

Галия Равилевна Сетдикова¹, Оксана Владимировна Паклина²,
Роман Евгеньевич Израйлов³, Сергей Евгеньевич Цыганов⁴

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОНКОБЕЛКОВ p16, p53 и МЕТАСТИНА ПРИ ПРОТОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Врач, патологоанатомическое отделение ФГУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна
ФМБА России (123098, РФ, г. Москва, ул. Маршала Новикова, г. 23)

² Д. м. н., заведующая, патологоанатомическое отделение ФГУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна
ФМБА России (123098, РФ, г. Москва, ул. Маршала Новикова, г. 23)

³ К. м. н., доцент, кафедра факультетской хирургии № 2 МГМСУ
(127473, РФ, г. Москва, ул. Десятская, г. 20)

⁴ Заведующий, патологоанатомическое отделение Городской клинической
больницы им. С. П. Боткина (125284, РФ, г. Москва, 2-й Боткинский проезд, г. 5)

Адрес для корреспонденции: 123098, РФ, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 17А,
ФГУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, патологоанатомическое отделение,
Сетдикова Галия Равилевна; e-mail: galiya84@mail.ru

В статье описаны клинико-морфологические факторы прогноза рака поджелудочной железы. Дана оценка экспрессии генов — супрессоров опухолевого роста p16, p53 и метастина при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы.

Ключевые слова: протоковая аденокарцинома поджелудочной железы, гены — супрессоры опухолевого роста, p16, p53, метастин.

Протоковая аденокарцинома (ПАК) поджелудочной железы (ПЖ) входит в четверку карцином с наименьшей 5-летней выживаемостью. Лишь 2% пациентов не умирают от этой болезни [1]. Недостаток знаний о механизме развития рака поджелудочной железы (РПЖ) во многом затрудняет разработку эффективных подходов к лечению. В последнее время все большее внимание уделяется именно молекулярно-генетическим нарушениям при РПЖ для улучшения диагностики и прогнозирования развития болезни. К известным факторам, определяющим исход заболевания, относят локализацию первичной опухоли, клиническую стадию, наличие периневральной инвазии (ПНИ) и метастазов в регионарных лимфатических узлах, степень дифференцировки неопластических клеток и резектабельность опухоли [2]. Прогноз при ПАК ПЖ крайне неблагоприятный в связи с ее быстрым лимфогенным и гематогенным метастазированием. Положительные результаты можно ожидать лишь при I—II стадии заболевания, при которой 5-летняя выживаемость после радикальных операций достигает 35—37% [3].

В последние годы предпринимаются многочисленные попытки по выявлению самостоятельных иммуногистохимических факторов прогноза РПЖ. Молекулярно-

генетические исследования позволили выявить, что в развитии ПАК ПЖ важную роль играют активация онкогенов и инактивация генов — супрессоров опухолевого роста (табл. 1) [4].

Одним из самых известных генов — супрессоров опухолевого роста является ген p53. Мутации в этом гене приводят к безудержному росту клеток, удлинению клеточного цикла и генетической нестабильности [5]. Происходит разьединение двух взаимосвязанных процессов — клеточного деления и апоптоза. Имеются данные о том, что мутации p53 характерны преимущественно для поздних стадий рака, ассоциированы с метастазами в лимфатических узлах и резистентностью опухоли к химио- и лучевой терапии [6].

Таблица 1
Гены-супрессоры при ПАК ПЖ

Ген	Локализация гена	Распространенность при ПАК ПЖ, %
p16	9p/13q	> 90
p53	17p	50—75
Ген метастина	1q	50—65

Мутации гена-супрессора *p16* выявляются в 90% случаев ПАК ПЖ (см. табл. 1). При мутации данного гена происходит потеря контроля над скоростью и порядком прохождения фаз деления клетки, изменяется чувствительность к сигналам, ингибирующим рост, клетка теряет способность вступать в состояние покоя и приобретает свойства неконтролируемой пролиферации. Практически при всех карциномах ПЖ утрачена функция белка *p16* [7].

