

А.В. Евсеев, В.А. Туманский, И.С. Коваленко

ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ α -SMA-ПОЗИТИВНЫХ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЗВЕЗДЧАТЫХ КЛЕТОК В ДЕСМОПЛАСТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ СТРОМЫ ПРИ ПРОТОВОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ТЯЖЕЛОМ ФИБРОЗЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПАНКРЕАТИТЕ

УДК 616.37-002-036.1-06:[616.37-006.04
+616.37-006.327-036.1]-079.4-091.8

С целью количественного определения панкреатических звездчатых клеток (ПЗК) в десмопластической строме протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и очагах тяжелого фиброза при хроническом панкреатите методами гистохимии, молекулярной иммуногистохимии и цифровой фотоморфометрии изучены особенности гистотопографии фиброзного компонента, распределения α -SMA-иммунопозитивного материала, а также вычислены показатели относительной площади Массон-позитивных соединительнотканых волокон и экспрессии α -изоформы гладкомышечного актина. Установлено, что количественная экспрессия α -SMA в активированных ПЗК десмопластической стромы протокового рака достоверно превышает таковую в зонах тяжелого фиброза при хроническом панкреатите. Увеличение количества α -SMA-позитивных активированных ПЗК прямо коррелирует с увеличением Массон-позитивного соединительнотканного компонента стромы с наличием сильной связи между этими показателями в группе больных протоковым раком и средней силы связи в группе больных хроническим панкреатитом.

Ключевые слова: поджелудочная железа, протоковая аденокарцинома, хронический панкреатит, панкреатические звездчатые клетки.

The characteristics of histotopography of fibrous components and distributions of α -SMA-positive activated material are studied by methods of histochemistry molecular immunohistochemistry and digital photomorphometry with the purpose of quantitation of pancreatic stellate cells (PSC) in pancreatic ductal adenocarcinoma desmoplastic stroma and focuses with severe fibrosis (CP) in chronic pancreatitis. Indicators of relative area of Masson-positive connective fibrous components and expressions of α -isoform smooth muscle actin are calculated as well. It has been established that the α -SMA quantitative expression in activated PSC of stromal desmoplastic ductal adenocarcinoma is significantly higher than in focuses with severe fibrosis in chronic pancreatitis. Thus, the expansion in the number of α -SMA-positive activated PSC correlates directly with increasing Masson-positive connective stroma component due to the strong relation between these parameters and moderate association between these parameters in patients with chronic pancreatitis.

Keywords: pancreas, ductal adenocarcinoma, chronic pancreatitis, pancreatic stellate cells.

Введение. Протоковая аденокарцинома (ПА) является наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью поджелудочной железы (ПЖ), на её долю приходится 85–90% всех панкреатических опухолей [12]. ПА ПЖ является смертельным заболеванием с практически идентичными показателями заболеваемости и летальности, для которого характерно отсутствие ранних симптомов и вследствие этого – поздняя диагностика и крайне низкий коэффициент выживания. Микроскопически ПА ПЖ характеризуется хорошо развитыми железистыми структурами, которые в той или иной степени напоминают нормальные панкреатические протоки, окруженные большим количеством стромы с характерной

выраженной десмопластической реакцией [5], являющейся постоянным признаком этих опухолей [7]. Патоморфологическая диагностика осложняется тем, что иногда опухолевые протокоподобные железы выглядят настолько высокодифференцированными, что их бывает трудно отличить от неопухолевых протоков или тубулярных комплексов при хроническом панкреатите (ХП), а богатая десмопластическая строма имитирует распространенные очаги фиброза при ХП [3].

В современной литературе имеются данные об экспрессии α -изоформы гладкомышечного актина (α -SMA) в строме ПА ПЖ [2,4,8] и его роли в развитии десмопластической реакции стромы панкреатического рака [6,9–11]. Однако данных о количественных показателях уровня экспрессии стромальных маркеров в ПА ПЖ в доступной литературе нами не было найдено. Ранее [1] были показаны особенности экспрессии основных фиброгенных маркеров при ХП. В то же время определение достоверных различий экспрессии стромальных маркеров, в частности α -SMA, в десмопластической строме ПА ПЖ и зонах фиброза

при ХП может быть полезным при биопсийной дифференциальной диагностике рака ПЖ протокового генеза и ХП с выраженным фиброзом стромы, особенно в небольших по размеру кусочках трепанобиоптатов ПЖ.

Цель работы – количественное определение экспрессии α -изоформы гладкомышечного актина в десмопластической строме протоковой аденокарциномы поджелудочной железы и очагах выраженного фиброза при хроническом панкреатите.

