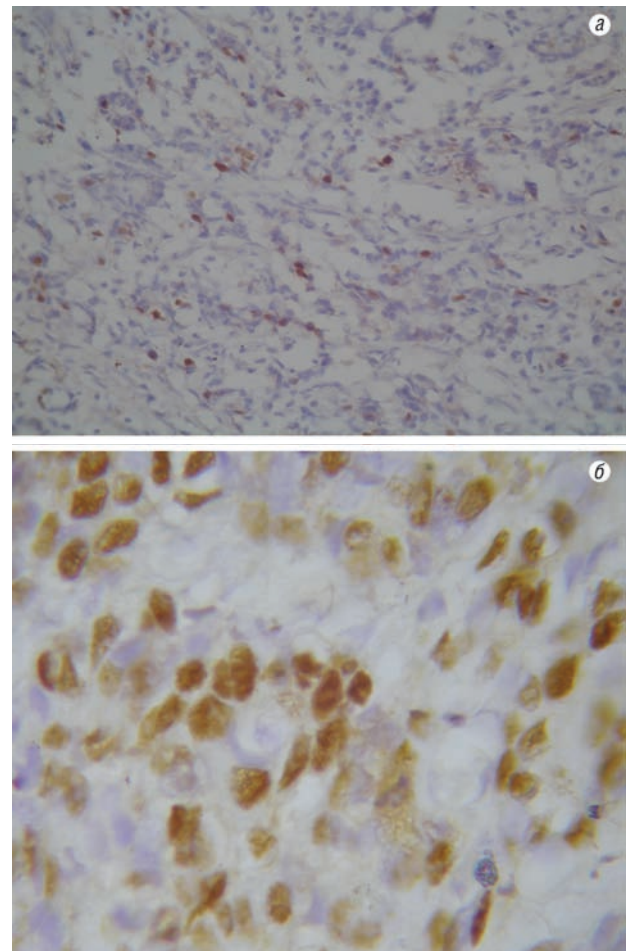


Рис. 1. Експресія і локалізація ГПФ-1 α (а) та p53 (б) у тканині РШ; а — $\times 200$, б — $\times 1000$

Для аналізу взаємозв'язків експресії досліджуваних білків з деякими клініко-патологічними характеристиками виділяли 4 групи хворих: ГПФ-1 α (–)/p53(–), ГПФ-1 α (–)/p53(+), ГПФ-1 α (+)/p53(–), ГПФ-1 α (+)/p53(+). Результати аналізу, представлені в таблиці, вказують на існування статистично значимих відмінностей за ступенем диференціювання пухлинних клітин, у яких наявна або відсутня експресія ГПФ-1 α та p53. Так, ГПФ-1 α (+)/p53(+) та ГПФ-1 α (+)/p53(–) пухлини були

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

низько- та недиференційованими (G3–4) частіше, ніж ГФ-1α(-)/p53(-)-пухлини ($p < 0,01$). Були виявлені вірогідні відмінності між групами ГФ-1α(-)/p53(-) і ГФ-1α(+)/p53(+), а за категорією рТ: за наявності експресії ГФ-1α/p53 частіше виявляли рТ2, рТ3, рТ4 ($p < 0,01$). Серед хворих з ГФ-1α(+)/p53(+)-пухлинами (на відміну від ГФ-1α(-)/p53(-)-пухлин) була більшою кількість пізніх стадій захворювання (III–IV) ($p < 0,05$). Слід зазначити також, що у хворих з ГФ-1α(+)/p53(+)-пухлинами вірогідно частіше ($p < 0,05$), ніж у хворих з ГФ-1α(-)/p53(-)-пухлинами, спостерігали метастази в регіонарних лімфатичних вузлах (pN1-2), проте не було виявлено відмінностей між цими групами за наявністю віддалених метастазів (M-категорія).

Таблиця

Експресія ГФ-1α і p53 у пухлинній тканині та деякі клініко-патологічні характеристики хворих на РШ

Показник	ГФ-1α(-)/p53(-) (n = 3)	ГФ-1α(-)/p53(+) (n = 4)	ГФ-1α(+)/p53(-) (n = 17)	ГФ-1α(+)/p53(+) (n = 76)
Вік (роки)	63,3 ± 9,1	55,8 ± 4,0	57,4 ± 10,3	62,0 ± 9,5
Стать				
жін.	0	1	7	24
чол.	3	3	10	52
Стадія рTNM				
I–II	3	3	11	29
III–IV	0	1	6	47*
Ступінь диференціювання				
G1–2	3	1	1	20
G3–4	0	3	16**	56**
рТ-категорія				
T1	1	0	3	0
T2	0	2	1	12**
T3	2	2	9	48**
T4	0	0	4	16**
рN-категорія				
N0	3	3	12	32
N1–2	0	1	5	44*
M-категорія				
M0	3	4	16	66
M1	0	0	1	10

