

Рубцов В.А., Поморгайло Е.Г., Кононов А.В.

## Регуляторный белок PDCD4 в тканях слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите и раке желудка

ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава России, кафедра патологической анатомии, г.Омск

Rubtsov V.A., Pomorgailo E.G., Kononov A.V.

### PDCD4 regulatory protein in tissue gastric mucosa in chronic gastritis and stomach cancer

#### Резюме

В статье представлены результаты иммуногистохимической оценки белка PDCD4 у пациентов с раком желудка кишечного типа для определения перспективы использования его в качестве молекулярного маркера предикции и ранней диагностики рака желудка. Исследованы образцы операционного материала рака желудка (ткань аденокарциномы кишечного типа и фрагменты слизистой оболочки желудка дистантной зоны с хроническим гастритом) от 45 больных. Иммуногистохимическое исследование выявило статистически значимое снижение уровня PDCD4 в опухолевых клетках рака желудка кишечного типа, в большей степени из-за утраты ядерной фракции, по сравнению со слизистой оболочкой дистантной зоны рака желудка с гистологической картиной хронического гастрита. Полученные результаты позволяют рассматривать белок PDCD4 как потенциальный дополнительный иммуногистохимический маркер для ранней диагностики рака желудка кишечного типа.

**Ключевые слова:** рак желудка, хронический гастрит, белок PDCD4

#### Summary

The article presents the results of an immunohistochemical evaluation of PDCD4 protein in patients with intestinal-type gastric cancer to determine the prospects for using it as a molecular marker of prediction and early diagnosis of gastric cancer. Samples of gastric cancer surgical material (intestinal adenocarcinoma tissue and fragments of the gastric mucosa of the distant zone with chronic gastritis) from 45 patients were studied. An immunohistochemical study revealed a statistically significant decrease in the level of PDCD4 in tumor cells of gastric cancer of the intestinal type, mainly due to the loss of the nuclear fraction, compared with the mucous membrane of the distant zone of the gastric cancer with a histological picture of chronic gastritis. The obtained results allow us to consider the PDCD4 protein as a potential additional immunohistochemical marker for the early diagnosis of gastrointestinal cancer

**Key words:** gastric cancer, chronic gastritis, proteins PDCD4

#### Введение

Рак желудка занимает третье место по смертности среди всех онкологических заболеваний в мире и в Российской Федерации [1, 2]. Самый частый гистологический тип рака желудка - аденокарцинома кишечного типа возникает на фоне длительно протекающего воспаления слизистой оболочки желудка (СОЖ), приводящего к атрофическому гастриту, за которым следует интраэпителиальная неоплазия и инвазивный рак кишечного типа [3]. Широкая распространенность этого заболевания и его социальная значимость диктует необходимость разработки методов ранней диагностики и определения молекулярных маркеров, которые ассоциированы с опухолевой трансформацией.

В последнее время все большее значение в развитии рака желудка отводят нарушениям в эпигенетической регуляции клетки, в том числе изменениям уровней факторов, регулирующих трансляцию. Одним из важнейших регуляторов трансляции является белок программируемой клеточной смерти (programmed cell death protein 4, PDCD4), который за счет подавления активности эукариотического комплекса инициации трансляции 4F (eIF4F) ингибирует избыточную продукцию многих белков, имеющих ключевое значение в канцерогенезе [4-6].

Таким образом, в связи с участием белка PDCD4 в молекулярных механизмах канцерогенеза его изучение является актуальным в аспекте поиска молекулярных маркеров ранней диагностики рака желудка кишечного типа.

**Цель** - оценить возможность использования регуляторного белка PDCD4 в качестве молекулярного маркера ранней диагностики рака желудка.

## Материалы и методы

В исследование включены образцы операционного материала рака желудка от 45 больных (1 фрагменту ткани опухоли и по 4 фрагмента СОЖ дистантной зоны (на расстоянии не менее 5 мм от границы опухолевого роста, 2 из антрального отдела и 2 из тела желудка) с гистологической картиной хронического гастрита. Исследования было одобрено локальным этическим комитетом.

