

BARBARA ŚLESIAK¹, ANTONINA HARŁOZIŃSKA¹, WITOLD KNAST²

Ekspresja kaspazy 3 (CPP32), Ki-67 w relacji do wczesnych faz apoptozy w złośliwych i zapalnych guzach trzustki

Caspase 3 (CPP32) and Ki-67 Expression in Relation to Early Phases of Apoptosis in Malignant and Inflammatory Pancreatic Tumors

¹ Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej AM we Wrocławiu

² Katedra i Klinika Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. W komórkach nabłonkowych i formacjach wywodzących się z nich we wczesnych fazach apoptozy cytokeratyna 18 (CK18) jest rozszczepiana przez kaspazę 3/CPP32, uwalniając neoepitop swoiście rozpoznawany przez przeciwciało M30.

Cel pracy. Ocena ekspresji cysteinowej proteazy (CPP32), CK18/M30 i antygenu Ki-67 oraz analiza wzajemnych zależności między badanymi markerami w przewlekłych stanach zapalnych i rakach trzustki.

Materiał i metody. Ekspresję CPP32, M30 i Ki-67 oceniano prospektywnie metodą immunohistochemiczną używając testu EnVision na skrawkach tkankowych pochodzących odpowiednio od 25 i 21 chorych z przewlekłym zapaleniem i rakiem trzustki.

Wyniki. Ekspresja CPP32, M30 i Ki-67 była między- i wewnątrzguzowo zróżnicowana. Dodatnią immunoreaktywność z CPP32, M30 i Ki-67 wykazywało odpowiednio 60, 60 i 56% zapalnych guzów oraz 57,76 i 62% złośliwych guzów trzustki. Porównawcza analiza ekspresji CPP32 i M30 pozwoliła na wyodrębnienie w obu schorzeniach czterech fenotypów. Dominował fenotyp z jednoczesną ekspresją CPP32 i M30 (odpowiednio w 40 i 34% zapalnych i złośliwych guzów trzustki). 4% przypadków przewlekłego zapalenia i 14% raków trzustki wykazywało fenotyp CPP32 + i M30 –, a odpowiednio 12 i 28% – fenotyp CPP32 – i M30 +. Oba markery były niewykrywalne w 44% zapalnych i 24% złośliwych guzów trzustki. Podwyższona aktywność proliferacyjna przy obniżonej zdolności do apoptozy występowała w wysokim odsetku (60%) przypadków raka i 43% przypadków przewlekłego zapalenia trzustki.

Wnioski. W wieloczynnikowym i złożonym procesie apoptozy zarówno w przewlekłym zapaleniu, jak i w rakach trzustki wczesne fazy apoptozy są najczęściej zależne od aktywacji kaspazy 3/CPP32. Mechanizm jest bardziej zaburzony w rakach niż w przewlekłym zapaleniu trzustki i czasem niewystarczający do wystąpienia programowanej śmierci komórki. Pogłębianie się defektu aktywacji CPP32 we wczesnych fazach apoptozy może ułatwiać selektywną przewagę wzrostową subpopulacji komórek o wysokiej aktywności proliferacyjnej i małej zdolności do apoptozy (Adv Clin Exp Med 2005, 14, 2, 225–229).

Słowa kluczowe: przewlekłe zapalenie trzustki, rak trzustki, ekspresja kaspazy 3/CPP32, Ki-67, wczesne fazy apoptozy (M30).

Abstract

Background. In epithelial cells and their formations in early phases of apoptosis cytokeratin 18 (CK18) is cleaved by a caspase 3/CPP32 liberating a neoepitope specifically recognized by the M30 monoclonal antibody.

Objectives. The evaluation of caspase 3/CPP32, Ki-67 and M30 expression, and analysis of relations between studied markers in chronic pancreatitis and pancreatic cancer.

