

А.В.Євсєєв

Запорізький державний
медичний університет

Ключові слова: карцинома підшлункової залози, інвазивність новоутворення, клітинна проліферація, апоптоз.

Надійшла: 11.09.2014

Прийнята: 23.09.2014

УДК: 616.37-006.6-036.4-091.8

ОСОБЛИВОСТІ ПРОЦЕСІВ ПРОЛІФЕРАЦІЇ І АПОПТОЗУ В ІНВАЗИВНІЙ ПРОТОВИЩІ АДЕНОКАРЦИНОМІ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Дослідження інвазивно-метастатичних властивостей пухлин і їх раннє прогнозування в біоптатах хворих» (номер державної реєстрації 0114U000967).

Реферат. На гістологічних препаратах операційного матеріалу панкреато-дуоденальних резекцій 80 хворих на протоковий рак без інвазії та інвазивну аденокарциному проводили імуногістохімічні дослідження маркерів Ki-67, p53, p16^{INK4A}, p21^{WAF1} та Caspase-3. Протокову аденокарциному характеризує низький рівень експресії маркера проліферації Ki-67. Інвазивна протокова аденокарцинома відрізняється від аденокарциноми без інвазії достовірно вищим рівнем ядерної експресії Ki-67 та p53 і цитоплазматичної експресії каспази-3 атипичним епітелієм залоз при однаково високому рівні експресії p21^{WAF1} і низькому рівні експресії p16^{INK4A}.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 3. – С. 23-26.

© А.В.Євсєєв, 2014

✉ evseevanton@ukr.net

Evseyev A.V. Features of proliferation and apoptosis of invasive pancreatic ductal adenocarcinoma.

ABSTRACT. Background. Current immunohistochemical identification of prognostic markers of the pancreatic ductal adenocarcinoma needs to be improved, as it helps to estimate the rate of invasion and imidiation, and consequently give an opportunity to predict the individual behavior of tumor in every case. **Objective.** The purpose of the work was to investigate the proliferative and apoptotic activity of invasive pancreatic ductal adenocarcinoma and adenocarcinoma without invasion with the help of immunocytochemical markers. **Methods.** Operational materials of pancreato-duodenal resections from 80 patients with invasive and non-invasive pancreatic ductal adenocarcinoma were used to examine the expression of Ki-67, p53, p16, p21 and Caspase-3 immunocytochemical markers. **Results.** Ductal adenocarcinoma is characterized by the low level of proliferation marker Ki-67 expression. An invasive ductal adenocarcinoma differs from an adenocarcinoma without invasion by the significantly higher level of nuclear expression of Ki-67 and p53 and cytoplasmic expression of caspase-3 by the atypical epithelium of glands at the identically high level of p21^{WAF1} and low level of p16^{INK4A} expression. **Conclusion.** 1. Pancreatic ductal adenocarcinoma without invasion is distinguished by the prominent tissue-cellular atypism, presence of rich desmoplastic stroma, low level of nuclear expression of Ki-67 (1,42±0,06 point) by the epithelium of malignant ductular cells, tubular and glandular structures, presence of pathological mitoses and absence of perineural invasion loci and invasion of the tumor into surrounding organs. 2. The invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma is diagnosed much more often, it differs from an adenocarcinoma without invasion by its expansion on perineural spaces and surrounding organs, and also by the significantly higher level of nuclear expression of Ki-67 and p53 and cytoplasmic expression of caspase-3 in cancer cells at the identically high level of p21^{WAF1} and low level of p16^{INK4A} expression. 3. The invasion zone of ductal adenocarcinoma to duodenum is characterized by moderate proliferative activity of tumor cells (2,24±0,26 point), lower, than in the main mass of malignant tumor. At the same time, levels of p53 (30,06±4,2%) and caspase-3 expression in these zones substantially were not differ (81,2±2,8%) in atypical cells from expression of these markers in the main tumor mass of invasive adenocarcinoma.

Key words: pancreatic cancer, neoplasm invasiveness, cell proliferation, apoptosis.