Фрагменты СОЖ фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном (рН 7,2–7,4) формалине на протяжении 12–24 часов. Гистологическую проводку материала, заливку в парафин, приготовление парафиновых срезов и окраску гематоксилином-эозином проводили по общепринятой методике.

Степень и стадию хронического гастрита в СОЖ вне опухолевого роста оценивали согласно визуально-аналоговой шкале Российского пересмотра Международной классификации хронического гастрита OLGA [7]. Гистологический тип опухоли, степень ее дифференцировки, определяли в соответствии с «Классификацией опухолей системы пищеварения ВОЗ» 4-е издание и критериям P. Lauren [8, 9].

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. Депарафинизация, регидратирование и тепловая демаскировка антигена проводились по стандартному протоколу. Используются первичные моноклональные анти-PDCD4 антитела (клон EP 102, «abcam», США) в разведении 1:100 и система визуализации KP-500 («Diagnostic BioSystems», США), представленная биотинилированными антителами второго слоя и стрептавидином, меченым пероксидазой.

Полуколичественная иммуногистохимическая оценка белка PDCD4 проводилась на основе существующих методик [10, 11] путем суммации балла окрашивания ядра и балла окрашивания цитоплазмы эпителиальных клеток. При этом балл окрашивания ядра представлял собой произведение индекса позитивно окрашенных ядер (отсутствие окрашенных ядер – 0 баллов, 1–30% позитивно окрашенных ядер – 1 балл, 31–70% позитивно окрашенных ядер – 2 балла, >70% позитивно окрашенных ядер – 3 балла) и индекса полуколичественной визуальной оценки интенсивности окрашивания ядер (отсутствие метки – 0 баллов, слабое/метка светло-коричневого цвета – 1 балл, умеренное/метка коричневого цвета – 2 балла, выраженное/метка темно-коричневая – 3 балла), а балл окрашивания цитоплазмы, представлял собой полуколичественную визуальную оценку интенсивности окрашивания цитоплазмы (отсутствие метки – 0 баллов, слабое/метка светло-коричневого цвета – 1 балл, умеренное/метка коричневого цвета – 2 балла, выраженное/метка темно-коричневая – 3 балла).

Оценку уровня белка PDCD4 проводили на 100 эпителиальных клеток в случайно выбранных 10 полях зрения, увеличение 400. В качестве внутреннего положи-

тельного контроля выступали клетки воспалительного инфильтрата. В качестве отрицательного контроля выступала ткань аденокарциномы толстой кишки.

Фотографирование микропрепаратов осуществляли при помощи камеры Axiosam 503 color, установленной на микроскопе Axioscope 40, для обработки изображения использовалось программное обеспечение AxioVision Rel. 4.7.2.

Данные описательной статистики представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентеля, максимального и минимального значения. Аналитическая статистика выполнялась в пакете программ STATISTIKA 10.0. В качестве критерия сравнения числовых данных был использован – U-критерий Манна–Уитни для 2-х независимых выборок (основная группа и группа сравнения). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При оценке гистологического материала по системе OLGA в дистантной зоне операционного материала 4 случая соответствовало стадии 0, 6 - стадии I, 8 - стадии II, 16 - стадии III, 11 - стадии IV.

При морфологическом исследовании опухолевой ткани 5 случаев соответствовали аденокарциноме высокой степени дифференцировки, 17 - умеренной и 23 - низкой дифференцировки.

При полуколичественной иммуногистохимической оценке уровня синтеза белка PDCD4 в фрагментах операционного материала вне опухолевого роста с гистологической картиной хронического гастрита отмечался высокий уровень белка PDCD4 в эпителиальных клетках (медиана – 10, интерквартильная широта - от 9 до 10). PDCD4-позитивные клетки располагаются как в фовеолярном эпителии, так и в железах фундального/пилорического типа, наиболее яркая метка обнаруживается в шеечном отделе желез, в зоне активно пролиферирующих клеток (рисунок).