Material and Methods. The expression of CPP32, Ki-67 and M30 were examined prospectively on tissue sections of 25 and 21 chronic pancreatitis and pancreatic cancer, respectively by immunoperoxidase method using EnVision test.

Results. The expression of CPP32, M30 and Ki-67 showed inter- and intratumoral heterogeneity. Positive immunoreactivity with CPP32, M30 and Ki-67 were found in 60, 60, 56% inflammatory tumors, respectively and in 57, 76, 62% malignant tumors, respectively. The comparative analysis of both markers expression allows strat-

ifying the inflammatory and malignant tumors into four phenotypes. Simultaneous expression of CPP32 and M30 was dominated (40% and 34% of chronic pancreatitis and pancreatic cancer, respectively). 4% inflammatory and 14% of malignant tumors showed phenotype CPP32 + and M30 – and 12 and 28% of chronic pancreatitis and pancreatic cancer showed CPP32 – and M30 + phenotype. In 44 and 24% of chronic pancreatitis and pancreatic cancer both biomarkers were undetectable. The high proliferative activity and low levels of apoptosis were found in 60% of pancreatic cancer and 43% of chronic pancreatitis.

Conclusions. In multifactorial and complex apoptosis pathways in chronic pancreatitis and pancreatic cancer early steps of apoptosis are mainly dependent on caspase 3 activation. This pathway is more disturbed in pancreatic cancer than in chronic pancreatitis and seems to be not sufficient to cause the programmed cell death. The increase of the defects in caspase 3 activation could facilitate the selective growth advantage of cell subpopulations with high proliferative potency and low ability to apoptosis (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 2, 225–229).

Key words: chronic pancreatitis, pancreatic cancer, expression of caspase 3/CPP32, Ki-67, early phases of apoptosis (M30).

Apoptoza (programowana śmierć komórki) odgrywa istotną rolę w procesie karcynogenezy [1]. W komórkach ulegających apoptozie, niezależnie od rodzaju czynnika wywołującego ten proces, następuje uruchomienie ewolucyjnie utrwalonej kaskady procesów proteolitycznych i nukleolitycznych. Głównymi efektorami tych procesów są proteazy cysteinowe, tzw. kaspazy oraz kilka endonukleaz. Kaspazom (*caspase, cysteine-dependent aspartate specific proteinase*), należącym do rodziny cysteinowych proteaz ICE (*interleukin-1beta converting enzyme*) przypisuje się duże znaczenie w przebiegu efektorowej nieodwracalnej fazy apoptozy. Kaspazy rozszczepiają łańcuch polipeptydowy za resztą asparaginianową znajdującą się w określonym kontekście reszt aminokwasowych [2].

Dotychczas wykryto 14 kaspaz biorących udział w apoptozie oraz w aktywacji cytokin [3]. Kaspazy podzielono na: inicjatorowe, aktywujące inne kaspazy (kaspaza 2, 8, 9, 10); efektorowe, uczestniczące w dalszych etapach apoptozy (kaspaza 3, 6, 7) oraz kaspazy związane z cytokinami (kaspazy 1, 4, 5, 11, 12, 14 *cytokine processors*). Liczne białka cytoplazmatyczne i jądrowe są substratami dla kaspaz.

Kaspaza 3 (CPP32, YAMA, apopain) jest jedną z ważniejszych składowych w kaskadzie apoptotycznej komórek człowieka [3], wywołuje destrukcję materiału genetycznego przez aktywację endonukleazy CAD (*caspase-activated-deoxyribonuclease*), inaktywuje enzymy naprawiające DNA oraz wykazuje zdolność do cięcia białek cytoszkieletowych [2, 4, 5]. W komórkach nabłonkowych oraz w nowotworach wywodzących się z tych komórek głównym budulcem cytoszkieletu są filamenty pośrednie [2, 6]. Podstawowy składnik filamentów pośrednich to białka typu I (cytokeratyna 18) i typu II (cytokeratyna 8) [7].

W komórkach nabłonkowych, we wczesnych etapach apoptozy, dochodzi do rozszczepienia przez kaspazy filamentów pośrednich, zwłaszcza cytokeratyny 18 (CK18). Otrzymanie przeciwciała

ła monoklonalnego M30, rozpoznającego neoepitop w cytokeratynie 18, podatnego na działanie kaspaz pozwoliło na immunohistochemiczną detekcję wczesnych etapów apoptozy w komórkach nabłonkowych i wywodzących się z nich strukturach. Neoepitop określony przeciwciałem M30 nie jest wykrywany w prawidłowych komórkach nabłonkowych [2].

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac porównujących aktywność kaspazy 3/CPP32 efektorowego enzymu apoptozy z wczesnymi etapami tego procesu w zapalnych i złośliwych guzach trzustki. Guzy zapalne trzustki powstające w wyniku przewlekłego zapalenia w badaniach epidemiologicznych stanowią wysokie ryzyko następowego rozwoju gruczolakoraka trzustki [8, 9]. W pracy przedstawiono wyniki badań ekspresji kaspazy 3/CPP32 i CK18/M30 oraz antygenu Ki-67 w przewlekłym zapaleniu i gruczolakorakach trzustki. Przeanalizowano również wzajemne zależności między ekspresją badanych markerów w zrozumieniu mechanizmów rozwoju gruczolakoraka trzustki na bazie przewlekłego zapalenia.

Materiał i metody

Materiał do badań pochodził od 21 chorych z gruczolakorakiem i 25 z przewlekłym zapaleniem trzustki, uzyskany po zabiegach operacyjnych wykonanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Ekspresję badanych markerów oceniano metodą immunoperoksydazową na skrawkach mrożeniowych z użyciem testu EnVision (Dako, Dania) (immunoglobulina kozia skierowana przeciwko immunoglobulinie mysiej skoniugowana z dekstranem i peroksydazą chrzanową), stosując następujące przeciwciała monoklonalne:

– M30 CytoDEATH – wykrywające produkt rozszczepienia przez kaspazy cytokeratyny 18 (Roche Diagnostics, Niemcy) w rozcieńczeniu 1:25,

– Kaspaza 3/CPP32 – wykrywające proteazę cysteinową należącą do ICE, rozszczepiającą łańcuch polipeptydowy za resztą asparaginianową (Novocastra, Wielka Brytania) w rozcieńczeniu 1:50,

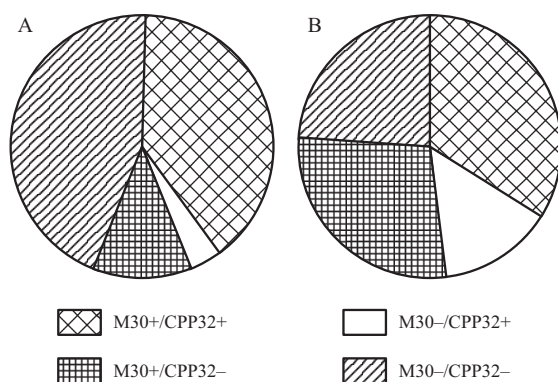
– Ki-67 (Dako, Dania) – wykrywające wszystkie fazy cyklu komórkowego, z wyjątkiem fazy Go w rozcieńczeniu 1:50.

Immunobarwienie skrawków badanych tkanek oceniano za pomocą mikroskopu świetlnego BH (Olympus) przy powiększeniu 200×. Komórki wykazujące ekspresję kaspazy 3/CPP32 oraz reagujące z M30 i Ki-67 określano jako odsetek dodatnich komórek liczonych co najmniej w pięciu przypadkowo wybranych polach widzenia. Za CPP32 i M30 dodatnie przyjęto wszystkie przypadki, w których brązowy produkt reakcji immunohistochemicznej wykazywał lokalizację cytoplazmatyczną. Przeciwciała Ki-67 wykazywało jądrową lokalizację immunobarwienia. W barwieniach kontrolnych przeciwciała monoklonalne zastępowano odpowiednim buforem.