Citation:

Evseyev AV. [Features of proliferation and apoptosis of invasive pancreatic ductal adenocarcinoma]. *Morphologia*. 2014;8(3):23-6. Ukrainian.

Вступ

Протокова аденокарцинома (ПА) підшлункової залози (ПЗ) є однією з найбільш розповсюджених злоякісних пухлин шлунково-кишкового тракту, при якій внаслідок пізньої діагностики п'ятирічної виживаності після оперативного

втручання вдається досягти лише у 10% хворих, а середня 5-річна виживаність після радикального хірургічного лікування складає 8–45% [1], що робить її однією з найнебезпечніших пухлин. Перипанкреатична інвазія пухлини при карциномі головки ПЗ розповсюджується на заочере-

винну жирову тканину, вени та нерви, а в прогресуючих випадках – на сусідні органи та очеревину. Карцинома тіла та хвоста ПЗ має більш широке місцеве розповсюдження, яке включає інвазію селезінки, шлунку, наднирників, товстого кишечника та очеревини. У зв'язку з цим актуальним залишається пошук альтернативних методів ранньої біопсійної діагностики на предінвазивному етапі та індивідуального прогнозування перебігу ПА ПЗ. Новітнім, але недостатньо розвиненим напрямом є імуногістохімічна (ІГХ) ідентифікація в пухлині прогностичних маркерів, що забезпечують здатність її клітин до інвазивного росту та до метастазування, а отже дають змогу оцінити індивідуальний перебіг ПА у кожної хворого.

У багатьох дослідженнях [2–6] було встановлено незалежну прогностичну роль рівнів окремих регуляторних і функціональних протеїнів (Ki-67, каспази-3, p53, p16^{INK4A}, p21^{WAF1}, Smac, K-ras), котрі беруть участь у процесах проліферації та апоптозу пухлинних клітин. Але особливості експресії цих маркерів в інвазивних і неінвазивних ПА ПЗ вивчено не повністю, подальшого дослідження потребують імуногістохімічні особливості зони інвазії аденокарциноми в тканину ПЗ, у прилеглі органи (дванадцятипалу кишку, фатерову ампулу, жовчний міхур), а також периневральної інвазії, у порівнянні з основним масивом клітин злоякісної пухлини.

Мета роботи – імуногістохімічне визначення профілю експресії маркерів проліферації і апоптозу у зонах інвазії протокової аденокарциноми підшлункової залози.

Матеріали та методи

Дослідження було проведене на післяопераційному матеріалі 80 пацієнтів віком від 51 до 68 років, яким була виконана панкреатодуоденальна резекція з приводу ПА ПЗ. Шматочки тканини з пухлини, ПЗ та оточуючих органів фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні і заливали в парафін. Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином, за Ван Гізон, методом Массон-триколю і альціановим синім за загальноприйнятими методиками. ІГХ дослідження проводили за стандартною методикою [7] з використанням первинних антитіл проти Ki-67 Antigen, Clone MIB-1; p53 Protein, Clone DO-7; (DAKO, США), Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP03; p21^{WAF1} Ab-3, Clone DCS-60.2 (NeoMarkers, США) та Anti-p16[INK4], Clone G175-405 (BioGenex, США). Для цього парафінові зрізи поміщали на адгезивні скельця SuperFrost Plus (Menzel Glaser, Німеччина), після депарафінації та високотемпературного демаскування антигенів у Трис-ЕДТА буфері з рН=9 проводили інкубацію з первинними антитілами згідно рекомендацій фірми-виробника, та візуалізацію ІГХ-реакції за допомогою системи детекції EnVision FLEX з діамінобензидином (DAKO, США). Ре-

