



УДК 616.37-006.6-074/-078:[57.083.3+57.089]-091.8

А. В. Евсеев

Особливості імунотипу протокової аденокарциноми підшлункової залози*Запорізький державний медичний університет***Ключові слова:** рак підшлункової залози, імуногістохімія.

З метою визначення імунотипу протокової аденокарциноми підшлункової залози здійснили імуногістохімічне дослідження біопсійного та післяопераційного матеріалу 120 пацієнтів із патогістологічно верифікованим діагнозом. Визначили рівні експресії діагностичних маркерів раку протокового генезу, а також особливості імуногістохімічного патерну експресії цитокератинів та онкопротеїнів у злоякісних структурах пухлини, у вогнищах PanIN, у реактивно змінених протоках та в нормальній тканині підшлункової залози. Результати свідчать про доцільність використання імуногістохімічної панелі маркерів до цитокератинів 7, 17, 18, 19 і 20, онкопротеїнів CEA, CA 125, CA 19-9 та панкреатичного поліпептиду для верифікації та диференційної діагностики протокової аденокарциноми підшлункової залози (мінімальна діагностична панель включає CK7/19, CK20, CEA та PP).

Особенности иммунофенотипа протоковой аденокарциномы поджелудочной железы

А. В. Евсеев

С целью определения иммунофенотипа протоковой аденокарциномы поджелудочной железы выполнили иммуногистохимическое исследование биопсийного и послеоперационного материала 120 пациентов с патогистологически верифицированным диагнозом. Установили уровни экспрессии диагностических маркеров рака протокового генеза, а также особенности иммуногистохимического паттерна экспрессии цитокератинов и онкопротеинов в злокачественных структурах опухоли, в очагах PanIN, в реактивно измененных протоках и в нормальной ткани поджелудочной железы. Результаты свидетельствуют о целесообразности использования иммуногистохимической панели маркеров к цитокератинам 7, 17, 18, 19 и 20, онкопротеинам CEA, CA 125, CA 19-9 и панкреатическому полипептиду для верификации и дифференциальной диагностики протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (минимальная диагностическая панель включает CK7/19, CK20, CEA и PP).

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, иммуногистохимия.*Запорожский медицинский журнал. – 2014. – №6 (87). – С. 87–89***Features of immunophenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma**

A. V. Evseyev

Aim. To determine features of immunophenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma.

Methods and results. At the immunohistochemical research of biopsy and postoperative material of 120 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma the expression levels of diagnostic markers of ductal-genesis cancer were made.

Conclusion. There were shown features of immunohistochemical pattern of cytokeratins and oncoproteins expression in malignant structures of tumor, in PanIN foci, in reactive-changed ductules and in normal pancreatic tissue. Expediency of use of the immunohistochemical panel of markers to cytokeratins 7, 17, 18, 19 and 20, oncoproteins CEA, CA 125, CA 19-9 and pancreatic polypeptide for verification and differential diagnostics of pancreatic ductal adenocarcinoma is shown, and also the minimum diagnostic panel which includes CK7/19, CK20, CEA and PP is certain.

Key words: Pancreatic Cancer, Immunohistochemistry.*Zaporozhye medical journal 2014; №6 (87): 87–89*

Панкреатичні карциноми – високозлоякісні пухлини, що мають край несприятливий прогноз. Найчастішим типом таких пухлин є протокова аденокарцинома (ПА) та її різновиди, становлячи 85–90% усіх пухлин підшлункової залози. За статистичними даними ВООЗ, щорічна захворюваність у розвинутих країнах дорівнює 2–20 на 100 тис. населення (світова стандартна сукупність), а у країнах, що розвиваються, – 1–10 на 100 тис. населення [6]. Рак підшлункової залози (ПЗ) є смертельним захворюванням, котре характеризується відсутністю ранніх симптомів і пізньою діагностикою. Показники захворюваності й летальності майже ідентичні, оскільки коефіцієнт виживаності в ПА вкрай низький. Перипанкреатична інвазія пухлини при карциномі головки ПЗ поширюється на заочеревинну жирову тканину, вени та нерви, а в прогресуючих випадках – на сусідні органи та очеревину. Карцинома тіла та хвоста ПЗ має більше місцеве поширення, що включає інвазію селезінки, шлунку, наднирників, товстого кишечника та очеревини. Отже, стає очевидним дуже важливе значення

вірогідної ранньої біопсійної діагностики ПА ПЗ на передінвазивному етапі.