Ocenę statystyczną przeprowadzono testem χ^2 przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Ekspresję kaspazy 3 wykazano w 60% przewlekłego zapalenia i 57% złośliwych guzów trzustki. Wczesne fazy apoptozy, wykrywane za pomocą przeciwciała monoklonalnego M30, zostały uwidocznione odpowiednio w 60 i 76% zapalnych i złośliwych guzach trzustki. Antygen Ki-67 występował odpowiednio w 57 i 62% przewlekłego zapalenia i raka trzustki. Nie wykazano zależności statystycznej między reaktywnością przeciwciał CPP32, M30 i Ki-67 w obu badanych schorzeniach.



Ryc. 1. Porównanie immunofenotypów zapalnych (A) i złośliwych (B) guzów trzustki w zależności od ekspresji kaspazy 3/CPP32 i M30

Fig. 1. Comparison of inflammatory (A) and malignant (B) pancreatic tumors immunophenotypes in relation to caspase 3/CPP32 and M30 expression

Jednoczesna analiza występowania CPP32 i M30 pozwoliła na wyodrębnienie czterech fenotypów (ryc. 1). Dominował fenotyp z jednoczesną ekspresją kaspazy 3 i M30 (odpowiednio 40 i 34% zapalnych i złośliwych guzów trzustki). 4% przypadków przewlekłego zapalenia i 14% raków trzustki wykazywało fenotyp CPP32 + i M30 –, a odpowiednio 12 i 28% fenotyp CPP32 – i M30 +. Oba markery były niewykrywalne w 44% zapalnych i 24% złośliwych guzów trzustki.

Porównanie aktywności proliferacyjnej określonej jako dodatnia reakcja z przeciwciałem Ki-67 z reaktywnością przeciwciała M30 wykazało, że wysokiemu indeksowi proliferacyjnemu odpowiada zazwyczaj niski indeks apoptotyczny, odpowiednio w 43 i 60% przewlekłego zapalenia i raka trzustki.

Niezależnie od stosowanego przeciwciała reakcja immunohistochemiczna wykazywała heterogeny układ barwienia w obu badanych schorzeniach. Komórki z cytoplazmatyczną ekspresją kaspazy 3 i M30 oraz jądrową z Ki-67 były zazwyczaj nierównomiernie rozproszone w obrębie zarówno zmiany nowotworowej, jak i zapalnej. Odsetek dodatnich CPP32 komórek wahał się w szerokim zakresie (1–50%) w przewlekłym zapaleniu i w rakach trzustki. Komórki M30 + wykrywano w zakresie 1–50% w rakach trzustki i 1–20% w przewlekłym zapaleniu. Podobnie antygen Ki-67 był wykrywany w zróżnicowanym odsetku komórek obu schorzeń, chociaż wyższa aktywność proliferacyjna występowała w rakach (1–80%) niż w przewlekłym zapaleniu trzustki (1–50%).

Omówienie

Wzrost guza jest wynikiem nie tylko niekontrolowanej proliferacji komórkowej, ale również zahamowania procesów prowadzących do programowanej śmierci komórki – apoptozy.

Po raz pierwszy do określenia wczesnych faz apoptozy w przewlekłym zapaleniu i rakach trzustki zastosowano przeciwciała monoklonalne M30, znakujące neoepitop cytokeratyny 18 [2, 6]. We wczesnych apoptotycznych zdarzeniach cytokeratyna jest rozszczepiana przez kaspazy, odsłaniając swoistą strukturę rozpoznawaną przez przeciwciała M30, które w metodach immunohistochemicznych uwidacznia komórki apoptotyczne. Ekspresja M30 jest wykrywana wcześniej metodami immunohistochemicznymi niż zmiany w błonie komórkowej (uwidocznione po zastosowaniu aneksyny V) lub w jądrze komórkowym (metoda TUNEL) [2].

