

ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ p53 И Ki-67 ПРИ HBV-АССОЦИИРОВАННОЙ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ: КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ¹

© 2021 г. Z. Heidari^{a, b}, B. Moudi^{a, b, *}, H. Mahmoudzadeh-Sagheb^{a, b}

^aInfectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Resistant Tuberculosis Institute, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743111 Iran

^bDepartment of Histology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743463 Iran

*e-mail: bita.moudi@yahoo.com

Поступила в редакцию 02.05.2020 г.

После доработки 27.07.2020 г.

Принята к публикации 05.08.2020 г.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), развивающаяся на фоне хронической инфекции вируса гепатита В (HBV), — широко распространенное в мире злокачественное заболевание печени, имеющее неблагоприятный прогноз. Для успешного лечения ГЦК необходима точная диагностика. Целью исследования была оценка взаимосвязи между уровнями экспрессии определенных молекулярных маркеров и диагнозом ГЦК в образцах ткани больных из Ирана. Проанализированы уровни экспрессии генов и белков p53 и Ki-67 в тканях печени 121 пациента с ГЦК и/или HBV, а также 30 здоровых доноров. Для этого использованы методы количественной ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии. Выявлены повышенные уровни экспрессии как p53, так и Ki-67 у пациентов с ГЦК на фоне хронической HBV-инфекции по сравнению с пациентами только с HBV, что указывает на наличие связи между уровнями экспрессии p53 и Ki-67 и диагнозом ГЦК. Показано, что как прогностический маркер для диагностики ГЦК уровень экспрессии p53 — более достоверный и чувствительный параметр, чем Ki-67 (чувствительность и специфичность составили для p53 77.3 и 76.4% и для Ki-67 51.0 и 97.9%). Диагностическая панель с двумя позитивными маркерами имела более высокую специфичность и сопоставимую чувствительность с панелями, оценивающими экспрессию только из этих маркеров (чувствительность и специфичность соответствовали 94.8 и 97.9% для двух положительных маркеров и 96.5 и 86.4% для одного положительного маркера). В целом, комбинированный анализ экспрессии p53 и Ki-67 позволяет повысить специфичность и чувствительность диагностики HBV-ассоциированной ГЦК до приемлемого уровня.

Ключевые слова: p53, Ki-67, гепатоцеллюлярная карцинома, иммуногистохимия, ПЦР в реальном времени

DOI: 10.31857/S0026898421030083

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) широко распространена в мире и является злокачественным новообразованием печени с неблагоприятным прогнозом [1]. Это онкологическое заболевание обычно диагностируют поздно — когда ответ пациента на лечение и шансы на выживание низкие.

Хронические заболевания печени считаются основными причинами развития ГЦК и одной из важнейших причин смерти от рака [1]. Хронические вирусные инфекции, такие как вирус гепа-

тита В (HBV) и С (HCV), могут провоцировать развитие ГЦК через многоступенчатые механизмы канцерогенеза. ДНК HBV может интегрироваться в геном хозяина и вызывать хромосомные перестройки и мутации [2]. Также при ГЦК воспалительные клетки вызывают окислительный стресс и хроническое повреждение печени, что приводит к образованию опухолей и канцерогенезу в гепатоцитах [3–5]. HBV-инфекция имеет две формы: острую и хроническую [6]. Хроническая форма может привести к развитию тяжелых заболеваний, таких как цирроз печени и ГЦК [7].

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

Сокращения: HBV (hepatitis B virus) — вирус гепатита В; HCV (hepatitis C virus) — вирус гепатита С; ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома.

По меньшей мере 200 млн. человек в мире страдает хронической HBV-инфекцией и почти две трети из них проживает в Азии. Двадцать пять процентов этих пациентов обычно умирает от HBV-ассоциированного онкологического заболевания [8, 9].

На процесс канцерогенеза сильно влияет пролиферация клеток [10]. Экспрессия гена *TP53*, кодирующего белок p53, как онкосупрессора гепатоканцерогенеза достаточно хорошо изучена [11]. Белок p53 контролирует репарацию ДНК, пролиферацию клеток и апоптоз [12], а его мутации могут приводить к образованию и прогрессии опухоли [13]. Действительно, p53 дикого типа (wt) – онкосупрессор, тогда как у мутированной формы доминируют онкогенные свойства. Белок wt-p53 характеризуется низким уровнем экспрессии и имеет короткий период полужизни, что затрудняет его детекцию иммуногистохимическими методами в нормальных условиях [14]. Ряд стрессовых факторов может повышать продукцию и стабильность wt-p53 или синтез мутантной формы p53 с более длительным периодом полужизни. В этих условиях облегчается детекция белка методом иммуноокрашивания [15]. Мутации в гене *TP53* обнаружены в тканях ГЦК человека [16]. Частота выявления этих мутаций коррелирует с определенными факторами, такими как географические, а также гистологическим классом и размером опухоли [16]. В тоже время повышенная продукция белка p53 у пациентов с ГЦК не всегда связана с наличием мутаций [17]. Однако рак, связанный с дефицитом p53, чрезвычайно агрессивен и летален и, к сожалению, не поддается химиотерапии [18].

