

# Zmiany molekularne w hepatocytach związane z rozwojem pierwotnego raka wątroby

## Molecular hepatocyte disorders connected with primary liver carcinoma

Sylwia Serafińska, Monika Pazgan-Simon, Krzysztof Simon

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych, AM we Wrocławiu

**Summary:** Hepatocellular carcinoma is the fifth most common cancer in the world and the fourth cause of death. The global incidence of HCC is increasing. In Poland the number of patients suffering from HCC has not been determined.

Liver cancer develops in a liver changed by chronic viral inflammation caused by HCV, HBV, nonalcoholic fatty liver disease, or toxic, autoimmune, or hereditary liver cirrhosis. If there is more than one cause of liver illness, especially HBV/HCV, HBV/HDV, or HIV co-infection or alcohol intake, liver cancer will develop earlier.

Patients usually present few nonspecific symptoms and the majority of them have advanced disease with poor prognosis and not many treatment possibilities. Hepatocellular carcinoma is a very heterogeneous disease with different etiologies, structures, biological behaviors, and molecular carcinogenic mechanisms, among them the growth factor-stimulated receptor Tyrosine Kinase pathways, the PI3 kinase/AKT/mTOR pathway, the Wnt/beta-catenin pathway, the angiogenic signaling pathway, and many others.

The focus here is on pathways important for molecular targeted therapy.

**Słowa kluczowe:** rak wątrobowo-komórkowy • marskość wątroby • zmiany molekularne

**Key words:** hepatocellular carcinoma • liver cirrhosis • molecular changes

**Adres do korespondencji:** Monika Pazgan-Simon, Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych, Wątroby i Nabytych Niedoborów Odpornościowych, AM we Wrocławiu, ul. Koszarowa 5, 51-149 Wrocław, Polska, e-mail: monika.pazgan.simon@onet.eu

### Wstęp

Rak wątrobowo-komórkowy (HCC – hepatocellular carcinoma) jest nowotworem wywodzącym się ze zmienionych genotypowo i fenotypowo komórek wątroby. HCC jest najczęstszym pierwotnym nowotworem wątroby, piątym nowotworem co do częstości zapadalności i trzecią przyczyną zgonów z powodu nowotworów na świecie. W Polsce w 2006 roku rozpoznano 1453 przypadki nowych zachorowań, 800 u mężczyzn i 653 u kobiet. Największą zapadalność stwierdza się w województwach śląskim (109 mężczyzn: 72 kobiety), wielkopolskim (80:60), dolnośląskim (62:61) i małopolskim (72 mężczyźni) [1]. Obecnie obserwuje się trend wzrastającej zapadalności na HCC.

### Etiologia

Do uznanych czynników ryzyka rozwoju HCC zaliczamy marskość wątroby bez względu na etiologię oraz przewlekłe choroby wątroby: na tle zakażenia wirusami hepatotropowymi (HBV – 30–40% przypadków wszystkich przypadków HCC nawet przy braku marskości, szczególnie w Azji i Afryce; HCV – przeważająca etiologia w stanach Zjednoczonych, Japonii i Europie Zachodniej), choroby metaboliczne: hemochromatoza (w stadium marskości w 10% przypadków prowadzi do rozwoju nowotworu [2]), niedobór alfa-1AT, wrodzona tyrozynemia, choroba Wilsona. Do uznanych karcynogenów hepatocytów zaliczmy też: aflatoksyny (pochodzące z orzeszków ziemnych), thorotrast, „żółcień maślaną” czyli dwumetyloaminoazobenzon. Nowotworzeniu sprzyja również nikotynizm, płęć męska, hormony anaboliczne i estrogeny oraz alkoholizm [3].