В образцах с аденокарциномой отмечалось резкое падение уровня белка PDCD4 в опухолевых клетках (медиана – 3, интерквартильная широта - от 2 до 4). При этом в первую очередь происходило снижение ядерной фракции PDCD4 - в 80% случаев фрагментов ткани аденокарциномы индекс окраски ядра не превышал 2 балла, полная утрата ядерной фракции отмечалась в 20% случаев, тогда как цитоплазменная метка могла оставаться умеренной и даже выраженной (см. рисунок на специальной цветной вставке журнала — прим. ред.). При сравнении балла полуколичественной иммуногистохимической оценки PDCD4 зависимости от уровня дифференцировки опухоли выявлено не было.

Таким образом, при сравнении результатов оценки иммуногистохимической метки регуляторного белка PDCD4 в опухолевых клетках аденокарциномы кишечного типа отмечалось статистически значимое ( $p=0,00001$ ) снижение уровня PDCD4 по сравнению с дистантной зоной вне опухолевого роста.

В норме белок PDCD4 расположен преимуществен-

но в ядре пролиферирующих клеток. Потеря продукции PDCD4 ассоциируется с злокачественной трансформацией [12].

При иммуногистохимическом исследовании тканей дистантной зоны с хроническим гастритом отмечается наличие выраженной ядерной метки PDCD4 и слабой цитоплазматической в эпителиальных клетках СОЖ. В опухолевых клетках рака желудка наблюдается значительное снижение уровня PDCD4, в большей степени из-за утраты ядерной фракции.

Белок PDCD4 играет важную роль в регуляции основных биологических процессов в клетках. PDCD4 регулирует процессы пролиферации, эпителиально-мезенхимального перехода и апоптоза, за счет ингибирования инициации трансляции eIF4F-зависимых белков, связываясь с их мРНК в ядре клетки [4, 5, 13]. В опухолевых клетках, вследствие уменьшения количества белка PDCD4, прекращается подавление трансляции eIF4A и как следствие преобладание количества комплекса eIF4A над PDCD4. Это стимулирует синтез белков, зависимых от eIF4A, что ведет к увеличению пролиферативного потенциала клеток, подавлению их апоптоза, стимулированию эпителиально-мезенхимального перехода, увеличению клеточной подвижности и инвазии [14], и, как следствие, к инициации и прогрессии злокачественных опухолей [15-17].

Таким образом, многосторонняя роль белка PDCD4 в процессах, ассоциированных с канцерогенезом, делает

актуальным исследование уровня этого белка в эпителиальных клетках СОЖ, для раннего обнаружения нарушений молекулярных механизмов жизнедеятельности клетки для прогноза развития рака желудка.

## Заключение

При иммуногистохимическом исследовании белка PDCD4 в эпителиальных клетках дистантной зоны рака желудка отмечался высокий уровень этого белка в ядре клетки, тогда как в опухолевых клетках рака желудка кишечного типа наблюдается значительное снижение уровня PDCD4, в большей степени из-за утраты ядерной фракции. Полученные результаты позволяют рассматривать белки PDCD4 как перспективный иммуногистохимический маркер для ранней диагностики рака желудка кишечного типа. ■

**Рубцов Вячеслав Александрович**, очный аспирант кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава России, г. Омск. **Поморгайло Елена Геннадьевна**, д.б.н., доцент, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава России, г. Омск. **Кононов Алексей Владимирович**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава России, г. Омск. Автор, ответственный за переписку — Поморгайло Елена Геннадьевна, 644099, г.Омск, ул.Партизанская, 20, тел. +7-913-974-16-83, e-mail: elenarom@bk.ru

