

Імуногістохімічна характеристика епітеліально-мезенхімальної трансформації в протоковій аденокарциномі підшлункової залози

М. А. Шишкін^{id}*^{A,E,F}, В. О. Кабаченко^{id}^{A,B,C,D,E}

Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; В – збір даних; С – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Вирішальну роль у розвитку протокової аденокарциноми підшлункової залози (ПАПЗ) відіграє епітеліально-мезенхімальна трансформація (ЕМТ). В науковій літературі наведено недостатні й суперечливі дані щодо особливостей експресії епітеліальних і мезенхімальних маркерів у протоках ПАПЗ і зоні ЕМТ. Це актуалізує дослідження ролі ЕМТ у розвитку та прогресуванні ПАПЗ.

Мета роботи – здійснити комплексне оцінювання епітеліальних і мезенхімальних маркерів ЕМТ у протоках ПАПЗ і зоні ЕМТ при різних ступенях диференціювання.

Матеріали і методи. Виконали комплексне патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження 49 випадків операційного матеріалу хворих на ПАПЗ, який поділили на групи помірного (G2) та низького ступеня диференціювання (G3) пухлин.

Результати. ПАПЗ характеризується низьким рівнем експресії E-кадгерину і в протоках, і в ЕМТ – Me = 22,58 % [12,81; 36,23] та Me = 25,17 % [19,04; 35,37] відповідно ($p > 0,05$). У протоках виявлена тільки мембранна експресія, у зоні ЕМТ – мембрано-цитоплазматична експресія маркера без достовірної різниці в групах. Встановили вірогідне зниження експресії β -катеніну в протоках ($p < 0,05$) при G2 із мембрано-цитоплазматичним забарвленням (Me = 15,58 % [10,42; 26,24]), при G3 – з мембранним (Me = 4,42 % [2,35; 5,93]). У зоні ЕМТ в обох групах виявили тільки мембрано-цитоплазматичну експресію без достовірної різниці ($p > 0,05$). У 100 % ПАПЗ визначена мембранна експресія СК7, достовірно нижча при G2 (Me = 19,51 % [10,70; 27,24] проти Me = 26,19 % [20,93; 30,05] при G3, $p < 0,05$), та СК18 (Me = 21,34 % [9,68; 29,96] – при G2, Me = 22,50 % [8,24; 40,08] – при G3, $p > 0,05$). Експресію α -SMA та Vim виявили у веретеноподібних клітинах стромы, навколо тубулярних і трабекулярних структур із мембрано-цитоплазматичним забарвленням. Не встановили вірогідну різницю за α -SMA при G2 і G3, а рівень віментину достовірно нижчий при G3 ($p < 0,05$).

Висновки. Особливості експресії маркерів E-кадгерину, β -катеніну, СК7 та СК18 при ПАПЗ свідчить про більш виражений процес епітеліально-мезенхімальної трансформації на периферії пухлини, вираженість якого зростає з прогресуванням пухлини. Оптимальними маркерами мезенхімального фенотипу клітин протокової аденокарциноми підшлункової залози є α -SMA та віментин.

Ключові слова:

аденокарцинома протоки підшлункової залози, підшлункова залоза, епітеліально-мезенхімальна трансформація, імуногістохімія, E-кадгерин, β -катенін, α -SMA, віментин, цитокератин 7 (СК7), цитокератин 18 (СК18).

Запорізький медичний журнал. 2024. Т. 26, № 2(143). С. 127-133

*E-mail: shishkin.stomat@gmail.com

Immunohistochemical characteristics of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma

M. A. Shyshkin, V. O. Kabachenko

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays a crucial role in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). There are insufficient and contradictory data in the scientific literature on the peculiarities of epithelial and mesenchymal marker expression in PDAC ducts and EMT zone, which requires further research on the role of EMT in the development and progression of PDAC.

Aim: to conduct a comprehensive assessment of epithelial and mesenchymal markers of EMT in the PDAC ducts and EMT zone at different degrees of differentiation.

Materials and methods. A comprehensive pathomorphological and immunohistochemical examination including 49 cases of surgical material from patients with PDAC, divided into groups of moderate (G2) and low degree of tumor differentiation (G3).

