ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ♦ ORIGINAL ARTICLE

DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-3-59-65

УДК 616.37-006.327-06:616.37-002-036.1]-091.8

14.03.02 – патологическая анатомия

© Коллектив авторов, 2019

Морфологические изменения в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы при эпителиально-мезенхимальном переходе

Т. Н. Сотникова^{1,5*}, Г. Р. Сетдикова^{2,4}, О. В. Паклина^{2,5}, В. П. Шубин³, М. В. Мнихович^{4,5},
А. С. Цуканов³, А. А. Карпов², М. М. Тавобилов², С. С. Лебедев², Д. С. Озерова²

¹ГБУЗ Городская клиническая больница №1 им. Н.И. Пирогова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

²ГБУЗ Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

³ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рязикова» Минздрава России, Москва, Россия

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

⁵ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Цель исследования – изучить экспрессию генов-маркеров эпителиально-мезенхимального перехода в протоковой аденокарциноме поджелудочной железы.

Материал и методы. Операционный материал от 44 пациентов с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы подвергался морфологическому анализу с молекулярно-генетическим исследованием. В обнаруженных участках анапластического компонента выявляли суммарную РНК с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Для молекулярно-генетического исследования эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) использовали 5 генов-маркеров: ZEB1, ZEB2, CDH1, VIM, SNAIL1 (SLUG). Измерение экспрессии генов проводили в 3 разовом повторении, используя интеркалирующий краситель EvaGreen. На серийных парафиновых срезах с применением технологии tissue microarrays, проводили иммуногистохимическое выявление p63, гладкомышечного актина, общего цитокератина, цитокератина 7, виментина, Е-кадгерина (Ventana).

Результаты. В результате проведенного исследования в клетках анапластического компонента выявлена положительная реакция с мезенхимальными маркерами (виментин, p63, гладкомышечный актин), в отличие от железистого компонента. При молекулярном исследовании анапластического компонента изменения экспрессии генов характеризовались как ЭМП-положительные.

Заключение. Гетерогенность протокового рака проявляется в появлении анапластического (саркомоподобного) компонента, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих стромы и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом, влияющем на выживаемость больных.

Ключевые слова: кератин-7, виментин, эпителиально-мезенхимальный переход, кератины, актины, CDH1 протейн, кадгерин, протоковая карцинома, РНК.

Morphological Changes in the Cells of the Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas at Epithelial-Mesenchymal Transition

© T. N. Sotnikova^{1,5*}, G. R. Setdikova^{2,4}, O. V. Paklina^{2,5}, V. P. Shubin³, M. V. Mnikhovich^{4,5}, A. S. Tsukanov³,
A. A. Karpov², M. M. Tavobilov², S. S. Lebedev², D. S. Ozerova², 2019

¹Pirogov Municipal Clinical Hospital of Moscow Healthcare Department, Moscow Russia

²Botkin Municipal Clinical Hospital of Moscow Healthcare Department, Moscow Russia

³Ryazhikh State Scientific Center of Coloproctology

⁴Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The aim of the research was to study the expression of marker genes for the epithelial-mesenchymal transition in the ductal adenocarcinoma of the pancreas.

Material and methods. Surgical material from 44 patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas was subjected to morphological analysis with molecular genetic research. Total RNA was detected in the detected sections of the anaplastic component using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). 5 marker genes were used for molecular genetic studies of the epithelial-mesenchymal transition (EMT): ZEB1, ZEB2, CDH1, VIM, SNAIL1 (SLUG). Gene expression was measured in triplicate using an EvaGreen intercalating dye. On serial paraffin sections using tissue microarrays technology, immunohistochemical detection of p63, smooth muscle actin, total cytokeratin, cytokeratin 7, vimentin, E-cadherin (Ventana) was performed.

Results. As a result of the study, a positive reaction with mesenchymal markers (vimentin, p63, smooth muscle actin) was detected in the cells of the anaplastic component, in contrast to the glandular component. In a molecular study of the anaplastic component, changes in gene expression were characterized as EMT-positive.

Conclusion. The heterogeneity of ductal cancer is manifested in the appearance of an anaplastic (sarcoma-like) component, in which the ability of epithelial tumor cells to acquire the property of mesenchymal cells that do not require stroma and have aggressive malignant potential that affects the survival of patients is traced.