Aktualnie podkreśla się rosnące znaczenie stłuszczenia w rozwoju patologii wątroby: NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) – niealkoholowa choroba stłuszczeniowa wątroby odpowiada za 0,5% nowotworów pierwotnych wątroby, dodatkowo przy zagrażającej życiu otyłości (BMI >35) ryzyko wzrasta do 4,52% [4]; w przypadku marskości na tle NASH 5 letnie ryzyko HCC wynosi 7,6% [5]. Istotnym problemem jest też synergistyczne uszkadzające działanie alkoholu oraz koinfekcji wirusowych HBV/HCV, HBV/HDV, czy HCV/HIV, HBV/HIV [6].

### Patomechanizm

W przebiegu wszystkich wyżej wymienionych przewlekłych chorób wątroby dochodzi do indukcji zaprogramowanej śmierci komórki, następnie pobudzenia procesów regeneracji i naprawy, które prowadzą do przedwczesnego starzenia narządu. Procesy te związane są z utratą mechanizmów kontrolnych oraz regeneracyjnych komórki i pobudzeniem aberracji chromosomalnych oraz mechanizmów komórkowych dojrzewania i apoptozy, co w wątrobie związane jest z nadmierną ekspresją zrębu guza oraz włóknieniem narządu, a przy jednoczesnej przebudowie cytoangioarchitektoniki narządu a więc powstawania zrzadkonych określane jest jako marskość wątroby. Cytokiny i chemokiny, wydzielane w trakcie zakażenia, szczególnie w związku z pobudzeniem transkrypcji czynnika NF- $\kappa$ B, aktywują kaskadę zapalną mającą kluczową rolę w karcynogenezie.

Rak wątrobowo-komórkowy należy do nowotworów bardzo zróżnicowanych. Zarówno etiologia tego guza jest złożona, podobnie jak formy morfologiczne: postać jednoguzkowa, wieloguzkową lub rozsianą; zróżnicowana jest również zdolność HCC do tworzenia przerzutów-wyjątkowo rzadka w postaci włóknistoblastkowej, po szybko przerzutujące w innych postaciach.

Również złożone są mechanizmy molekularne prowadzące do powstania nowotworu. W tym procesie biorą udział aktywowane ścieżki sygnałowe: Ras/Raf/Mek/Erk oraz PI3k/Akt/mTor, pobudzenia czynników wzrostu (EGFR epidermal growth factor receptor, FGFR – fibroblast growth factor receptor, PDGFR – platelet derived growth factor receptor, VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor) oraz czynników angiogenezy, białko p 53 oraz cząstki regulatorowe cyklu komórkowego [7]. Natomiast mechanizm wzrostu guza związany jest przede wszystkim z pobudzeniem receptora kinazy tyrozynowej i aktywacją ścieżek sygnałowych wewnątrz komórkowych prowadzących do proliferacji, migracji i tworzenia przerzutów.

### Ścieżka receptora kinazy tyrozynowej

Ta ścieżka aktywowana jest poprzez związanie się z tym receptorem czynników wzrostu: EGFR, FGFR, PDGFR, HGF (hepatocyte growth factor), co wywołuje fosforylację receptora oraz zmiany wewnątrzkomórkowe. Dochodzi do aktywacji kompleksu cząstek Grb2/Shc/SOS i następowej aktywacji kaskady mitogenowych kinaz białkowych Ras/Raf/Erk i (MAPK) oraz AP-1 aktywatorów transkrypcyjnych c-fos i c-jun, które są promotorami transkrypcji genów pobudzających proliferację komórki. Udowodniono że nowotwory pierwotne wątroby, które powstają w tym mechanizmie cechuje gorsze rokowanie.

### Epidermal growth factor

EGF- i TGF-(transforming growth factor) związane są z regulacją cyklu komórkowego. Znane są 4 receptory dla EGF – human epidermal growth factor receptor (HER-1-4), składający się z domeny zewnątrz i wewnątrzkomórkowej. Po związaniu EGF z receptorem dochodzi do zmian konformacyjnych, aktywacji wewnątrzkomórkowej kinazy tyrozynowej i związania z ufosforylowaną tyrozyną, co skutkuje aktywacją wielu ścieżek nowotworowych z proliferacją, inwazją, tworzeniem naczyń i przerzutów oraz inhibicją apoptozy. Czynniki te zdają się odgrywać znaczącą rolę w guzach nisko zróżnicowanych oraz stanach wczesnych rozwoju guza. [7,8].