В последнее время роль независимого прогностического фактора при РПЖ отводится метастину (ген *KISS-1*). Метастин был выявлен в клетках меланомы и описан как ген — супрессор опухолевого роста в 1996 г. [8]. В норме метастин экспрессируется в плаценте, центральной нервной системе, яичках, печени, поджелудочной железе и кишечнике [9]. Свое действие метастин осуществляет через медиатор GPR-54 (G-белок), распознанный в 2001 г. Прогностическая ценность метастина показана при нескольких солидных опухолях, а также при раке яичников [10], щитовидной железы [11], желчного пузыря [12], желудка [13], пищевода [14] и поджелудочной железы [8]. N. Kazuуuki и соавт. обнаружили, что экспрессия *KISS-1* в ПАК ПЖ была значительно ниже, чем в нормальной ткани органа. Однако клиническое значение метастина при РПЖ остается неясным. Имеются данные, что высокий уровень экспрессии *KISS-1* может наблюдаться у больных РПЖ с благоприятным прогнозом. Отмечено, что рецидивы РПЖ чаще встречаются при метастин-негативных опухолях. Эти результаты показывают, что при прогрессировании рака происходит утрата гена метастина.

Целью работы явились изучение клинико-морфологических данных и оценка экспрессии онкобелков *p16*, *p53*, метастина при ПАК ПЖ и влияния данных факторов на прогноз заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на операционном материале, полученном от 30 больных, находившихся на лечении в КБ 119 ФМБА России с 2005 по 2009 г. после гастропанкреатобилиарной резекции (ГПДР) ($n = 13$), лапароскопической (Ls) пилоросохраняющей панкреатодуоденальной резекции ($n = 8$), Ls ГПДР ($n = 8$), дистальная субтотальная резекция ($n = 1$). В качестве контроля использовали 7 образцов нормальной ткани ПЖ (аутопсийный материал). Среди пациентов преобладали мужчины (1,2:1). Возраст больных составил от 40 до 80 лет (средний 56,5 года).

Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм стрептавидинбиотинопереоксидазным методом с докраской ядер гематоксилином фирмы «Shandon» по стандартной методике, рекомендованной фирмой-производителем с применением моно- и поликлональных антител: *p16*, *p53* (Novocastra) и метастин (Abcam). Использовали систему визуализации «Ultra Vision LP» («LabVision»). Интенсивность экспрессии маркеров оценивали полуколичественным методом, разделяя по концентрации антигена и локализации (цитоплазматическое, мембранное, внеклеточное): (–) — отрицательная реакция; (+) — слабая очаговая реакция; (+++) — сред-

няя реакция; (+++) — интенсивная реакция по всей цитоплазме. При ядерной локализации оценивали процент окрашенных ядер на 100 исследованных ядер.

Силу и значимость связи между анализируемыми признаками оценивали с помощью корреляционного анализа. Для количественных признаков вычисляли корреляционный коэффициент Пирсона. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$. Для анализа выживаемости (по методу Каплана—Мейера) использовали регрессионную модель пропорциональных рисков Кокса. Достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждали с помощью лог-рангового теста, критерия Гехана и F-критерия Кокса, с использованием пакета программ Statistica для Microsoft Windows, версия 6.0 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследуемом материале преобладали опухоли IIВ стадии (Т3N1M0) — у 13, что составило 43,3% (рис. 1). У 4 (13,3%) больных выявлены опухоли IIА стадии, при которой диаметр узла превышал 2 см в наибольшем измерении и отмечалось распространение процесса на прилежащие анатомические структуры, но лимфогенные и гематогенные метастазы отсутствовали. Доля стадии IА (диаметр опухолевого узла не превышает 2 см, метастазы отсутствуют), при которой отмечается самый благоприятный прогноз, составила всего 3% (у одного из 30 пациентов).

Продолжительность жизни после резекции ПЖ в среднем достигала 9 мес. Кумулятивная доля выживших спустя год после операции составила 0,15.