Більшість гістохімічних та імуногістохімічних маркерів не дають можливості надійно диференціювати ПА ПЗ від екстрапанкреатичних муцин-продукуючих аденокарцином [1,2,5], але вони можуть допомогти відрізнити ПА ПЗ від пухлин іншого генезу, а також від панкреатичної інтраепітеліальної неоплазії (PanIN). Найбільш відомими імуногістохімічними маркерами аденокарцином ПЗ є цитокератини «простих» епітеліїв, муцини, CEA, CA19-9, M1, DuPan 2, CA125 і TAG72 [2], хоча їх використання як маркерів ПА ПЗ обмежене відсутністю у них тканинної та органної специфічності [1]. Нині при визначенні первинної локалізації аденокарциноми найбільш інформативним вважають визначення експресії цитокератинів 7 і 20 [4], хоча у багатьох випадках цитокератиновий профіль ПА ПЗ є ідентичним такому холангіоцелюлярної карциноми печінки, що не дає змоги надійно диференціювати останню від метастазу ПА ПЗ у печінку.

**Мета роботи**

Визначення імунофенотипу протокової аденокарциноми підшлункової залози.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на біопсійному та післяопераційному матеріалі 120 пацієнтів (вік – від 51 до 68 років) із патогістологічно верифікованим діагнозом ПА ПЗ. Шматочки тканини з голівки, тіла та хвоста ПЗ фіксували в 10% нейтральному забуференому формаліні та заливали в парафін. Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином, за Ван Гізоном, методом Массон-триколом і альціановим синім за загальноприйнятими методиками. Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження виконали за стандартною методикою [3] з використанням первинних антитіл проти *Carcinoembryonic Antigen (CEA)*, *Clone II-7*; *CA 125*, *Clone M11*; *Cytokeratine 7*, *Clone OV-TL 12/30*; *Cytokeratine 17*, *Clone E3*; *Cytokeratine 18*, *Clone DC 10*; *Cytokeratine 19*, *Clone RCK 108*; *Cytokeratine 20*, *Clone Ks20.8* (DAKO, США), *CA 19-9*, *Clone C241:5:1:4*; *Pancreatic Polypeptide*, *Polyclonal rabbit* (Diagnostic BioSystems, США). Для цього парафінові зрізи поміщали на адгезивні скельця SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, ФРН), після депарафінації та високо-температурного демаскування антигенів у Трис-ЕДТА буфері з рН=9 здійснили інкубацію з первинними антитілами згідно з рекомендаціями фірми-виробника та візуалізацію ІГХ-реакції за допомогою системи детекції EnVision FLEX із діамінобензидином (DAKO, США). Зрізи дозбарвлювали гематоксиліном Майєра, вмішували в бальзам і оцінювали результати ІГХ-реакції з фотодокументацією за допомогою мікроскопа Ахіоплан 2 (Carl Zeiss, ФРН) і цифрової фотокамери Camedia C5060WZ (Olympus, Японія).

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження виявили, що більшість ПА мають високий або помірний ступінь диференціювання. Вони характеризуються добре розвиненими залозистими структурами, які нагадують нормальні панкреатичні протоки, що оточені характерною рясною десмопластичною стромою. Велика кількість цієї десмопластичної фіброзної стромі є постійною ознакою цих пухлин. Варіації ступеня диференціювання в межах однієї пухлини траплялись доволі часто.

Високодиференційовані ПА ПЗ складались із великих протокоподібних структур у поєднанні з пухлинними залозами

середнього розміру. Типові також тубулярні або гратчасті (ситоподібні) структури; іноді виявляли дрібні папілярні вирости неправильної форми без чіткої фіброваскулярної ніжки, особливо у великих протокоподібних структурах. Мітотична активність, як правило, низька. Між пухлинними залозами іноді спостерігали нечисленні непухлинні протоки, а також залишки ацинусів і окремі острівці Лангерганса. Іноді пухлинні протокоподібні залози були настільки високодиференційованими, що їх було важко відрізнити від непухлинних протоків. Муцин-продукуючі пухлинні клітини характеризувались циліндричною формою, слабо еозинофільною цитоплазмою і зазвичай більшими розмірами в порівнянні з клітинами непухлинних протоків. Вони містили великі ядра круглої або овоїдної форми різного розміру з виразною ядерною мембраною і чітко помітними ядерцями; такого не встановили у нормальних протокових клітинах.

Помірно диференційовані карциноми переважно мали змішаний вигляд із протокоподібних і тубулярних структур середнього розміру різної форми, котрі оточені десмопластичною стромою. Часто траплялись неповністю сформовані залози. У порівнянні з високодиференційованим раком ставав більш варіабельним ядерний поліморфізм, структура хроматину і розрізнуваність ядерця, частіше виявляли фігури мітозів. Цитоплазма, як правило, слабоеозинофільна, але іноді у великій кількості виявляли світлі клітини. Продукція муцину знижена, внутрішньопрокові *in situ* компоненти траплялись рідше, ніж у високодиференційованій ПА.