### Ścieżka PI3k/Akt/mTor

Również w tym przypadku aktywacja rozpoczyna się od związania kinazy tyrozynowej z receptorem insulino-podobnego czynnika wzrostu, dochodzi do aktywacji rodziny enzymów PI3K-kinazy 3 fosfatydyloinozytolu, który tworzy wtórny informator lipidowy PIP-3-3 fosforylowany fosfoinozytol. Ten związek aktywuje Akt/kinazę białkową B, która ma zdolność fosforylacji licznych białek m.in. proapoptycznego białka B, które jest inaktywowane przez fosforylację, białka mTOR, które fosforyluje białko represorowe transkrypcji PHAS-1/4 E-BP i kinazę p70 S6, które są promotorami progresji cyklu komórkowego. Ścieżka ta jest hamowana przez białko supresorowe PTEN, którego stężenie jest zmniejszone lub nieobecne w co najmniej połowie postaci HCC. Ten sposób nowotworzenia obecny jest w 45% guzów HCC.

### Ścieżka Wnt/beta kateniny

Wnt jest wydzielaną glikoproteiną bogatą w cysteinę, która wiąże się z receptorem nazywanym Frizzled. W nieaktywnej komórce beta-kenina jest zlokalizowana po wewnętrznej stronie komórki w powiązaniu z E- katedheryną. Natomiast beta-kenina osoczowa jest fosforylowana przez komplet: APC, AXIN1 i 2 oraz GSK3 beta, a następnie degradowana do proteosomów; ogólnie stężenie w osoczu tego związku jest niskie. Związanie WNT z receptorem Frizzled powoduje mobilizację AXIN oraz rozpad kompleksu fosforylującego beta-keninę. Skumulowana b-kenina transportowana jest do jądra i wchodzi w interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym komórek T-TCF oraz LEF wzmagając ekspresję genów oraz stymulując proliferację komórki [7,9].

Ścieżka ta aktywowana jest w około 30% guzów pierwotnych wątroby i wiąże się z dłuższym okresem przeżycia.

### Ścieżka angiogenezy

W procesie hepatoonkogenezy niezwykle istotna jest ścieżka angiogenezy. zależna od czynników wzrostu naczyń FGF (Fibroblast growth factor), PDGF (Platelet derived endothelial cell growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) oraz innych związków: angiopoetyny, cyklooksygenazy 2, itp. Czynniki te wydzielane są przez komórki guza, i oddziałują w pętli parakrynej na komórki endotelialne odpowiedzialne za proliferację i migrację przez ścieżki Ras, PI3K oraz STATs oraz na pericyty wydzielające VEGF. Wzajemne oddziaływanie autokryjne i parakryjne między tymi 3 układami reguluje angiogenezę guza [10].



Fibroblast growth factors są rodziną 22 czynników, z których najlepiej zbadane są a-FGF – acidic fibroblast growth factor oraz b-FGF – basic fibroblast growth factor. Czynniki te oddziałują przez różne receptory endotelium np. receptory kinazy tyrozynowej FGFR1 i 2, proteoglikany, integryny. Czynniki bFGF działa synergistycznie z VEGF w indukcji angiogenezy. Ekspresja tego czynnika koreluje w biopsjach guza z zaawansowaniem angiogenezy [10].

