

Гистогенез эпителиального и стромального компонентов протоковой аденокарциномы поджелудочной железы

Г.Р. Сетдикова¹, О.В. Паклина^{1,2}, И.А. Чекмарева², Е.Н. Гордиенко^{1,2}

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

² Институт хирургии им. А.В. Вишневского, Москва

Histogenesis of epithelial and stromal components at ductal adenocarcinoma of the pancreas

G.R. Setdikova¹, O.V. Paklina^{1,2}, I.A. Chekmareva², E.N. Gordienko^{1,2}

¹ A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of the FMBA of Russia, Moscow

² A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow

Цель исследования — определить гистогенез анапластических участков опухоли и окружающей стромы при протоковом раке поджелудочной железы. Установлено, что эпителиально-стромальные взаимодействия при протоковом раке поджелудочной железы обуславливают его агрессивное биологическое поведение, резистентность к химиотерапевтическому лечению и различную выживаемость в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Гетерогенность протокового рака проявляется в появлении анапластического (саркомоподобного) компонента, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих наличия стромы для своего развития и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом, влияющим на выживаемость больных.

Ключевые слова: протоковая аденокарцинома, поджелудочная железа, анапластический рак, эпителиально-мезенхимальный переход.

В настоящее время большое количество научных работ сосредоточено на изучении эпителиально-стромальных взаимоотношений играющих важную роль в прогрессии эпителиальных опухолей в сторону дедифференцированного, т.е. более злокачественного фенотипа [1]. Рак поджелудочной железы (РПЖ) — является агрессивным заболеванием и входит в четверку карцином с наименьшей пятилетней выживаемостью [2]. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый в изучении протокового РПЖ и развитии подходов к его хирургическому лечению, выживаемость больных остается на низком уровне [3]. Одной из причин этого является выраженная десмопластическая реакция стромы опухоли, составляющая до 70–80% объема опухолевой ткани [4, 5], проявляющаяся в гиперэкспрессии белков внеклеточного матрикса и пролиферацией миофибробластов [6]. Ряд исследований подчеркивают важную роль развитой десмопластической стромы РПЖ, в «защите» от химиотерапии опухоли и (или) увеличении риска метастазирования опухолевых клеток [7, 8].

Одним из ключевых механизмов прогрессии РПЖ, как и других вариантах опухолей, считают эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). Известно, что утрата полярности клеток в карциномах ведет к изменению их цитоскелета, при этом

The aim of our research is to define the morphological properties of anaplastic tumor site and surrounding stroma in ductal pancreatic cancer. The epithelial-stromal interactions in ductal pancreatic cancer cause its aggressive biological behavior, resistance to chemotherapy and survival of different depending on tumor differentiation. Heterogeneity of ductal carcinoma manifested in the appearance of anaplastic (sarcomatoid) component, which outlined the ability of epithelial tumor cells acquire the property of mesenchymal cells, which do not require the stroma and have aggressive malignant potential that influences the survival of patients.

Key words: ductal adenocarcinoma, pancreas, anaplastic carcinoma, epithelial-to-mesenchymal transition.

одним из признаков ЭМП является утрата клетками цитокератиновых промежуточных филаментов и приобретение виментиновых. Также, ЭМП сопровождается изменением профилей транскрипции генов, в том числе компонентов цитоскелета и внеклеточного матрикса, а также протеолитических ферментов, участвующих в деградации последнего [10]. Фенотипические изменения ЭМП включают снижение экспрессии белков эпителиальных маркеров (таких как Е-кадгерин, десмоплакин и др.) и появление и (или) усиление экспрессии белков мезенхимальных маркеров (виментин, фибронектин, гладкомышечный актин и др.) [11]. Изменение микроокружения и утрата полярности могут способствовать снижению дифференцировки опухолевых клеток [12], однако полной утраты тканеспецифических свойств никогда не происходит. Так, при потере дифференцировки эпителиальные опухоли продолжают сохранять часть признаков исходной ткани, считается, что они способны к редифференцировке [13]. Кроме того, в процессе утраты дифференцировки опухолевых клеток может происходить возобновление синтеза эмбриоспецифических белков, характерных для «незрелых» клеток [14].

