

УДК 616.36-006

РОЛЬ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

^{1,2}Щеголев А.И., ²Мишнёв О.Д.

¹ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва;

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, e-mail: ashegolev@oparina4.ru

Проведен анализ возможностей применения иммуногистохимических маркеров для диагностики и дифференциальной диагностики гепатоцеллюлярной карциномы. Наиболее существенную помощь для подтверждения печеночно-клеточной природы новообразования оказывает иммуногистохимическое выявление альфа-фетопротейна, глипикана-3, глутаминсинтетазы и аргиназы. Указаны особенности иммуногистохимической экспрессии раково-эмбрионального антигена, цитокератинов, белка теплового шока 70 при карциноме печени. Подчеркнута особая роль маркеров кровеносных сосудов, отражающих процессы опухолевого неоваскулогенеза и коррелирующих с лучевыми характеристиками опухолей печени. Отмечена роль PCNA и Ki-67 для оценки уровня пролиферации опухолевых клеток. Сделан вывод, что иммуногистохимическое исследование закономерно считается эффективным методом патогистологического исследования, позволяющим проводить объективную диагностику гепатоцеллюлярной карциномы, дифференциальную ее диагностику с опухолеподобными изменениями и метастазами других новообразований, а также определять прогноз заболевания.

Ключевые слова: печень, гепатоцеллюлярная карцинома, диспластический узелок, иммуногистохимия

THE ROLE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY FOR THE HEPATOCELLULAR CARCINOMA DIAGNOSIS

^{1,2}Shchegolev A.I., ¹Mishnev O.D.

¹Academician V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Health of Russia, Moscow;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia,
Moscow, e-mail: ashegolev@oparina4.ru

The analysis of possibilities of application of immunohistochemical markers for the diagnosis and differential diagnosis of hepatocellular carcinoma. Immunohistochemical detection of alpha-fetoprotein, glypican-3, glutamine synthetase and arginase has the most substantial help to confirm the hepatocellular nature of neoplasms. It is shown the features of immunohistochemical expression of carcinoembryonic antigen, cytokeratins, heat shock protein 70 in carcinoma of the liver. Emphasized the special role of the blood vessel markers, which reflect the processes of tumor neoangiogenesis and are correlated with radiation characteristics of liver tumors. Highlighted the role of PCNA and Ki-67 to assess the level of proliferation of tumor cells. It is concluded that the immunohistochemical study of naturally is considered as an effective method for histopathological studies and allows an objective diagnosis of hepatocellular carcinoma, its differential diagnosis of tumor-like changes and metastases from other tumors, and to determine the prognosis of the disease.

Keywords: liver, hepatocellular carcinoma, dysplastic nodule, immunohistochemistry

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) входит в группу наиболее распространенных злокачественных опухолей с высокими показателями летальности. Самые высокие показатели заболеваемости отмечаются в странах Азии и Африки. В России на конец 2015 года на учете находилось 7360 пациентов, страдающих ГЦК, при этом летальность составила 43,6% [1]. Единственным методом, позволяющим сделать объективное заключение, определяющее тактику лечения и прогноз заболевания, является гистологическое изучение биопсийного или операционного материала. Существенную, а в ряде случаев и ведущую, роль в диа-

гностике и дифференциальной диагностике играют иммуногистохимические методы исследования [2].

Цель работы: анализ возможностей применения иммуногистохимических маркеров для диагностики и дифференциальной диагностики гепатоцеллюлярной карциномы.

Одним из первых маркеров, внедренных в практику иммуногистохимического исследования препаратов ткани печени, был альфа-фетопротейн. Последний представляет собой гликопротеин, который образуется в тканях (преимущественно в печени, кишечнике и желточном мешке) при развитии эмбриона и плода. В этой связи

в нормальной ткани печени взрослого человека альфа-фетопротеин не определяется. Наряду с этим альфа-фетопротеин является достаточно специфичным маркером гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). По данным литературы [16], положительная цитоплазматическая иммуногистохимическая реакция с альфа-фетопротеином отмечается в 25–40% наблюдений ГЦК, имея нередко при этом очаговый характер. То есть данный иммуногистохимический маркер характеризуется относительно низкой чувствительностью, особенно при низкодифференцированных формах ГЦК. Вместе с тем, определение уровня альфа-фетопротеина в сыворотке крови считается эффективным методом для диагностики и контроля эффективности лечения ГЦК.

Большинство опухолевых клеток, представляющих аденокарциномы, характеризуются диффузной цитоплазматической реакцией с поликлональным раково-эмбриональным антигеном (пРЭА). Поскольку в состав пРЭА наряду с белками входит и билиарный гликопротеин, то иммуногистохимическая картина пРЭА в ткани ГЦК носит специфический характер в виде так называемой мелкой проводочной сетки курятника («chicken-wire fence»). Такая типичная картина канальцев отмечается в 60–90% наблюдений высоко- и умереннодифференцированных ГЦК и в 25–50% – низкодифференцированных форм [16, 21]. К сожалению, примерно в половине анализируемых препаратов наблюдается и цитоплазматическое окрашивание опухолевых клеток, что затрудняет проведение дифференциальной диагностики с метастатическими аденокарциномами. При этом моноклональный РЭА в ткани ГЦК не выявляется.

Для подтверждения эпителиальной природы новообразования используются различные цитокератины (ЦК). При этом нормальные и опухолевые гепатоциты характеризуются положительной реакцией на ЦК 8 и 18, в то время как реакция на ЦК 7, 19 и 20 – отрицательная [16, 19]. В этой связи реакция на цитокератины используется для дифференциальной диагностики ГЦК как от метастазов, так и предопухолевых гепатоцеллюлярных поражений [9]. Действительно, в качестве дифференциально-диагностического признака диспластических узелков высокой степени и ранней ГЦК на фоне цирроза печени используется оценка стромальной инвазии, характерная для ГЦК. В качестве уточняющего метода рекомендуется иммуногистохимическое выявление ЦК 7 и 19: наличие положительной реакции в протоках свиде-

тельствует о псевдоинвазии и не требует верификации ГЦК [10].

Высококочувствительным и высокоспецифичным маркером печеночно-клеточной дифференцировки является антитело HerPar-1, реагирующее с ферментом цикла мочевины карбамил фосфат-синтазой митохондрий печени. В этой связи на иммуногистохимических препаратах положительная реакция проявляется в виде зерен в цитоплазме нормальных и опухолевых гепатоцитов. К сожалению, HerPar-1 не является патогномичным показателем гепатоцитов, поскольку он также реагирует с митохондриями эпителия канальцев почек и кишечного эпителия. Тем не менее, HerPar-1 признан наиболее адекватным маркером ГЦК печени, так как его экспрессия определяется у 80–90% больных. При этом интенсивность окрашивания ослабевает по мере снижения степени дифференцировки карциномы, а в ткани низкодифференцированной и скirrosной ГЦК может даже не определяться [16]. Кроме того, положительная очаговая реакция HerPar-1 может наблюдаться при карциноме легкого, пищевода, желудка, толстой кишки, желчного пузыря, шейки матки, надпочечника, а также в ткани меланомы и параганглиомы [17].

Другим маркером печеночно-клеточной дифференцировки является аргиназа (ARG1), катализирующая расщепление аргинина на орнитин и мочевину. Иммуногистохимическими методами определяется в ядре и цитоплазме клеток. По мнению В.С. Yan с соавт. [24], ARG1 обладает большей чувствительностью и специфичностью по сравнению с HerPar-1, особенно при анализе низкодифференцированной ГЦК. Однако имеются указания, что ARG1 может также выявляться в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы.

В последнее время для дифференциальной диагностики ГЦК все чаще стали использовать глипикан-3 (GPC3), представителя семейства гепаран-сульфат протеогликанов, сцепленных с клеточной поверхностью при помощи фосфатидилинозитолового якоря. Глипикан-3 определяется в плаценте и печени плода, участвуя в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток. В нормальных гепатоцитах печени взрослого человека не определяется. В то же время в ткани ГЦК глипикан-3 выявляется преимущественно в виде цитоплазматического и иногда мембранного или канальцевого окрашивания: в 69% наблюдений высокодифференцированных и в 81% – умерен-

но дифференцированных форм [13]. Важным моментом является то, что глипикан-3 характеризуется большей чувствительностью по сравнению с HerPac-1 в ткани низкокодифференцированной ГЦК [16]. По данным D. Baumhoer с соавт. [11], положительная экспрессия глипикана-3 наблюдается и в отдельных диспластических узелках высокой степени, что свидетельствует об их предопухоловой природе. Наряду с этим, реакция на глипикан-3 отсутствует в ткани гепатоцеллюлярной аденомы, очаговой узловой гиперплазии и при циррозе печени. К отрицательным моментам следует отнести отдельные случаи отрицательной реакции в наблюдениях высококодифференцированной ГЦК и, наоборот, положительной реакции в ткани меланомы, карциномы желудка, плоскоклеточной карциномы легкого и герминогенных опухолей (хориокарциномы и опухолей желточного мешка) [16].

Еще одним маркером ГЦК является так называемый белок теплового шока 70 (HSP70), входящий в семейство белков теплового шока и имеющий молекулярную массу 70 кДа. Данные белки действуют как внутриклеточные шапероны, а также обладают выраженным антиапоптотическим эффектом [15]. При иммуногистохимическом исследовании HSP70 характеризуется ядерной и цитоплазматической реакцией и отмечается в 78% наблюдений высококодифференцированной и в 67% – умеренно и низкокодифференцированной ГЦК. Кроме того, он обнаруживался в 5% диспластических узелков высокой степени и отсутствовал в диспластических узелках низкой степени [13]. E. Shin с соавт. [23] показали высокую корреляцию выраженной экспрессией HSP70 с размерами ГЦК, степенью гистологической дифференцировки и наличием сосудистой инвазии. Примечательно, что положительная реакция с HSP70 наблюдается и в эпителии желчных протоков, что рекомендуется использовать в качестве внутреннего контроля постановки реакций [13].

Основной функцией глутаминсинтетазы считается участие в детоксикации аммиака. В то же время ген глутаминсинтетазы активируется в результате ядерной транслокации бета-катенина. Видимо, именно поэтому в клетках бета-катенин-активированной гепатоцеллюлярной аденомы отмечается диффузная реакция глутаминсинтетазы. И это, видимо, также является основным фактором повышенного риска злокачественной трансформации данного типа гепатоцеллюлярных аденом. В нормальной же ткани печени положительная

реакция глутаминсинтетазы наблюдается лишь в первом и втором слое гепатоцитов, окружающих терминальную печеночную венулу [12]. Развитие и прогрессирование ГЦК сопровождается увеличением частоты иммуногистохимического выявления глутаминсинтетазы в виде диффузной цитоплазматической окраски. Так, глутаминсинтетаза определяется в 14% диспластических узелков высокой степени, в 59% наблюдений высококодифференцированной и в 86% умеренно дифференцированной ГЦК [13].

Особую роль среди иммуногистохимических показателей ГЦК занимают маркеры кровеносных сосудов, поскольку наряду с диагностическими возможностями они могут использоваться и в качестве факторов прогноза. Действительно, многошаговый гепатоканцерогенез от предракового поражения до инвазивной формы опухоли сопровождается изменениями, как в структуре сосудов, так и ее кровоснабжении [6]. Так, по данным иммуногистохимического исследования эндотелиоциты нормальных синусоидов и при циррозе печени характеризуются отрицательной реакцией с антителами CD31 и CD34, в то время как эндотелиальные клетки сосудов в ткани диспластических узелков и ГЦК имеют положительную экспрессию данных маркеров. То есть реакцию с CD34 не рекомендуется использовать для дифференциальной диагностики диспластических узелков и ранней ГЦК.

Прогрессирующие процессы капилляризации синусоидов взаимосвязаны и со степенью злокачественности новообразования. В участках высококодифференцированной ГЦК встречаются как обычные синусоиды, так и микрососуды капиллярного типа, а при низкокодифференцированной форме – только капилляры [7]. При этом синусоиды в высококодифференцированной ГЦК характеризуются неполной капилляризацией: положительные реакции на CD34 и ламинин являются слабыми и только местами. В процессе дедифференцировки отмечается увеличение площади участков с CD34-положительной реакцией и развитие признаков полной капилляризации, как это отмечается в умеренно-дифференцированном ГЦК. Согласно проведенным нами исследованиям [8], морфологические показатели васкуляризации ткани ГЦК зависят от размера узлов и степени гистологической дифференцировки. Максимальные значения количества и суммарной площади сечения CD34-положительных сосудов установлены в новообразованиях диаметром не более 5 см,

а наименьшие – в опухолях размером более 10 см. Наибольшие значения показателя васкуляризации выявлены в ткани высоко дифференцированной ГЦК, а наименьшие – в наблюдениях низкодифференцированных карцином.

Следует также добавить, что изменения неоангиогенеза отражаются и на лучевых характеристиках образований: диспластические узелки обычно выглядят как изо- или гиповаскулярные участки, ГЦК же имеет характеристики гиперваскулярности в артериальную фазу исследования [14]. При этом лучевые характеристики выраженной ГЦК зависят также от размеров опухолевого узла [5] и степени гистологической дифференцировки [3, 4].

Важным моментом морфологического изучения ткани опухоли является оценка степени пролиферации ее клеток. К основным иммуногистохимическим маркерам, используемым для определения индексов пролиферации, относятся PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток) и Ki-67, которые определяются в ядрах пролиферирующих клеток. При этом Ki-67 не экспрессируется в фазу G0. При иммуногистохимическом анализе PCNA положительных клеток было показано прогрессирующее увеличение их количества в ряду, отражающим этапы гепатоканцерогенеза: регенеративные узелки ($2,6 \pm 1,35$), диспластические узелки низкой степени ($15,3 \pm 10,5$), диспластические узелки высокой степени ($25,4 \pm 5,25$), маленькая ГЦК ($34,9 \pm 15,7$) [22]. Дальнейшее прогрессирование ГЦК (стадия I – IV) тоже сопровождается с увеличением количества Ki-67 положительных клеток [20]. При этом на основании проведенного мета-анализа Y. Luo с соавт. [18] установили, что более высокие значения индекса пролиферации клеток (по Ki-67) сочетаются не только с более высокой степенью злокачественности, но и с большими размерами и количеством узлов, наличием сосудистой инвазии и метастазов.

Характеризуя иммуногистохимические маркеры, применяемые для верификации ГЦК, необходимо добавить, что эффективность такой диагностики повышается при использовании несколько антител. Как мы уже указывали, чувствительность и специфичность глутаминсинтетазы при диагностике высоко дифференцированной ГЦК составляет 59% и 86% соответственно, глипикана-3 – 69% и 91%, белка теплового шока 70–78% и 95% соответственно. Использование же двух из трех этих антител повышало чувствительность до 72% и специфичность

до 100%. Наиболее эффективным, по мнению [13], является применение белка теплового шока 70 и глипикана-3.