зультати кожної ІГХ реакції оцінювали напівкількісним методом шляхом підрахунку відсотка позитивно забарвлених клітин у стандартизованому полі зору мікроскопа AxioPlan 2 («Carl Zeiss», Німеччина) при збільшенні $\times 200$; у кожному випадку аналізували 200 клітин у 5 полях зору. Проліферативну активність клітин ПА ПЗ визначали за ядерною експресією Ki-67 у балах: 0 балів = 0–5% клітин з імунопозитивними ядрами, 1 бал = 6–25%, 2 бали = 26–50%, 3 бали = 51–75%, 4 бали = 76–100% клітин з імунопозитивними ядрами. При визначенні рівня експресії маркера Ki-67 0 і 1 бал оцінювали як низький рівень експресії, 2 і 3 бали як помірний, а 4 бали як високий рівень експресії. Рівень цитоплазматичної експресії каспази-3 розцінювали як слабкий при наявності 0–33% імунопозитивних клітин ПА ПЗ, як помірний – при 34–66%, як виразний – при 67–100% імунопозитивних клітин. Низький рівень експресії p53, p16^{INK4A} та p21^{WAF1} реєстрували при наявності <10% пухлинних клітин з імунопозитивними ядрами, високий рівень – при наявності 11–29% імунопозитивних клітин, а про гіперекспресію цих маркерів свідчила наявність $\geq 30\%$ таких клітин.

Результати та їх обговорення

При детальному патогістологічному дослідженні виявили, що ПА ПЗ характеризуються добре розвиненими залозистими структурами, які нагадують нормальні панкреатичні протоки, оточені багатою десмопластичною стромою, яка є постійною ознакою цих пухлин. Також спостерігаються тубулярні, гратчасті та папілярні структури. Мітотична активність, як правило, є низькою. Муцин-продукуючі пухлинні клітини характеризуються циліндричною формою, слабееозинофільною цитоплазмою і великим ядром круглої або овоїдної форми з виразною ядерною мембраною і чітко помітними ядерцями, чого не спостерігається в епітеліоцитах нормальних проток. У ділянках помірного диференціювання карциноми переважно мають змішаний вигляд з протокоподібних і тубулярних структур, трапляються неповністю сформовані залози зі зниженою продукцією муцину клітинами, іноді у великій кількості виявляються світлі клітини, частіше спостерігаються фігури мітозів.

У 61 хворого (76,25%) за результатами патоморфологічного дослідження була встановлена наявність інвазивного росту ПА в навколишню тканину ПЗ по міждольковим просторам. З цих хворих у 57 (71,25%) була також виявлена периневральна інвазія пухлини, а у 23 (28,75%) – інвазивний рост пухлини в навколишні органи (дванадцятипалу кишку, жовчний міхур, великий сальник). На межі інвазії ПА ПЗ виявляли пухлинні залози або дрібні злоякісні протокоподібні структури з незначною або помірною кількістю оточуючої десмопластичної стромы між ними, або визначали поширені солідні пласти злоякіс-

них клітин, іноді з наявністю атипичного залозистого або папілярного компонентів.

При ІГХ дослідженні виявили, що в основному масиві неінвазивної ПА ПЗ визначається низький рівень експресії маркера клітинної проліферації Ki-67 ($1,42 \pm 0,06$ бала). Цей показник є

достовірно вищим при інвазивній ПА ($2,8 \pm 0,08$ бала, $p < 0,05$). Найвищим рівнем експресії Ki-67 характеризуються злоякісні клітини протокового раку солідно-клітинного та папілярного компартментів, а найнижчим – клітини злоякісних протокоподібних структур (табл. 1).

Таблиця 1
Рівень експресії маркерів проліферації (Ki-67), апоптозу (каспаза-3) та регуляції клітинного циклу (p53, p16, p21) в неінвазивній та інвазивній протоковій аденокарциномі підшлункової залози

Різновиди ПА ПЗ	Рівень експресії Ki-67, бали	Рівень експресії каспази-3, %	Рівень експресії p53, %	Рівень експресії p16 ^{INK4A} , %	Рівень експресії p21 ^{WAF1} , %
Без інвазії	$1,42 \pm 0,06$	$52,8 \pm 6,2$	$16,56 \pm 1,32$	$7,16 \pm 0,04$	$34,12 \pm 4,2$
З інвазією	$2,8 \pm 0,08$	$78,16 \pm 8,22$	$28,16 \pm 1,65$	$6,82 \pm 0,02$	$36,68 \pm 2,46$
Значення p	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