Регрессионный анализ влияния различных факторов на выживаемость больных ПАК ПЖ позволил выявить, что наиболее значимыми показателями прогноза заболевания являются стадия процесса (pTNM), степень

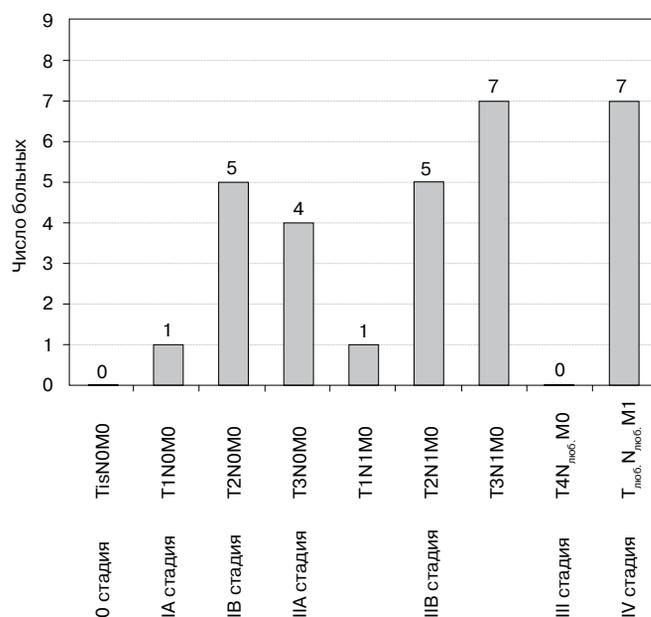


Рисунок 1. Распределение больных ПАК по стадиям. Люб. — любой.

дифференцировки опухолевых клеток (grade), резектабельность (R), периневральная инвазия (ПНИ) и изменения экспрессии генов — супрессоров опухолевого роста (табл. 2).

В зависимости от размера опухоли больных распределили на 3 группы: 1-я (n = 4) — опухоль 2 см и менее, 2-я группа (n = 23) — опухоль 2,1—5 см, 3-я группа (n = 3) — опухоль более 5,1 см. Прогноз в 1-й группе после резекции ПЖ был значительно лучше, чем у пациентов 2-й и 3-й групп. В отличие от данных W. Meurer и соавт. о связи между размером опухоли и ПНИ, а также наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах, в нашем исследовании не выявлена статистически значимая корреляция между этими признаками ($p > 0,05$).

ПНИ обнаружена у 20 (66,7%) из 30 обследованных больных (рис. 2). Чаще она наблюдалась в умереннодифференцированных аденокарциномах ПЖ, но значимой корреляции между дифференцировкой опухоли и наличием ПНИ не выявлено. Кумулятивная доля выживших преобладала в отсутствие ПНИ (0,95/0,65), прогноз у таких больных был более благоприятным. Следует отметить прямую зависимость между наличием ПНИ и поражением регионарных лимфатических узлов ($r = 0,62$). Сходные данные получили I. Hirai и соавт., обнаружив, что формы РПЖ, которые легко распространяются по лимфатическим путям, склонны к распространению по периневральным пространствам. При этом инвазия имеет прерывистый характер, поэтому даже при R0 нельзя полностью гарантировать отсутствие опухолевых клеток вдоль нервного волокна [16].

Следующим важным прогностическим фактором является радикальность операции (R). Изучали следующие

Таблица 2

Результаты регрессионного анализа влияния клинико-анатомических и биомолекулярных факторов на выживаемость больных ПАК ПЖ

Фактор	β	t	p
Пол	-1,17244	-1,85979	0,062924
Размер опухоли	-0,27109	-2,11349	0,034566
pTNM	2,19783	2,09061	0,036571
Стадия	12,91706	2,71495	0,006632
R	5,03258	2,46771	0,013603
Grade	-4,25673	-2,33910	0,019336
ПНИ	0,1020	6,1767	0,000001
p16	0,05986	0,22970	0,088326
p53	0,0338	3,56987	0,001145
Ген метастина	0,03250	3,39270	0,000367

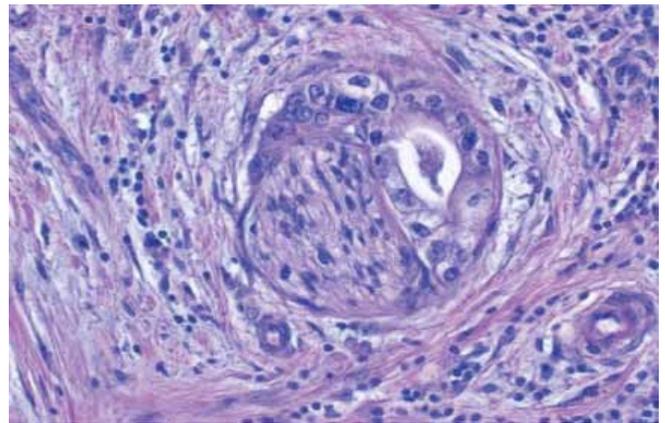


Рисунок 2. Протоковая аденокарцинома ПЖ: периневральная опухолевая инвазия (окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$).

