

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-3 В БИОПСИЯХ ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ МОНО- И СМЕШАННЫХ ИНФЕКЦИЯХ

И.И. Токин^{1,2}, И.Б. Токин³, Т.В. Сологуб¹, Г.Ф. Филимонова^{2,3}, П. Хуссар⁴

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17;

²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Россия, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский проезд, 47;

³ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7;

⁴Институт анатомии Тартуского университета, Эстония, 50090, Тарту, Юликооли, 18

Контакты: Иван Иванович Токин ivan.i.tokin@rambler.ru

Цель исследования — изучение активности проапоптотического сигнального белка каспазы-3 для выяснения особенностей регуляции апоптоза при хронических заболеваниях печени.

Материалы и методы. Проведен иммуногистохимический анализ активности каспазы-3 в биопсиях печени больных хроническим вирусным гепатитом В ($n = 5$) и в биопсиях печени пациентов со смешанной инфекцией (туберкулез, хронический вирусный гепатит С и вирус иммунодефицита человека) ($n = 5$). Морфологический и морфометрический анализы серийных микрофотографий выполнены с использованием цифровой аналитической системы (микроскоп Leica DM 2500, цифровая камера Leica DFC320 R2 и компьютер).

Результаты. Экспрессия каспазы-3 в виде темно-коричневой зернистости в ядрах и цитоплазме выявлена во всех тканевых элементах печени (в гепатоцитах, эпителии желчных протоков, эндотелиоцитах, купферовских клетках синусоидов, а также в лимфогистиоцитарных инфильтратах). Наибольшая активность каспазы-3 обнаружена в ядрах гепатоцитов. Во всех тканевых элементах печени экспрессия каспазы-3 была значительно выше в биопсиях печени пациентов со смешанной инфекцией. Характерно, что иммунореактивные гепатоциты не имели морфологических признаков апоптоза.

Заключение. Экспрессия каспазы-3 как проапоптотического сигнального белка может служить ранним маркером повреждения печени, в том числе возможности развития апоптоза.

Ключевые слова: апоптоз, биопсия, каспаза-3, вирусный гепатит, туберкулез, вирус иммунодефицита человека

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CASPASE-3 ACTIVITY IN LIVER BIOPSIES OF PATIENTS WITH MONO AND MIXED INFECTIONS

I.I. Tokin^{1,2}, I.B. Tokin³, T.V. Sologub¹, G.F. Filimonova^{2,3}, P. Hussar⁴

¹Research Institute of Influenza, Ministry of Health of Russia, 15/17 Professor Popov St., St. Petersburg, 97376, Russia;

²I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia, 47 Piskarevskiy proyezd, St. Petersburg, 195067, Russia;

³St. Petersburg State University, 7 University Quay, St. Petersburg, 199034, Russia;

⁴Institute of Anatomy, Tartu University, 18 Yulikooli St., Tartu, 50090, Estonia

Objective: to study the activity of proapoptotic signal protein caspase-3 for determination of peculiarities of apoptosis regulation under liver chronic diseases.

Subjects and methods. The immunohistochemical analysis of caspase-3 activity in 5 liver biopsies of the patients with mono infection of chronic hepatitis B and 5 liver biopsies of the patients with mixed infection of tuberculosis, chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus was fulfilled. Morphological and morphometric analysis of serial microphotographs was performed using an image analysis system (microscope Leica DM 2500, digital camera Leica DFC320 R2 and a computer).

Results. The activity of caspase-3 as dark brown granularity was revealed in all tis-sue components of liver (hepatocytes, epithelium of bile ducts, endotheliocytes, Kupffer cells of sinusoids, in compositions of lymphohistiocyte infiltrations). The maximal activity was discovered in hepatocytes nuclei. The expression of caspase-3 was significantly higher in liver biopsies of the patients with mixed infection. It is typical that the immunoreactive hepatocytes had not any morphological marks of apoptosis.

Conclusion. The caspase-3 expression of proapoptotic signal protein caspase-3 may serve as an early marker of liver damage including the possibilities of apoptosis development.