Материал и методы исследования. Комплексное патогистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование было проведено на послеоперационном материале 30 пациентов в возрасте от 51 до 68 лет, больных ПА ПЖ, а также на материале, полученном при интраоперационных панкреатобиопсиях у 30 пациентов в возрасте от 48 до 70 лет, больных ХП с тяжелым фиброзом ПЖ. Кусочки ткани из опухоли, а также головки, тела и хвоста ПЖ фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине и заливали в парафин. На прецизионном ротационном микротоме Microm HM 340E (Thermo

Запорожский гос. мед. университет: **ЕВСЕЕВ Антон Владимирович** – к.м.н., доцент, врач патологоанатом высшей квалификации категории, evseevanton@ukr.net, **ТУМАНСКИЙ Валерий Алексеевич** – д.м.н., проф., зав. кафедрой, проректор по научной работе, директор Института клинической патологии человека, **КОВАЛЕНКО Инна Сергеевна** – к.м.н., ассистент кафедры.

Scientific, США) изготавливали срезы толщиной 4 мкм, которые монтировали на обычные предметные стекла для обзорной микроскопии и на адгезивные предметные стекла SuperFrost Plus (Menzel Gläser, Германия) для последующего ИГХ маркирования. При обзорной микроскопии препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, определяли основные патогистологические изменения в ПЖ, характерные для ПА и ХП; в микропрепаратах, окрашенных методом Массон-трихром, анализировали выраженность фиброза ПЖ.

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике [4] с использованием моноклональных мышиных первичных антител Smooth Muscle Actin (Clone 1A4) (DAKO, США). Для этого после депарафинизации и высокотемпературной демаскировки антигенов в Трис-ЭДТА буфере с pH=9 проводили инкубацию с первичными антителами согласно рекомендациям фирмы-производителя и визуализацию ИГХ реакции с помощью системы детекции EnVision FLEX с диаминобензидином (DAKO, США). Срезы докрашивали гематоксилином Майера, заключали в бальзам и проводили оценку результатов ИГХ реакции с фотодокументацией с помощью микроскопа Axioplan 2 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой фотокамеры C5060WZ (Olympus, Япония). Для морфометрического исследования в каждом случае фотографировали 10 полей зрения, в которых отсутствовали опухолевые клетки, ацинарная ткань и панкреатические протоки. Для унификации полученных данных фотосъемку проводили в стандартизованных условиях: увеличение микроскопа x200, цветовая температура освещения 3200 K, параметры фотокамеры F3.2 (диафрагма), 1/400 (выдержка), ISO 100 (светочувствительность), баланс белого в одно касание.

Количественное определение уровня гистохимического и ИГХ окрашивания проводили с помощью медицинской программы для обработки цифровых изображений ImageJ с использованием встроенного плагина «Colour Deconvolution» и схемы анализа окрашивания «H DAB» (гематоксилин+DAB) и «Masson Trichrom» в автоматическом режиме. Для морфометрического измерения относительной площади соединительнотканых волокон и иммунопозитивных структур в отфильтрованном канале изображения устанавливали

стандартный порог чувствительности (инструмент «Threshold») для дальнейшей сегментации изображения, которая предусматривает разделение всех пикселей изображения на два типа – черные и белые. Далее проводили вычисление процентного соотношения числа пикселей цифрового изображения иммунопозитивной реакции (черных) к общему числу пикселей в изображении.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (σ). Корреляционную связь определяли с расчетом коэффициента Пирсона (r). Достоверность отличий сравниваемых величин определяли с помощью критерия Стьюдента (T). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Проведенные патогистологические, ИГХ и морфометрические исследования показали, что основным компонентом десмопластической стромы ПА ПЖ и участков тяжелого фиброза при ХП являются соединительнотканые волокна, окрашенные методом Массон-трихром в интенсивно-синий цвет (рис. 1). При ИГХ исследовании материала больных ПА ПЖ установлено, что в десмопластической строме опухоли определяется большое количество α -SMA+ активированных панкреатических звездчатых клеток (ПЗК). Для стромального компонента ПА ПЖ характерным является выраженное положительное иммуноокрашивание на маркер активированных ПЗК α -SMA как стромальных клеток и их отростков, так и частично – фибриллярного компонента десмопластической стромы (рис. 2). В отличие от неактивных ПЗК, локализованных вокруг долек ПЖ и во внешнем слое стенки главного панкреатического протока, активированные ПЗК секретируют большое количество протеинов внеклеточного матрикса (фибронектин, тубулин, ламинин, коллаген I, III и IV типов), а также протеины промежуточных филаментов (десмин, глиофибрилярный кислый протеин, виментин и нестин) [5].

