

УДК 616.831-006-036:612.017

**Т.В. Шинкаренко,  
І.С. Шпонька**

## АНАЛІЗ P53-ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ В АСТРОЦИТАРНИХ ПУХЛИНАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»  
кафедра патологічної анатомії і судової медицини  
(зав. – д. мед. н., проф. І.С. Шпонька)  
вул. Дзержинського, 9, Дніпро, 49044, Україна  
SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»  
Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine  
Dzerzhinsky str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine  
e-mail: Timash3061990@gmail.com

**Ключові слова:** пухлина головного мозку, імуногістохімія, діагностика, p53, Ki-67  
**Key words:** brain tumor, immunohistochemistry, diagnostics, p53, Ki-67

**Реферат.** Аналіз p53-імунореактивності в астроцитарних опухлях головного мозгу. Шинкаренко Т.В., Шпонька І.С. P53 – антионкоген, мутації которого часто зустрічаються в опухольових клітках людини, що приводить до надвисловлення відповідного білка, який може бути виявлений за допомогою імуногістохімії. Дослідження, присвячені можливостям використання цього методу, представили суперечливі результати. Авторів досліджували особливості висловлення протеїна p53 в астроцитарних опухлях головного мозгу різної ступеня злоякісності (пілоцитарних, дифузних, анапластичних астроцитом, гліобластомах), а також проаналізували зв'язок рівня висловлення p53 опухольовими клітками з клінічними параметрами та індексом проліферації. Було досліджено операційний матеріал 52 пацієнтів з діагнозом астроцитарних опухольових головного мозгу. При імуногістохімічному дослідженні були використані первинні антитіла проти p53 та Ki-67. Для кожного маркера підраховували відсоток імунореактивних кліток з урахуванням статусу 1000 опухольових кліток, використовуючи пакет програмного забезпечення ImageJ 1,47v. Статистичну значимість різниці результатів в групах досліджуваних опухольових було перевірено за допомогою тесту Фішера; з метою визначення сили зв'язку між показателями використали коефіцієнт кореляції Спірмана. p53-імунореактивні опухольові клітки були виявлені в 25% (1/4) пілоцитарних астроцитом, 33,3% (2/6) дифузних астроцитом, 53,8% (7/13) анапластичних астроцитом, 58,6% (17/29) гліобластом. Висока частка p53-імунореактивних кліток (>30%) спостерігалася тільки в гліобластомах. p53-імунореактивність опухольових не показала залежності від віку, статі пацієнтів та рівня злоякісності за ВОЗ ( $p > 0,05$ ). Коефіцієнт кореляції Спірмана між відносними кількостями ki-67- та p53-імунореактивних ядер показав слабку пряму кореляцію (0,023), яка однак не була статистично достовірною ( $p > 0,05$ ). Рівень p53-імунореактивності – критерій, не залежний від віку, статі хворих, Grade за ВОЗ та проліферативної активності ( $p > 0,05$ ). Залежність між відносними кількостями ki-67 та p53-реактивних ядер слабка пряма статистично незначима ( $p > 0,05$ ).

**Abstract.** Analysis of p53- immunoreactivity in astrocytic brain tumors. Shinkarenko T.V., Shpon'ka I.S. P53 is an antioncogene with the frequently occurred mutations in human tumor cells, leading to corresponding protein overexpression which can be detected by immunohistochemistry. Researches dedicated to the investigation of possibilities of using this technique gave controversial results. The authors investigated features of p53 protein expression in astrocytic brain tumors with different degrees of malignancy. Analyzed the relationship of the expression level of p53 by tumor cells with clinical parameters and Ki-67 proliferation index (PI) as well. Tissues were collected from 52 cases with diagnosed astrocytic brain tumors. The sections were immunohistochemically stained with p53 and Ki-67. For each marker, 1000 tumor cells were counted and the ratio of positive tumor cells was calculated using software package ImageJ 1,47v. In normal brain tissue p53- expression was not identified. p53-immunoreactive tumor cells were detected in 25% (1/4) pilocytic astrocytomas, 33.3% (2/6) of diffuse astrocytomas, 53.8% (7/13) anaplastic astrocytomas, 58.6% (17/29) glioblastomas. A high proportion of p53-immunoreactive cells (> 30%) was observed only in glioblastomas. The level of p53-immunoreactivity was not related to the age, gender and Grade WHO ( $p > 0,05$ ). Spearman correlation coefficient between the relative quantity of ki-67- and p53-immunoreactive nuclei showed weak direct correlation (0.023), but the one was not statistically significant ( $p > 0,05$ ). The level of p53-immunoreactivity is not dependent from age and sex of patients, Grade (WHO) and proliferative activity ( $p > 0,05$ ) but the high level of p53-immunoreactive cells (>30%) is found in glioblastoma specimens only, that may be due to the accumulation of mutations in DNA of tumor cells. There is insignificant weak relationship between relative quantities of ki-67- and p53-immunoreactive tumor cells ( $p > 0,05$ ).