линии резекции: край общего желчного протока, край главного панкреатического протока, край ткани железы, срезы задней и передней поверхностей удаленной части железы. Кумулятивная доля выживших при R0 составила 0,92, что в 2 раза больше, чем при R1. Продолжительность жизни больных с III стадией при R1 составила 9 мес.

В результате иммуногистохимического исследования установлено, что в неизмененной ткани ПЖ наблюдалась выраженная (+++) экспрессия метастина в цитоплазме клеток эпителия протоков и ацинарных клеток (рис. 3); экспрессия онкобелка p16 расценена как интенсивная ($> 75\%$), а экспрессия p53 не превышала 5%. При оценке уровня экспрессии генов-супрессоров больных ПАК ПЖ распределили по группам (табл. 3) в зависимости от уровня экспрессии антигенов. Следует отметить, что при ПАК ПЖ экспрессия онкобелка p16 не превышала 30% — II группа и составила 11 (36,7%) из 30 случаев. В основном это были высокодифференцированные формы рака. При низкодифференцированных формах экспрессия p16 резко снижалась и

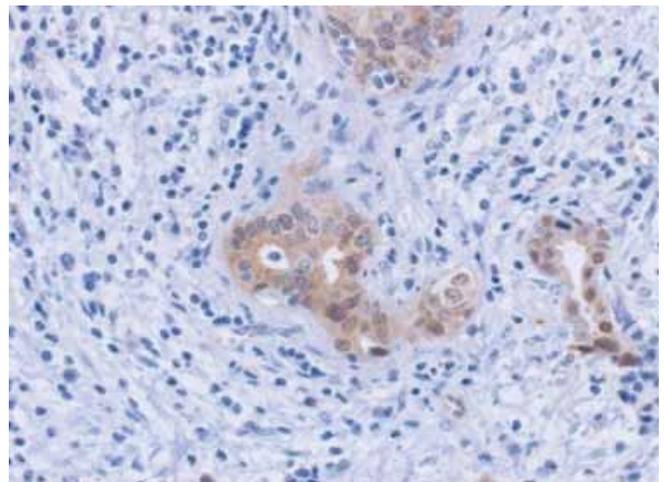


Рисунок 3. Экспрессия метастина нормальной тканью ПЖ ($\times 100$).

Таблица 3
Распределение уровней экспрессии антигенов по группам

Маркер	Группа	Уровень экспрессии антигена, %
p16, p53	I — прогноз относительно благоприятный	< 25
	II — прогноз относительно благоприятный	25,1—50
	III — прогноз относительно неблагоприятный	50,1—75
	IV — прогноз неблагоприятный	> 75,1
Метастин	I — прогноз неблагоприятный	—
	II — прогноз относительно неблагоприятный	+
	III — прогноз относительно благоприятный	++
	IV — прогноз относительно благоприятный	+++

выявлялась лишь в единичных ядрах. В умереннодифференцированных формах экспрессия p16 не превышала 25%. Значимой связи между экспрессией онкобелка p16 и клинико-морфологическими данными не выявлено. При оценке экспрессии онкобелка p53 преобладала III группа (рис. 4) и составила 53,33% (16 случаев из 30). При оценке экспрессии p53 отмечена прямая зависимость с наличием метастазов ($r = 0,33$; $p = 0,004$) и соответственно стадией заболевания ($r = 0,25$; $p = 0,03$).