У хворих на неінвазивну та інвазивну ПА ПЗ в основному пухлинному масиві визначається низький рівень експресії регулятора клітинного циклу p16^{INK4A} – специфічного інгібітора циклін-залежних кіназ CDK4 і CDK6 – у поодиноких клітинах атипичних залоз і в лімфоцитах стромі. Достовірної різниці в експресії цього маркера між інвазивною та неінвазивною ПА ми не виявили ($6,82 \pm 0,02\%$ та $7,16 \pm 0,02\%$ відповідно, $p > 0,05$) (табл. 1). Низький рівень експресії та негативну експресію p16^{INK4A} пояснюють тим, що при ПА ПЗ часто відбувається мутація гену CDKN2A, що кодує синтез білка p16^{INK4A} [2].

Встановлено, що основний масив пухлини при інвазивній ПА ПЗ відрізняється від ПА без інвазії достовірно вищим рівнем експресії каспази-3 ($78,16 \pm 8,22\%$ клітин при інвазивній ПА проти $52,8 \pm 6,2\%$ клітин при ПА без інвазії) (табл. 1).

Наші дослідження показали, що інвазивна ПА ПЗ відрізняється від карциноми без інвазії також достовірно вищим рівнем експресії p53 пухлинними клітинами ($28,16 \pm 1,65\%$ мічених ядер при інвазивній ПА проти $16,56 \pm 1,32\%$ імунопозитивних ядер при неінвазивній формі пухлини, $p < 0,05$) (табл. 1). При наявності інвазивної ПА ПЗ практично всі пацієнти мають позитивне імунозабарвлення певної кількості клітин того чи іншого ступеня виразності, і лише у 2-х хворих ($3,28\%$) відзначена негативна експресія p53, тоді як при неінвазивній ПА ПЗ негативне імунозабарвлення спостерігається в $36,84\%$ випадків (7 хворих). Загалом, позитивна експресія p53 відзначається у $88,75\%$ хворих обох груп. Відомо, що ген-супресор p53 кодує ядерний білок, який модулює експресію генів, що відповідають за репарацію ДНК і поділ клітин і апоптоз, який запобігає розмноженню аномальних клітин. Отже, мутації p53 асоційовані з агресивністю клінічного перебігу пухлин і з їх стійкістю до хіміотерапії [5].

Протягом ІГХ аналізу визначено високий рівень експресії інгібітора циклін-залежних кіназ p21^{WAF1} пухлинними клітинами як неінвазивної,

так і інвазивної ПА ПЗ (табл. 1), а також наявність надекспресії цього маркера в епітелії частини пухлинних залоз. Водночас, достовірних відмінностей між рівнем експресії цього маркера у неінвазивній та інвазивній карциномі не знайдено ($34,12 \pm 4,2\%$ та $36,68 \pm 2,46\%$ відповідно, $p > 0,05$). Наші результати збігаються з висновками інших дослідників [6], які доводять, що ПА ПЗ має високий рівень експресії p21^{WAF1}. Велика кількість активованих p21^{WAF1}+ клітин призводить до зростання клітинного об'єму пухлинного масиву та є поганою прогностичною ознакою.

Під час порівняльного ІГХ аналізу зони інвазії ПА в тканину ПЗ та навколишні органи і її основного пухлинного масиву встановили, що в зоні інвазії аденокарциноми визначається помірний середній рівень експресії маркера Ki-67, який дорівнює $2,24 \pm 0,26$ бала і є достовірно нижчим, ніж в основному пухлинному масиві інвазивної ПА ПЗ. Це свідчить про те, що процес активної проліферації пухлинних клітин відбувається насамперед в основному масиві, і зростання маси пухлини відбувається передовсім за рахунок клітин центру пухлини у ПЗ, а не клітин зони інвазії. Водночас у зоні інвазії аденокарциноми рівень експресії p53 пухлинними клітинами дорівнює $30,06 \pm 4,2\%$, каспази-3 – $81,2 \pm 2,8\%$, p16^{INK4A} – $6,48 \pm 0,03$, рівень експресії p21^{WAF1} – $37,06 \pm 2,52$; рівні експресії цих маркерів у зоні інвазії не мають достовірної різниці від їх експресії клітинами в основному масиві інвазивної аденокарциноми.