Цель исследования — определить гистогенез анапластических участков опухоли и окружающей стромы при протоковом раке поджелудочной железы.

e-mail: dr.setdikova@mail.ru

Материал и методы

Выполнен анализ операционного материала от 118 больных протоковой аденокарциномой поджелудочной железы (ПАК ПЖ), находившихся на лечении в медицинских учреждениях г. Москвы в период с 2005 по 2013 гг. Среди больных ПАК ПЖ преобладали мужчины (1,3:1). Возраст больных колебался от 40 до 80 лет. Средний возраст мужчин – 61 год, средний возраст женщин – 52 года.

Материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, затем заливали в парафин по обычной методике. Серийные парафиновые срезы толщиной 3 мкм депарафинировали по стандартной схеме, окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по стандартной методике с применением следующей панели поликлональных антител: рб3, кальпонин, гладкомышечный актин (ГМА), общий цитокератин, цитокератин 7, виментин, Е-кадгерин (Dako, LabVisionFlex, Дания). Интенсивность пероксидазной метки оценивали полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическая реакция оценивалась как негативная («–» – нет реакции), слабопозитивная («+» – <10% окрашенных клеток), умеренная («++» – >10% клеток средней интенсивности окраски) и выраженная («+++» – >50% клеток высокой интенсивности окраски). Для проведения ИГХ-реакции применялась техника *tissuemicroarrays* (ТМА), сконструированная в формате *multitumorarrays*. Данная модель состояла из 24 образцов первичной опухоли от разных больных, при этом от одного больного использовались образцы с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток. Таким образом, это позволило осуществить скрининг определенного молекулярного повреждения во всем разнообразии представленных опухолей с наименьшей затратой реактивов и времени. Для получения цветного изображения использовали сканер Miraxdesk (Zeiss, Германия).

Результаты

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы имеет вид узла неправильной формы без четких границ, размерами от 2 до 10 см, на разрезе матового белесовато-серого или беловато-желтого цвета, каменистой плотности. Нередко в центре опухоли можно обнаружить очаги распада с формированием полостей различной формы. В большинстве случаев 78,8% (93 из 118) опухоль представлена железистыми структурами неправильной формы, состоящими из опухолевых клеток с различным содержанием муцина, выраженной десмопластической реакцией стромы, как правило, занимающей большую долю опухолевой массы (от 50–80%).

Однако в 21,2% (25 из 118) случаев в классическом гистологическом варианте ПАК ПЖ в опухоли наряду с железистыми структурами обнаружен анапластический (саркомо-подобный) компонент, представленный крупными полиморфными или веретенообразными клетками с гиперхромными ядрами, иногда многоядерными, с минимальным стромальным компонентом (рис. 1). Объем анапластического компонента различался и составил от 5 до 20% общей

массы опухоли, но во всех случаях не являлся преобладающим.

При проведении ИГХ-реакции обнаружены различия в экспрессии маркеров в железистом и анапластическом компонентах ПАК ПЖ. Так, выраженная экспрессия гладкомышечного актина (+++) отмечена только в десмопластической строме, окружающей железистые структуры. В опухолях с анапластическим компонентом также отмечена выраженная положительная реакция с ГМА, выявленная как в гладкомышечных волокнах, так и в единичных крупных анапластических опухолевых клетках. Помимо этого, как в строме, так и в эпителиальном анапластическом компоненте отмечена выраженная диффузная реакция с виментином (+++) (рис. 2), отсутствующая в железистых структурах (рис. 3). Одновременно в отдельных анапластических клетках отмечалась потеря экспрессии общего цитокератина и цитокератина 7 при сохраненной экспрессии эпителиального-мембранного антигена. Также, в ядрах анапластических клеток отмечена положительная реакция с рб3, который может рассматриваться как маркер базальных стволовых клеток (рис. 4).