Таким образом, иммуногистохимическое исследование закономерно считается эффективным методом патогистологического исследования, позволяющим проводить объективную диагностику гепатоцеллюлярной карциномы, дифференциальную ее диагностику с опухолеподобными изменениями и метастазами других новообразований, а также определять прогноз заболевания.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016.
2. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – Казань, 2012.
3. Туманова У.Н., Кармазановский Г.Г., Дубова Е.А., Щеголев А.И. Сравнительный анализ степени васкуляризации гепатоцеллюлярного рака и очаговой узловой гиперплазии печени по данным компьютерно-томографического и морфологического исследований // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 12. – С. 9–15.
4. Туманова У.Н., Кармазановский Г.Г., Щеголев А.И. Денситометрические характеристики гепатоцеллюлярного рака при спиральной компьютерной томографии // Медицинская визуализация. – 2012. – № 6. – С. 42–49.
5. Туманова У.Н., Кармазановский Г.Г., Яшина Н.И., Щеголев А.И. Диагностическая значимость компьютерно-томографических характеристик узлов гепатоцеллюлярного рака в зависимости от размера // REJR. – 2016. – Т. 6. № 4. – С. 44–55.
6. Туманова У.Н., Щеголев А.И. Ангиогенез при гепатоцеллюлярном раке // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. № 2. – С. 164–176.
7. Туманова У.Н., Щеголев А.И. Васкуляризация гепатоцеллюлярного рака // Архив патологии. – 2015. – № 2. – С. 50–55.
8. Щеголев А.И., Дубова Е.А., Туманова У.Н. Васкуляризация ткани гепатоцеллюлярного рака зависит от степени его дифференцировки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – № 4. – С. 480–484.
9. Щеголев А.И., Мишнев О.Д. Онкоморфология печени. – М.: Издательство РГМУ, 2006.
10. Щеголев А.И., Туманова У.Н., Мишнев О.Д. Классификация и морфологическая характеристика гепатоцеллюлярных узелковых поражений печени // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 1–1. – С. 71–75.
11. Baumhoer D., Tornillo L., Stadlmann S. et al. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples // Am. J. Clin. Pathol. – 2008. – V. 129. – P. 899–906.
12. Bioulac-Sage P., Balabaud C., Zucman-Rossi J. Subtype classification of hepatocellular adenoma // Dig. Surg. – 2010. – V. 27. – P. 39–45.
13. Di Tommaso L., Franchi G., Park Y.N. et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis // Hepatology. – 2007. – V. 45. – P. 725–734.
14. Hytiroglou P., Park Y.N., Krinsky G., Theise N.D. Hepatic precancerous lesions and small hepatocellular car-

cinoma // *Gastroenterol. Clin. North. Am.* – 2007. – V. 36. – P. 867–887.

15. Jolly C., Morimoto R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2000. – V. 92. – P. 1564–1572.

16. Kakar S., Gown A.M., Goodman Z.D. et al. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: hepatocellular carcinoma versus metastatic neoplasms // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2007. – V. 131. – P. 1648–1654.

17. Krishna M. Diagnosis of metastatic neoplasms: an immunohistochemical approach // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2010. – V. 134. – P. 207–215.

18. Luo Y., Ren F., Liu Y. et al. Clinicopathological and prognostic significance of high Ki-67 labeling index in hepatocellular carcinoma patients: a meta-analysis // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. V. 8. – P. 10235–10247.

19. Maeda T., Kajiyama K., Adachi E. The expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in primary and metastatic carcinomas of the liver // *Mod. Pathol.* – 1996. – V. 9. – P. 901–909.

20. Mohamed W.S., Omar M.M., Khayri T.M., Fakhr I.M. Assessment of the pro-liferative marker Ki-67 and p53 protein expression in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma cases in Egypt // *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. – 2008. – V. 2. – P. 27–34.

21. Morrison C., Marsh W.Jr., Frankel W.L. A comparison of CD10 to pCEA, MOC-31, and hepatocyte for the distinction of malignant tumors in the liver // *Mod. Pathol.* – 2002. – V. 15. – P. 1279–1287.

22. Park Y.N., Chae K.J., Kim Y.B. et al. Apoptosis and proliferation in hepatocarcinogenesis related to cirrhosis // *Cancer*. 2001. – V. 92. – P. 2733–2738.

23. Shin E., Ryu H.S., Kim S.H. et al. The clinicopathological significance of heat shock protein 70 and glutamine synthetase expression in hepatocellular carcinoma // *J. Hepatobiliary. Pancreat. Sci.* – 2011. – V. 18. – P. 544–550.

24. Yan B.C., Gong C., Song J. et al. Arginase-1: a new immunohistochemical marker of hepatocytes and hepatocellular neoplasms // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2010. – V. 34. – P. 1147–1154.