При ИГХ исследовании материала больных ХП установлено, что в зонах тяжелого панкреатического фиброза при ХП сосредоточено очень большое количество активированных ПЗК, экс-

прессирующих α -SMA (рис. 3). Диффузно распространенный тяжелый междольковый фиброз ПЖ характеризуется значительным расширением междольковых септ, которые в гистологических срезах представляют собой неравномерно расширенные фиброзные ленты, охватывающие большинство долек ПЖ. При ИГХ исследовании в расширенных междольковых фиброзных лентах обнаруживается повышенное количество α -SMA+ звездчатых клеток. При иммуногистохимическом исследовании в зонах тяжелого диффузно распространенного лентовидного междолькового фиброза

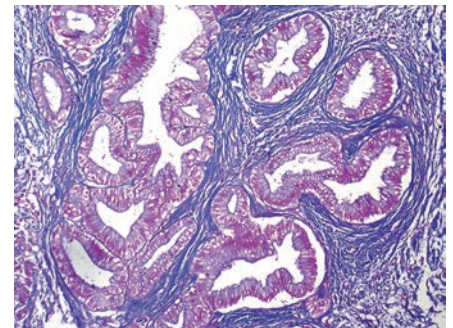


Рис. 1. Десмопластическая реакция стромы протокового рака поджелудочной железы. Окраска Массон-трихром. Ув. x200

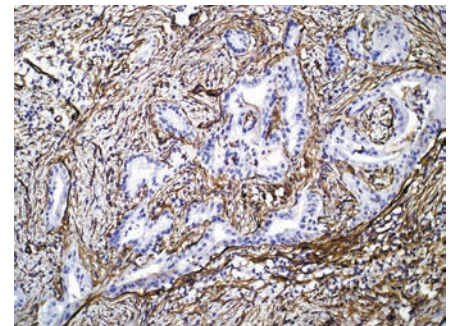


Рис. 2. Экспрессия гладкомышечного актина в десмопластической строме протокового рака поджелудочной железы. ИГХ реакция с моноклональными антителами к α -SMA. Ув. x200

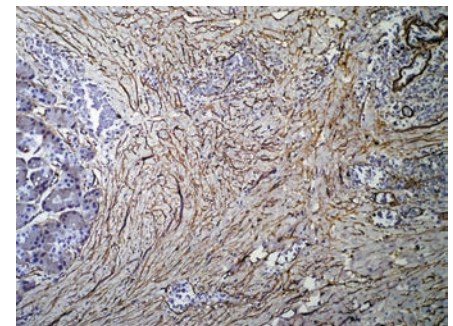


Рис. 3. Экспрессия гладкомышечного актина в зонах тяжелого междолькового фиброза при хроническом панкреатите. ИГХ реакция с моноклональными антителами к α -SMA. Ув. x200

и септально-периацинарного внутридолькового фиброза также обнаруживается повышенное количество активированных α -SMA+ ПЗК

С помощью цифровой фотоморфометрии были установлены достоверные различия в экспрессии исследуемых маркеров между группами ПА и ХП. Так, относительная площадь экспрессии α -SMA в десмопластической строме ПА ПЖ определялась на уровне $28,54 \pm 6,09\%$, а аналогичный показатель в зонах тяжелого фиброза при ХП составил $18,69 \pm 6,67\%$ ($p < 0,05$). При этом показатели относительной площади фиброзного компонента, позитивно окрашенного методом Массон-трихром, в строме ПА ПЖ и зонах тяжелого фиброза при ХП составили $61,92 \pm 9,28$ и $57,54 \pm 7,03$ соответственно ($p > 0,05$). Таким образом, площадь α -SMA+ активированных ПЗК в десмопластической строме ПА ПЖ более чем в 1,5 раза статистически достоверно превышает аналогичный показатель в зонах тяжелого панкреатического фиброза при ХП. Увеличение количества α -SMA+ ПЗК коррелирует с увеличением Массон-позитивного соединительнотканного компонента стромы (коэффициент корреляции Пирсона r составил $+0,72$ в группе больных ПА ПЖ и $+0,65$ в группе больных ХП), что свидетельствует о наличии сильной прямой связи между количеством активированных ПЗК и площадью фиброза в строме при ПА ПЖ и средней силы прямой связи между этими показателями при ХП.

Выводы:

1. Результаты комплексного патогистологического, иммуногистохимического и фотоморфометрического исследования поджелудочной железы у больных протоковым раком и хроническим панкреатитом позволили установить, что развитию десмопластической реакции стромы протокового рака и прогрессии фиброза при панкреатите способствует пролиферация и увеличение количества α -SMA+ активированных панкреатических звездчатых клеток, синтезирующих избыток компонентов волокнисто-молекулярного матрикса.

2. Полученные результаты могут быть использованы в дифференциальной диагностике протокового рака и хронического панкреатита с тяжелым фиброзом в небольших по размеру трепанобиоптатах поджелудочной железы, представленных преимущественно стромой.