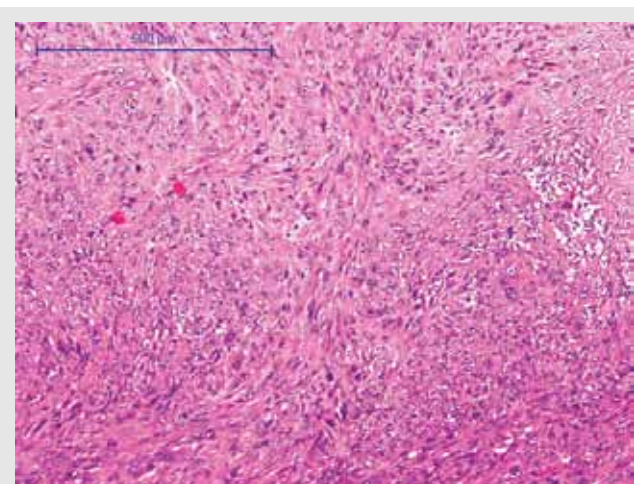


Рис. 1. Анапластический компонент в протоковом раке поджелудочной железы. Окраска: гематоксилин, эозин

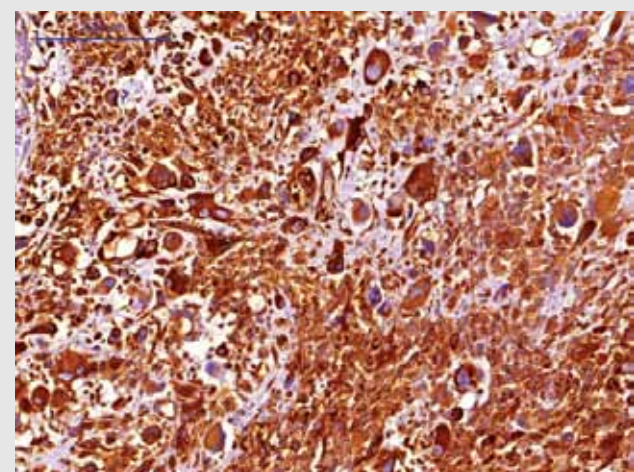


Рис. 2. Анапластический компонент при протоковом раке поджелудочной железы. Иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину. Докраска гематоксилином

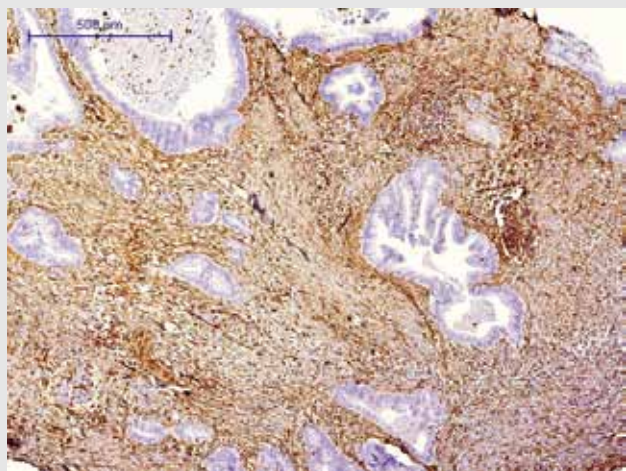


Рис. 3. Стромальный компонент протокового рака поджелудочной железы.
Иммуногистохимическая реакция с антителами к виментину.
Докраска гематоксилином

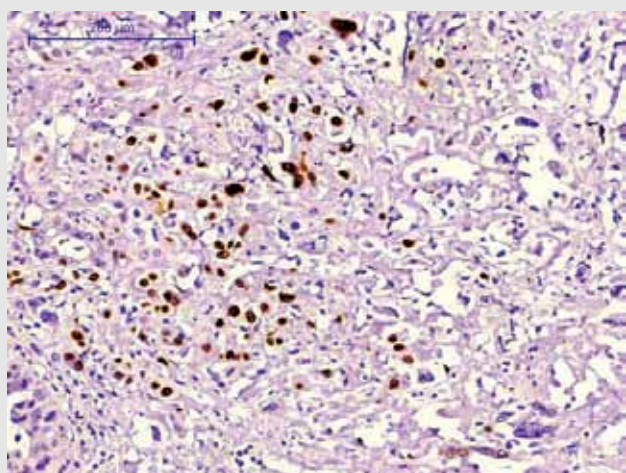


Рис. 4. Анапластический компонент в протоковом раке поджелудочной железы.
Иммуногистохимическая реакция с антителами к p63.
Докраска гематоксилином