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Патоморфологічна діагностика та прогноз перебігу новоутворень різних локалізацій з урахуванням маркерів біологічних властивостей» (номер держреєстрації 0112U006965).

p53 – білок-супресор пухлинного росту з масою 43,7 кДа, кодується геном TP53, розташованому в локусі 17p13.1. У випадку незначного ушкодження ДНК p53 стимулює її репарацію, призупиняє поділ клітини, а при неможливості відновлення структури ДНК запускає механізми апоптозу. Ці дії запобігають накопиченню помилок і таким чином блокують онкогенез. Більшість TP53-мутацій – місенс-мутації в екзонах 5–8 домену зв'язування ДНК призводять до збільшення експресії протеїну p53 із втратою частини його властивостей, що у свою чергу відзначається порушеннями адаптації клітини та репарації ДНК, накопиченнями протоонкогенних мутацій з пришвидшенням онкогенезу.

Деградація протеїну p53 стимулюється убіквілін лігазою MDM2 та її гомологом MDMX [11]. Також непрямий вплив (через MDM2) на тривалість існування протеїну має інгібітор клітинного циклу ARF [5]. Дикий тип p53 існує в ядрі з середнім терміном напіврозпаду 6-30 хв у різних тканинах, який збільшується при клітинному стресі [7].

У базі мутацій TP53 налічується більше 45000 мутацій відповідного гена, частина з них характерна для гліом [6]. Для виявлення мутацій TP53 використовуються методи молекулярного аналізу. E. Gillet et al. [10], H. Takami et al. [8] показали значну позитивну кореляцію місенс-мутацій гена TP53 та визначеного імуногістохімічним методом рівнем експресії протеїну p53, зокрема у гліомах головного мозку, що дозволяє використовувати більш дешевий метод імуногістохімічного аналізу. Однак треба враховувати неідентичність мутації гена від надекспресії протеїну: полімеразна ланцюгова реакція встановлює всі мутації (які можуть призводити не тільки до підвищення кількості p53 у клітинах), а імуногістохімічне дослідження може виявити підвищення експресії незміненого (дикого) поліпептиду у випадках розладів епігенетичної регуляції нормального гена – змін концентрації регулюючих протеїнів (наприклад MDM2, MDMX, чи ARF), тому що найбільш часто вживаний клон для імуногістохімічного аналізу p53-імунореактивності (DO-7) виявляє і дикий, і мутантний поліпептид [8].

Хоча p53-імунореактивність, на відміну від мутацій TP53, зустрічається і при деяких захворюваннях, що супроводжуються реактивними змінами глії (гліозі) [7], наявність вираженої p53-імунореактивності дозволяє відрізнити гліому та непухлинні процеси, а рівень експресії, вищий за 10%, частіше зустрічається в дифузних, анапластичних астроцитомах і вторинних гліобластомах (ступені злоякості II, III і IV за WHO відповідно) порівняно з пілоцитарними астроцитомами (ступінь злоякості I за WHO) та первинними гліобластомами, що корелює з даними про частоту мутацій TP53 у відповідних пухлинах. Відомо, що мутація гена TP53 негативно корелює з тривалістю життя пацієнтів, хворих на гліоми [3].

Мутація TP53 у статевих клітинах та на ранніх етапах ембріогенезу пов'язана з виникненням спадкового захворювання – синдрому Лі-Фраумені, що характеризується розвитком у дитячому віці остеосарком, м'якотканинних сарком, пухлин ЦНС, а також раку молочної залози і м'якотканинних сарком у дорослих. Діагностика цього синдрому базується на виявленні клінічних ознак, але тільки в 70% хворих підтверджується за допомогою молекулярного аналізу гена TP53. При цьому синдромі мутації супроводжуються підвищенням рівня протеїну p53, що виявляється імуногістохімічно навіть у немалігнізованих тканинах [4].