Key words: *keratin-7, vimentin, epithelial-mesenchymal transition, ceratins, actins, CDH1 protein, cadherins, carcinoma ductal, RNA.*

***Автор для переписки:**

Сотникова Татьяна Николаевна
ГБУЗ Городская клиническая больница №1 им.
Н.И. Пирогова Департамента здравоохранения города
Москвы, Ленинский пр-т, 8, Москва, 119049, Россия
E-mail: mnichmaxim@yandex.ru

***Corresponding author:**

Tat'yana Sotnikova
Pirogov Municipal Clinical Hospital of Moscow Healthcare
Department, Leninskii pr-t, 8, Moscow, 119049, Russia
E-mail: mnichmaxim@yandex.ru

Введение

Рак поджелудочной железы (ПЖ), а именно, протоковая аденокарцинома, является одним из самых агрессивных заболеваний и несмотря на существенный прогресс, достигнутый в хирургическом лечении данной патологии, выживаемость больных остается на низком уровне [3]. Согласно имеющимся литературным данным, рак периампулярной локализации, в частности, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы к 2030 г. станет второй ведущей причиной онкологической смертности [9]. В настоящее время большинство научных работ сосредоточено на изучении взаимодействия эпителиального и стромального компонентов в различных карциномах, играющем важную роль в развитии дедифференцированного, т.е. более злокачественного фенотипа опухолей [12]. Одной из причин агрессивности протоковой аденокарциномы ПЖ является характер стромального компонента, в частности, наличие десмопластической реакции в строме опухоли [12], проявляющейся гиперэкспрессией белков внеклеточного матрикса и пролиферацией миофибробластов [5, 13]. Ряд исследований подчеркивают важную роль развитой десмопластической стромы рака ПЖ в резистентности к химиотерапии опухоли и/или увеличению риска метастазирования опухолевых клеток [7, 10].

При раке ПЖ, так же, как и при других карциномах, одним из ключевых процессов в прогрессии опухоли является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [6]. Известно, что утрата полярности клеток ведет к изменению их цитоскелета, при этом одним из признаков ЭМП является утрата клетками цитокератиновых промежуточных филаментов и приобретение виментиновых. Также, ЭМП сопровождается изменением профилей транскрипции генов, в том числе компонентов цитоскелета и внеклеточного матрикса, а также протеолитических ферментов, участвующих в деградации последнего [11]. Фенотипические проявления ЭМП включают снижение экспрессии белков эпителиальных

маркеров (Е-кадгерина, десмоплакина и др.) и появление и/или усиление экспрессии белков, характерных для опухолей из мезенхимы (виментина, фибронектина, гладкомышечного актина и др.) [7]. Изменение микроокружения и утрата полярности могут способствовать снижению дифференцировки опухолевых клеток [8], однако полной утраты тканеспецифических свойств никогда не происходит. При потере дифференцировки эпителиальные опухоли продолжают сохранять часть признаков исходной ткани и способность к редифференцировке [4].

Цель нашего исследования – изучение экспрессионного профиля генов в протоковой аденокарциноме ПЖ в аспекте эпителиально-мезенхимального перехода.

Материал и методы исследования

Выполнен морфологический анализ с дальнейшим молекулярно-генетическим исследованием операционного материала от 44 пациентов с протоковой аденокарциномой ПЖ, находившихся на лечении в ГКБ им. С.П. Боткина и ГКБ им. Н.И. Пирогова г. Москвы в период с 2008 по 2014 гг. Возраст больных варьировал в пределах от 40 до 80 лет, с преобладанием мужчин (1.3:1). Средний возраст мужчин составил 61 год, женщин – 52 года.

Проводили полное макроскопическое исследование резецированного нативного органокомплекса с подробным описанием параметров опухоли, рекомендованных О.В. Паклиной [1]. Далее из разных участков опухоли набирали 3–5 образцов размером 1.0×1.0×0.5 см для приготовления криостатных срезов. При микроскопическом исследовании криостатных срезов обнаруженные участки анапластического (саркомоподобного) компонента (рис. 1) вырезали tissue teck. Далее срезы толщиной 10 мкм нарезали в криостатные пробирки, предварительно охлажденные до –80°C, по 3–5 срезов. Затем срезы в пробирках заливали лизирующим буфером, используемым при выделении РНК набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия).

Суммарную РНК выделяли из образцов ткани, помещенных в лизирующий раствор сразу после взятия, с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Качество РНК проверяли с помощью электрофоретического разделения в 1.8% агарозном геле (окрашивали бромистым этидием) и анализировали с помощью системы анализа изображений GelDoc XR+ (BioRad, США) в ультрафиолетовом свете. Кон-

Рис. 1. Выявление анапластического компонента при раке поджелудочной железы.