Висновки

1. Протокову аденокарциному підшлункової залози без інвазії відрізняють виразна тканинно-клітинна атипія, наявність багатой десмопластичної стромі, низький рівень ядерної експресії Ki-67 ($1,42 \pm 0,06$ бала) епітелієм злоякісних протокоподібних, тубулярних та залозистих структур, наявність патологічних мітозів і відсутність локусів периневральної інвазії та проростання пухлини в навколишні органи.

2. Інвазивна протокова аденокарцинома пі-

дшлункової залози діагностується набагато частіше, вона відрізняється від аденокарциноми без інвазії розповсюдженням пухлини по перинеуральних просторах та в оточуючі органи, а також достовірно вищим рівнем ядерної експресії Ki-67, p53 і цитоплазматичної експресії каспази-3 раковими клітинами при однаково високому рівні експресії p21^{WAF1} і низькому рівні експресії p16^{INK4A}.

3. Зону інвазії протокової аденокарциноми в дванадцятипалу кишку характеризує помірна проліферативна активність пухлинних клітин

(2,24±0,26 бала), нижча, ніж в основному масиві зляканої пухлини. Водночас рівні експресії протеїну p53 (30,06±4,2%) і каспази-3 (81,2±2,8%) атипівними клітинами у цих зонах суттєво не відрізняються від експресії цих маркерів в основному пухлинному масиві інвазивної аденокарциноми.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з імуногістохімічним визначенням маркерів проліферації й апоптозу за умов неопластичних процесів у підшлунковій залозі.

Літературні джерела References

1. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010. 276 p. ISBN 978-5-98657-025-9.

2. Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. BMC Gastroenterology. 2005;5(22):(Open access e-Pub <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/5/22>).

3. Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, Baliello E, Valente M, Del Favero G. C-jun and CPP32 (Caspase 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death. Pancreas. 2003;26(1):65–70.

4. Hu H-Y, Liu H, Zhang J-W, Hu K, Lin Y. Clinical significance of Smac and Ki-67 expression in pancreatic cancer. Hepato-Gastroenterology.

2012;59:2640–3.

5. Jeong S, Lee DH, Lee JI, Lee JW, Kwon KS, Kim PS, Kim HG, Shin YW, Kim YS, Kim YB. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. World J Gastroenterol. 2005 Nov 21;11(43):6765-9. PMID: 16425381.

6. Cheng F, McLaughlin PJ, Verderame MF, Zagon IS. The OGF-OGFr axis utilizes the p21 pathway to restrict progression of human pancreatic cancer. Mol Cancer. 2008 Jan 11;7:5. doi: 10.1186/1476-4598-7-5. PMID: 18190706; PMCID: PMC2253554.

7. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications. 3rd ed. New York: Saunders; 2010. 941 p.

Евсеев А.В. Особенности процессов пролиферации и апоптоза в инвазивной протоковой аденокарциноме поджелудочной железы.

Реферат. На гистологических препаратах операционного материала панкреато-дуоденальных резекций 80 больных протоковым раком без инвазии и инвазивной аденокарциномой выполнили иммуногистохимическое исследование маркеров Ki-67, p53, p16^{INK4A}, p21^{WAF1} и каспазы-3. Протоковую аденокарциному характеризует низкий уровень экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Инвазивная протоковая аденокарцинома отличается от аденокарциномы без инвазии достоверно более высоким уровнем ядерной экспрессии Ki-67 и p53 и цитоплазматической экспрессии каспазы-3 атипичным эпителием желез при одинаково высоком уровне экспрессии p21^{WAF1} и низком уровне экспрессии p16^{INK4A}.

Ключевые слова: карцинома поджелудочной железы, инвазивность новообразования, клеточная пролиферация, апоптоз.