Results. PDAC was characterized by low levels of E-cadherin expression in both ducts and EMT – Me = 22.58 % [12.81; 36.23] and Me = 25.17 % [19.04; 35.37], respectively ($p > 0.05$). Only membrane expression of the marker was detected in the ducts and membrane-cytoplasmic one – in the EMT zone without significant differences in the groups. There was a significant decrease in the ductal β -catenin expression ($p < 0.05$) in G2 with membrane-cytoplasmic staining (Me = 15.58 % [10.42; 26.24]), in G3 – with membrane (Me = 4.42 % [2.35; 5.93]); in the EMT zone, only membrane-cytoplasmic expression was observed in both groups without significant difference ($p > 0.05$). Membrane expression of CK7 was positive in 100 % of PDAC, significantly lower at G2 (Me = 19.51 % [10.70; 27.24]; Me = 26.19 % [20.93; 30.05], $p < 0.05$), and CK18 (Me = 21.34 % [9.68; 29.96] – in G2, in G3 – Me = 22.50 % [8.24; 40.08], $p > 0.05$). Expression of α -SMA and Vim was seen in spindle-shaped stromal cells, around tubular and trabecular structures with membrane-cytoplasmic staining. There was no significant difference between α -SMA in G2 and G3, the level of vimentin was significantly lower in G3 ($p < 0.05$).

Conclusions. The features of PDAC E-cadherin, β -catenin, CK7 and CK18 marker expression indicate a greater EMT process at the periphery of the tumor and its severity increases with tumor progression. The optimal markers to determine the mesenchymal phenotype of PDAC cells are α -SMA and vimentin.

Keywords:

pancreatic ductal adenocarcinoma, pancreas, epithelial to mesenchymal transition (EMT), immunohistochemistry, E-cadherin, beta-catenin, alpha-SMA, vimentin, cytokeratin 7 (CK7), cytokeratin 18 (CK18).

Zaporozhye medical journal. 2024;26(2):127-133

У розвитку багатьох видів раку, зокрема й протокової аденокарциноми підшлункової залози (ПАПЗ), провідна роль належить епітеліально-мезенхімальній трансформації (ЕМТ). За даними фахової літератури, агресивність ПАПЗ корелює з ЕМТ [1].

ЕМТ – морфологічна клітинна програма фенотипового переходу клітин від епітеліального до мезенхімального стану, але в науковій літературі описано і проміжні, гібридні епітеліальні й мезенхімальні фенотипи як часткові ЕМТ [2,3]. Вважають також, що при різних видах раку ЕМТ відрізняється різноманітністю функцій, а також виявлена різна схильність раку до різних станів ЕМТ залежно від стадії. Так, згідно з даними фахової літератури, при ПАПЗ роль ЕМТ відрізняється від інших карцином (як-от раку молочної залози) [3,4,5].

У первинних пухлинах виявляють низьку кількість ракових клітин, що проходять ЕМТ, а більшість клітин, що циркулюють, експресують і епітеліальні, й мезенхімальні маркери. Тому, за результатами наукових досліджень, інфільтрація й дисемінація можуть відбуватися під час ЕМТ, що підтверджує роль ЕМТ в прогресуванні злоякісного процесу [6,7,8]. Втім, окремі автори піддають сумніву думку про те, чи є ЕМТ передумовою метастазування, особливо колонізації [9].

Особливості ЕМТ при різних видах раку вивчають за експресією маркерів епітеліального (Е-кадгерин, β -катенін, цитокератини) і мезенхімального (віментин, α -SMA) фенотипів. У процесі ЕМТ відбувається втрата міжклітинної адгезії, одними з основних компонентів якої в нормальній і пухлинній тканині є кадгерини і катеніни [9,10,11]. Для більшості злоякісних пухлин характерні втрата або різке зниження експресії Е-кадгерину та ядерна транслокація β -катеніну. Вважають, що експресія Е-кадгерину корелює з інвазивністю пухлини та метастазуванням, а отже з поганим клінічним прогнозом [10,11]. Згідно з іншими даними, клітини ПАПЗ підтримують мембранну експресію Е-кадгерину [11].

Роль β -катеніну при злоякісних процесах залишається дискусійною. Експресія маркера може корелювати з клініко-морфологічними особливостями ракового процесу, але інші дослідження не підтверджують залежність рівня експресії від канцерогенезу [12]. Тому вивчення цього маркера залишається актуальним.