Рис. 2. Анапластический компонент при протоковом раке поджелудочной железы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

центрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре Р300 (IMPLEN). В исследование брали РНК не менее 250 нг.

Для молекулярно-генетического исследования ЭМП использовали 5 генов-маркеров: ZEB1, ZEB2, CDH1, VIM, SNAIL1 (SLUG), выбранных при анализе данных литературы [2]. Измерение экспрессии генов проводили в 3-разовом повторении, используя интеркалирующий краситель EvaGreen. В качестве референсных генов использовали гены GAPDH и ACTB. Анализ полученных данных проводили в программе StepOnePlus Software v.2.2.2, используя данные RQ с учетом эффективности нескольких референсных генов по методу. Изменение экспрессии генов $\pm 2(\log_{10} \pm 0.18)$ считалось значимым.

Оставшиеся образцы опухоли фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, затем заливали в парафин по стандартной методике. Серийные парафиновые срезы толщиной 3 мкм депарафинировали по обычной схеме, затем окрашивали гематоксилином и эозином. Далее проводилось иммуногистохимическое исследование на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по стандартной методике с применением следующей панели поликлональных антител: р63, гладкомышечный актин (ГМА), общий цитокератин, цитокератин-7, виментин, Е-кадгерин (Ventana). Интенсивность пероксидазной метки для каждого цитоплазматического антигена оценивали полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток. Иммуногистохимическая реакция оценивалась как негативная («–» – отсутствие реакции), слабopозитивная («+» – <10% окрашенных клеток), умеренная («++» – >10% клеток средней интенсивности окраски) и выраженная («+++» – >50% клеток высокой интенсивности окраски). Для проведения иммуногистохимического исследования применялась техника tissue microarrays, сконструированная в формате мультиблока (multitumor arrays). Данная модель состояла из 24 образцов первичной опухоли от разных больных, при этом

от одного больного использовались образцы с разной степенью дифференцировки опухолевых клеток. Таким образом, это позволило осуществить скрининг определенного молекулярного повреждения во всем разнообразии представленных опухолей с наименьшей затратой реактивов и времени. Для получения цветного изображения использовали сканер Mirax desk (Zeiss, Германия).

Силу и значимость связи между анализируемыми признаками оценивали с помощью корреляционно-регрессионного анализа. Для количественных признаков вычисляли корреляционный коэффициент Пирсона. За уровень статистической значимости принимали $p < 0.05$. Для анализа выживаемости (по методу Каплана–Мейера) использовали регрессионную модель пропорциональных интенсивностей Кокса. Достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждали с помощью лог-рангового теста, критериями Гехана и F-критерия Кокса, с использованием пакета программ Statistica для Microsoft Windows версия 6.0.

Результаты и их обсуждение

Гистологически протоковая аденокарцинома ПЖ представлена железистыми структурами неправильной формы, сформированными опухолевыми клетками с различным содержанием муцина, замурованными в десмопластической строме, занимающей от 50 до 80% площади всей опухолевой массы. Однако, наряду с железистыми структурами во всех случаях обнаружен анапластический (саркомо-подобный) компонент (АК). Объем АК разнился и составлял от 5 до 20% от общей массы опухоли, но во всех случаях не являлся преобладающим. АК представлен крупными полиморфными или веретенообразными клетками с гиперхромными ядрами, иногда многоядерными, с минимальным стромальным компонентом (рис. 2). Основные морфологические характеристики протоковой аденокарциномы ПЖ приведены в табл. 1. Как видно из табл. 1, АК протоковой аденокарци-

Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование железистого (1-й столбец) и анапластического (2-й столбец) компонентов протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Обозначения: А – виментин; Б – p63, В – гладкомышечный актин; Г – цитокератин-7. Ув. 200.

номы ПЖ обнаружен вне зависимости от степени дифференцировки опухолевых клеток, статистической зависимости также не выявлено ($p > 0.05$).

При проведении иммуногистохимической реакции обнаружены различия в экспрессии маркеров в железистом и анапластическом компонентах протоковой аденокарциномы ПЖ. Так, выраженная экспрессия глад-

комышечного актина (+++) отмечена только в десмопластической строме, окружающей железистые структуры.