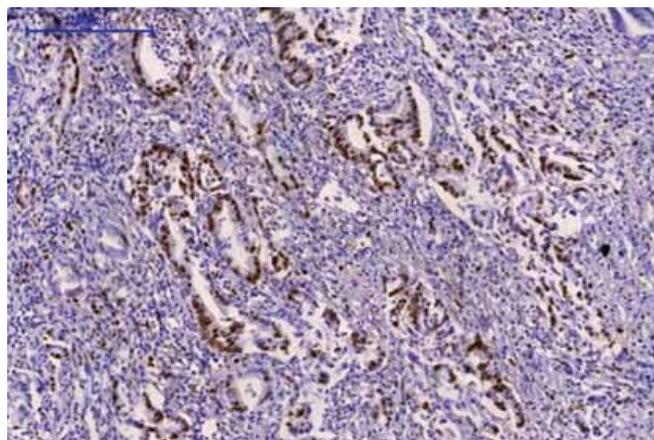


Рисунок 4. Экспрессия p53 в опухолевых клетках при ПАК ПЖ (x400).

Экспрессия метастина расценена как слабо и умеренно выраженная и составила 36,67% (11 случаев из 30) и 30% (9 случаев из 30) соответственно. По мере снижения дифференцировки опухолевых клеток экспрессия метастина уменьшалась, вплоть до полного исчезновения ($r = -0,57$), однако в неизмененных протоках его экспрессия оставалась высокой (рис. 5). Нами также обнаружена статистически значимая зависимость между экспрессией метастина и стадией заболевания ($r = -0,25$; $p = 0,03$).

Регрессионный анализ выживаемости пациентов с учетом индексов экспрессии онкобелка p53 и метастина позволил выявить, что изменение в генах — супрессорах опухолевого роста служит значимым прогностическим фактором ($p = 0,001145$ и $p = 0,000367$ соответственно), за исключением гена p16 ($p = 0,088$). Мы отметили прямую корреляцию между экспрессией p53 и продолжительностью жизни больных ($r = -0,28$). Медиана продолжительности жизни в I и во II группах по уровню экспрессии p53 составила по 17 мес, а в III и IV группах — 11 и 12 мес соответственно. В отсутствие экспрессии метастина продолжительность жизни больных после хирургического лечения не достигла 4 мес.

Такие клинико-анатомические факторы, как пол и возраст, по нашим данным, не имели прогностической значимости при оценке скорректированной выживаемости больных РПЖ ($p > 0,1$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что факторами прогноза ПАК ПЖ являются стадия, степень дифференцировки опухолевых клеток, резектабельность (R), наличие/отсутствие ПНИ, уровень экспрессии p53 и метастина. Более высокая выживаемость больных отмечается при R0 и диаметре опухоли менее 2 см в наибольшем измерении. Из исследованных генов-супрессоров уровень экспрессии метастина является наиболее значимым фактором прогноза РПЖ. Для более достоверной оценки прогноза протоковой аденокарциномы ПЖ необходимо детальное морфологическое и иммуногистохимическое исследование.

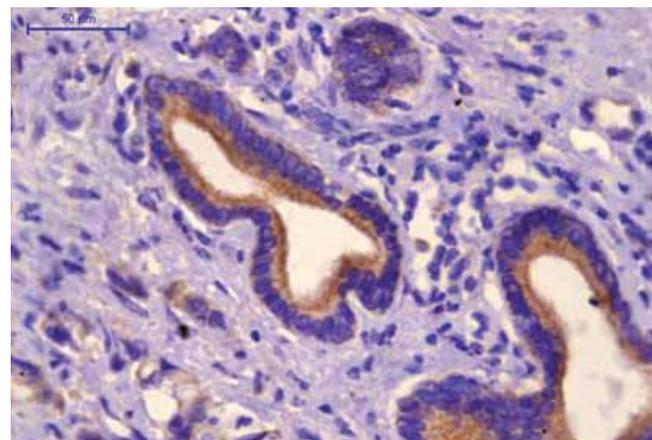


Рисунок 5. Экспрессия метастина в неизмененных протоках при ПАК ПЖ (x400).