ІГХ-патерн експресії діагностичних маркерів у структурах ПА ПЗ, зміненому та незміненому епітелію проток, а також в ацинарній тканині ПЗ наведений у таблиці 1.

Імуногістохімічно пухлинні клітини ПА, як і нормальний протоковий епітелій, у більшості випадків були позитивні на цитокератини (СК) 7, 18, 19, дуже рідко – на СК 20. Найнадійнішим маркером цитокератинової панелі був СК 7, який у 100% випадків позитивно забарвлював цитоплазму клітин нормальних панкреатичних проток і 95,8% випадків пухлинних протокоподібних структур; ацинарна тканина ПЗ залишалась ІГХ-негативною. Експресія СК 19 у клітинах ПА ПЗ була схожою, її виявили у 99,2% випадків, водночас цей цитокератин у 11,7% випадків позитивно забарвлював нормальні ацинарні клітини. СК 18 (т.зв. «пан-епітеліальний» маркер) забарвлював як клітини протокових (пухлинних і непухлинних) структур, так і ацинарні клітини у 100% випадків. У значно меншій кількості

Таблиця 1

Експресія основних діагностичних маркерів у злоякісних структурах протокової аденокарциноми й оточуючій тканині підшлункової залози

	Цитокератини					Онкомаркери			PP
	7	17	18	19	20	CEA	CA 125	CA 19-9	
Протокова аденокарцинома	+++	++	+++	+++	+/-	+++	+++	++	+++
Нормальний епітелій проток	+++	+/-	+++	+++	-	-	-	+/-	+++
Епітелій у вогнищах PanIN	+++	+/-	+++	+++	-	+	+	+	+++
Реактивно змінений епітелій проток	+++	-	+++	+++	-	-	-	+	+++
Ацинарна тканина	-	-	+++	+	-	-	-	-	+++

Примітки: «+++» – позитивна експресія у більшості (>90%) випадків, «++» – позитивна експресія у 50–90% випадків, «+» – позитивна експресія в меншій кількості випадків (10–50%), «+/-» – позитивна експресія в поодиноких випадках (<10%), «-» – негативна експресія.



випадків спостерігали позитивне імунозабарвлення на СК 17, котре було характерним для пухлинних структур 59,2% ПА ПЗ (переважно у зонах помірного диференціювання), вкрай рідко виявляли у клітинах нормальних панкреатичних протоків (8,3%) та у вогнищах PanIN (9,2%). Експресію СК 20 відзначили в 9,2% випадків; характерна лише для пухлинних залозистих структур високодиференційованих ПА ПЗ і мала осередковий характер у вигляді поодиноких імунопозитивних клітин.

У ПА ПЗ експресується низка онкопротеїнів, які включають раково-ембріональний антиген (СЕА), СА 125 і СА 19-9. Виявили виразне позитивне імунозабарвлення на СЕА переважної більшості (95,24±2,16%) злжакісних клітин у 99,2% ПА ПЗ, а також фокальну експресію у 18,4±4,82% епітеліоцитів у вогнищах PanIN-2 і PanIN-3. У високо диференційованих аденокарциномах імунореактивність до СЕА локалізувалась на апікальній поверхні цитоплазми і в просвіті залозистих структур пухлини (у слизі), в помірно диференційованих іноді спостерігали цитоплазматичну реакцію (18,6±0,84% клітин); у нормальних протоках ПЗ реакція з СЕА відсутня. Цей маркер виявився доволі специфічним, дав змогу відрізнити неопластичний протоковий епітелій від нормального та реактивно зміненого, оскільки непухлинні протоки і залози у 100% випадків були СЕА-негативними.

Схожий патерн ІГХ-забарвлення демонстрував маркер СА 125, позитивну експресію якого виявили у 98,3% ПА ПЗ, однак він виявився менш специфічним, бо у низці випадків забарвлював епітеліоцити у вогнищах PanIN навіть слабого ступеня. Незважаючи на це, визначення експресії СЕА і СА 125 може бути корисним у диференціюванні ПА від реактивних змін у залозах.

Експресію онкопротеїну СА 19-9 встановили у 81,7% ПА. Він менш специфічний, оскільки позитивне фарбування на цей маркер виявили також у вогнищах PanIN, а також в епітеліоцитах реактивно змінених панкреатичних протоків

на віддаленні від пухлини (34,8±5,14% і 23,6±3,76% клітин відповідно). Специфічне імунозабарвлення локалізувалось переважно на апікальній поверхні клітин і в секреті, іноді – в цитоплазмі пухлинних клітин ПА ПЗ і епітеліоцитів нормальних протоків ПЗ.