В опухолях с анапластическим компонентом также отмечена выраженная положительная реакция с гладкомышечным актином, выявленная как в гладкомышечных волокнах, так и в единичных крупных анапластических опухолевых клетках (рис. 3 В). По-

Таблица 1

Морфологические характеристики ПАК ПЖ (n=44)

Признак	Значение (абс., %)
Пол	М – 21 (47.7) Ж – 23 (52.3)
Возраст, лет	До 50 лет – 6 (13.6) 51–60 лет – 6 (13.6) 61–70 лет – 22 (50.0) 71–80 лет – 9 (20.5) Более 81 года – 1 (2.3)
Размер опухоли (pT)	pT1 – 2 (4.5) pT2 – 26 (59.1) pT3 – 16 (36.4)
Статус лимфатических узлов (pN)	pNo – 6 (13.0) pN1 – 15 (34.0) pN2 – 23 (52.0)
Степень дифференцировки	G1 – 3 (6.8) G2 – 27 (67.0) G3 – 14 (31.8)
Радикальность резекции	Ro – 36 (81.8) R1 – 8 (8.1)

Таблица 2

Показатели экспрессии генов при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы

Гены	N	M	Min	Max	St. dev.
ZEB1	44	0.305227	-2.24000	2.230000	0.680193
ZEB2	44	0.449273	-1.12000	4.560000	0.822896
VIMENTIN	44	0.420023	-1.04000	2.140000	0.677189
SNAIL1	44	0.606591	-0.40000	4.860000	0.820371
CDH1	44	-0.438864	-1.00000	0.300000	0.320930

Рис. 4. Экспрессия генов при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы.

мимо этого, как в строме, так и в эпителиальном АК отмечена выраженная диффузная реакция с виментином (+++), отсутствующая в железистых структурах (рис. 3 А). Одновременно в отдельных анапластических клетках отмечалась потеря экспрессии общего цитокератина и цитокератина-7 (рис. 3 Г) при сохраненной экспрессии эпителиально-мембранного антигена. Также, в ядрах анапластических клеток отмечена положительная реакция с маркером базальных стволовых клеток р63 (рис. 3 Б). В опухолях без АК доля окрашенных ядер с антителами к р63 была

ниже. Регистрировались единично окрашенные ядра по периферии железистых структур. Также при раке ПЖ происходила редукция экспрессии белка Е-кадгерина и изменение полярности его экспрессии, а именно, исчезновение мембранного окрашивания и появление цитоплазматического с разной степенью интенсивности. В анапластическом компоненте во всех случаях отмечена отрицательная как мембранная, так и цитоплазматическая экспрессия белка Е-кадгерина.

При молекулярном исследовании анапластического компонента значения изменения экспрессии генов в большинстве случаев характеризовались как ЭМП-положительные (рис. 4, табл. 2).

Заключение

Классический вариант протоковой аденокарциномы поджелудочной железы по своей гистологической структуре, как правило, является неоднородной опухолью, представленной полями различной дифференцировки от высокой до низкой, включая анапластический компонент. По нашему убеждению, анапластический компонент необходимо выделять даже при минимальном его объеме от общей массы опухоли, поскольку опухоли с анапластическим компонентом имеют не

только различия в гистологическом строении, но и в злокачественном потенциале, а также по экспрессии эпителиальных, миоэпителиальных и мезенхимальных иммуногистохимических маркеров.

Гистологически десмоплазия стромы, которая характерна для протокового рака поджелудочной железы, полностью отсутствует в анапластических участках. Опухолевые клетки, плотно располагаясь друг к другу, создают подобие «стромального каркаса».

Кроме того, выявленная в анапластических клетках диффузная экспрессия с виментином, гладкомышечным актином и p63 подтверждает, что в процессе потери дифференцировки опухолевые клетки приобретают миоэпителиальный и/или мезенхимальный фенотип. Данный факт, вероятно, связан с эпителиально-мезенхимальным переходом в опухоли, основными критериями которого являются утрата эпителиальной полярности, разделение на отдельные клетки и дисперсия при приобретении клеточной подвижности. При этом происходит разрушение плотных адгезионных контактов (редукция и изменение полярности экспрессии E-кадгерина) и реорганизация комплексов, обеспечивающих прикрепление клетки к субстрату. Однако частично сохраненная экспрессия цитокератинов и эпителиально-мембранного антигена свидетельствует о сохранении цитокартиновых рецепторов и возможной обратной трансформации при изменении микроокружения.