ЛИТЕРАТУРА

1. Гарин А. М. Четыре формы рака с наименьшей 5-летней выживаемостью / Матер. XII Рос. онкол. конгр., Москва, 2009 г. — С. 37—39.
2. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects / Schneider G., Siveke J. T., Eckel F., Schmid R. M. // Gastroenterology. — 2005. — Vol. 128. — P. 1606—1625.
3. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators / Sohn T. A., Yeo C. J., Cameron J. L., Koniaris L., Kaushal S., Abrams R. A., Sauter P. K., Coleman J., Hruban R. H., Lillemoe K. D. // J. Gastrointest. Surg. — 2000. — Vol. 4. — P. 567—579.
4. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma / Yamano M., Fujii H., Takagaki T., Kadowaki N., Watanabe H., Shirai T. // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156. — P. 2123—2133.
5. Kirsch D. G., Kastan M. B. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis // J. Clin. Oncol. — 1998. — Vol. 16. — P. 3158—3168.
6. Yeo C. J., Cameron J. L. Prognostic factors in ductal pancreatic cancer // Arch. Surg. — 1998. — Vol. 383. — P. 129—133.
7. Патютко Ю. И., Котельников А. Г. Хирургия рака органов билиопанкреатодуоденальной зоны — М.: Медицина, 2007. — 677 с.
8. Prognostic value of metastin expression in human pancreatic cancer // Kazuyuki Nagai, Ryuichiro Doi, Fumihiko Katagiri, Tatsuo Ito, Atsushi Kida, Masayuki Koizumi, Toshihiko Masui, Yoshiya Kawaguchi, Kenji Tomita, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii and Shinji Uemoto // J. Gastroenterol. — 2009. — Vol. 21. — P. 147—152.
9. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene / Lee J. H., Miele M. E., Hicks D. J., Phillips K. K., Trent J. M.,

Weissman B. E., Welch D. R. // J. Natl. Cancer Inst. — 1996. — Vol. 88. — P. 1731—1736.

10. Hata K., Dhar D. K., Watanabe Y. Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer // J. Cancer. — 2007. — Vol. 43. — P. 1452—1459.

11. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells / Ringel M. D., Hardy E., Bernet V. J., Burch H. B., Schuppert F., Burman K. D., Saji M. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 87, N 5. — P. 2399.

12. Sanchez-Carbayo M., Capodiceci P., Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome // Am. J. Pathol. — 2003. — Vol. 162. — P. 609—617.

13. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma / Dhar D. K., Naora H., Kubota H., Maruyama R., Yoshimura H., Tonomoto Y., Tachibana M., Ono T., Otani H., Nagasue N. // J. Cancer. — 2004. — Vol. 111. — P. 868—872.

14. Ikeguchi M., Yamaguchi K., Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma // J. Clin. Cancer Res. — 2004. — Vol. 10. — P. 1379—1383.

15. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. — М.: Медиа Сфера, 2002. — 312 с.

16. Perineural invasion in pancreatic cancer / Hirai I., Kimura W., Ozawa K., Kudo S., Suto K., Kuzu H., Fuse A. // J. Pancreas. — 2002. — Vol. 4. — P. 15—25.

Поступила 05.09.2011

*Galiya Ravilevna Setdikova¹, Oxana Vladimirovna Paklina²,
Roman Evgenievich Izrailov³, Sergey Evgenievich Tsyganov⁴*

CLINICOMORPHOLOGICAL CORRELATIONS AND PROGNOSTIC VALUE OF ONCOPROTEINS p16, p53 AND METASTATIN IN PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA

¹ Physician, Pathological Anatomy Department, A. I. Burnazyan PMBC,
Russian PMBA (23, Marshala Novikova ul., Moscow, 123098, RF)

² MD, PhD, DSc, Head, Pathological Anatomy Department, A. I. Burnazyan PMBC,
Russian PMBA (23, Marshala Novikova ul., Moscow, 123098, RF)

³ MD, PhD, Assistant Professor, Chair of Faculty Surgery No.2, MSMDU
(20, Delegatskaya ul., Moscow, 127473, RF)

⁴ Head, Pathological Anatomy Department, S. P. Botkin Municipal Clinical Hospital
(5, 2 Botkinsky pr., Moscow, 125284, RF)

Address for correspondence: Setdikova Galiya Ravilevna, Pathological Anatomy Department,
A. I. Burnazyan PMBC, Russian PMBA, 17a, Gamaley ul., Moscow, 123098, RF; e-mail: galiya84@mail.ru

The paper describes clinical and morphological prognostic factors for pancreatic cancer. Expression of tumor growth suppressor genes p16, p53 and metastatin is evaluated in pancreatic ductal adenocarcinoma.

Key words: pancreatic ductal adenocarcinoma, tumor growth suppressor genes, p16, p53, metastatin.