Литература

1. Туманский В.А. Тяжелый фиброз поджелудочной железы при хроническом панкреатите: основные патоморфологические составляющие, иммунофенотип фиброгенных клеток и коллагена / В.А. Туманский, И.С. Коваленко // Патология. – 2013. – №1(27). – С. 27–30.
2. Tumansky V.A. Heavy fibrosis of pancreas at chronic pancreatitis: main patomorphologic components, immunophenotype of fibrogenic cells and collagen / V.A. Tumansky, I.S. Kovalenko // Patology. – 2013. – № 1(27). – P. 27–30.
3. α -Smooth muscle actin expression and desmoplastic stromal reaction in pancreatic cancer: results from the CONKO-001 study / M. Sinn, C. Denkert, J.K. Striefler [et al.] // British

Journal of Cancer. – 2014. – Vol. 111. – P. 1917–1923.

3. Brimienė V. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: a prospective study of 156 patients / V. Brimienė, G. Brimas, K. Strupas // Medicina (Kaunas). – 2011. – Vol. 47, N. 3. – P. 154–162.

4. Dabbs D.J. Diagnostic Immunohistochemistry / D.J. Dabbs. – 3rd ed. – New York: Ch. Livingstone, 2010. – 941 p.

5. Desmoplastic Reaction in Pancreatic Cancer. Role of Pancreatic Stellate Cells / M.V. Apte, S. Park, P.A. Phillips [et al.] // Pancreas. – 2004. – Vol. 29. – P. 179–187.

6. Korc M. Pancreatic cancer associated stroma production / M. Korc // American Journal of Surgery. – 2007. – Vol. 194, Iss. 4, Suppl. 1. – P. 84–86.

7. Pancreatic Cancer / J.P. Neoptolemos, R. Urrutia, J.L. Abbruzzese, M.W. Bschler (eds.). – Springer Science+Business Media, LLC, 2010. – 1390 p.

8. Overexpression of COL11A1 by Cancer-Associated Fibroblasts: Clinical Relevance of a Stromal Marker in Pancreatic Cancer / C. Garcha-Pravia, J.A. Galvón, N. Gutiérrez-Corral [et al.] // PLOS ONE. – 2013. – Vol. 8, Iss. 10. – e78327. doi:10.1371/journal.pone.0078327.

9. Rucki A.A. Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies / A.A. Rucki, L. Zheng // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – Vol. 20, Iss. 9. – P. 2237–2246.

10. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer / A. Neesse, P. Michl, K.K. Frese [et al.] // Gut. – 2011. – Vol. 60. – P. 861–868.

11. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications / M. Erkan, S. Hausmann, C.W. Michalski [et al.] // Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. – 2012. – Vol. 9. – P. 454–467.

12. Tumours of the exocrine pancreas / G. Kluppel, R.H. Hruban, D.S. Longnecker [et al.] // In: World Health Organization Classification of Tumours-Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System / S. Hamilton, L.A. Aaltonen (eds.). – Lyon: IARC Press, 2000. – P. 219–305.

ВОПРОСЫ ГЕОГРАФИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ И АДАПТАЦИИ: ИНФЕКЦИИ

Л.С. Быхалов, А.В. Смирнов

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ АПОПТОЗА BCL-2 И BAX В ЛЕГКИХ ПРИ ВИЧ/ТБ КОИНФЕКЦИИ

УДК 616.98.-097-022:616-002.5-091

В настоящем исследовании выявлено увеличение экспрессии Bcl-2 в зонах гранулематозного воспаления и в паренхиме легких, а также возрастание количества Bax-позитивных клеток с изменением соотношения экспрессии Bcl-2/Bax (коэффициент апоптоза). Баланс про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 определяет чувствительность клетки к проапоптотическим стимулам, что свидетельствует об активации в инфицированных клетках антиапоптотических механизмов при коинфекции ВИЧ/ТБ.

In this study increase of expression Bcl-2 in zones of granulomatous inflammation and in lung parenchyma is revealed as well as an increasing rate of Bax-positive cells with change in the ratio of expression Bcl-2/Bax (coefficient of apoptosis). The balance pro- and antiapoptotic proteins of Bcl-2 family defines sensitivity of the cell to proapoptotic incentives that indicates activation of anti-apoptotic mechanisms in infected cells at VICH/TB coinfection.

БЫХАЛОВ Леонид Сергеевич – к.м.н., ассистент кафедры патологич. анатомии Волгоградского государственного медицинского ун-та, докторант, leonby-vgd@yandex.ru; **СМИРНОВ Алексей Владимирович** – д.м.н., проф., зав. кафедрой ВГМУ, alexey-smirnov@rambler.ru.

Введение. Глобальные медико-социальные проблемы, касающиеся ВИЧ-инфекции и туберкулёза, до на-

стоящего времени остаются нерешенными и несут угрозу всему человечеству. Заболеваемость туберкулёзом