Важливу роль у побудові цитоскелету, крім кадгеринів і катенінів, відіграють цитокератини (СК), що є проміжними філаментами. Їхня основна функція полягає у створенні внутрішньоклітинного каркасу, механічній підтримці плазматичної мембрани в місцях стикування з іншими клітинами і позаклітинним матриксом, підтримці ядерної оболонки.

Аденокарциноми експресують передусім цитокератини одношарового епітелію СК8, СК18, СК19 і, часто, СК7. Цитокератин 7 визначений як маркер ідентифікації нормальних і новоутворених протоків підшлункової залози (ПЗ), оскільки його вважають «класичною» проміжною клітиною протокової клітини ПЗ. СК18 відіграє важливу роль у клітинних процесах: апоптозі [13,14], мітозі, прогресуванні клітинного циклу та клітинній сигналізації [14]. За даними наукової літератури, висока концентрація СК18 корелює зі швидким метастазуванням, а також з однорічною виживаністю після хіміотерапії [13,14]. Для диференціації клітин епітеліального похо-

дження пропонують комплексне оцінювання маркерів СК18, СК8 і СК19. Зазначимо, що в доступній фаховій літературі наведено недостатньо даних про діагностичну характеристику комбінації цитокератинів 7 і 18 та їх комплексне оцінювання з іншими епітеліальними маркерами, як-от Е-кадгерином і β -катеніном, при ПАПЗ.

Втрата Е-кадгерину може призвести до переходу певних епітеліальних клітин до мезенхімального стану [15]. За даними наукової літератури, експресія віментин-позитивних клітин у пухлинній стромі корелює з прогресуванням злоякісного процесу, наявністю віддалених метастазів і погіршенням прогнозу. Є також гіпотеза, що віментин є фактором протипухлинного імунітету і пригнічення пухлинного росту, а отже може допомагати в лікуванні раку. Незважаючи на численні дані про важливу роль α -SMA в розвитку злоякісного процесу, є контраргументи про α -SMA як найбільш послідовний і переважаючий мезенхімальний маркер, пов'язаний із програмою ЕМТ [15,16].

Суперечливість відомостей щодо експресії ЕМТ-маркерів при ПАПЗ, відсутність достатніх даних про особливості експресії епітеліальних і мезенхімальних маркерів у протоках ПАПЗ і зоні ЕМТ обґрунтовують актуальність досліджень, спрямованих на вивчення ролі ЕМТ у розвитку та прогресуванні ПАПЗ.

Мета роботи

Здійснити комплексне оцінювання епітеліальних і мезенхімальних маркерів епітеліально-мезенхімальної трансформації у протоках ПАПЗ і зоні ЕМТ при різних ступенях диференціювання.

Матеріали і методи дослідження

Здійснили комплексне патоморфологічне дослідження 26 випадків операційного матеріалу та 23 випадків інтраопераційних панкреатотрепанобіопсій пацієнтів із ПАПЗ. Пацієнтів поділили на дві групи: у першу залучили хворих із помірним (G2) ступенем диференціювання (26 випадків); у другу – з низьким (G3) ступенем диференціювання пухлини (23 випадки). Вік пацієнтів становив від 39 до 83 років, середній вік – $62,15 \pm 2,34$ року. Як зразки групи контролю використали аутопсійний матеріал підшлункової залози 10 померлих пацієнтів віком 56–73 роки; у цих пацієнтів, за результатами аналізу клініко-морфологічних даних, не було захворювань підшлункової залози.

Матеріал для дослідження – шматочки тканини ПЗ, фіксований у 10 % розчині забуференого формаліну, залитий у парафінові блоки. Серійні парафінові зрізи завтовшки 4 мкм депарафінували за стандартною схемою та забарвлювали гематоксиліном та еозином для вивчення особливостей гістологічної будови ПАПЗ. Гістохімічні характеристики зразків стромы ПЗ вивчали за допомогою забарвлення Массон трихром.