VEGF jest jednym z najlepiej poznanych czynników angiogenezy. Wiadomo, że ma działanie mitogenne na komórki endotelium, i wpływa na tworzenie związków macierzy wspomagających wzrost komórek endotelialnych i umożliwiających inwazję komórek w głąb zrębu rozwijającego się guza. Generalnie czynnik ten jest istotny w rozwoju unaczynienia guza stąd największy jest jego udział w początkowych stadiach rozwoju guza. Ekspresja jego wzrasta w trakcie zmian guza od zmian dysplastycznych niskozróżnicowanych do wczesnego HCC, ekspresję tego czynnika wykazano w 69,9% guzów HCC z otoczką, oraz 78,3% guzów bez otoczki. VEGF odgrywa również rolę w progresji guza oraz tworzeniu przerzutów. Badania wskazują, że VEGF może działać autokrynnie jako czynnik stymulacji proliferacji guza [8].

Ta ścieżka nowotworzenia występuje w przypadku zapalenia wirusowego wątroby typu B-HBx proteina aktywuje VEGF przez ścieżkę HIF1-alfa i odgrywa znaczącą rolę w karcynogenezie [11].

### Procesy apoptotyczne

Komórki *hepatocarcinoma* HCC charakteryzują się tzw. opornością na apoptozę. Zaburzenia naturalnej równowagi między proliferacją a śmiercią komórkową stanowią podłoże nowotworzenia w HCC.

Obok typowego dla każdej komórki nowotworowej uniezależnienia się od czynników i inhibitorów wzrostu, zdolności do przerzutowania i podtrzymywania angiogenezy, wykazują one również nadekspresję czynników hamujących apoptozę (inhibitor białek apoptozy IAP, ang. *inhibitor of apoptosis protein*, inhibitor czynników FADD i FLICE – FLIP ang. *FADD/FLICE/caspase-8 inhibitory protein*) i/lub zmniejszoną a nawet brak ekspresji czynników aktywujących apoptozę (receptor Fas/CD95/APO-1) [12].

Większość HCC prezentuje jedno lub kilka zaburzeń molekularnych drogi zależnej od Fas/FasL, które hamują apoptozę zależną od Fas. Ekspresja Fas ligandu (FasL) jest wyraźnie zwiększona, co prawdopodobnie umożliwia (na drodze niszczenia komórek sąsiednich) ekspansję guza i tłumaczy częściowo właściwości metastatyczne tkanek nowotworowych. Dzięki wydzielanemu FasL komórki nowotworowe są uprzywilejowane immunologicznie. Mogą inicjować apoptozę w komórkach pełniących funkcje przeciwnowotworowe (limfocytach posiadających receptory Fas). Nowotwory wątrobowokomórkowe o wysokiej ekspresji FasL mają znac-

nie gorsze rokowanie od tych z niską ekspresją FasL [13]. Wykazano, że status ekspresji Fas/FasL hepatocytów może być czynnikiem predykcijnym nawrotu HCC [14].

Ligand indukujący TNF-zależny, tzw. układ TRAIL, pełni rolę indukującą apoptozę w nowotworach wątroby, podczas gdy prawidłowe hepatocyty nie są wrażliwe na jego obecność. Komórki HCC konstytutywnie wydzielają TRAIL mRNA oraz jego białkowy transkrypt. Fakt ten pozostaje w sprzeczności z omawianymi innymi mechanizmami apoptotycznymi charakterystycznymi dla HCC. Wydaje się jednak, że komórki HCC, mimo powszechnej obecności TRAIL są na ten układ niewrażliwe, a nawet wydzielają mediatory hamujące wpływ TRAIL [15], uzyskując w ten sposób status nieśmiertelnych.

W komórkach HCC zaobserwowano istotną zmianę równowagi między białkami pro i antyapoptotycznymi należącymi do licznej rodziny białek Bcl-2. Wykazano ekspresję Bcl-2, którego nie syntezują prawidłowe hepatocyty oraz nadekspresję bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, c-IAP1, XIAP, oraz, niezależnie od rodziny Bcl-2, nadekspresję czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Zapobiegają one proapoptotycznemu oddziaływaniu układu Fas/FasL oraz TRAIL, przez co umożliwiają niekontrolowaną proliferację komórek nowotworowych [16]. W szczególności wysoki poziom białka hamującego apoptozę XIAP, naturalnego inhibitora kaspazy 8, obserwowany w ponad 90% przypadków HCC silnie koreluje z potencjałem metastatycznym i antyapoptotycznym komórek nowotworowych.

Zmiana ekspresji i/lub aktywacji białka p53 na podłożu mutacji genu supresorowego dla nowotworów p53 jest częsta w komórkach HCC. Odpowiada to za endogenne procesy karcynogenezy (w przebiegu hemochromatozy), wpływ środowiskowych czynników promujących nowotworzenie (afłatoksyna B1, HBV) oraz za niewrażliwość komórek HCC na klasyczne chemioterapeutyki [17]. Brak prawidłowego białka p53 lub zaburzenia jego budowy uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie są najprawdopodobniej silnie związane z niestabilnością chromosomalną zależną od dysfunkcji telomerów, co jest cechą charakterystyczną dla HCC, promującą przetrwanie komórek nowotworowych.

### Podsumowanie

Obecnie znanych jest wiele molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za inicjację i progresję HCC, u podłoża których leży zaburzenie równowagi między siecią sygnałów apoptozy i przeżycia preneoplazmatycznych hepatocytów a także zdolnością do podtrzymywania angiogenezy. Liczne proapoptotyczne czynniki ulegają zahamowaniu, inaktywacji bądź nie są produkowane, w przeciwieństwie do czynników antyapoptotycznych, podlegających zwiększonej ekspresji lub przyspieszonej aktywacji. W związku z tym komórki nowotworowe raka wątroby prezentują liczne uwarunkowania promujące ich przeżycie oraz niewrażliwość na wpływ układu immunologicznego i potencjalnych leków przeciwnowotworowych.

### Piśmiennictwo:

1. [www.pzh.gov.pl](http://www.pzh.gov.pl)
2. Kowdley KV: Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2004; 127: 79–86
3. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F i wsp: Natural course of chronic HCV and HBV infection and role of alcohol in the general population: the Dionysos Study. *Am J Gastroenterol*, 2008; 103(9): 2248–53
4. Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L i wsp: Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol*, 1997; 26(1): 1–5

5. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J i wsp: The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population- based cohort study, *Gastroenterology*, 2005; 129: 113–21
6. Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M i wsp: Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *J Gastroenterol*, 2009; 44(Suppl.19): 89–95
7. Thomas M: Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma, *J Gastroenterol*, 2009; 44: 136–41
8. Furuse J: Growth factor as therapeutic targets in HCC. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008; 67: 8–15
9. Roberts LR: Emerging Experimental Therapies for Hepatocellular carcinoma: What if You Can't Cure? Postgraduate Course 2007, AASLD, Boston, USA, 185–95
10. Tanaka S, Aii S: Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol*, 2006; 11: 82–89
11. Yoo YG, Oh SH, Parc ES i wsp: Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia – inducible factor 1 alpha through activation of mitogen activated protein kinase pathway, *J Biol Chem*, 2003; 278: 309076–84
12. Nakajima Y, Hisanaga M, Kayagaki N i wsp: The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinomas: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance *in vivo*? *Hepatology*, 1999; 30: 413–21
13. Serafińska S, Simon K: Apoptoza w wybranych chorobach wątroby – implikacje kliniczne i terapeutyczne. *Med Sci Rev Hepatol*, 2007; 7: 104–10
14. Ito Y, Monden M, Takeda T i wsp: The status of Fas and Fas ligand can predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 2000; 82: 1211–17
15. Shiraki K, Yamanaka T, Inoue H i wsp: Expression of TNF-related apoptosis inducing ligand in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 2005; 26: 1273–81
16. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ: Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver diseases: an overview. *Semin Liver Dis*, 1998; 18: 105–14
17. Fabregat I: Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol*, 2009; 15(5): 513–20