Подальший розвиток таргетної терапії гліобластом може бути пов'язаний не тільки з антиангіогенним бевацизумабом, що блокує фактор росту ендотелію судин VEGF, а й зі створенням препарату, що реактивує p53.

Мета роботи – дослідити особливості експресії протеїну p53 в астроцитарних пухлинах головного мозку різного ступеня злоякості.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліджено 52 зразки пухлин астроцитарного походження, які було отримано шляхом біопсії або оперативного втручання переважно в нейрохірургічному відділенні ДОКБМ та підлягали імуногістохімічному дослідженню в морфологічному відділі лікувально-діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» (м. Дніпропетровськ) протягом 2006-2015 рр. Гістологічний діагноз був встановлений, спираючись на сучасні гістологічні та імуногістохімічні критерії [12]. Клініко-нозологічна характеристика відібраних зразків наведена в таблиці 1.

**Розподіл астроцитом за клінічними показниками та нозологіями (n, %)**

Критерій	Кількість всіх випадків, (n)	%
<b>Стать</b>		
Чоловіча	27	51,9
Жіноча	25	48,1
<b>Вік</b>		
<50	34	65,4
>50	18	34,6
<b>Гемісфера</b>		
Ліва	8	17,8
Права	16	35,6
Невідомо	25	55,6
<b>Локалізація</b>		
Лобна	9	20,0
Скросева	7	15,6
Тім'яна	2	4,4
Потилична	1	2,2
2 частки	7	15,6
Стовбур	1	2,2
Невідомо	25	55,6
<b>Гістологічний діагноз</b>		
Пілоцитарна астроцитома (Grade I*)	4	7,7
Дифузна астроцитома (Grade II)	6	11,5
Анапластична астроцитома (Grade III)	13	25
Гліобластома (Grade IV)	29	55,8
<b>Всього</b>	<b>52</b>	<b>100%</b>

Примітка. \* – тут і далі за ВООЗ [23].

*Імуногістохімічний метод.* Імуногістохімічне дослідження проводилось згідно з протоколами компанії TermoScientific (TS), (США): для визначення експресії p53 (клон sp-5, р. 1:200 (TS,США)) та Ki-67 (клон sp6, р. 1:400 (TS,США)) у зрізах завтовшки 4 мкм використовували систему візуалізації Lab Vision Quanto (TS, США) з виявленням білкового ланцюга за допомогою DAB Quanto Chromogen (TS, США).

*Морфометричний метод.* Дослідження включало підрахунок кількості позитивно та негативно забарвлених ядер клітин пухлини, виключаючи ядра нейронів, макрофагів та клітин ендотелію, у зонах найбільшої щільності інтрануклеарної реакції трьома незалежними досвідченими патоморфологами. Визначали відносну кількість Ki-67 (індекс проліферації) та p53-імунореактивних гліомоцитів. При відносній кількості p53-імунореактивних ядер більше 10% робили висновок про позитивність пухлини за маркером p53 (p53-імунопозитивність).

Для аналізу цифрових фотографій «гарячих» зон та найточнішого підрахунку ядер були отримані зображення за допомогою камери ZEISS AxioCam 105 color на світловому мікроскопі Axio Scope.A1 при збільшенні об'єктиву  $\times 40$ . Кожний зразок був ілюстрований 1-4 зображеннями з найбільшою щільністю імунореактивних пухлинних клітин. Для підрахунку клітин використовувався ImageJ 1.49v з його plug-іном PointPicker. Визначали відносну кількість Ki-67 (індекс проліферації) та p53-імунореактивних гліомоцитів. Серед отриманих результатів обирався найбільший [2].

*Статистичний аналіз* був проведений за допомогою онлайн-сервісу <http://medstatistic.ru/>. Статистичну значущість відмінності результатів у групах досліджуваних пухлин було перевірено за допомогою теста Фішера, з метою визначення сили зв'язку між показниками використовувався коефіцієнт кореляції Спірмана. Значення  $p < 0,05$  було прийнято статистично значущим [1].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нормальна тканина головного мозку показала експресію p53 у незначній кількості ядер (до 0,5%). В якості внутрішнього позитивного контролю було використано p53-імунореактивність частини ядер ендотеліальних клітин (рис. 1 А-В). Типовим для астроцитарних пухлин з дифузним ростом (II-IV рівнів злоякісності за ВООЗ) була інфільтрація p53-негативної нормальної мозкової тканини p53-імунопозитивними пухлинними клітинами з більшими ядрами (рис. 1 С), тому частка p53-імунореактивних клітин

у пухлинах астроцитарного походження була неоднаковою в полях зору різних частин зразку – від повної відсутності до 83,2% (рис. 1 D). Ділянки навколо некротизованої тканини у гліобlastомах за відносною кількістю p53-імунореактивних пухлинних клітин суттєво не відрізнялися від інших частин пухлини, що аналогічно спостереженням за Ki67-імунореактивністю, яка відображає проліферативну активність.