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження виконали на депарафінованих і регідрататованих серійних зрізах (завтовшки 4 мкм) за стандартною методикою. Використали первинні антитіла проти Е-кадгерину (Mo a-Hu E-Cadherin, Clone EP 700 Y, «Thermo Scientific», США), β -катеніну (Mo a-Hu Beta-Catenin, Clone E-247,

«Thermo Scientific», США), цитокератину 7 (Mo a-Hu Keratine 7, Clone OV-TL 12/30, «Thermo Scientific», США), цитокератину 18 (Mo a-Hu Cytokeratine 18, Clone DC10, «DAKO», Данія), гладком'язового актину α -SMA (Mo Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, «DAKO», Данія), віментину (Mo a-Hu Vimentin Ab-2, «Thermo Scientific», США). Зрізи дозобарвлювали гематоксиліном Маєра, заключали в бальзам.

Результати ІГХ-дослідження вивчали й оцінювали за допомогою мікроскопа Axioplan 2 (Carl Zeiss, ФРН). Зрізи фотографували (п'ять стандартизованих мікроскопічних полів зору, збільшення $\times 200$) цифровою фотокамерою Ахіосам 105 Color ZEISS (ФРН).

Рівні експресії ІГХ-маркерів оцінювали методом фотоцифрової морфометрії з використанням медичної програми опрацювання цифрового зображення ImageJ [12]. Використовували плагін Colour Deconvolution та схему аналізу забарвлення «HDAB» (hematoxylin + DAB) в автоматичному режимі.

Для морфометричного вимірювання відносної площі імунопозитивних структур (епітеліальні маркери – Е-кадгерин, β -катенін, цитокератин 7 (СК7) та цитокератин 18 (СК18); мезенхімальні маркери – гладком'язовий актин (α SMA), віментин (Vim)) у відфільтрованому DAB-каналі зображення встановлювали стандартизований поріг чутливості (інструмент Threshold) для сегментації зображення, що розподіляє усі пікселі на два типи – білі та чорні. Наступний етап – обчислення відносної площі, яку займають імунопозитивні структури. Обраховували відсоткове співвідношення кількості пікселів цифрового зображення позитивної ІГХ-реакції до загальної кількості пікселів у зображенні. Градували на три групи: низький показник відносної площі ІГХ-позитивних клітин – 0–25%; помірний – від 26% до 75%; високий показник – від 76% до 100% відносної площі імунозабарвлених клітин.

Статистично результати дослідження опрацювали на персональному комп'ютері в програмі Statistica 13.0 (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J). Обчислювали медіану (Me), нижній і верхній квартилі [Q1; Q3]. Порівняльний аналіз у групах дослідження виконали з використанням критерію Манна–Вітні. Для кореляційного аналізу використали коефіцієнт Пірсона (r) для непараметричних даних: при r від 0,10 до 0,29 в значали слабкий зв'язок, $r = 0,30$ –0,69 – помірний, r понад 0,7 – сильний зв'язок сполучення ознак. Результати вважали статистично достовірними при $p < 0,05$.

Результати

ПАПЗ відрізняється помірним і низьким ступенем диференціації. В матеріалі, що дослідили, помірний ступінь диференціювання (G2) встановили у 45,65%, низький (G3) – у 54,35% випадків.

ІГХ-аналіз зразків ПАПЗ показав мембрано-цитоплазматичну експресію Е-кадгерину в 100% випадків. ПАПЗ характеризується низьким рівнем експресії маркера і в протоках (Me = 22,58% [12,81; 36,23]), і в зоні ЕМТ (25,17% [19,04; 35,37]). Тільки мембранне забарвлення визначили в дрібних тубулярних і трабекулярних комплексах у пухлинах із G2 і G3 рівнями диференціювання. Мембрано-цитоплазматичне забарвлення

виявили в окремих дрібних ракових клітинах у пухлинах із G2 рівнем диференціювання (рис. 1) та в пластах, що сформовані дрібними раковими клітинами, у пухлинах із G3 рівнем диференціювання (рис. 2). У першій групі експресія Е-кадгерину в протоках становила Me = 22,48% [12,82; 37,81], у зоні ЕМТ – Me = 26,23% [19,29; 35,79]; у другій групі – Me = 22,68% [12,79; 31,23] у протоках, Me = 24,55% [16,71; 30,37] у зоні ЕМТ.