W dostępnym piśmiennictwie nie ma również prac omawiających wczesne etapy apoptozy wy-

krywane przeciwciałem M30 w relacji do ekspresji enzymu efektorowego – kaspazy 3 (CPP32) oraz badań oceniających zależności między aktywnością proliferacyjną i wczesnymi fazami apoptozy w przewlekłym zapaleniu i rakach trzustki.

Wyniki badań własnych wykazały mniejszy odsetek przypadków z jednoczesną ekspresją M30 i CPP32 w rakach w porównaniu z przewlekłym zapaleniem trzustki. Obniżony odsetek dodatnich wyników może być związany z zaburzeniami aktywacji kaspaz jako czynników wykonawczych apoptozy [3]. Aktywacja kaspaz współdziała z fragmentacją DNA i jest pośrednio odpowiedzialna za morfologiczne zmiany zachodzące podczas apoptozy [10]. Dotyczy to szczególnie kaspazy 3, która, jak się uważa, odgrywa ważną rolę w procesie zaprogramowanej śmierci komórki, łącząc w fazie wykonawczej zewnętrzną i wewnętrzną drogę aktywacji apoptozy [2, 3]. Znaczenie i udział kaspazy 3 w procesie apoptozy omówiono zaledwie w kilku pracach [11–13]. Satoh et al. [11] wyróżnili dwa typy immunobarwienia kaspazy 3: cytoplazmatyczny i jądrowy obserwowany zarówno w rakach przewodowych, jak i rzadkich przypadkach raka wewnątrzprzewodowego brodawkowo-śluzowego trzustki. Cytoplazmatyczna ekspresja CPP32 korelowała ze wzrostem złośliwości raka, a jądrowa ekspresja tego enzymu była wyższa w nieinwazyjnych niż inwazyjnych guzach trzustki. W badaniach własnych obserwowano wyłącznie cytoplazmatyczną lokalizację CPP32, szczególnie w III stopniu klinicznego zaawansowania raka trzustki, w których odsetek CPP32 + komórek przekraczał 50%. Zgodnie z doniesieniem Satoh et al. [11] obserwacja ta może wskazywać na wyższą złośliwość komórek nowotworowych i tłumaczyć zdolność do zasiedlania węzłów chłonnych. Wyniki badań własnych wykazały również, że w pojedynczych przypadkach przewlekłego zapalenia stwierdzono wysoki i porównywalny z rakami odsetek CPP32 + komórek, co może potwierdzać obserwacje kliniczne, że przewlekłe zapalenie trzustki stanowi potencjalne zagrożenie rozwoju raka.

W pracy Meggiato et al. [13] nie wykazano korelacji między CPP32, aktywnością proliferacyjną i apoptozą badaną metodą TUNEL w rakach trzustki. W obecnych badaniach dodatnia korelacja między CPP32 i apoptozą wykrywaną przeciwciałem M30 występowała w 40% przewlekłego zapalenia i 34% raków trzustki. Wykazany w niniejszej pracy wysoki odsetek Ki-67 + komórek towarzyszący niskiemu indeksowi apoptotycznemu w rakach trzustki (60% przypadków) i w guzach zapalnych (43% przypadków) potwierdza możliwość selekcji klonu komórek o dużej potencji rozrostowej.

W 14% przypadków raka trzustki i 4% przewlekłego zapalenia obserwowano ekspresję kaspazy 3 bez wykrywalnych wczesnych faz procesu programowanej śmierci komórki. Aktywacja kaspazy 3 może zatem występować bez zmian w cytoszkieletcie komórek nabłonkowych uwidocznionych za pomocą przeciwciała M30. Jest to zgodne z obserwacjami Zeuner et al. [14], którzy sugerują możliwość przeżywania komórek, mimo aktywacji kaspaz. Istnieją również doniesienia, że może występować apoptoza niezależna od kaspazy 3, w przebiegu której nie ma charakterystycznych zmian związanych z jądrem komórkowym [15]. Stwierdzony w naszej pracy fenotyp CPP32 – M30 +, występujący odpowiednio w 12 i 28% przypadków przewlekłego zapalenia i raka trzustki, stanowi pośrednie potwierdzenie tych badań.