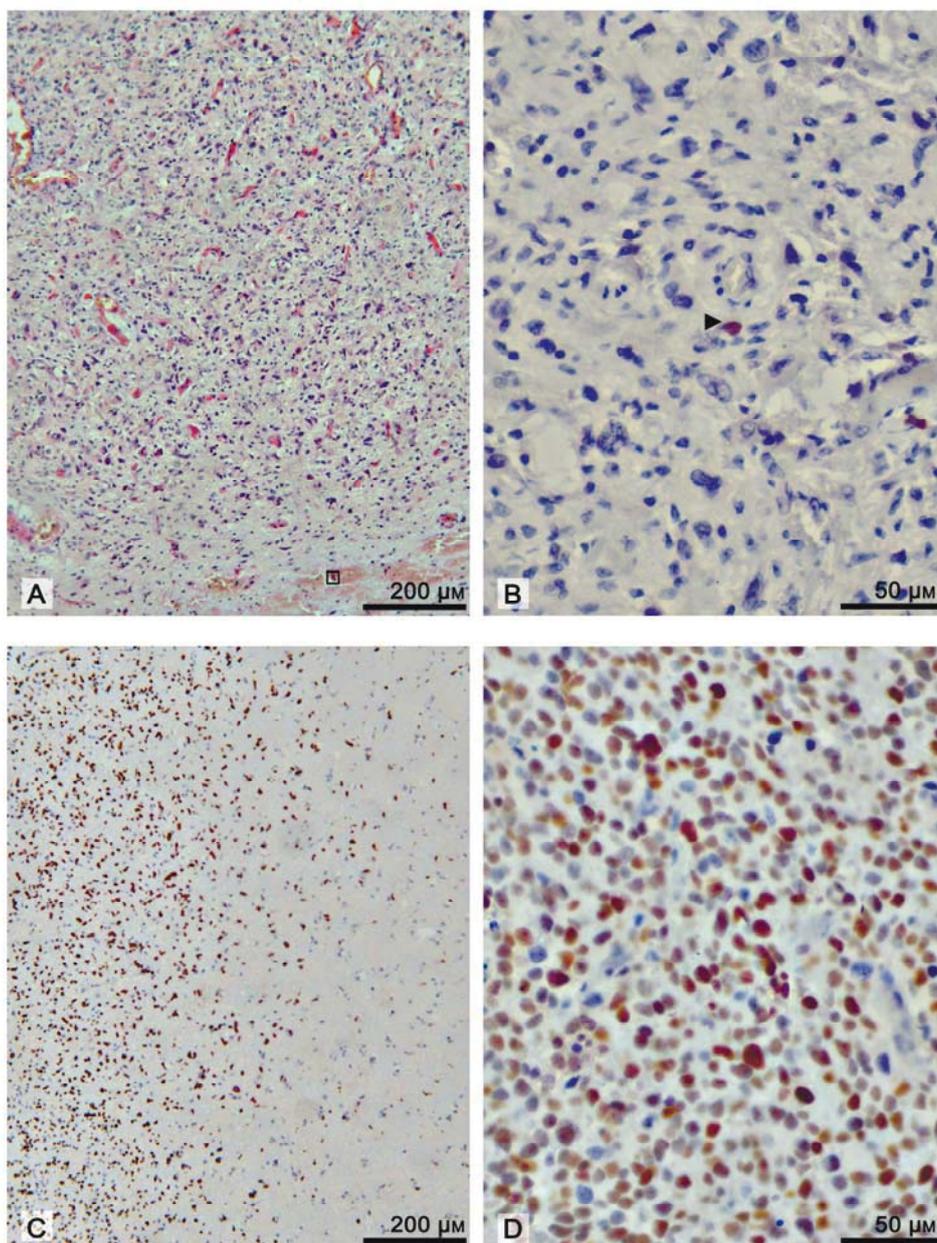


Рис. 1. А-В, Гліобlastома<sub>WHO2007</sub>. А (г-е), велика щільність клітин, судин переважно дрібного калібру, ділянки крововиливів (□), В (той же випадок, велике збільшення, p53), одиничні ендотеліальні клітини з ядерною імунореактивністю (►). С, Анапластична астроцитома<sub>WHO2007</sub> (p53), межа пухлини: значна щільність імунореактивних клітин у центральній частині пухлини (ліворуч), інфільтрація одиничними імунореактивними клітинами мозкової тканини (праворуч). D, Гліобlastома<sub>WHO2007</sub> (велике збільшення, p53) відсоток імунореактивних ядер у цьому випадку – 83,2%

Аналіз p53-імунопозитивності поданий у таблиці 2. Співвідношення чоловіків і жінок серед хворих на астроцитому дорівнювало 1,08:1, середній вік становив 41,0 (діапазон 9-72) рік. При аналізі за статтю та віком була продемонстрована рівність частоти зустрічаємості p53-імунопозитивних астроцитарних пухлин, а також окремо гліобластом, у пацієнтів чоловічої і жіночої статі, пацієнтів молодого і похилого віку ( $p > 0,05$ ).

p53-позитивність пухлини була зафіксована у 25% (1/4) пілоцитарних астроцитом, 33,3% (2/6) дифузних астроцитом, 53,8% (7/13) анапластичних астроцитом, 58,6% (17/29) гліобластом. Статистично вагомої залежності діагнозу від p53-імунопозитивності не зафіксовано ( $p > 0,05$ ).

Усі p53-імунопозитивні зразки ми розподілили на 2 групи: 1) відносна кількість імунореактивних клітин від 10 до 30% та 2) відносна кількість імунореактивних клітин більше 30%. Перша група була представлена пухлинами всіх рівней злоякісності, а друга – тільки гліобластомами.

Зразок гігантоклітинної гліобластоми був p53-позитивним, при цьому переважна більшість багатоядерних гігантських клітин містила тільки p53-реактивні ядра, незначна частина подібних багатоядерних клітин мала тільки p53-негативні ядра; клітини, які б містили p53-реактивні і p53-негативні ядра, не виявлялися.

Таблиця 2

**Аналіз p53-імунореактивності астроцитарних пухлин головного мозку за клініко-морфологічними ознаками (n, %, p)**

	Стать		Вік		Ступінь злоякісності за ВООЗ			
	Ч	Ж	<50	≥50	I	II	III	IV
p53 «-» (n=14)	13 48,1%	12 48%	17 50%	8 44,4%	3 75%	4 66,7%	6 46,2%	12 41,4%
p53 «+» (n=31)	14 51,9%	13 52%	17 50%	10 55,6%	1 25%	2 33,3%	7 53,8%	17 58,6%
Всього (n=52)	27 100%	25 100%	34 100%	18 100%	4 100%	6 100%	13 100%	29 100%
p	p > 0,05		p > 0,05		p <sub>I,II</sub> > 0,05 p <sub>I,II,III</sub> > 0,05 p <sub>I,II,III,IV</sub> > 0,05			

Примітка. Відмінність статистично значуща при  $p < 0,05$ .

Коефіцієнт кореляції Спірмана між відносною кількістю Ki-67- та p53-імунореактивних ядер показав слабку пряму кореляцію (0,023), що однак не була статистично достовірною ( $p > 0,05$ ).

Співвідношення чоловіків і жінок у нашому дослідженні відповідає епідеміологічним даним про гендерну рівність у захворюваності на астроцитому. Менший середній вік хворих можна пояснити малою кількістю випадків та наявністю переважно матеріалу, отриманого при оперативних втручаннях, які доцільніші при лікуванні пацієнтів більш молодого віку.

**ВИСНОВКИ**

1. p53-імунопозитивність астроцитарних пухлин головного мозку не залежить від віку, статі пацієнтів, рівня злоякісності за ВООЗ та проліферативної активності ( $p > 0,05$ ). При діагности-

ці пухлин астроцитарного походження слід враховувати, що висока відносна кількість імунореактивних клітин (>30%) спостерігається тільки у гліобластомах, у той час, як в інших пухлинах відповідна відносна кількість становить не вище 30%.

2. Не виявлено статистично вагомого зв'язку між відносними кількостями ki-67- та p53-імунореактивних ядер ( $p > 0,05$ ).

Перспективи подальших розробок.