Паралельне ІГХ-дослідження β -катеніну показало також мембрано-цитоплазматичну експресію в трабекулярних і тубулярних структурах при G2 ПАПЗ. При G3 визначали тільки мембранну експресію в тубулярних і трабекулярних структурах, а в пластах із ракових клітин – мембрано-цитоплазматичну експресію. У протоках ПАПЗ експресія маркера становила Me = 13,97% [5,72; 24,28], у зоні ЕМТ – Me = 11,71% [6,29; 24,44]. У першій групі рівень експресії β -катеніну в протоках становив Me = 15,58% [10,42; 26,24], у зоні ЕМТ – Me = 11,41% [6,72; 24,19]. У другій групі експресія β -катеніну в зоні ЕМТ пухлин становила Me = 13,42% [2,90; 25,97], а в протоках – Me = 4,42% [2,35; 5,93], це понад утричі нижче за показник в ЕМТ ($p < 0,001$).

ІГХ-аналіз епітеліальних маркерів СК7 і СК18 показав дифузну мембранну експресію в 100% випадків. Експресія СК7 становила Me = 13,03% [8,40; 19,52], СК18 – Me = 8,54% [5,99; 10,23], це в 1,52 рази нижче за показник експресії СК7 ($p < 0,05$). Експресію СК7 виявили тільки в тубулярних і трабекулярних структурах: при G2 Me = 19,51% [10,70; 27,24], при G3 – Me = 26,19% [20,93; 30,05], $p > 0,05$. Експресію СК18 визначили тільки в тубулярних і трабекулярних структурах: при G2 Me = 21,34% [9,68; 29,96], при G3 – Me = 22,50% [8,24; 40,08], $p > 0,05$.

Експресія віментину виявлена в 100% випадків, мембрано-цитоплазматична – в веретеноподібних клітинах строми пухлини, що щільно оточують дрібні тубулярні комплекси та трабекули. Цей показник становив Me = 25,10% [15,06; 35,09], характеризувався достовірним зниженням у пухлинах G2 порівняно з таким про ступені диференціювання G3: Me = 18,27% [10,94; 30,63] проти Me = 27,04% [19,59; 36,77], $p < 0,05$. У пухлинах G2 імунопозитивні ракові клітини веретеноподібної форми скупчувалися навколо дрібних раковозмінених тубулярних і трабекулярних комплексів, при G3 – навколо крупних аналогічних комплексів.

Експресія гладком'язового актину також у 100% випадків мембрано-цитоплазматична в клітинах строми, становила Me = 25,35% [15,19; 34,36]. Пухлини різних ступенів диференціювання не відрізнялися за рівнями експресії маркера. При G2 площа маркера становила Me = 25,69% [14,15; 33,88], при G3 – Me = 25,66% [19,95; 34,36] (рис. 3). Скупчення імунопозитивних веретеноподібних клітин виявили навколо дрібних раковозмінених тубулярних і трабекулярних комплексів при G2 і навколо крупних аналогічних комплексів при G3.

Кореляційний аналіз показав слабкий прямиий кореляційний зв'язок між рівнями експресії Е-кадгерину і β -катеніну в центрі пухлини (коефіцієнт Пірсона $r = +0,24$), сильний – у зоні ЕМТ (коефіцієнт Пірсона $r = +0,87$). У пухлинах із помірним ступенем диференціювання також виявлено слабкий прямиий кореляційний зв'язок між рівнями експресії Е-кадгерину і β -катеніну в

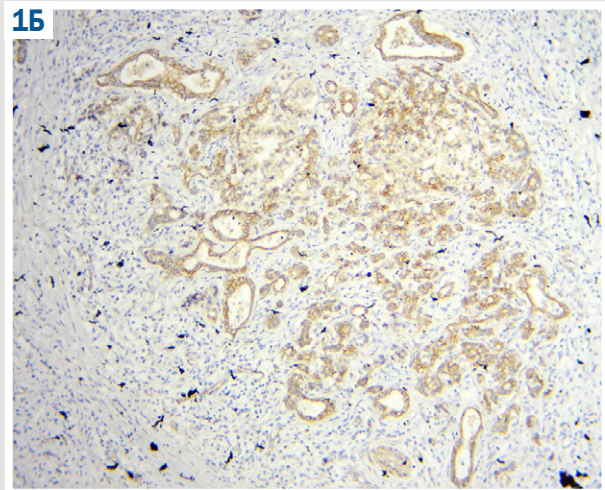
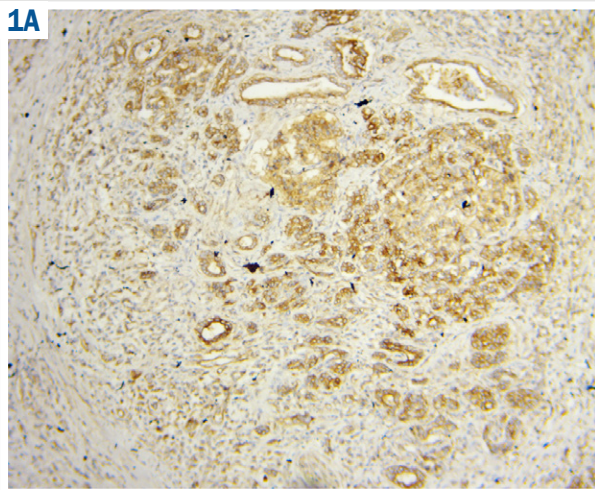