Działania zmierzające do regulacji mechanizmów apoptozy, a zwłaszcza przywracające równowagę między proliferacją i programowaną śmiercią komórki, są jednym z podstawowych mechanizmów ograniczających rozrost komórek złośliwych [16, 17].

Zrozumienie kaskady procesów prowadzących do apoptozy, łącznie z czynnikami aktywującymi i hamującymi ten proces, powinno pomóc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych, istotnych w zwiększeniu efektywności chirurgii onkologicznej [18].

Podziękowanie. Autorzy dziękują mgr J. Adamiak za pomoc techniczną w czasie wykonywania pracy.

Piśmiennictwo

- [1] **Thompson CB:** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267, 1456–1462.
- [2] **Leers MPG, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramackers FCS, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B:** Immunohistochemical detection and mapping of cytokeratin 18 neoepitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999, 187, 547–572.
- [3] **Martin LJ:** Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med* 2001, 7, 455–478.
- [4] **Sulejczak D:** Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post Biol Kom* 2000, 27, 527–568.
- [5] **Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA:** Apoptosis definition, mechanisms and relevance to disease. *Am J Med* 1999, 107, 489–506.
- [6] **Caulin C, Slavesen GS, Oshina RG:** Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1977, 138, 1379–1394.

- [7] **Fuchs E, Weber K:** Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Ann Rev Biochem* 1994, 63, 345–382.
- [8] **Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, Di Francesco V, Vaona B, Bo-vo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G:** Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999, 94, 1253–1260.
- [9] **Ślesak B, Harłodzińska-Szmyrka A, Knast W, Sedlaczek P, Einarsson R, van Dalen A:** TPS and CA 19-9 measurements in the follow-up of patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Int J Biol Markers* 2004, 19, 115–119.
- [10] **Janicke RV, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG:** Caspase is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998, 273, 9357–9360.
- [11] **Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Toyota T, Shimosegawa T:** The pattern of CPP32/caspase-3 expression reflects the biological behavior of the human pancreatic duct cell tumors. *Pancreas* 2000, 21, 352–357.
- [12] **Kobayashi D, Sasaki M, Watanabe N:** Caspase-3 activation downstream from reactive oxygen species in heat-induced apoptosis of pancreatic carcinoma cells carrying a mutant p53 gene. *Pancreas* 2001, 22, 255–260.
- [13] **Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, Baliello E, Valente M, Del Favero G:** C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death. *Pancreas* 2003, 26, 65–70.
- [14] **Zeuner A, Eramo A, Peschle C, De Maria R:** Caspase activation without death. *Cell Death Differ* 1999, 6, 1075–1080.
- [15] **Deas O, Domont C, MacFarlane M, Rouleau M, Hebib C, Harper F, Hirsh F, Charpentier B, Cohen GM, Senik A:** Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1998, 161, 3375–3383.
- [16] **Szala S:** Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory* 2000, 50, 11–121.
- [17] **Schmitt CA, Lowe SW:** Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999, 187, 127–137.
- [18] **Sarela AI, Guillou PJ:** Significance of apoptosis in surgical oncology. *Br J Surgery* 2003, 90, 129–130.

Adres do korespondencji:

Barbara Ślesak
Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej AM
ul. Mikulicza-Radeckiego 7
50-368 Wrocław
e-mail: slesak@immuno.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.05.2004 r.
Po recenzji: 21.05.2004 r.
Zaakceptowano do druku: 2.06.2004 r.

Received: 13.05.2004
Revised: 21.05.2004
Accepted: 2.06.2004