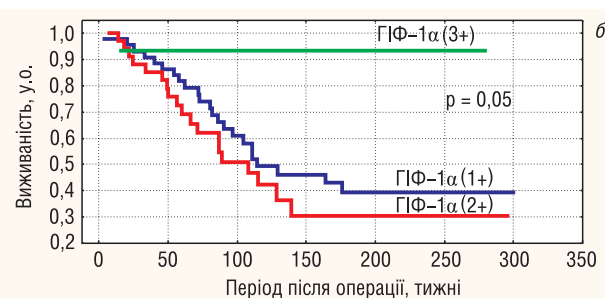
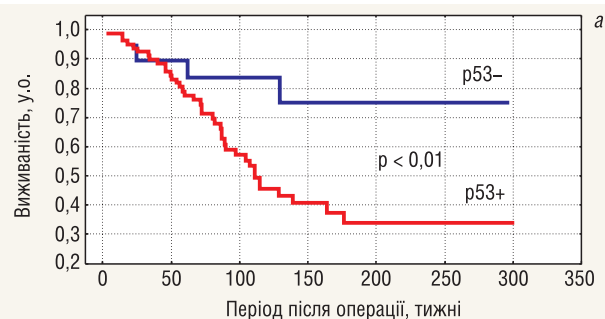
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Дані літератури щодо взаємозв'язків експресії ГФ-1α та p53 з прогнозом захворювання не є однозначними. За висновком Y. Sumiyoshi і співавторів [9] «... комбінація гіперекспресії ГФ-1α з тенденцією до нефункціональності білка p53 вказує на несприятливий прогноз». За результатами інших досліджень гіперекспресія цих білків вірогідно не була пов'язана з прогнозом [11]. При гіперекспресії p53 у ГФ-1α-позитивних пухлинах яєчника спостерігали кращу виживаність [12]. Деякі дослідники вважають, що неоднозначність і суперечливість даних літератури щодо взаємозв'язків експресії ГФ-1α, p53 та прогнозу захворювання може бути зумовлена подвійною функцією ГФ-1α, коли він, з одного боку, сприяє прогресії пухлини, з іншого — опосередковує апоптоз пухлинних клітин. Гіпоксичні пухлини з низьким апоптотичним індексом, як повідомляли, були надмірно агресивними [13, 14]. Комбінація дисфункції

білка p53 і гіперекспресії ГФ-1α, очевидно, є необхідною для сприяння прогресії пухлини внаслідок індукції внутрішньоклітинної відповіді на гіпоксію без підтримки проапоптотичних механізмів [12].

Однофакторний аналіз виживаності виявив зворотний зв'язок експресії p53 з тривалістю життя хворих: у групі хворих з p53(+)-пухлинами виживаність є вірогідно нижчою, ніж у p53(-)-групі ($p < 0,01$) (рис. 2а). При дослідженні взаємозв'язку експресії ГФ-1α і виживаності було виявлено, що в групі хворих з ГФ-1α(-)-пухлинами на момент аналізу всі пацієнти були живі, хоча показники виживаності між ГФ-1α(-) та ГФ-1α(+)-групою вірогідно не відрізнялися ($p = 0,2$). Останнє може бути зумовлене недостатньою вибіркою хворих з ГФ-1α(-)-пухлинами. Для більш детального аналізу виживаності хворих з ГФ-1α(+)-пухлинами виділяли наступні умовні рівні за кількістю ГФ-1α-позитивних клітин: 1+ (10–25% позитивних клітин), 2+ (26–45%), 3+ (> 45%). За умов такої градації спостерігається тенденція до зниження виживаності хворих при збільшенні кількості клітин, що експресують цей маркер від ГФ-1α(-) до ГФ-1α(2+) умовного рівня. Неочікуваним виявилось те, що у хворих, у пухлинах яких кількість ГФ-1α-позитивних клітин перевищує 45% (3+), виживаність є вірогідно кращою, ніж при ГФ-1α(1+) та ГФ-1α(2+) ($p < 0,05$) (рис. 2б).

Аналіз значення експресії ГФ-1α і p53 для прогнозу перебігу захворювання виявив наступні закономірності: на момент аналізу не відзначено відмінності у виживаності хворих на РШ у групах ГФ-1α(-)/p53(-) та ГФ-1α(-)/p53(+). Середня тривалість спостереження за цими хворими становила 82 ± 20 тиж (спостереження за хворими триває). Проте виживаність хворих з ГФ-1α(+)-пухлинами є вірогідно вищою в групі з ГФ-1α(+)/p53(-)-пухлинами, ніж у групі з ГФ-1α(+)/p53(+)-пухлинами ($p < 0,05$) (рис. 2в).