Рис. 1. А, Б: Протокова аденокарцинома підшлункової залози, помірний (G2) ступінь диференціювання. **А:** мембранна експресія Е-кадгерину в клітинах тубулярних і трабекулярних структур ПАПЗ. **Б:** мембрано-цитоплазматична експресія β -катеніну в клітинах тубулярних і трабекулярних структур ПАПЗ. **Забарвлення:** А: Мо a-Hu E-Cadherin, Clone EP 700Y; Б: Мо a-Hu Beta-Catenin, Clone E-247. **36. А, Б:** $\times 200$.

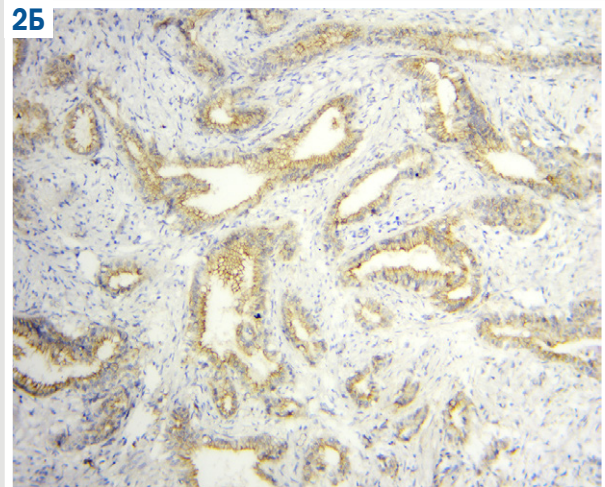
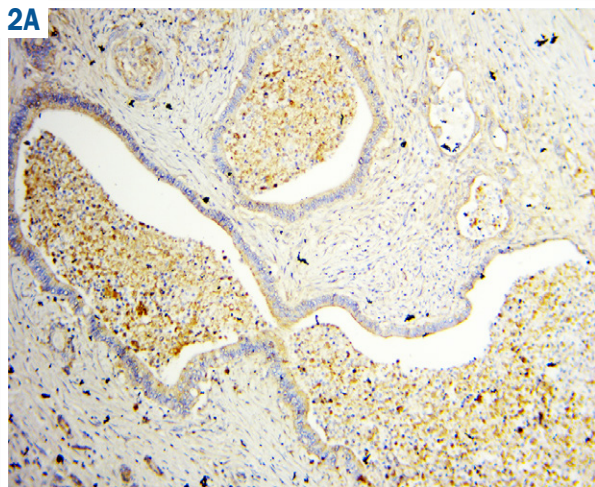


Рис. 2. А, Б: Протокова аденокарцинома підшлункової залози, низький ступінь диференціювання. **А:** мембранна експресія Е-кадгерину в клітинах тубулярних і трабекулярних структур ПАПЗ. **Б:** мембранна експресія β -катеніну в клітинах тубулярних і трабекулярних структур ПАПЗ. **Забарвлення:** А: Мо a-Hu E-Cadherin, Clone EP 700Y; Б: Мо a-Hu Beta-Catenin, Clone E-247. **36. А, Б:** $\times 200$.