В работе Ayano Kabashima-Niibe с соавт. показано, что ингибирование трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) при протоковом раке поджелудочной железы приводит к обратному мезенхимально-эпителиальному переходу, и потере мезенхимального и восстановления эпителиального фенотипа [6].

Таким образом, возрастающий интерес исследователей к эпителиально-стромальным взаимодействиям в протоковом раке поджелудочной железы обусловлен его агрессивным биологическим поведением, резистентностью к химиотерапевтическому лечению и различной выживаемостью в зависимости от дифференцировки опухоли. Гетерогенность протокового рака заключается в появлении анапластического (саркомоподобного) компонента, в котором прослеживается способность эпителиальных опухолевых клеток приобретать свойство мезенхимальных клеток, не требующих стромы и обладающих агрессивным злокачественным потенциалом, влияющим на выживаемость больных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

1. Паклина О.В., Сетдикова Г.Р. Методология исследования операционного материала при протоковом раке поджелудочной железы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2014; 1:42–50 [Paklina OV, Setdikova GR. Operational research methodology material in ductal pancreatic cancer. Clinical and Experimental Morphology. 2014; 1:42–50] (in Russian).
2. Шубин В.П., Шелыгин Ю.А., Сушков О.И., Цуканов А.С. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в развитии колоректального рака (обзор литературы). Колопроктология. 2018; 2:111–7 [Shubin VP, Shelygin YuA, Sushkov OI, Tsukanov AS. The role of the epithelially-mesenchymal transition in the development of colorectal cancer (review). Koloproktologia. 2018; 2:111–7](in Russian).
3. Bosman FT. World Health Organization. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon: Iarc Press; 2010.
4. Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Nakata K, Yu J, Kayashima T, et al. α -Smooth Muscle Actin Expressing Stroma Promotes an Aggressive Tumor Biology in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Pancreas. 2010 Nov;39(8):1254–62. DOI: 10.1097/mpa.0b013e3181dbf647
5. Gao Q, Liang W-W, Foltz SM, Mutharasu G, Jayasinghe RG, Cao S, et al. Driver Fusions and Their Implications in the Development and Treatment of Human Cancers. Cell Reports. 2018 Apr;23(1):227–238.e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.050
6. Kabashima-Niibe A, Higuchi H, Takaishi H, Masugi Y, Matsuzaki Y, Mabuchi Y, et al. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. Cancer Science. 2013 Jan 11;104(2):157–64. DOI: 10.1111/cas.12059
7. Kadaba R, Birke H, Wang J, Hooper S, Andl CD, Di Maggio F, et al. Imbalance of desmoplastic stromal cell numbers drives aggressive cancer processes. The Journal of Pathology. 2013 Mar 21;230(1):107–17. DOI: 10.1002/path.4172
8. Mürköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse M-L, et al. Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 β . Cancer Research. 2004 Feb 15;64(4):1331–7. DOI: 0.1158/0008-5472.can-03-1860
9. Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cancer Cell. 2017 Aug;32(2):185–203.e13. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.07.007
10. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. Cell. 2012 Jan;148(1–2):349–61. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025
11. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. BioEssays. 2001;23(10):912–23. DOI: 10.1002/bies.1132

12. <i>Thiery JP</i> . Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. <i>Nature Reviews Cancer</i> . 2002 Jun;2(6):442–54. DOI: 10.1038/nrc822	sponsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. <i>Surgery</i> . 2002 Feb;131(2):129–34. DOI: 10.1067/msy.2002.119192
13. <i>Yen TWF, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, et al</i> . Myofibroblasts are re-	

Поступила в редакцию 17.06.2019
Принята в печать 2.09.2019

Received 17.06.2019
Accepted 2.09.2019

Для цитирования: Сотникова Т.Н., Сетдикова Г.Р., Паклина О.В., Шубин В.П., Мнихович М.В., Цуканов А.С., Карпов А.А., Тавобиллов М.М., Лебедев С.С., Озерова Д.С. Морфологические изменения в клетках протоковой аденокарциномы поджелудочной железы при эпителиально-мезенхимальном переходе. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8(3): 59–65. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-3-59-65

For citation: Sotnikova T.N., Setdikova G.R., Paklina O.V., Shubin V.P., Mnikhovich M.V., Tsukanov A.S., Karpov A.A., Tavobilov M.M., Lebedev C.S., Ozerova D.S. Morphological changes in the cells of the ductal adenocarcinoma of the pancreas at epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2019; 8(3): 59–65. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-3-59-65