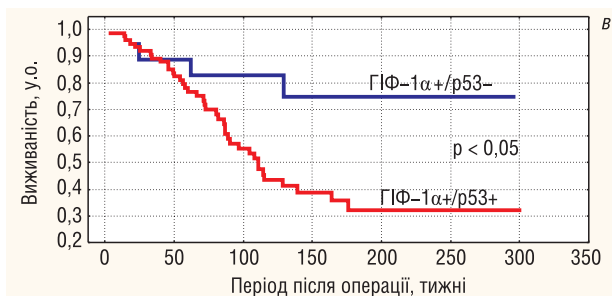


Рис. 2. Вживаність (оцінка за методом Карпан — Meier) хворих на РШ залежно від експресії p53 (а), ГІФ-1α (б), а також ГІФ-1α/p53 (в) у пухлинній тканині

ВИСНОВКИ

1. Серед хворих на РШ з ГІФ-1α(+)/p53(+)-пухлинами (порівняно з ГІФ-1α(-)/p53(-)) статистично достовірно більша частка пацієнтів з такими клініко-патологічними характеристиками, як стадія захворювання III–IV, категорія pT2, 3, 4, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах (pN1–2), низький ступінь диференціювання (G3–4).

2. Однофакторним аналізом встановлено зворотний зв'язок експресії p53 у пухлинних клітинах з вживаністю хворих на РШ.

3. На момент аналізу не відзначено смертності у групі хворих на РШ з ГІФ-1α(-)-пухлинами.

4. Вживаність хворих на РШ, у пухлинах яких кількість ГІФ-1α(+)-клітин перевищувала 45%, вірогідно вища порівняно з вживаністю пацієнтів, у яких кількість клітин, що експресують ГІФ-1α, знаходилася в межах 10–45%.

5. У групі хворих на РШ з ГІФ-1α(+)/p53(-)-пухлинами вживаність є вірогідно вищою, ніж у групі з ГІФ-1α(+)/p53(+)-пухлинами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dicken BJ, Bigam DL, Cass C, *et al.* Gastric Adenocarcinoma. Review and Considerations for Future Directions. *Ann Surg* 2005; **241** (1): 27–39.

2. Рак в Україні, 2006–2007. Захворюваність, смертність показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцерреєстру України. Київ, 2008; **9**. 96 с.

3. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M *et al.* Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen condition is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 6264–77.

4. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, *et al.* Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1α. *Gen Develop* 2000; **14** (1): 34–44.

5. Vaupel P. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *Oncologist* 2004; **5**: 10–7.

6. Осинский СП, Глузман ДФ, Клифф Й и др. Молекулярная диагностика опухолей: фундаментальные основы и практическое применение. Киев: ДІА, 2007. 248 с.

7. Zhong H, De Marco A, Laughner E, *et al.* Over-expression of hypoxia-inducible factor 1α in common human cancers and metastases. *Cancer Res* 1999; **59** (15): 5830–5.

8. Фильченков АА, Стойка РС. Апоптоз и рак. Киев: Морион, 1999. 184 с.

9. Sumiyoshi Y, Kakeji Y, Egashira A, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1α and p53 is a marker for an unfavorable prognosis in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12** (17): 5112–7.

10. Hall PA, Lance DP. p53 In tumor pathology: Can we trust immunohistochemistry? – revisited. *J Pathol* 1994; **172**: 1–4.

11. Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma. *Gastric Cancer* 2006; **9** (1): 44–9.

12. Birner P, Chindl M, Obermair A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 1661–7.

13. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relation to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res* 2000; **20**: 1527–34.

14. Hockel M, Schlenger K, Kockel S, *et al.* Hypoxic cervical cancer with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 1999; **59**: 4525–8.

EXPRESSION OF HIF-1α AND p53 IN HUMAN GASTRIC CANCER AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE

L.D. Gumenyuk, S.P. Merentsev

Summary. Expression of HIF-1α and p53 was evaluated in human gastric cancer by immunohistochemical method. The link between expression of above mentioned proteins and clinico-pathological characteristics of tumor and disease outcome were analyzed. HIF-1α(+)/p53(+) tumors were characterized by low grade of differentiation, high level of infiltration (pT) and presence of metastases in lymph nodes in comparison with HIF-1α(-)/p53(-) ones. p53 accumulation in tumor cells demonstrated reverse correlation with overall survival. Positive expression both of HIF-1α and p53 in tumor was correlated with unfavourable disease outcome. At the same time survival of patients with more higher expression of HIF-1α (>45% positive cells) was more better in comparison with other HIF-1α positive groups.

Key Words: gastric cancer, HIF-1α, p53, survival.

Адреса для листування:

Гуменюк Л.Д.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: lilia_gumenuk@mail.ru