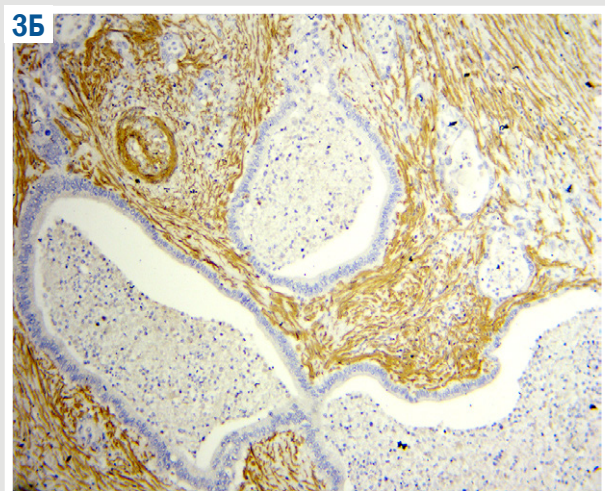
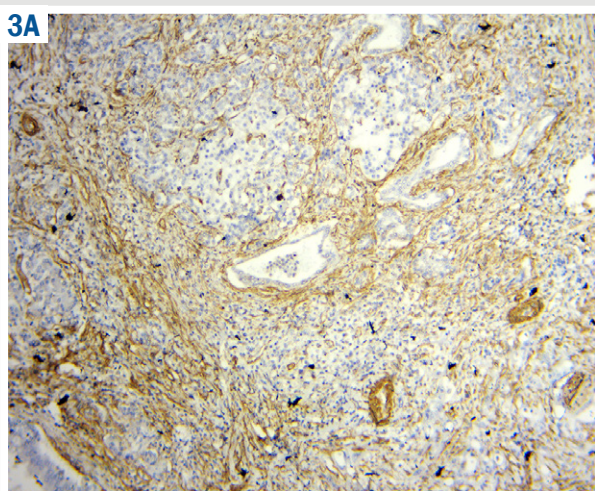


Рис. 3. Експресія гладком'язового актину в веретеноподібних клітинах строми ПАПЗ при помірному (А) та низькому (Б) ступенях диференціювання. **Забарвлення А,Б:** Мо Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4. **36. А, Б:** $\times 200$.

центрі пухлини (коефіцієнт Пірсона $r = +0,10$), помірний – у зоні ЕМТ (коефіцієнт Пірсона $r = +0,36$), а також прямий кореляційний зв'язок у центрі і на периферії пухлини при низькому ступені диференціювання (коефіцієнт Пірсона $r = +0,36$).

Кореляційний аналіз Пірсона між СК7 і СК18 у пухлинах із помірним ступенем диференціювання показав прямий помірний зв'язок ($r = +0,60$, $p < 0,05$), у пухлинах із низьким ступенем диференціювання – зворотний помірний зв'язок ($r = -0,41$, $p > 0,05$).

Встановили помірний прямий кореляційний зв'язок між мезенхімальними маркерами a-SMA та віментином при G2-ступені диференціювання ($r = 0,62$, $p < 0,05$), слабкий зворотний ($r = -0,12$, $p > 0,05$) – при низькодиференційованій ПАПЗ. Аналіз кореляційних зв'язків між епітеліальними і мезенхімальними маркерами показав при G2 помірний прямий зв'язок між a-SMA і СК7, a-SMA і СК18, між віментином і СК18; слабкий прямий зв'язок – між віментином і СК7. При G3 мезенхімальні маркери мали помірний прямий зв'язок із СК18 (a-SMA – $r = 0,35$, $p < 0,05$; віментин – $r = 0,51$, $p < 0,05$), а з СК7 – слабкий негативний ($r = -0,29$, $p > 0,05$; $r = -0,11$, $p > 0,05$). У зоні ЕМТ при G2 визначено помірний прямий зв'язок між епітеліальними і мезенхімальними маркерами, а в протоках – слабкий прямий. При G3 у зоні ЕМТ між a-SMA і Е-кадгерином встановлено помірний прямий ($r = 0,38$, $p < 0,05$), а з β -катеніном – слабкий прямий зв'язок ($r = 0,18$, $p > 0,05$); у протоках a-SMA з обома епітеліальними маркерами визначено слабкий зворотний зв'язок. Віментин при G3 мав у зоні ЕМТ і протоках з Е-кадгерином слабкий зворотний зв'язок, а з β -катеніном – слабкий прямий зв'язок.

Обговорення

Результати дослідження підтверджують, що ранньою важливою подією ЕМТ є втрата епітеліального фенотипу та полярності, адгезії клітин, і при ПАПЗ характеризується зниження експресії Е-кадгерину, що може свідчити про активацію інвазивного росту і поганий прогноз для життя. Ці дані збігаються з відомостями наукової літератури [15,16]. Повна чи часткова втрата експресії Е-кадгерину відбувається, за деякими даними, в 43 % випадків, впливає не тільки на прогноз виживаності, але й розвиток хіміорезистентності [11].