З метою удосконалення діагностики гліальних пухлин головного мозку необхідні подальші дослідження, присвячені вивченню різноманітних клініко-морфологічних, у тому числі ІГХ характеристик, їхнього взаємозв'язку та визначенню можливостей використання у щоденній лікарській практиці.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. – Киев, 2006. – 558 с.
2. Пославська О.В. Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців / О.В. Пославська // *Morphologia*.-2015.-Т. 9, № 3.- С. 122-126.
3. Apoptosis therapy in cancer: the first single-molecule co-activating p53 and the translocator protein in glioblastoma / S. Daniele, S. Taliani, E. Da Pozzo [et al.] // *Scientific reports*. – 2014. – Т. 4.
4. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas / X. Hu, W. Miao, Y. Zou [et al.] // *Oncology letters*. – 2013. – Vol. 6, N 1. – P. 130-134.
5. Ganguly A. Li-Fraumeni Syndrome / A. Ganguly, Z. Chen // *Molecular Pathology in Clinical Practice*. – Switzerland: Springer International Publishing, 2016. – С. 377-383.
6. Kruiswijk F. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill / F. Kruiswijk, C. F. Labuschagne, K.H. Vousden // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2015. – Vol. 16, N 7. – P. 393-405.
7. Leroy B. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade / B. Leroy, M. Anderson, T. Soussi // *Human Mutation*. – 2014. – Vol. 35, N 6. – P. 672-688.
8. Nuclear interactor of ARF and Mdm2 regulates multiple pathways to activate p53 / S. M. Reed, J. Hagen, V. S. Tompkins [et al.] // *Cell Cycle*. – 2014. – Vol. 13, N 8. – P. 1288-1298.
9. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry – a comparative study in 157 diffuse gliomas / H. Takami, A. Yoshida, S. Fukushima [et al.] // *Brain Pathology*. – 2015. – Vol. 25, N 3. – P. 256-265.
10. Tanboon J. The Diagnostic use of immunohistochemical surrogates for signature molecular genetic alterations in gliomas / J. Tanboon, E. A. Williams, D. N. Louis // *J. Neuropathol. & Experim. Neurology*. – 2016. – Vol. 75, N 1. – P. 4-18.
11. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley, E. Sontag, P. Chen [et al.] // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9, N 5. – P. 402-412.
12. WHO Classification of tumours of the central nervous system / D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler [et al.]. – 4-е изд. – Lyon: IARC, 2007. – 312 p.

## REFERENCES

1. Antomonov M. [Mathematical processing and analysis of medical and biological data.] Kyiv: FMD. 2006;558. Russian.
2. Poslavska OV. [Methodology for the use of software for the analysis of digital micrographs on the base of pathomorphology course in order to increase the professional level of students and scientists]. *Morphologia*. 2015;9(3):122-6. Ukrainian.
3. Daniele S, Taliani S, Da Pozzo E et al. Apoptosis therapy in cancer: the first single-molecule co-activating p53 and the translocator protein in glioblastoma. *Scientific reports*. 2014 Apr 23;4. doi:10.1038/srep04749.
4. Hu X, Miao W, Zou Y, et al. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. *Oncology letters*. 2013 Jul 1;6(1):130-4. doi:10.3892/ol.2013.1317.
5. Ganguly A, Chen Z. Li-Fraumeni Syndrome. In *Molecular Pathology in Clinical Practice* 2016 (pp. 377-383). Springer International Publishing.
6. Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015 Jul 1;16(7):393-405. doi:10.1038/nrm4007.
7. Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Human mutation*. 2014 Jun 1;35(6):672-88. doi:10.1002/humu.22552.
8. Reed SM, Hagen J, Tompkins VS et al. Nuclear interactor of ARF and Mdm2 regulates multiple pathways to activate p53. *Cell cycle*. 2014 Apr 15;13(8):1288-98. doi:10.4161/cc.28202.
9. Takami H, Yoshida A, Fukushima S et al. Revisiting TP53 mutations and immunohistochemistry – a comparative study in 157 diffuse gliomas. *Brain Pathology*. 2015 May 1;25(3):256-65. doi:10.1111/bpa.12173.
10. Tanboon J, Williams EA, Louis DN. The Diagnostic use of immunohistochemical surrogates for signature molecular genetic alterations in gliomas. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2016 Jan 1;75(1):4-18. doi:10.1093/jnen/nlv009.
11. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 May 1;9(5):402-12. doi:10.1038/nrm2395.
12. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (eds) (2007) WHO Classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon.

Стаття надійшла до редакції  
10.10.2016