В опухолях без анапластического компонента, доля окрашенных ядер с антителами к p63 была ниже и представлена единично окрашенными ядрами по периферии железистых структур. Также при раке поджелудочной железы происходила редукция экспрессии белка E-кадгерина и изменение полярности его экспрессии, а именно исчезновение мембранного окрашивания и появление цитоплазматического с разной степенью интенсивности. В опухолевых клетках железистых структур ПАК в 66,7% (62 из 93 случаев) наблюдалась умеренно-выраженная (++) цитоплазматическая экспрессия данного белка; в 30,1% (28 из 93) — выраженная цитоплазматическая (+++). Мембранная реакция наблюдалась только в 3,2% (3 из 93) случаев. В анапластическом компоненте во всех случаях отмечена отрицательная как мембранная, так и цитоплазматическая экспрессия белка E-кадгерина.

Заключение

Классический вариант протоковой аденокарциномы поджелудочной железы по своей гистологической структуре, как правило, неоднородная опухоль, которая представлена полями ткани различной дифференцировки от высокой до низкой, включая анапластический компонент. В исследуемой серии анапластический компонент присутствовал в 21,2% (25 из 118) случаев. По нашему убеждению, его необходимо выделять даже при минимальном его объеме от общей массы опухоли, поскольку опухоли с анапластическим компонентом имеют не только различия в гистологическом строении, но и в злокачественном потенциале, а также по экспрессии эпителиальных, миоэпителиальных и мезенхимальных иммуногистохимических маркеров. Гистологически десмоплазия стромы, которая характерна для протокового рака поджелудочной железы, полностью отсутствует в анапластических участках. Опухолевые клетки, плотно располагаясь друг к другу, как бы создают «стромальный каркас» из самих себя (рис. 5).

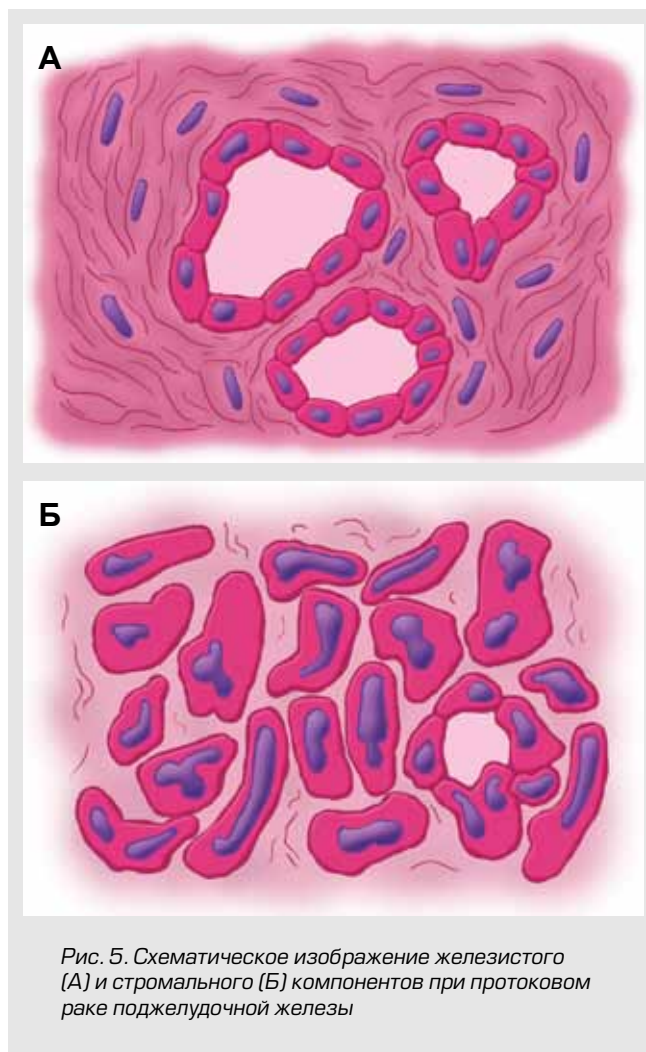


Рис. 5. Схематическое изображение железистого (А) и стромального (Б) компонентов при протоковом раке поджелудочной железы