Відзначили також високу експресію панкреатичного поліпептиду (РР) у цитоплазмі злжакісних клітин пухлинних структур 100% ПА ПЗ і у клітинах нормального протокового епітелію, ацинарної тканини, що не дало можливості диференціювати нормальні й пухлинні компоненти у ПЗ. Використання цього маркера може бути корисним для визначення первинної локалізації пухлини у випадках диференційної діагностики між раком ПЗ і злжакісними новоутвореннями іншої локалізації.

Висновки

1. Для ПА ПЗ характерним є імунофенотип СК7+/СК18+/СК19+/СК20-/СЕА+/СА125+/СА19-9+, який виявили у понад 90% таких пухлин. Мінімальна діагностична панель, котра в більшості випадків дає можливість встановити діагноз ПА ПЗ, має включати СК 7/19, СК 20, СЕА та РР.

2. У складних діагностичних випадках наявність позитивного імунозабарвлення на СК 17 свідчить на користь протокового раку, оскільки цей маркер вкрай рідко експресується нормальним і зміненим протоковим епітелієм, однак слід пам'ятати, що СК 17+ імунофенотип характерний менше ніж 60% ПА ПЗ.

3. У диференціюванні ПА від реактивних змін панкреатичних протоків важливим є використання маркерів СЕА і СА 125, позитивна експресія яких говорить на користь пухлини, однак не дає можливості виключити PanIN; менш специфічним є маркер СА 19-9, експресію якого в низці випадків відзначили у вогнищах PanIN, у реактивно змінених і нормальних протоках.

4. Виразна експресія РР є неспецифічним маркером, бо спостерігається як у ПА, так і в нормальній тканині ПЗ, однак визначення цього антигену доцільне для диференційної діагностики метастазів ПА ПЗ і карцином іншої локалізації.

Список літератури

1. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С.В. Петрова и Н.Т. Райхлина. – 4-е изд. – Казань : Титул, 2012. – 624 с.
2. Туффаха М. Иммуногистохимическая диагностика опухолей / М. Туффаха, С.Г. Гичка, Г. Гуски. – К. : Интермед, 2013. – 223 с.
3. Dabbs D.J. Diagnostic Immunohistochemistry / D.J. Dabbs. – 3rd ed. – N.Y. : Ch. Livingstone, 2010. – 941 p.
4. Duvel J.V. Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the extrahepatic biliary tract, pancreas and gallbladder / J.V. Duvel, L. Savas, B.F. Banner // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2000. – Vol. 124. – P. 1196–1200.
5. Pancreatic Cancer / J.P. Neoptolemos, R. Urrutia, J.L. Abbruzzese, M.W. Büchler (eds.). – Springer Science+Business Media, LLC, 2010. – 1390 p.
6. Tumours of the exocrine pancreas / G. Klöppel, R.H. Hruban, D.S. Longnecker, et al. // 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.

References

1. Petrov, S. V., Raykhlin, N. T. (Eds.) (2012). *Rukovodstvo po immunohistokhimicheskoy diagnostike opukholej cheloveka [Guide for immunohistochemical diagnosis of human tumors]*. Kazan: Titul. [in Russian].
2. Tuffaha, M., Gichka, S., & Guski, H. (2013). *Immunohistokhimicheskaya diagnostika opukholej [Immunohistochemical diagnosis of tumors]*. Kyiv: Intermed. [in Ukrainian].
3. Dabbs, D. J. (2010). *Diagnostic Immunohistochemistry*. New York: Ch. Livingstone.
4. Duvel, J. V., Savas, L., & Banner, B. F. (2000). Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the extrahepatic biliary tract, pancreas and gallbladder. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124, 1196–1200. doi: 10.1043/0003-9985(2000)124<1196:EOCAIC>2.0.CO;2.
5. Neoptolemos, J. P., Urrutia, R., Abbruzzese, J. L., & Büchler, M. W. (Eds.) (2010). *Pancreatic Cancer*. Springer Science+Business Media, LLC.
6. Klöppel, G., Hruban, R.H., Longnecker, D.S., et al. (2000). Tumours of the exocrine pancreas. *World Health Organization Classification of Tumours-Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. S. Hamilton, L.A. Aaltonen (Eds.). (pp. 219–305). Lyon: IARC Press.

Відомості про автора:

Євсєєв А.В., к. мед. н., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: evseevanton@ukr.net.

Поступила в редакцію 02.10.2014 г.