Key words: *apoptosis, biopsy, caspase-3, viral hepatitis, tuberculosis, human immunodeficiency virus*

Введение

Каспазы играют важную роль в развитии и регуляции апоптоза и воспалительных процессов [1], запущенная каскад ферментативных реакций, которые ведут к конденсации хроматина и фрагментации ДНК. Повышение уровня активации каспаз описано при различных заболеваниях печени [2–4].

Цель исследования – изучение активности проапоптотического сигнального белка каспазы-3 для выяснения особенностей регуляции апоптоза при хронических заболеваниях печени.

Материалы и методы

Исследованы биопсии печени больных хроническим вирусным гепатитом В (HBV) ($n = 5$) и биопсии печени пациентов со смешанной инфекцией (в сочетании с туберкулезом (ТВ), хроническим вирусным гепатитом С (HCV) и вирусом иммунодефицита человека (HIV)) ($n = 5$).

Материал фиксировали в 10 % формалине, парафиновые срезы окрашивали гематоксилин-эозином для морфологического и полуколичественного анализа. Для иммуногистохимического выявления экспрессии каспазы-3 срезы окрашивали в соответствии со стандартной процедурой, рекомендованной производителем набора (Cell Signaling Technology, Inc., США). Первичными антителами служила Cleaved caspase-3 (Asp175). Ядра окрашивали гематоксилином Харриса. Негативный контроль не содержал первичных антител. Анализ серийных микрофотографий выполнен с использованием цифровой аналитической системы (микроскоп Leica DM 2500, цифровая камера Leica DFC320 R2).

Для полуколичественного анализа определяли индекс гистологической активности (ИГА) по R.G. Knodell et al. [5] и стадию фиброза по K. Ishak et al. [6] (таблица). При количественном анализе меченных по каспазе-3 клеточных элементов (однойядерных и двухядерных гепа-

тоцитов, клеток синусоидальной выстилки) в разных отделах долек определяли их процентное содержание.

Возраст пациентов в обеих группах составил от 24 до 39 лет. Компьютерный морфометрический анализ биопсий печени пациентов со смешанной инфекцией выполнен нами ранее [7]. В этой группе клинический диагноз ТВ у всех пациентов определен как очаговый ТВ верхней доли левого или правого легкого в фазе рассасывания и уплотнения.

Результаты

Особенности распределения каспазы-3 в биопсиях печени пациентов с хроническим HBV

Для анализа были использованы биопсии печени пациентов со слабой и умеренной активностью HBV. Наиболее характерны для биопсий печени этой группы расширение портальных зон с незначительной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, центральных вен и части синусоидов, полиморфизм и вакуолизация ядер гепатоцитов. ИГА не превышал 3 баллов, стадия фиброза – F1.

Локализация и распределение иммунореактивных к каспазе-3 клеток

Активность каспазы-3 выявляется в ядрах единичных гепатоцитов (рис. 1). Хроматин приобретает интенсивное темно-коричневое окрашивание, при этом зона расположения ядрышек остается неокрашенной. В двухядерных гепатоцитах, как правило, окрашивалось только одно ядро. Наибольшее число иммунореактивных гепатоцитов выявлено в среднезональных отделах долек (см. рис. 1). Менее выражена активность каспазы-3 в центральных отделах долек и вокруг портальных зон (рис. 2). Каспаза-3 выявляется в ядрах гепатоцитов, не имеющих морфологических признаков апоптоза. Это особенно очевидно при сравнительном анализе срезов, окрашенных гематоксилин-эозином. Количество иммунореактивных гепатоцитов составило 6–8 %; однойядерных иммунореактивных гепатоци-

Полуколичественные и биохимические показатели у пациентов со смешанной инфекцией

| Номер биопсии | ИГА по Knodell | Стадия фиброза по Ishak | Аланинаминотрансфераза | Аспаргатамино- трансфераза |
|---------------|----------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|
| 1 | 15 | F4 | 90 | 68 |
| 2 | 8 | F3 | 45 | 42 |
| 3 | 12 | F3 | 48 | 39 |
| 4 | 9 | F3 | 140 | 90 |
| 5 | 10 | F3 | 162 | 179 |

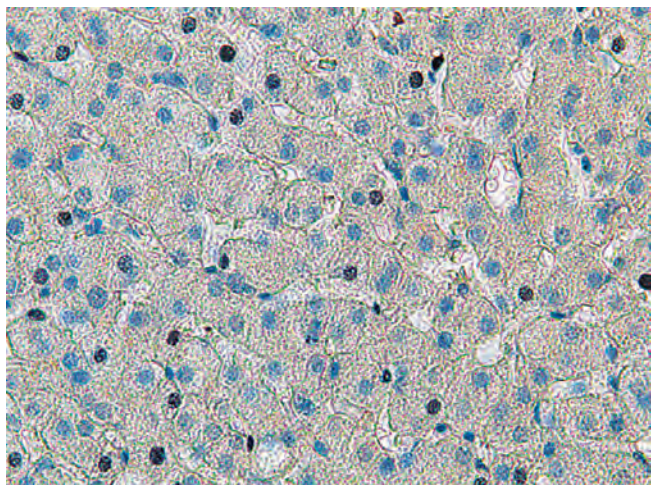


Рис. 1. Биопсия печени пациента с HBV. Умеренная экспрессия каспазы-3 в ядрах гепатоцитов и в отдельных клетках выстилки синусоидов. Об. $\times 40$

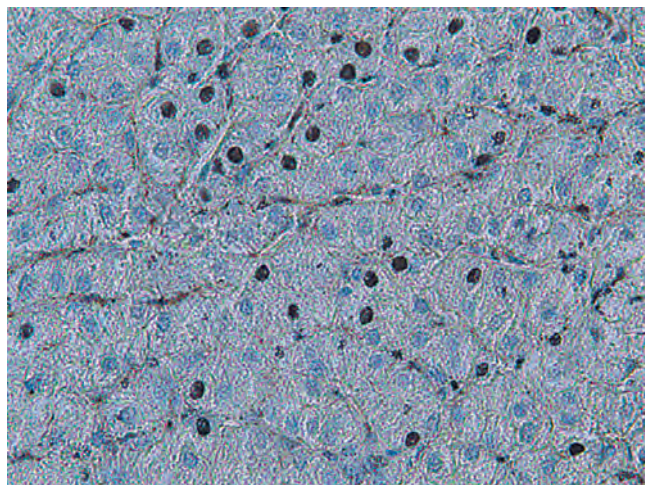


Рис. 3. Биопсия печени пациента со смешанной инфекцией (TB, HCV, HIV). Высокий уровень экспрессии каспазы-3 в ядрах гепатоцитов и в клетках синусоидов. Об. $\times 40$

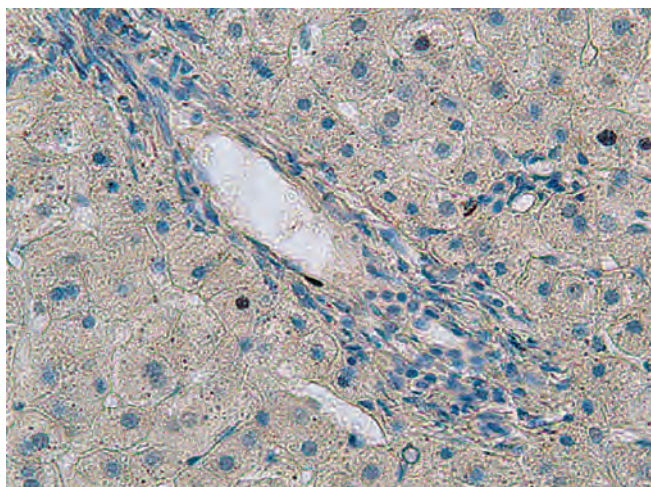


Рис. 2. Биопсия печени пациента с HBV. Экспрессия каспазы-3 в перипортальной зоне дольки. В составе клеток портального тракта активность каспазы минимальна. Об. $\times 40$

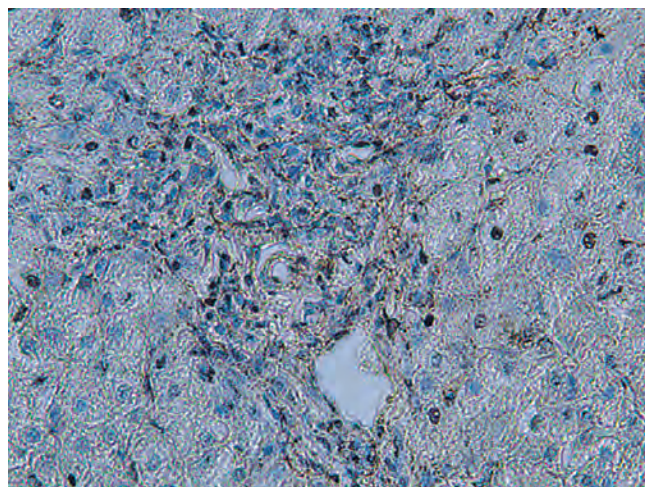


Рис. 4. Биопсия печени пациента со смешанной инфекцией (TB, HCV, HIV). Высокий уровень экспрессии каспазы-3 в ядрах клеток лимфоцитарного инфильтрата портального тракта. Об. $\times 40$

тов – 2,8–3,6 %, а меченых двуядерных гепатоцитов – 3,2–4,4 %. Активность каспазы-3 выявлена также в ядрах и цитоплазме клеток, выстилающих синусоиды, главным образом в купферовских клетках (см. рис. 1). Количество иммунореактивных клеток синусоидов колебалось в разных отделах долек от 0,5 до 1,5 %. В составе портальных зон окрашивались только единичные клетки соединительной ткани (см. рис. 2). У этой группы пациентов воспалительные изменения были выражены слабо.

Особенности распределения каспазы-3 в биопсиях печени пациентов со смешанной инфекцией (TB, HCV, HIV)

Воспалительно-некротические изменения более выражены в биопсиях группы пациентов со смешанной инфекцией. В составе портальных трактов присутствует выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Внутри долек печени выявляется множество мелкооча-

говых инфильтратов. Синусоиды часто содержат лимфогистиоцитарные клетки. ИГА достигает 15 баллов, стадия фиброза – F3–4. Экспрессия каспазы-3 в биопсиях этой группы пациентов значительно выше, чем у больных моноинфекцией HBV. Количество меченных по каспазе гепатоцитов колеблется в разных отделах долек от 15 до 45 %. Экспрессия каспазы-3 в ядрах гепатоцитов особенно демонстративна в центральных отделах долек. Во всех отделах долек чаще окрашиваются ядра в одноядерных гепатоцитах (рис. 3). В двуядерных гепатоцитах обычно окрашиваются оба ядра. Экспрессия каспазы-3 в биопсиях пациентов со смешанной инфекцией значительно выше как в цитоплазме, так и в ядрах клеток синусоидов (см. рис. 3). Число иммунореактивных клеток синусоидов достигало 15–20 %. Активность каспазы-3 выявлена в составе множества клеток лимфогистиоцитарных инфильтратов портальных зон (рис. 4).

Обсуждение

Экспрессия каспазы-3 в той или иной мере выявлена нами практически во всех клеточных элементах биоптатов, что подтверждает их взаимосвязь в развитии как патологических, так и защитных реакций.

Данные о взаимосвязи активности каспазы-3 и степени воспалительных и фиброзных изменений в биоптатах печени противоречивы [3, 8–10]. Наше исследование подтверждает существование такой зависимости. При моноинфекции воспалительно-некротические изменения были выражены слабее: ИГА не превышал 3 баллов, стадия фиброза – F1. Меченные по каспазе-3 гепатоциты составляли 6–8 %. При смешанной инфекции ИГА достигал 15 баллов, стадия фиброза – F4. Доля меченных по каспазе-3 гепатоцитов варьировала от 15 до 45 % в разных отделах долек. Активация каспазы-3 резко возростала в других элементах печени – в стенке синусоидов, в составе лимфогистиоцитарных инфильтратов портальных трактов.

Апоптотический индекс в биоптатах печени больных HCV с использованием метода TUNEL [11, 12] варьировал от 0,02 до 1,2 %. Проведенное исследование показало, что количество меченных по каспазе-3 гепатоцитов значительно превышает число апоптотических клеток. При иммуногистохимическом исследовании каспазы-3 окрашиваются гепатоциты, не имеющие явных морфологических признаков апоптоза (см. рис. 1–4). Аналогичные результаты приводят и другие авторы [3, 8]. Активация каспазы-3, возможно, идентифицирует более ранние стадии развития апоптоза [3]. Фрагментация ДНК распознается, по-видимому, на поздних стадиях апоптоза. Выявление активности

каспазы-3 в клетках лимфогистиоцитарных инфильтратов свидетельствует о существенной роли апоптоза в регуляции воспалительных процессов. Ранее отмечалось, что, являясь универсальным биологическим механизмом, апоптоз при вирусных гепатитах может приводить к избыточной гибели не только гепатоцитов, но и других клеточных популяций, отражая либо системный иммуновоспалительный ответ на инфекцию, либо внепеченочную персистенцию вируса [13].

Заключение

В данной работе впервые исследована активность каспазы-3 в биопсиях печени больных хроническим HBV и при смешанном инфицировании (ТВ, HCV, HIV). Экспрессия каспазы-3 в той или иной мере выявляется во всех структурных компонентах печени: в гепатоцитах, клетках синусоидов, составе портальных зон и внутридольковых фокальных некрозов, эпителии желчных протоков, что иллюстрирует тесную взаимосвязь всех тканевых элементов печени в развитии патологических процессов. Существенное повышение экспрессии каспазы-3 в биоптатах печени больных со смешанной инфекцией в значительной мере связано с разницей в степени гистологической активности.

Мониторинг каспазы-3 может служить маркером раннего повреждения тканей печени. Он полезен при определении эффективности терапии и выборе стратегии терапевтических мероприятий, а также открывает дополнительные диагностические возможности при хронических заболеваниях печени, в том числе при вирусных гепатитах.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(3):459–70.
- Bantel H., Ruck P., Schultze-Osthoff K. In situ monitoring of caspase activation in hepatobiliary diseases. *Cell Death Differ* 2000;7(5):504–5.
- Bantel H., Luger A., Poremba C. et al. Caspase activation correlates with the degree of inflammatory liver injury in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):758–67.
- Bantel H., Ruck P., Gregor M., Schulze-Osthoff K. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *Eur J Cell Biol* 2001;80(3):230–9.
- Knodell R.G., Ishak K.G., Black W.C. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1(5):431–5.
- Ischak K., Baptista A., Bianchi L. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22(6):696–9.
- Tokin I.B., Tokin I.I., Filimonova G.F. Computer image analysis of liver biopsy specimens in patients with heroin abuse and coinfection (tuberculosis, HCV, HIV). In: N. Tagaya (ed.). *Liver biopsy – indications, procedures, results*. 2012. Pp. 235–56.
- McPartland J.L., Guzail M.A., Kendall C.H., Pringle J.H. Apoptosis in chronic viral hepatitis parallels histological activity: an immunohistochemical investigation using anti-activated caspase-3 and M30 cytochrome antibody. *Int J Exp Pathol* 2005;86(1):19–24.
- Piekarska A., Kubiak R., Omulecka A. et al. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand and caspase-3 in relation to grade of inflammation and stage of fibrosis in chronic hepatitis C. *Histopathology* 2007;51(5):597–604.
- Salama H., Medhat I., El-Makhzangy H. et al. Detection of caspase-3 activity in sera of Egyptian patients with chronic HCV and normal ALT level. *Med J Cairo Univ* 2009;77(4):237–42.
- Tokin I.B., Hussar P., Filimonova G. et al. Features of the liver apoptosis in patients with chronic hepatitis C viral infection (HCV). The 7th international Cell Death Society Symposium “Targeting cell death pathways for human diseases”. Shanghai, China, 2008. 127 p.
- Tokin I.B., Hussar P., Filimonova G. et al. Features of liver apoptosis in chronic hepatitis C virus infection. *Papers on Anthropology* 2009;18:361–71.
- Буверов А.О. Апоптоз и вирусные гепатиты. Вирусные гепатиты: достижения и перспективы 2001;1(11):12–4. [Buyerov A.O. Apoptosis and viral hepatitis. *Viral hepatitis: achievements and outlooks* 2001;1(11):12–4. (In Russ.)].