Кроме того, выявленная в анапластических клетках диффузная экспрессия виментина, гладкомышечного актина и p63 подтверждает, что в процессе потери дифференцировки опухолевые клетки приобретают миоэпителиальный и (или) мезенхимальный фенотип. Данный факт, вероятно, связан с эпите-

лиально-мезенхимальным переходом опухолевых клеток, основными критериями которого являются утрата эпителиальной полярности, разделение на отдельные клетки и дисперсия при приобретении клеточной подвижности. При этом происходит разрушение плотных адгезионных контактов (редукция и изменение полярности экспрессии E-кадгерина) и реорганизация комплексов, обеспечивающих прикрепление клетки к субстрату. Однако частично сохраненная экспрессия цитокератинов и эпителиального мембранного антигена свидетельствует о сохранении цитокератиновых рецепторов и возможной обратной трансформации при изменении микроокружения. В работе A. Kabashima-Niibe с соавт. показано, что ингибирование трансформирующего фактора роста- β в протоковом раке поджелудочной железы приводит к обратному мезенхимально-эпителиальному переходу и потере мезенхимального и восстановлению эпителиального фенотипа [15].

Наличие анапластического компонента в опухоли существенно влияет на продолжительность

жизни больных с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы, снижая ее практически в два раза. Медиана жизни у больных в группе без анапластического компонента составила 14 мес., против 6 мес. при его наличии ($p = 0,00016$) [16].

Таким образом, возрастающий интерес исследователей к эпителиально-стромальным взаимодействиям в протоковом раке поджелудочной железы обусловлен его агрессивным биологическим поведением, резистентностью к химиотерапевтическому лечению и различной выживаемостью в зависимости от дифференцировки опухоли. Гетерогенность протокового рака проявляется в появлении анапластического (саркомоподобного) компонента, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих стромы и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом, влияющим на выживаемость больных.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat.Rev.Cancer*. 2002;2(6):442–54.
2. Гарин А.М. Четыре формы рака с наименьшей 5-летней выживаемостью. Материалы XII Российского онкологического конгресса 18–20 ноября 2008: 37–9.
3. Sohn T.A., Yeo C.J., Cameron J.L. et.al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J. Gastrointest Surg*. 2000; 4: 567–79.
4. Erkan M., Michalski C.W., Rieder S. et al. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin.Gastroenterol.Hepatol*. 2008; 6: 1155–61.
5. Fujita H., Ohuchida K., Mizumoto K. et al. α -Smooth muscle actin expressing stroma promotes an aggressive tumor biology in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2010; 39: 1254–62
6. Yen T.W., Aardal N.P., Bronner M.P. et al. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 2002;131:129.
7. Xu X., Ehdaie B., Ohara N. Synergistic action of Smad4 and Pten in suppressing pancreatic ductal adenocarcinoma formation in mice. *Oncogene* 2010;29(5):674–86.
8. Mürköster S., Wegehenkel K., Arlt A. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res*. 2004;64(4):1331–7.
9. Rhim A.D., Mirek E.T., Aiello N.M. et al EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012;148(1-2):349–61.
10. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001;23(10):912–23.
11. Kadaba R., H. Birke, Wang J.et.al. Imbalance of desmoplastic stromal cell numbers drives aggressive cancer processes. *Pathology* 2013; 230: 107–17
12. Абелев Г.И. Механизмы дифференцировки и опухолевый рост. *Биохимия* 2000; 65: 127–38.
13. Абелев Г.И. Дифференцировочные антигены в опухолях — зависимость от механизмов канцерогенеза и прогрессии (гипотеза). *Молекулярная биология* 2003.37, 1–8.
14. Abelev G.I., Sell S. *Semin. Cancer Biol*. 1999; 9: 61–5.
15. Kabashima-Niibe A., Higuchi H., Takaishi H. et.al. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*. 2013; 104: 157–64.
16. Чекмарева И.А., Сетдикова Г.Р., Паклина О.В и др. Гистологические и ультраструктурные критерии злокачественности протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. *Клин. Морфол*. 2013. В печати.

Поступила: 18.12.2013