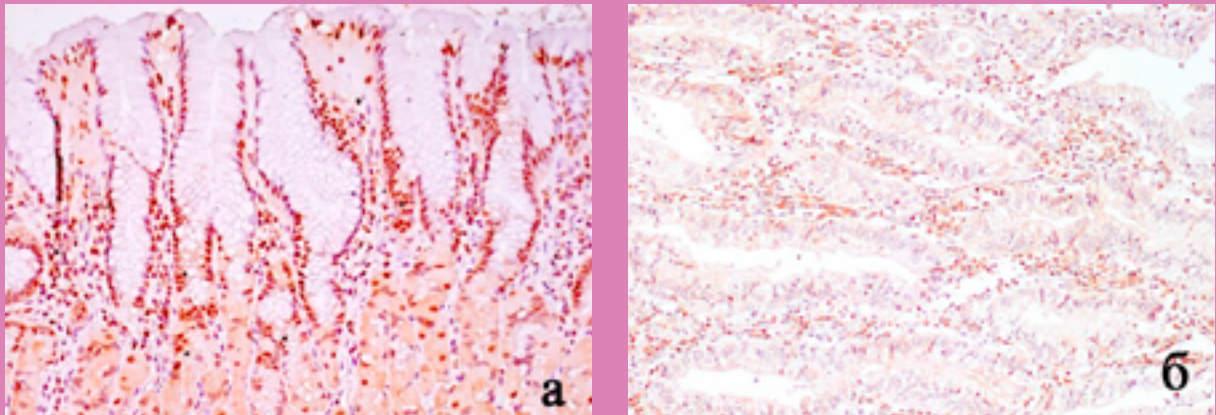
## Литература:

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018. - 236 с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. The state of cancer care for the population of Russia in 2017. M.: Moscow at P.A. Herzen - a branch of the Federal Research Center for Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia; 2018. - 236 p. (In Russian)].
3. Ruge M, Genta R.M., Graham D.Y. et al. Chronicles of a cancer foretold: 35 years of gastric cancer risk assessment. *Gut.* 2016; 65(5): 721-725.
4. Wang Q., Yang H.S. The role of Pcd4 in tumour suppression and protein translation. *Biol Cell.* 2018; 110(8): 169-177.
5. Singh P., Wedeken L., Waters L.C., Carr M.D., Klempnauer K.H. Pcd4 directly binds the coding region of c-myc mRNA and suppresses its translation. *Oncogene.* 2011; 30(49): 4864-4873.
6. Biyane A., Singh P., Klempnauer K.H. Translation, PDCD4 and eIF4A. *Oncoscience.* 2015; 2(9): 731-732.
7. Кононов А.В., Мозговой С.И., Шиманская А.Г. и соавт. Российский пересмотр классификации хронического гастрита: воспроизводимость оценки патоморфологической картины. *Архив патологии.* 2011; 73(4): 52-56 [Kononov A.V., Mozgovoy S.I., Shimanskaya A.G., et al. The Russian revision of chronic gastritis classification: reproducibility of the pathomorphological picture. *Arkh Pat.* 2011; 4(73): 52-5 (In Russian)].
8. Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a hosto-clinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1965; 64: 31-49.
9. Hamilton S.R., Aaltonen L.A., Lambert R. et al. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2000.
10. Yu H., Zeng J., Liang X. et al. Helicobacter pylori promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer by downregulating programmed cell death protein 4 (PDCD4). *PLoS One.* 2014; 9(8): e105306.
11. Mudduluru G., Medved F., Grobholz R. et al. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent

- prognostic factor in resected colorectal cancer. Cancer. 2007; 110(8): 1697-1707.*
12. Chenglong L., Li D., Qiaoming Zhi et al. *MicroRNA-183 Functions As an Oncogene by Regulating PDCD4 in Gastric Cancer. Anti-Cancer Ag. in Med. Chem. 2016; 16: 436-447.*
  13. Vkhreva P.N., Kalinichenko S.V., Korobko I.V. *Programmed cell death 4 mechanism of action: The model to be updated? Cell Cycle. 2017; 19(16): 1761-1764.*
  14. Biyanee A., Ohnheiser J., Singh P., Klempnauer K.H. *A novel mechanism for the control of translation of specific mRNAs by tumor suppressor protein Pdc4: inhibition of translation elongation. Oncogene. 2015; 34: 1384-1392.*
  15. Modelska A., Turro E., Russell R. et al. *The malignant phenotype in breast cancer is driven by eIF4A1-mediated changes in the translational landscape. Cell Death Dis. 2015; 6: 1603-1609.*
  16. Chu J., Pelletier J. *Targeting the eIF4A RNA helicase as an anti-neoplastic approach. Biochim Biophys Acta. 2015; 184(9): P. 781-791.*
  17. Rubio C.A. Weisburd B., Holderfield M. et al. *Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation. Genome Biol. 2014; 15: 476-485.*

Рубцов В.А., Поморгайло Е.Г., Кононов А.В.

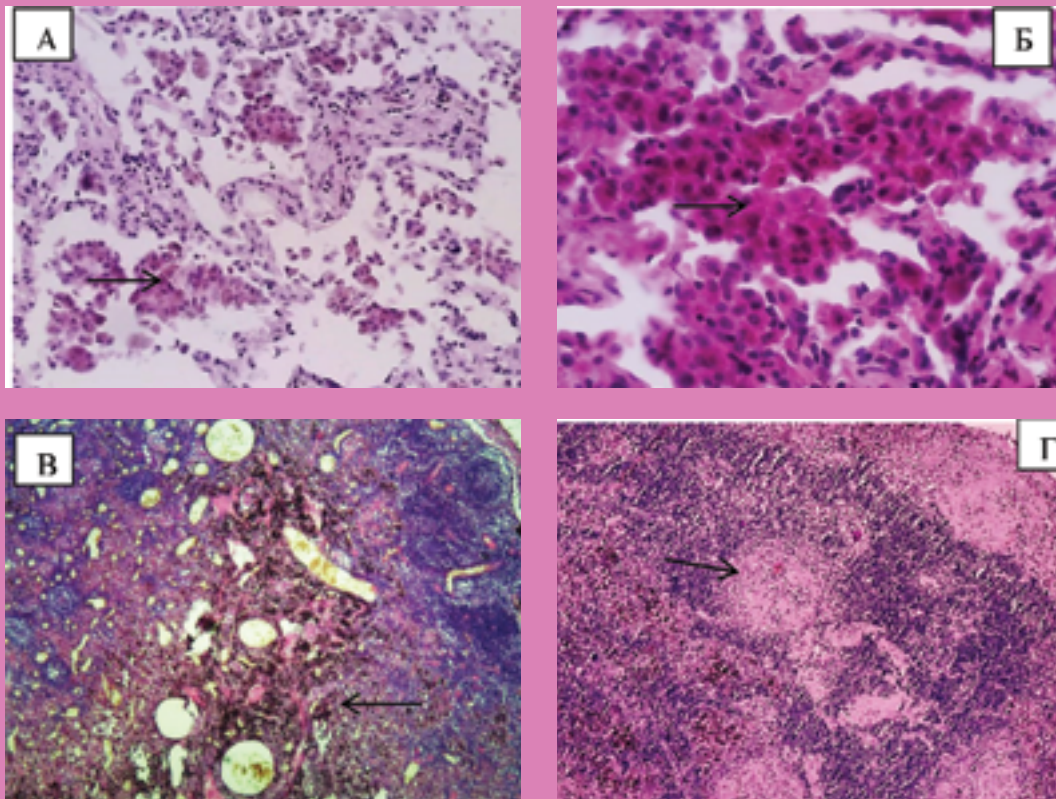
**Регуляторный белок PDCD4 в тканях слизистой оболочки желудка при хроническом гастрите и раке желудка**



**Рисунок.** Иммуногистохимическая оценка белка PDCD4. Стрептавидин-биотиновый метод, докраска ядер гематоксилином. А – ядерная локализация белка PDCD4 в эпителиоцитах желез фовеолярного и фундального типа в фрагменте дистантной зоны, ув.200; б – отсутствие белка PDCD4 в клетках аденокарциномы при наличии выраженной окраски клеток воспалительного инфильтрата, ув.200.

Мещерякова Е.Ю., Гринберг Л.М., Валамина И.Е.

**Патоморфология пылевых поражений органов дыхания непрофессиональной природы по данным резекций при опухолях легкого**



**Рис.1.** Патоморфология пылевых поражений непрофессиональной природы. Окраска Г-Э. А. «Легкое курильщика». Скопления альвеолярных макрофагов в умеренном количестве. Ув. X100. Б. Большое количество «макрофагов курильщика» в просвете альвеол. Ув. X 200. В. Антракокониз бронхопульмонального лимфатического узла. Ув. X40. Г. Кониотуберкулез ВГЛУ в неактивной фазе. Фиброзно-гиалиновые узелки. Ув. X40.