Белок Ki-67 представляет собой ядерный антиген и молекулярный маркер пролиферации раковых клеток. Этот белок детектируют на всех фазах клеточного цикла [19]. Его экспрессию (ген *MKI67*) исследуют при изучении пролиферации злокачественных опухолевых клеток и используют как прогностический маркер при раке простаты, молочной железы, легкого [20] и колоректальной аденокарциноме [10, 11]. Однако уровень экспрессии Ki-67 не имеет прогностического значения при раке шейки матки [20] и раке поджелудочной железы [21]. Обнаружено, что экспрессия Ki-67 при ГЦК и раннем рецидиве заболевания коррелирует со скоростью роста опухоли [22, 23]. Следовательно, он может быть ценным маркером при изучении регенерации печени, процессов канцерогенеза и естественного течения ГЦК.

Целью исследования была оценка взаимосвязи между паттернами экспрессии молекулярных маркеров p53 и Ki-67 и наличием HBV-ассоциированной гепатоцеллюлярной карциномы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. Свежие биоптаты печени были получены от 121 пациента из Ирана, в том числе 40 пациентов только с хронической HBV-инфекцией, 41 пациент с ГЦК на ранних стадиях в отсутствие HBV-инфекции (единичная опухоль <5 см без сосудистой инвазии), 40 пациентов с ГЦК на фоне HBV-инфекции и 30 здоровых волонтеров с нормальным уровнем АЛТ и отсутствием в анамнезе ГЦК, HBV- и HCV-инфекции. Образцы ткани печени были собраны в двух больницах Ирана (Namazi Hospital и Shaheed Labbafinezhad Hospital) в период с сентября 2015 г. по май 2016 г. Каждый образец делили на две части. Одну часть образца замораживали при -80°C для проведения молекулярно-генетического исследования, а другую хранили в растворе формалина для проведения иммуногистохимического анализа. Гистологический диагноз ГЦК был поставлен в соответствии с международными критериями [24]. У всех пациентов с HBV был выявлен HBsAg. Исследование проведено в Захеданском университете медицинских наук (Zahedan University of Medical Sciences; ZAUMS) после получения информированного согласия от всех участников. Комитет по этике ZAUMS одобрил исследование (№ 7262).

Количественная ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили по методике, описанной нами ранее [25]. Экстрагированную РНК замораживали при -80°C для дальнейшего молекулярного анализа. После количественной и качественной оценки препарат выделенной РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора для двухэтапной ОТ-ПЦР (“Vivantis Technologies”, Малайзия), как описано ранее [25]. В табл. 1 приведены последовательности праймеров, использованных для оценки уровней экспрессии генов-мишеней (*TP53* и *MKI67*) и контрольного гена (*GAPDH*).

Метод $2^{-\text{Ct}}$ [26] использовали для определения относительного количества копий и подсчета экспрессии гена по сравнению с контролем. Каждую реакцию проводили в двух технических повторях, и для каждого образца рассчитывали значение $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Имуногистохимическое исследование. Депарфинизированные срезы гидратировали в серии градиентных растворов этанола. Раствор H_2O_2 использовали для дезактивации эндогенной пероксидазы. Для демаскировки антигена использовали автоклавирование и обработку Na-цитратным буфером (10 мМ) при 120°C в течение 20 мин. Иммуноокрашивание проводили моноклональными антителами к p53 и Ki-67 (NCL-L-p53-DO7 и NCL-L-Ki-67-MM1; “Leica Biosystems”, США), как описано ранее [25, 27]. Образцы рака толстой кишки и ткань аппендикса использовали в качестве положительного контроля экспрессии p53 и Ki-67 соответственно. Предметные стекла были

закодированы. Рассчитывали интенсивность окрашивания, процент положительных клеток и затем уровни экспрессии биомаркеров. Двумя экспертами-гистологами на основе интенсивности окрашивания и процента положительных клеток на слайдах были получены индексы биомаркеров (biomarker labeling indices). При этом на каждом срезе случайным образом выбирали 10 полей (в среднем 500 гепатоцитов). Картина окрашивания для p53 и Ki-67 свидетельствовала о ядерной локализации белков. В серию срезов всегда включали внешние положительные контроли. Положительные клетки подсчитывали в последовательных полях с большим увеличением ($\times 400$) и результаты выражали как среднее число положительных клеток на площадь поверхности. Плотность окрашивания оценивали следующим образом: отсутствие окрашивания или менее 5% окрашенных клеток, слабое окрашивание (менее 5–25%), умеренное (25–75%) и сильное (более 75%) [28]. Интенсивность окрашивания оценивали от 0 до 3 (0 – отсутствие, 1 – слабое, 2 – умеренное и 3 – сильное).

Статистический анализ. В исследовании использовали программный пакет SPSS 20. Расчеты выполняли с помощью непараметрических методов Манна–Уитни, точного теста Фишера, однофакторного дисперсионного анализа, апостериорных критериев Бонферрони и критерия χ^2 с учетом $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемая группа состояла из 30 здоровых индивидов (контрольная группа, С) и 121 пациента (только инфекция HBV – 40, только ГЦК – 41, ГЦК на фоне HBV – 40). Демографические и клинические данные 4 групп представлены в табл. 2. Значительные различия между четырьмя группами по возрасту и полу отсутствовали ($P > 0.05$).

С целью определить взаимосвязь между биомаркерами p53 и Ki-67 и ГЦК мы изучили их экспрессию в четырех группах пациентов. Между группами наблюдались значительные различия (рис. 1 и 2). У пациентов с HBV, ГЦК и ГЦК на фоне HBV (HBV+ГЦК) выявлены более высокие уровни относительной экспрессии гена *TP53* по сравнению с контрольной группой (4.50 ± 1.24 , 6.10 ± 1.34 , 11.00 ± 1.42 , 1.00 ± 1.22 соответственно; $P < 0.001$). В частности, пациенты с ГЦК на фоне HBV имели повышенные уровни экспрессии *TP53* по сравнению с пациентами с хронической инфекцией HBV ($P < 0.001$). Более того, у пациентов с HBV, ГЦК и ГЦК на фоне HBV зарегистрированы повышенные относительные уровни экспрессии гена *MKI67* по сравнению с контрольной группой (1.26 ± 0.34 , 1.42 ± 0.63 , 1.87 ± 0.94 , 1.00 ± 0.32 соответственно; $P < 0.001$). Кроме того, у пациентов с ГЦК на фоне HBV выявлены более высокие уровни экспрессии гена *MKI67* чем у пациентов, инфицированных HBV ($P < 0.001$).

Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии биомаркеров в четырех группах приведены в табл. 3. В этом исследовании положительными считали образцы, где была выявлена ядерная локализация p53 и Ki-67. У пациентов с HBV+ГЦК экспрессия p53 и Ki-67 была значительно выше, чем у пациентов, инфицированных HBV, или больных ГЦК другой этиологии.

На рисунках 3а–3г и 4а–4г показаны результаты иммуногистохимического исследования. У пациентов с HBV+ГЦК экспрессия биомаркеров (как p53, так и Ki-67) была значительно выше, чем у пациентов, инфицированных HBV, или больных ГЦК, образовавшейся в отсутствие вирусной инфекции.

Результаты по специфичности и чувствительности обнаружения ГЦК с использованием комбинации двух положительных биомаркеров приведены в табл. 4. Когда хотя бы один маркер был по-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Ген	Последовательность ^a , 5' → 3'	Размер ампликона, п.о.
<i>MKI67</i>	F: TGAACCTGCGGAAGAGCTGAA	102
	R: GAGCGCAGGGATATCCCTTA	
	P: GACATGAAAACCAACAAAGAGGAAC	
<i>TP53</i>	F: TGTAACAGTTCCTGCATGGGC	121
	R: GACAGGCACAAACACGCACC	
	P: CGGAGGCCCATCCTCACCATC	
<i>GAPDH</i> (внутренний контроль)	F: CATGAGAAGTATGACAACAGCC	70
	R: GGGGTGCTAAGCAGTTGGTG	
	P: CATCAGCAATGCCTCCTGCACC	

^a Обозначения: F – прямой праймер, R – обратный праймер, P – зонд.

Таблица 2. Демографические и клинические данные

Параметры	C, N (%) ^a	HBV, N (%)	ГЦК, N (%)	HBV+ГЦК, N (%)	P/F ^b
Возраст (лет)					
Средний возраст	33.00 ± 6.22	53.85 ± 9.58	55.44 ± 10.31	57.13 ± 9.82	0.161/1.740
Диапазон возрастов	37–61	31–71	30–72	37–72	
(медиана)	(51.50)	(58)	(56)	(59)	
Пол					
М	24 (80.0)	28 (70.0)	32 (78.0)	29 (72.5)	0.738/0.413
Ж	6 (20.0)	12 (30.0)	9 (22.0)	11 (27.5)	
Гепатоцеллюлярная карцинома					
Высоко- или умереннодифференцированная	–	–	37 (90.2)	35 (87.5)	
Низкодифференцированная			4 (9.8)	5 (12.5)	
Гистологическая степень злокачественности ГЦК:					
Ранняя	–	–	39 (95.1)	38 (95.0)	
G1			1 (2.4)	2 (5.0)	
G2–G3			1 (2.4)	0	
Билирубин (мкМ)	15.43 ± 5.65	18.76 ± 6.75	28.45 ± 12.24	33.10 ± 11.77	
АЛТ (У/л)	26.23 ± 10.90	45.76 ± 32.03	88.25 ± 95.32	117.76 ± 102.54	
α-Фетопротеин (нг/мл)	2.12 ± 1.14	3.12 ± 2.79	421.21 ± 104.33	534.54 ± 420.76	
Уровень ДНК HBV в сыворотке (среднее, Ig(IU/мл) (1SD)^c	–	7.6 ± 0.8	–	7.8 ± 0.1	
HBsAg-позитивные	–	40 (100.0)	–	40 (100.0)	
HBeAg-позитивные	–	12 (30.0)	–	15 (37.5)	

^aЗдесь и далее: N (%) – число человек в группе (процент от общего числа в группе). ^bP – p-value; F – число степеней свободы. ^c1SD относится к Первому международному стандарту ВОЗ.

Таблица 3. Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов ткани печени пациентов антителами к биомаркерам

Группа	Число образцов	p53-положительные клетки (среднее ± SEM)	P ^a	Ki-67-положительные клетки (среднее ± SEM)	P ^a
C	30	1.43 ± 0.62	<0.001	9.26 ± 2.06	<0.001
HBV	40	3.75 ± 1.23		10.85 ± 1.90	
ГЦК	41	5.07 ± 1.48		12.21 ± 1.86	
HBV + ГЦК	40	8.20 ± 2.54 ^a		16.02 ± 1.87 ^a	

^aP < 0.001 по сравнению с контрольной группой C и группами HBV и ГЦК. Коррекция Бонферрони. P_{BC} < 0.001.

ложительным, независимо от того, какой именно, чувствительность, специфичность, а также положительное и отрицательное прогностические значения составляли 96.5, 86.4, 90.0 и 94.5% соответственно. Когда оба маркера были положи-

тельными, эти показатели соответствовали 94.8, 97.9, 96.3 и 56.9%. Таким образом, специфичность и положительное прогностическое значение этой комбинации были заметно выше. Это значит, что комбинация из двух маркеров способ-

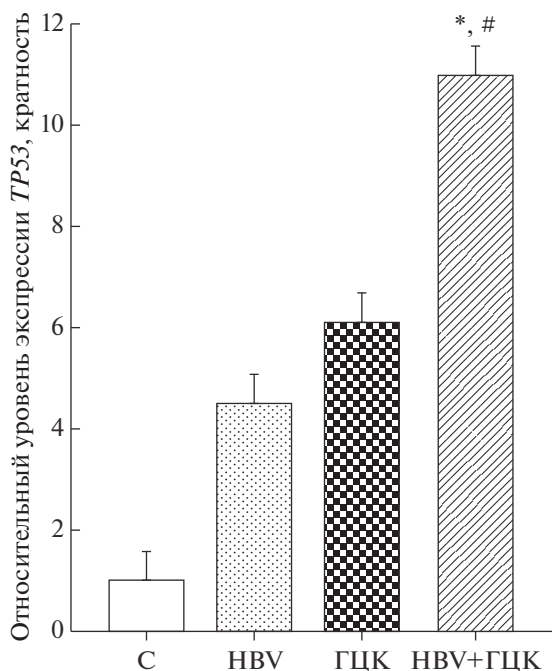


Рис. 1. Относительная экспрессия мРНК p53. Между группами наблюдались существенные различия. У пациентов с ГЦК на фоне HBV-инфекции (HBV+ГЦК) уровень экспрессии *TP53* повышен по сравнению с HBV-инфицированными пациентами и контрольной группой (С). Уровень экспрессии *TP53* в контрольной группе принят за единицу. # $P < 0.001$ по сравнению с контрольной группой; * $P < 0.001$ по сравнению с группой HBV.

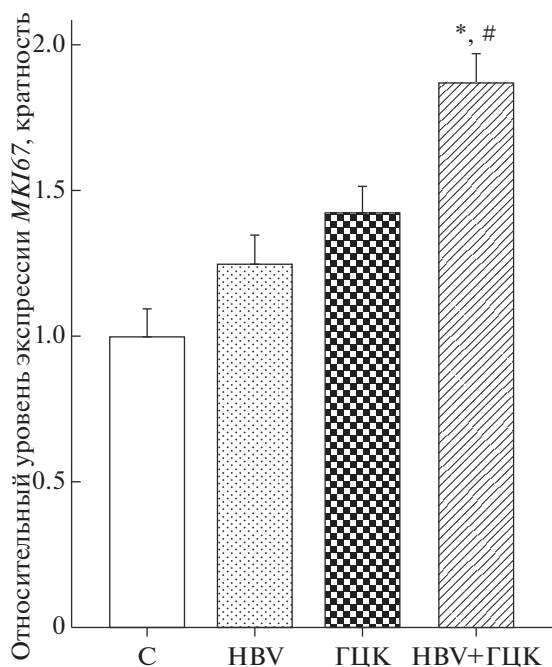


Рис. 2. Относительная экспрессия мРНК Ki-67. Между группами наблюдались значительные различия. У пациентов с HBV+ГЦК повышен уровень экспрессии *MKI67* по сравнению с HBV-инфицированными пациентами и контрольной группой (С). Уровень экспрессии *MKI67* в контрольной группе принят за единицу. # $P < 0.001$ по сравнению с контрольной группой; * $P < 0.001$ по сравнению с группой HBV.

ствует более точной диагностике ГЦК на ранней стадии по сравнению с панелью для анализа только одного маркера.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хронические заболевания печени, в особенности хронический гепатит и цирроз, считаются основными причинами развития ГЦК. По этой при-

чине прогрессирование этих заболеваний необходимо предотвращать до возникновения ГЦК, что до сих пор остается проблемой глобального масштаба. Учитывая, что существует взаимосвязь между инфекцией вирусами гепатита и ГЦК, исследования хронических заболеваний печени имеют первостепенное значение. Наиболее эффективный способ снизить заболеваемость раком — это ранняя диагностика. Гистологические изменения, вызван-

Таблица 4. Чувствительность, специфичность, а также положительные и отрицательные прогностические значения, полученные при использовании для диагностики ГЦК панелей с одним или двумя биомаркерами^a

Панель	Чувствительность, %	Специфичность, %	PPV, %	NPV, %	LR ⁺	LR ⁻
Один маркер:						
p53	77.3	76.4	82.5	75.8	4.21	0.30
Ki-67	51.0	97.9	98.4	63.7	47.2	0.70
Два маркера:						
Как минимум один положительный маркер	96.5	86.4	90.0	94.5	6.8	0.04
Оба маркера положительные	94.8	97.9	96.3	56.9	31.20	0.71

^aОбозначения: PPV — положительное прогностическое значение; NPV — отрицательное прогностическое значение; LR^{+/−} — отношение правдоподобия для положительного/отрицательного результата.

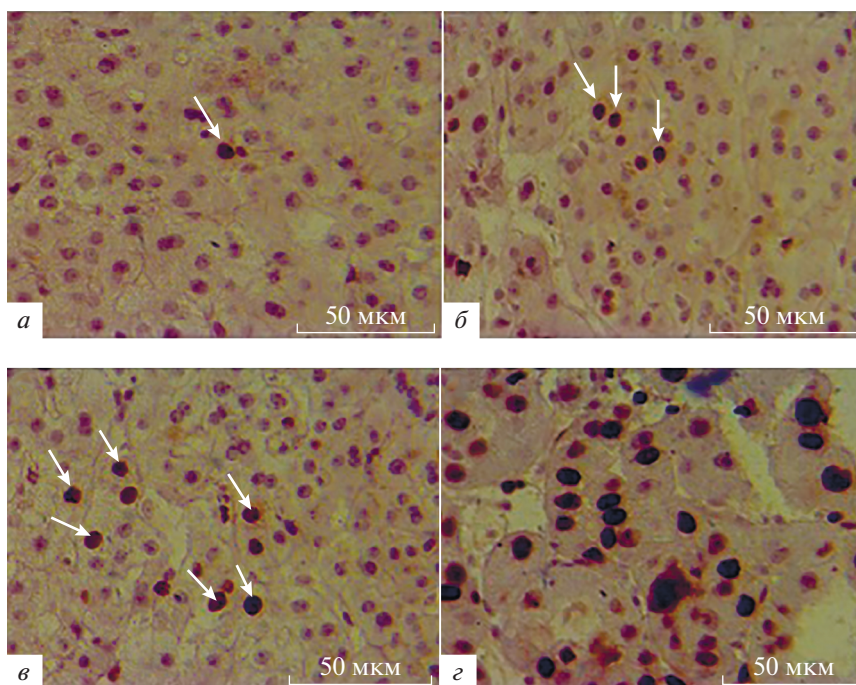


Рис. 3. Экспрессия p53 в тканях печени пациентов из групп С (а), HBV (б), ГЦК (в), HBV+ГЦК (з) (окрашивание иммунопероксидазой, увеличение $\times 400$). Локализация p53 в ядрах гепатоцитов показана стрелками.

ные развитием ГЦК, различаются у разных пациентов, что создает значительные сложности при диагностике. Следовательно, необходимы точные методы выявления ГЦК на ранней стадии.

В проведенном нами исследовании показано, что у пациентов с HBV+ГЦК повышена экспрессия p53 и Ki-67 по сравнению с пациентами, инфицированными HBV. Следовательно, эти биомаркеры могут быть использованы для выявления HBV-ассоциированной ГЦК на ранних стадиях. Данные по экспрессии генов *TP53* и *MKI67*, по-видимому, могут указывать на риск развития рака у людей, инфицированных HBV, так как уровни экспрессии этих генов коррелируют со стадиями процесса канцерогенеза и значительно повышены у пациентов с HBV+ГЦК. Следует отметить, что Ki-67 как маркер оказался более специфичным и менее чувствительным, чем p53. В тоже время одновременное тестирование на оба биомаркера позволяет повысить специфичность и чувствительность диагностики ГЦК до приемлемых уровней. Важно отметить, что использование комбинации p53 и Ki-67 вместо одного из этих биомаркеров позволит повысить точность диагностики ГЦК и тем самым оптимизировать схему терапии.

В этом исследовании, проанализировав экспрессию двух онкомаркеров: p53 и Ki-67, — мы оценили риск развития ГЦК у пациентов, инфицированных HBV. Ранее показано, что более чем в половине известных случаев рака белок p53 де-

тектируется в следовых количествах [29]. Генетические мутации, а также структурные или функциональные изменения белка p53 считаются основными причинами рака печени [30]. Заболеваемость ГЦК варьирует в разных географических регионах от 10 до 60%. В опухолях высокой степени злокачественности выявляют повышенный уровень p53 [31]. Иммуногистохимия — один из лучших способов определения уровня p53 при ГЦК, что, вероятно, связано с присутствием мутантного белка p53 [32].

Выявленные в данной работе уровни экспрессии p53 в группах HBV+ГЦК и ГЦК, в целом, согласуются с данными других авторов [33]. В образцах от пациентов из группы HBV+ГЦК зарегистрированы более высокие уровни экспрессии p53, чем в группах HBV и ГЦК. Обнаружена статистически значимая разница между пациентами с HBV-ассоциированной ГЦК на ранних стадиях и больными хронической HBV-инфекцией. На основании этих данных можно сделать вывод, что p53 может быть использован для идентификации HBV-инфицированных пациентов с предрасположенностью к развитию ГЦК. Эти результаты согласуются с данными Chen Van и др. [34], полученными в Китае, Waleed и др. [28] и Zekri и др. [35], полученными в Египте, и Koskinas и др. [36], полученными в Греции. Однако наши результаты отличаются от данных исследования Voix-Ferrogio и соав. [37], выполненного на населении Испании, где в HBV-ассоциированных гепатокарци-

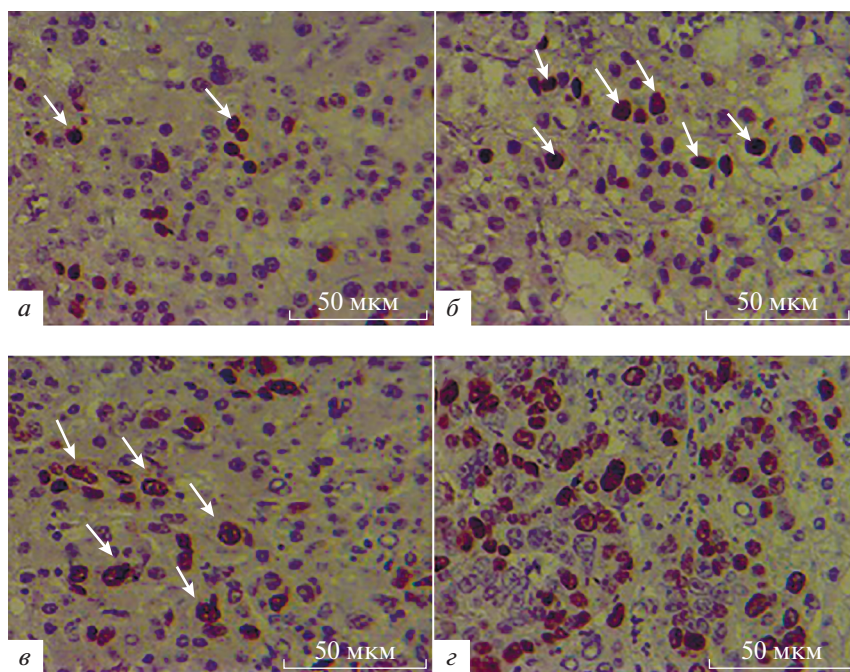


Рис. 4. Экспрессия Ki-67 в тканях печени пациентов из групп С (а), HBV (б), ГЦК (в), HBV+ГЦК (з) (окрашивание иммунопероксидазой, увеличение $\times 400$). Локализация Ki-67 в ядрах гепатоцитов показана стрелками.

номах были выявлены пониженные уровни экспрессии p53. Расхождения в результатах могут быть обусловлены различными факторами, в том числе различной чувствительностью используемых в иммуногистохимическом анализе моноклональных антител; маскированием распознаваемых антителами эпитопов p53, различными пороговыми значениями при проведении количественной ПЦР, мутациями и однонуклеотидными полиморфизмами в *TP53*, а также использованием различных канцерогенов [31, 38]. Любой из этих факторов может быть причиной несовпадения результатов при оценке экспрессии p53 разными группами исследователей.

Нами показано, что у пациентов с HBV+ГЦК и только с ГЦК повышены уровни экспрессии гена и белка Ki-67 по сравнению с HBV-инфицированными пациентами без ГЦК, а также здоровыми волонтерами из контрольной группы. Ранее сообщалось, что экспрессия Ki-67 значительно повышена в метастазах в печени, и был сделан вывод, что этот белок может быть использован для изучения естественного течения онкологического заболевания на поздних стадиях [39]. Нами обнаружено, что экспрессия Ki-67 постепенно увеличивается с прогрессированием заболевания печени до ГЦК. Выявлена статистически значимая разница в экспрессии Ki-67 между образцами от больных гепатитом В и HBV-ассоциированной ГЦК. Более того, в образцах, взятых от пациентов из обеих групп с ГЦК (HBV+ГЦК и ГЦК), детектировали повышенный уровень Ki-67 по сравне-

нию с образцами от больных из группы HBV. На основании этих результатов можно сделать вывод, что Ki-67 следует рассматривать как возможный биомаркер для выявления естественного течения ГЦК у пациентов с хронической HBV-инфекцией.

Нами показано, что экспрессия p53 и Ki-67 выше в образцах больных HBV+ГЦК по сравнению с больными ГЦК без HBV-инфекции в анамнезе. Ранее сообщалось, что использование комбинаций различных биомаркеров позволяет повысить точность диагностики [40]. Это подтверждено нами на примере двух биомаркеров: p53 и Ki-67. Нами показано, что экспрессия p53 и Ki-67 выше в образцах больных HBV+ГЦК по сравнению с больными ГЦК без HBV-инфекции в анамнезе. Их одновременное определение позволило повысить специфичность и чувствительность выявления ГЦК и довести точность диагностики ГЦК до приемлемого уровня. В том случае, когда экспрессия обоих маркеров по данным иммуногистохимического исследования была положительной (++) , чувствительность и специфичность составляли 94.8 и 97.9% соответственно. Следует заметить, что на панели с одним положительным маркером (+) показатели чувствительности были лучше (96.5%), а специфичности – хуже. Это указывает на то, что наличие как минимум двух положительных маркеров может повысить надежность диагностики ГЦК. Кроме того, правильная комбинация маркеров (p53 и Ki-67) на панели с двумя (++) и одним (+) положительным марке-

ром, по-видимому, позволит улучшить как специфичность, так и чувствительность диагностики ГЦК по сравнению с тестированием на один маркер.

Учитывая, что образцы, использованные в этом исследовании, взяты у больных на ранних стадиях онкологического процесса, можно надеяться, что панель пригодна для диагностики трудноизлечимых и дифференцированных пораженных у пациентов, инфицированных HBV.

Применимость результатов исследования может быть ограничена из-за размера выборки. Использование выборки большего размера в когортном исследовании, проведенном несколькими научными центрами, позволит уточнить роль p53 и Ki-67 в канцерогенезе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно говорить о наличии корреляции между экспрессией p53 и Ki-67 и развитием HBV-ассоциированной ГЦК. Эти два биомаркера могут быть использованы для выявления ГЦК на ранних стадиях, в особенности у HBV-инфицированных индивидов. Одновременное применение этих биомаркеров позволит сделать правильный выбор схемы терапии для лечения злокачественных новообразований печени на разных стадиях. Из-за высокой распространенности гепатитов и ГЦК в различных популяциях необходимы дополнительные исследования для оценки эффективности предложенной модели на других этнических группах.

Авторы благодарят Elizabeth McConchie за редактирование статьи на английском языке. Авторы выражают благодарность всем участникам исследования (№7262, IR.ZAUMS.REC.1394.211).

Исследование поддержано диссертационным грантом (№ 7262) от заместителя декана по научной работе Zahedan University of Medical Sciences.

Работа одобрена Комитетом по этике Zahedan University of Medical Sciences (№7262, IR.ZAUMS.REC.1394.211), в рамках которого проводилась работа, и соответствует положениям Хельсинкской декларации. Информированное согласие получено от всех участников.

Все авторы участвовали в разработке концепции и дизайна исследования, подготовке материалов, сборе и анализе данных, а также в написании рукописи. Все авторы прочитали, отредактировали и одобрили окончательную рукопись.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferenci P., Fried M., Labrecque D., Bruix J., Sherman M., Omata M., Heathcote J., Piratsivuth T., Kew M., Oteg-

bayo J.A., Zheng S.S., Sarin S., Hamid S., Modawi S.B., Fleig W., Fedail S., Thomson A., Khan A., Malfert-heiner P., Lau G., Carillo F.J., Krabshuis J., Le Mair A. (2010) World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **19**(3), 311–317.

2. Matsubara K., Tokino T. (1990) Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol. Biol. Med.* **7**(3), 243–260.
3. Maeda S., Kamata H., Luo J.L., Leffert H., Karin M. (2005) IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell.* **121**(7), 977–990.
4. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H. (2019) Meta-analysis and systematic review of prognostic significance of Glypican-3 in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Virus Dis.* **30**(2), 193–200.
5. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H. (2018) Study of liver in HBV-related hepatocellular carcinoma: stereology shows quantitative differences in liver structure. *Eur. J. Histochem.* **62**(3), 238–246.
6. Heidari Z., Moudi B., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Hashemi M. (2016) The correlation between interferon lambda 3 gene polymorphisms and susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepat. Mon.* **16**(3), e34266. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.34266>
7. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Hashemi M. (2016) Gene polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor affect susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in an Iranian cohort. *Microbiol. Immunol.* **60**(6), 390–396.
8. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H. (2016) Impact of host gene polymorphisms on susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Infect. Genet. Evol.* **44**, 94–105.
9. Alavian S.M., Haghbin H. (2016) Relative importance of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma in EMRO Countries and the Middle East: a systematic review. *Hepat. Mon.* **16**(3), e35106. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.35106>
10. Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Charkhat Gorgich E.A. (2017) Immunohistochemical expression of P16^{ink4a} in colorectal adenocarcinoma compared to adenomatous and normal tissue samples: a study on Southeast Iranian samples. *Iran Red Crescent Med. J.* **19**(6), e15174. <https://doi.org/10.5812/ircmj.15174>
11. Mahmoudzadeh Sagheb H., Heidari Z., Jahantigh M., Narouei M. (2016) Immunohistochemical expression of p53 and Ki-67 genes in gastric cancer and precancerous lesions in the patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gene Cell Tissue.* **3**(4), e41341. <https://doi.org/10.17795/gct-41341>
12. Yang H.W., Chung M., Kudo T., Meyer T. (2017) Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature.* **549**(7672), 404–408.
13. Cox L.S., Lane D.P. (1995) Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays.* **17**(6), 501–508.

14. Porter P.L., Gown A.M., Kramp S.G., Coltrera M.D. (1992) Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. *Am. J. Pathol.* **140**(1), 145–153.
15. Attallah A.M., Shiha G.E., Ismail H., Mansy S.E., El-Sherbiny R., El-Dosoky I. (2009) Expression of p53 protein in liver and sera of patients with liver fibrosis, liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma associated with chronic HCV infection. *Clin. Biochem.* **42**(6), 455–461.
16. Tannapfel A., Wasner M., Krause K., Geissler F., Katalinic A., Hauss J., Mossner J., Engeland K., Wittekind C. (1999) Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**(13), 1154–1158.
17. Kang Y.K., Kim C.J., Kim W.H., Kim H.O., Kang G.H., Kim Y.I. (1998) p53 mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in the liver. *Virchows Arch.* **432**(1), 27–32.
18. Li J.Q., Zhang C.Q., Zhang Y.Q., Yuan Y.F., Chen M.S., Li G.H. (1996) Immunohistochemical study of PCNA and p53 in primary liver cancer – an implication for prognosis and treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **15**, 77–80.
19. Guzman G., Alagiozian-Angelova V., Layden-Almer J.E., Layden T.J., Testa G., Benedetti E., Kajdacsy-Balla A., Cotler S.J. (2005) p53, Ki-67, and serum alpha fetoprotein as predictors of hepatocellular carcinoma recurrence in liver transplant patients. *Mod. Pathol.* **18**(11), 1498–1503.
20. Graflund M., Sorbe B., Karlsson M. (2002) MIB-1, p53, bcl-2, and WAF-1 expression in pelvic lymph nodes and primary tumors in early stage cervical carcinomas: correlation with clinical outcome. *Int. J. Oncol.* **20**(5), 1041–1047.
21. Stanton K.J., Sidner R.A., Miller G.A., Cummings O.W., Schmidt C.M., Howard T.J., Wiebke E.A. (2003) Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am. J. Surg.* **186**(5), 486–492.
22. Stroescu C., Dragnea A., Ivanov B., Pechianu C., Herlea V., Sgarbura O., Popescu A., Popescu I. (2008) Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **17**(4), 411–417.
23. Nakanishi K., Sakamoto M., Yamasaki S., Todo S., Hirohashi S. (2005) Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* **103**(2), 307–312.
24. Gibson J.B., Sobin L.H. (1978) Histological typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas. *Series: International histological classification of tumors number, no. 20.* Geneva: World Health Organization, 12–30.
25. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Alavian S.M., Lankarani K.B., Farrok P., Randel Nyengaard J. (2018) Concomitant use of heat-shock protein 70, glutamine synthetase and glypican-3 is useful in diagnosis of HBV-related hepatocellular carcinoma with higher specificity and sensitivity. *Eur. J. Histochem.* **62**(1), 42–50.
26. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* **7**, 85. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
27. Heidari Z., Mahmoudzadeh Sagheb H., Asemi Rad A., Keikhaee M.A. (2015) Immunocytochemical study of p53 protein in exfoliated cells of oral mucosa in patients with type 2 diabetes. *Gene Cell Tissue.* **2**(1), e24881.
28. Mohamed W.S., Omar M.M., Khayri T.M., Fakhr I.M. (2008) Assessment of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein expression in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma cases in Egypt. *Int. J. Health Sci. (Qassim).* **2**(1), 27–34.
29. Marcel V., Catez F., Diaz J.J. (2015) p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene.* **34**(44), 5513–5523.
30. Meng X., Franklin D.A., Dong J., Zhang Y. (2014) MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **74**(24), 7161–7167.
31. Lee S.N., Park C.K., Sung C.O., Choi J.S., Oh Y.L., Cho J.W., Yoo B.C. (2002) Correlation of mutation and immunohistochemistry of p53 in hepatocellular carcinomas in Korean people. *J. Korean Med. Sci.* **17**(6), 801–805.
32. Mitsumoto Y., Nakajima T., Marutani M., Kashiwazaki H., Moriguchi M., Kimura H., Okanou T., Kagawa K., Tada M. (2004) Loss of p53 transcriptional activity in hepatocellular carcinoma evaluated by yeast-based functional assay: comparison with p53 immunohistochemistry. *Hum. Pathol.* **35**(3), 350–356.
33. Wang Z., Gou W., Liu M., Sang W., Chu H., Zhang W. (2015) Expression of P53 and HSP70 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and early and advanced hepatocellular carcinoma tissues and their diagnostic value in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Med. Sci. Monit.* **21**, 3209–3215.
34. Chen Ban K., Singh H., Krishnan R., Fong Seow H. (2004) Comparison of the expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in areas with high and low levels of exposure to aflatoxin B1. *J. Surg. Oncol.* **86**(3), 157–163.
35. Zekri A.R., Bahnassy A.A., Madbouly M.S., Asaad N.Y., El-Shehaby A.M., Alam El Din H.M. (2006) p53 mutation in HCV-genotype-4 associated hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *J. Egypt. Natl. Cancer Inst.* **18**(1), 17–29.
36. Koskinas J., Petraki K., Kavantzias N., Rapti I., Kountouras D., Hadziyannis S. (2005) 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. *J. Viral Hepat.* **12**(6), 635–641.
37. Boix-Ferrero J., Pellin A., Blesa R., Adrados M., Llombart-Bosch A. (1999) Absence of p53 gene mutations in hepatocarcinomas from a Mediterranean area of Spain. A study of 129 archival tumour samples. *Virchows Arch.* **434**(6), 497–501.
38. Otsuka M., Kato N., Lan K., Yoshida H., Kato J., Goto T., Shiratori Y., Omata M. (2000) Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation

- of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J. Biol. Chem.* **275**(44), 34122–34130.
39. King K.L., Hwang J.J., Chau G.Y., Tsay S.H., Chi C.W., Lee T.G., Wu L.H., Wu C.W., Lui W.Y. (1998) Ki-67 expression as a prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**(3), 273–279.
40. Tremosini S., Forner A., Boix L., Vilana R., Bianchi L., Reig M., Rimola J., Rodriguez-Lope C., Ayuso C., Sole M., Bruix J. (2012) Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut.* **61**(10), 1481–1487.

EXPRESSION PATTERNS OF p53 AND Ki-67 IN HBV-RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA: A QUANTITATIVE REAL-TIME PCR AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Z. Heidari^{1, 2}, B. Moudi^{1, 2, *}, and H. Mahmoudzadeh-Sagheb^{1, 2}

¹*Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Resistant Tuberculosis Institute, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743111 Iran*

²*Department of Histology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743463 Iran*

*e-mail: bita.moudi@yahoo.com

The HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) is an important liver malignancy worldwide and carries a poor prognosis. In this regard, an accurate diagnosis is necessary to enable successful treatment. The aim of the current study was to assess the relationship between the expression of certain molecular markers and HCC diagnosis in Iran. Immunohistochemistry and quantitative RT-PCR techniques were used to evaluate the expression patterns of p53 and Ki-67 in liver tissues from 121 HCC and/or HBV-infected patients and 30 healthy volunteers. Patients with HBV+HCC demonstrated increased expression of both p53 and Ki-67 compared to patients with HBV only, highlighting correlation between the p53 and Ki-67 expression levels and HCC diagnosis. The prognostic value of p53 for the diagnosis of HCC was more reliable. The p53 demonstrated higher sensitivity compared to the Ki-67 (sensitivity and specificity, 77.3 and 76.4% for the p53, and 51.0 and 97.9% for the Ki-67, respectively). A panel containing two positive markers had higher specificity and comparable sensitivity to a panel with one positive marker regardless of which one (sensitivity and specificity, 94.8 and 97.9%, for two positive markers and 96.5% and 86.4% for one positive marker, respectively). Taken together the combined analysis of p53 and Ki-67 expression provides a mean to increase the specificity and sensitivity of HBV-related HCC diagnosis to an acceptable level.

Keywords: p53, Ki-67, hepatocellular carcinoma, immunohistochemistry, quantitative real-time PCR