На відміну від ПАПЗ, при інших карциномах, як-от при раку молочної залози, стравоходу, шлунка, товстої кишки, гепатокарциномах, спостерігають різке зниження експресії Е-кадгерину. За даними фахової літератури, при ПАПЗ відбувається редукція і зміна полярності експресії Е-кадгерину з мембранної локалізації на повну цитоплазматичну [11]. У наших дослідженнях, навпаки, виявлена дифузна мембранно-цитоплазматична та мембранна експресія маркера.

Змінна експресія Е-кадгерину в раку підшлункової залози людини підтверджена в дослідженні, де виявили, що в деяких зразках цей маркер було втрачено, а в інших виявлена виражена мембранна експресія. В останньому випадку, як і в проведених дослідженнях, ПАПЗ вирізнялася диференційованим фенотипом: низькодиференційований рак характеризувався повною втратою Е-кадгерину [12] і поганим прогнозом [11].

Тільки мембранна локалізація маркера, виявлена під час дослідження, може характеризувати прогресування злоякісного процесу [10,11], оскільки така морфологічна характеристика не виключає інвазивної поведінки, коли клітини пухлини можуть «вторгнутися» в навколишні тканини, приймаючи різні морфологічні та міграційні схеми. Це зумовлено також клітинною неоднорідністю більшості пухлин людини і, відповідно, відсутністю домінування певного фенотипу. Крім того, збереження Е-кадгерину не виключає, що клітини не пройшли ЕМТ, оскільки цей процес може бути сильно локалізованим і тимчасовим, може функціонувати як коротка програма перетворення проінвазії, обмежена певними етапами та термінами метастазування [10,11,12].

У результаті дослідження не виявили абсолютної зворотної кореляції між маркером і агресивністю ПАПЗ. Це може підтверджувати факт високоінвазивної, агресивної поведінки клітин ПАПЗ при збереженні диференційованого фенотипу [7,8]. Ця невідповідність може підтверджувати також гіпотезу про те, що ЕМТ є багатоступеневим процесом, який передбачає кілька фенотипових змін і є проявом часткового фенотипу ЕМТ [6,7,8].

Отже, виявлені особливості експресії Е-кадгерину можуть свідчити про відмінність ролі ЕМТ при ПАПЗ порівняно з іншими карциномами [5,8].

Одночасну мембранну експресію Е-кадгерину і β -катеніну при холангіоцелюлярному раку виявили в 37,8 % і 41,94 % спостережень відповідно [9,10]. В інших дослідженнях встановили позитивну мембранну експресію β -катеніну, асоційовану з його цитоплазматичною або ядерною експресією, в 78 % і навіть 97 % злоякісних клітин гепатоцелюлярного раку, при цьому локалізація маркера залежала від ступеня диференціації пухлини [13,14]. Відповідні зміни епітеліальних маркерів, за даними фахових джерел, корелюють з інвазивністю і поганим прогнозом [13,14]. Наші результати збігаються з відомими даними.

Слабкий прямий кореляційний зв'язок між маркерами в центрі пухлини ($r = +0,24$) і сильний у зоні ЕМТ ($r = +0,87$) свідчить про взаємопов'язаний процес втрати експресії Е-кадгерину і накопичення β -катеніну, більш виражений у протоках пухлини, що спричиняє швидку інвазію та метастазування ПАПЗ. Виявили посилення прямого кореляційного зв'язку між епітеліальними маркерами в зоні ЕМТ і послаблення кореляції від сильної до слабкої в протоках при зниженні диференціації пухлини. Дані наукової літератури підтверджують залежність кореляції між епітеліальними маркерами від ступеня диференціації пухлини. При низькій диференціації ПАПЗ вирізняється суттєвим підвищенням експресії β -катеніну на фоні зниження експресії Е-кадгерину, а при помірному ступені диференціювання спостерігають зворотну імуногістохімічну реакцію епітеліальних маркерів [13,14]. Підтверджено значущий зв'язок між епітеліальними маркерами в первинних пухлинах, залежність маркерів від гістологічного ступеня [15,16]. