

Н.В. Вальковская
 Й. Клифф
 С.П. Осинский
 Г. Фрисс

Институт экспериментальной
 патологии, онкологии
 и радиобиологии
 им. Р.Е. Кавецкого
 НАН Украины, Киев, Украина

Университет Карла Рупрехта,
 Хайдельберг, Германия

Ключевые слова: ADAM8,
 рак поджелудочной железы,
 иммуногистохимический метод,
 метастазирование.

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА ADAM8 В ТКАНИ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Резюме. Поскольку ADAM8 относится к семейству белков, которые вовлечены в межклеточное взаимодействие, протеолиз белков мембраны, а также в процесс канцерогенеза, задачей исследования было определение его экспрессии в опухолевой и неопухолевой тканях поджелудочной железы в связи с прогрессирующей заболеванием. Экспрессию ADAM8 определяли иммуногистохимическим методом. Было показано значительное повышение уровня экспрессии ADAM8 в ткани протоковой аденокарциномы поджелудочной железы по сравнению с нормальной тканью. Выявлена тенденция к лучшей выживаемости больных, в опухолях которых отмечено слабое и/или среднее окрашивание ADAM8. Медиана продолжительности жизни таких больных составила 20 мес; пациентов, в опухолях которых выявили сильное окрашивание ADAM8, — 14 мес ($p = 0,065$). Полученные данные позволяют предположить, что повышение уровня экспрессии и функциональной активности белка ADAM8 способствует миграции, инвазии и метастазированию клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Рак поджелудочной железы (РПЖ) занимает 4-е место среди причин смертности вследствие злокачественных новообразований с медианой продолжительности жизни около 6 мес и 5-летней выживаемостью в пределах 3–5% [1]. В Украине РПЖ как причина смертности вследствие злокачественных опухолей занимает 7-е место среди мужчин и 9-е — среди женщин [2]. Известно, что 85% всех опухолей поджелудочной железы составляют аденокарциномы. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАПЖ) является наиболее часто определяемой опухолью этого органа [3]. Неблагоприятный прогноз при ПАПЖ связан с ее способностью к быстрому метастазированию в лимфатические узлы и отдаленные органы, что очень часто отмечают к моменту постановки диагноза. Такое агрессивное поведение и резистентность к различным видам лечения, включая химиотерапию, облучение и иммунотерапию, является характерным признаком данной патологии. Проведено много исследований, цель которых — выяснение молекулярной природы агрессивности ПАПЖ, среди которых значительное место занимают работы по изучению механизмов раннего метастазирования этих новообразований [4].

В настоящее время исследователи обратили внимание на белки семейства ADAM (A Desintegrin And Metalloprotease domen), являющиеся семейством трансмембранных протеинов I типа, которые содержат металлопротеазу и дезинтегриновый домен

[5, 6]. У человека идентифицировано более 20 генов семейства ADAM, часть из которых экспрессируется преимущественно в клетках репродуктивных органов и играет важную роль в слиянии сперматозоида и яйцеклетки, а также в сперматогенезе, другие же выявляют в различных тканях организма [7]. Белки семейства ADAM участвуют как в протеолизе, так и в клеточной адгезии, что позволяет предположить их определенную роль в реконструировании внеклеточного матрикса и изменениях адгезивных свойств клетки, характерных для патологических процессов, в частности для малигнизации. Установлено, что белки ADAM влияют на клеточную миграцию и контролируют различные сигнальные пути, активирующиеся в опухолевых клетках [8].

ADAM8 является членом семейства белков ADAM, клонированным как MS2 (CD156) из мышинных макрофагов и экспрессируемым в гранулоцитах и В-клетках, а также в нейронах, олигодендроцитах [7, 9]. Ген ADAM8 кодирует протеин, содержащий 824 аминокислоты с карбоксидным терминалом трансмембранного домена и внеклеточными доменами, участвующими в адгезии и протеолизе [10]. U. Schlomann и соавторы предложили модель процессинга и функции ADAM8, согласно которой про-ADAM8 подвергается автокатализу в участке между продоменом и металлопротеазным доменом с последующим образованием двух форм, одна из которых образуется при удалении продомена и представляет «shedдase» (белок, участвующий в «сбрасывании» каких-либо молекул с поверхности клетки), другая же — это оста-

точный ADAM8, образующийся путем удаления металлопротеазного домена и опосредующий адгезию клеток. Обе формы ADAM8 располагаются на клеточной поверхности [11]. ADAM8 *in vitro* действует как активная металлопротеаза, гидролизуя основной белок миелина (МВР), белок-предшественник β -амилоида, CD23, интерлейкины и фактор некроза опухоли α [12–15]. Активность ADAM8 не подавляется тканевыми ингибиторами металлопротеиназы (TIMPs), что отличает его от других протеолитических ферментов [16].

В ряде работ показано, что ADAM8 является потенциальным опухолевым маркером сыворотки при карциномах легкого и почки, а также демонстрирует корреляцию с прогрессированием процесса при раке легкого и предстательной железы, с меньшей выживаемостью при карциноме почки и с увеличением инвазивности опухолей головного мозга [17–20]. Только для трех членов семейства ADAM, а именно ADAM9, ADAM15 и ADAM17, установлено определенное участие в развитии РПЖ [21, 22]. Исходя из сказанного, цель исследования — выявление экспрессии белка ADAM8 в ткани ПАПЖ и оценка ее связи с некоторыми клиническими показателями течения опухолевого процесса.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Больные. Все образцы опухолевой ткани пациентов получены после их информирования об исследовании и получения согласия. Больные подвергались хирургическому вмешательству в отделении общей хирургии и трансплантологии университета Хайдельберга (Германия). Ткань нормальной поджелудочной железы (всего 8 проб) получили у здоровых доноров в соответствии с программой трансплантации органов. Всего было исследовано 99 пациентов с диагнозом ПАПЖ (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика больных с ПАПЖ

Характеристика	Количество больных (%)
Пол:	
женский	33 (33,0%)
мужской	66 (67,0%)
Возраст (среднее значение, в скобках разброс):	
женщины	58 (38–78)
мужчины	65 (49–76)
Классификация UICC:	
стадия 0 (TisNoMo)	1 (1,0%)
стадия IB (T2N0M0)	5 (5,0%)
стадия IIA (T3N0M0)	10 (10,0%)
стадия IIB (O1N1M0)	77 (77,0%)
стадия III (T4N1M0)	1 (1,0%)
стадияIV (T3N1M1)	3 (3,0%)
стадия ? (T3N1Mx)	3 (3,0%)

Иммуногистохимические методы. Экспрессию ADAM8 определяли иммуногистохимически в заключенных в парафин образцах ткани, фиксированных в 4% забуференном формалине. Гистологические срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали в ксилоле и обезжовивали в постепенно снижающихся концентрациях этанола. Затем срезы помещали в отмывочный буфер (10 нМ Трис-HCl, 0,85% NaCl, 0,1% раствор бычьего сывороточ-

ного альбумина (БСА), pH 7,4) с последующим иммуногистохимическим окрашиванием. После того как антиген (АГ) в срезах восстановили с помощью тепловой обработки в 10 нМ цитратном буфере в течение 10 мин в микроволновой печи, срезы инкубировали в 3% растворе пероксидазы в течение 10 мин, а затем, после промывания, в 3% растворе БСА в течение 1 ч для блокирования неспецифических мест связывания. Срезы нормальной ткани и ПАПЖ инкубировали с мышинным моноклональным антицитокератин-19 антителом (АТ-СК19) (DAKO Cytoation, Germany), кроличьим поликлональным АТ к ADAM8 (Chemicon Int., USA), примененными в концентрации 1 : 250, или с нормальным мышинным IgG или кроличьим IgG соответственно в качестве контроля при 4 °С в течение 18 ч. Затем срезы ополаскивали в промывочном буфере и инкубировали с HRP-меченными антимышиным или антикроличьим соответственно АТ («DAKO Cytoation», Германия) в течение 45 мин при комнатной температуре. После того как срезы отмывали в буфере, каждый срез был обработан 100 μ l DAB-хромогенной субстратной смесью (DAKO) с последующей остановкой реакции в H₂O и окрашиванием гематоксилином Mayer's. После того как срезы отмыли и обезжовили, их заключили в среду на основе ксилола (premount media). Оценку экспрессии ADAM8 осуществляли визуально два независимых исследователя. Окрашивание опухолевых клеток каждого образца оценивали как отсутствующее, слабое, среднее или сильное.

Выживаемость больных определяли методом Kaplan — Meier, различия между кривыми выживаемости анализировали с помощью long-rank теста. Корреляционные связи оценивали коэффициентами Pearson [r] и Spearman [rho] и критерием χ^2 . Различия между показателями оценивали тестом Mann — Whitney.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В нормальной ткани поджелудочной железы (n = 8), выявлено слабое окрашивание ADAM8 в цитоплазме и мембране клеток протоков и ацинусов, а также среднее в эндокринных клетках (тельца Лангерганса) (рис. 1а, б). В тех же самых срезах определена экспрессия СК19 как маркера клеток протоков поджелудочной железы (рис. 1а (верхняя вставка), в). Экспрессия ADAM8 оказалась слабой в строме, нервах и кровеносных сосудах нормальной ткани поджелудочной железы доноров. В ткани ПАПЖ (n = 99) выявлена интенсивность окрашивания ADAM8 от средней до сильной в цитоплазме и мембране опухолевых клеток в 79% случаев (рис. 1в, д, е).

Клетки протоков при ПАПЖ были также положительны по экспрессии СК19 в параллельных срезах (рис. 1г). Кроме того, экспрессию ADAM8 определяли в тубулярных комплексах в 36% случаях и в дегенеративных ацинарных клетках в 51% случаев.

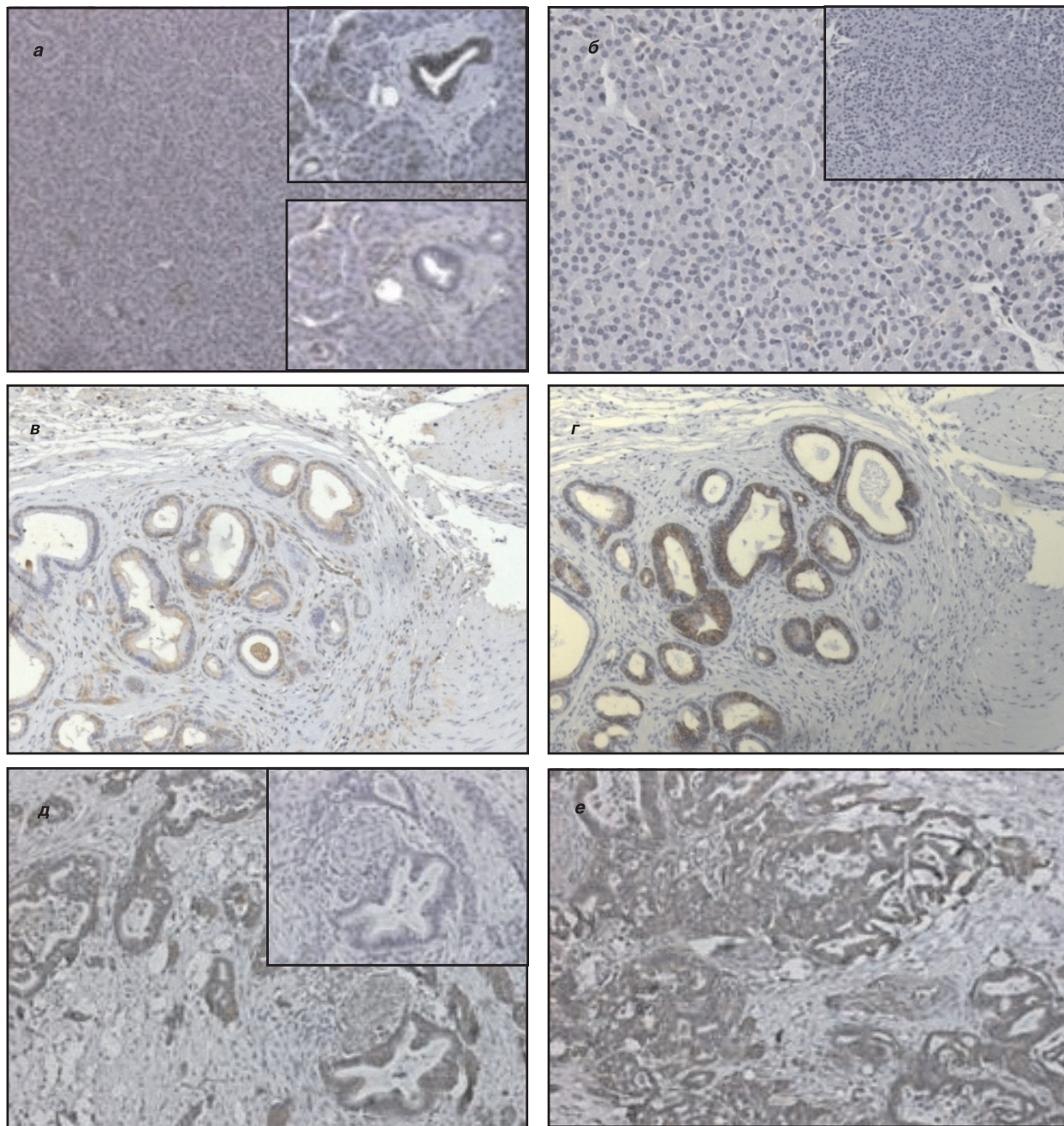


Рис. 1. Экспрессия и локализация ADAM8 в ткани нормальной поджелудочной железы и ПАПЖ: (а, б) ADAM8 экспрессировался в нормальных эндокринных клетках, ацинусах, а также клетках протоков (нижняя вставка (а)). Окрашивание соответствующих срезов на СК19 в качестве маркера протоковых клеток (верхняя вставка (а)). Отсутствие окрашивания в соответствующих срезах негативного контроля (верхняя вставка (б)). Окрашивание (в, з) ADAM8 (в) и СК19 (з) в опухолевых клетках ПАПЖ. Сильное окрашивание (д, е) ADAM8 в клетках ПАПЖ. Отсутствие окрашивания в соответствующих срезах как негативного контроля (верхняя вставка (д)). Увеличение на всех препаратах х 200

Слабое окрашивание ADAM8 отмечали и в нервах, расположенных в ткани поджелудочной железы. Реакция с нормальным мышинным IgG в соответствующих срезах показала негативное окрашивание (негативный контроль) (рис. 1а (нижняя вставка), б, д (верхняя вставка)).

Полуколичественный анализ интенсивности окрашивания ADAM8 в опухолевых клетках поджелудочной железы при ПАПЖ позволил установить следующее: отсутствие окраски — 0 случаев, слабое окрашивание — 21 случай (21,2), среднее — 46 (46,5) и сильное — 32 (32,3%) (табл. 2).

Таблица 2

Экспрессия ADAM8 в ткани ПАПЖ человека

Показатель	Экспрессия ADAM8 (указано отношение количества опухолей с позитивным окрашиванием на ADAM8 к общему количеству ПАПЖ)			
	отсутствие	слабая	средняя	сильная
Количество опухолей (%)	0	21/99 (21,2)	46/99 (46,5)	32/99 (32,3)

Не выявлено корреляции между уровнем экспрессии ADAM8 в опухолевой ткани и клинико-патологическими показателями, такими как стадия развития процесса и степень дифференцировки опухоли.

Отмечена тенденция к лучшей выживаемости больных, в опухолях которых определяли слабое и/или среднее окрашивание ADAM8. Медиана продолжительности жизни таких больных составила 20 мес, тогда как пациентов, в опухолях которых выявлено сильное окрашивание ADAM8, — 14 мес ($p = 0,065$) (рис. 2).

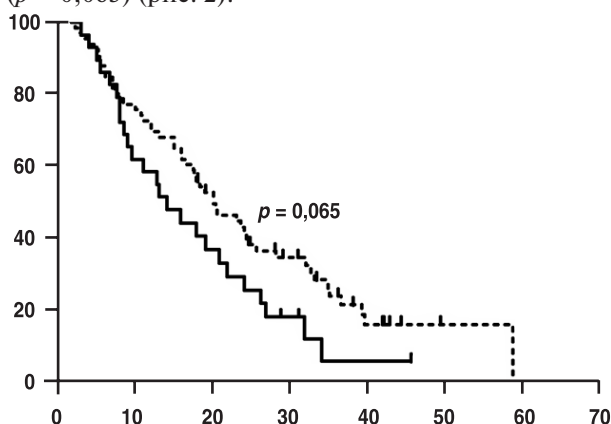


Рис. 2. Кривые выживаемости пациентов с ПАПЖ ($n = 99$) (нижняя кривая — сильное окрашивание, верхняя кривая — слабое/среднее окрашивание) ($p = 0,065$). По оси абсцисс — продолжительность жизни (мес), по оси ординат — количество больных (%)

Ранее было показано, что белки семейства ADAM участвуют в реализации адгезивных и миграционных свойств клеток, столь важных в развитии целого ряда патологических процессов [8]. Известно, что и адгезия, и миграция могут оказывать существенное влияние на развитие опухоли, в частности модулируя способность клеток опухоли к метастазированию. Эти данные и сделанные на их основе предположения способствовали развитию исследований белков ADAM в связи с опухолевым ростом и привлекли к ним внимание как к возможным мишеням для противоопухолевой терапии.

Белок ADAM8, один из членов семейства ADAM, гиперэкспрессируется в ряде опухолей человека, в частности в опухолях легкого, почки [17, 18]. В ткани РПЖ также отмечали аномальную экспрессию членов семейства ADAM, таких как ADAM9, ADAM15 и ADAM17 [21, 22]. При этом высказано предположение, что гиперэкспрессия этих белков имеет отношение к инвазивности и агрессивности РПЖ [21–23].

В исследовании отметили значительное усиление экспрессии белка ADAM8 в ткани ПАПЖ по сравнению с нормальной тканью поджелудочной железы, что позволяет говорить о потенциальной роли ADAM8 в патогенезе и прогрессии рака поджелудочной железы. В ткани нормальной поджелудочной железы белок ADAM8 локализуется на мембране клеток протоков поджелудочной железы и в меньшей степени — клеток островков и ацинусов. В ткани ПАПЖ ADAM8 экспрессировался в умеренной и сильной степени в раковых клетках и клетках тубулярных комплексов. Установлено, что низкий уровень экспрессии белка ADAM8 коррели-

ровал с выживаемостью больных с ПАПЖ: определено, что выживаемость больных с низким уровнем экспрессии ADAM8 была значительно лучше, чем таковая у больных с высоким уровнем ADAM8. Это совпадает с результатами недавно опубликованных работ, в которых показано, что гиперэкспрессия ADAM8 ассоциируется с плохим прогнозом у больных со злокачественными опухолями легкого, головного мозга, предстательной железы и почки [17–20, 24]. Установлено также, что экспрессия ADAM8 является хорошим маркером прогнозирования развития отдаленных метастазов при карциноме почки [18].

ВЫВОДЫ

1. Установлена экспрессия белка ADAM8 в клетках протокового РПЖ, оцененная как «умеренная/сильная» в 79% случаях.

2. Не выявлена корреляция уровня экспрессии ADAM8 с основными клиническими характеристиками опухолевого процесса. В то же время во всех наблюдаемых случаях в метастатических очагах в лимфатических узлах отмечена «умеренная/сильная» экспрессия ADAM8.

3. Определена обратная связь выживаемости больных и уровня экспрессии ADAM8 в клетках первичной опухоли, хотя корреляция оказалась статистически незначимой на данном этапе наблюдения за больными.

4. Точный механизм влияния белка ADAM8 на опухолевую прогрессию все еще не известен, но можно предположить, что повышение экспрессии и функциональной активности этого белка способствует усилению клеточной миграции, инвазивности и метастазированию.

ЛИТЕРАТУРА

- Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin 2006; **56**: 106–30.
- Шалимов СА, Осинский ДС, Черный ВА и др. Рак поджелудочной железы (современное состояние проблемы). Монография. Киев: Основа 2007. 320 с.
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, *et al.* Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes and Dev 2006; **20**: 1218–49.
- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. Lancet 2004; **363**: 1049–57.
- Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DC, White JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interaction. J Cell Biol 1995; **131**: 275–8.
- Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, *et al.* ADAM family proteins in the immune system. Immunol Today 1999; **20**: 278–84.
- Richens J, Fairclough L, Ghaemmaghami AM, *et al.* The detection of ADAM8 proteins on cells of the human immune systems and the demonstration of its expression on peripheral blood B cells, dendritic cells and monocyte subsets. Immunobiology 2007; **212**: 29–38.
- Mochizuki S, Okava Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Sci 2007; **98**: 621–8.
- Kelly K, Hutchinson G, Nebenins-Oosthuizen D, *et al.* Metalloprotease-Disintegrin ADAM8: Expression Analysis and

Targeted deletion in Mice. *Developmental dynamics* 2005; **232**: 221–32.

10. **Yoshiyama K, Higuchi Y, Kataoka M, et al.** CD 156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. *Genomics* 1997; **41**: 56–62.

11. **Schlomann U, Wildeboer D, Webster A, et al.** The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem* 2002; **277**: 48210–9.

12. **Naus S, Reipschlager S, Wildeboer D, et al.** Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin ADAM8. *Biol Chem* 2006; **387**: 337–46.

13. **Fourie AM, Coles F, Moreno V, Karlsson L.** Catalytic activity of ADAM8, ADAM15, and MDC-L (ADAM28) on synthetic peptide substrates and in ectodomain cleavage of CD23. *J Biol Chem* 2003; **278**: 30469–77.

14. **King NE, Zimmermann N, Pope SM, et al.** Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 8 in experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; **31**: 257–65.

15. **Schlomann U, Rathke-Hartlieb S, Yamamoto S, et al.** Tumor necrosis factor alpha induces a metalloprotease-disintegrin, ADAM8 (CD 156): implications for neuron-glia interactions during neurodegeneration. *J Neurosci* 2000; **20**: 7964–71.

16. **Amour A, Knight CG, English WR, et al.** The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett* 2002; **524**: 154–8.

17. **Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, et al.** ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 8363–70.

18. **Roemer A, Schwettmann L, Jung M, et al.** The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers? *J Urol* 2004; **172**: 2162–6.

19. **Fritzsche FR, Jung M, Xu C, et al.** ADAM8 expression in prostate cancer is associated with parameters of unfavorable prognosis. *Virchows Arch* 2006; **449**: 628–36.

20. **Wildeboer D, Naus S, Amy Sang QX, et al.** Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 516–27.

21. **Yamada D, Ohuchida K, Mizumoto K, et al.** Increased expression of ADAM9 and ADAM15 mRNA in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2007; **27**: 793–9.

22. **Ringel J, Jesnowski R, Moniaux N, et al.** Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2006; **66**: 9045–53.

23. **Grutzmann R, Luttges J, Sipos B, et al.** ADAM9 expression in pancreatic cancer is associated with tumor type and is a prognostic factor in ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2004; **90**: 1053–8.

24. **Valkovskaya N, Kayed H, Felix K, et al.** ADAM8 expression is associated with increased invasiveness and reduced patient survival in pancreatic cancer. *J Cellular Mol Med* 2007; **11** (5): 1162–74.

INCREASED EXPRESSION OF ADAM8 IN HUMAN PANCREATIC CANCER: IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

N.V. Valkovskaya, J. Kleeff, S.P. Osinsky, H. Friess

Summary. *ADAM8 is one of the members of a family of transmembrane proteins which implicated in cell-cell interaction, proteolysis of membrane proteins, and various aspects of carcinogenesis. The aims of the present study was evaluate the expression of ADAM8 in pancreatic cancer. Immunohistochemistry was performed to localize ADAM8 in pancreatic tissues. ADAM8 was localized on the plasma membrane of ductal cells and was less expressed in islets and acinar cells in the normal pancreas. In PDAC tissues, ADAM8 was moderately to strongly present in cancer cells and tubular complexes. There was a tendency toward better survival of PDAC patients exhibiting weak/moderate ADAM8 staining (median survival: 20 months), in comparison to patients exhibiting strong ADAM8 staining in pancreatic cancer cells (median survival: 14 months; $p = 0.065$). In conclusion, the increase of expression and functional activity of ADAM8 influences pancreatic cancer cell migration, invasion and metastatic activity.*

Key Words: ADAM8, pancreatic cancer, immunohistochemistry method, metastatic activity.

Адрес для переписки:

Вальковская Н.В.

03022, Киев, ул. Васильковская, 45

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии

им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,

отдел модификации противоопухолевой терапии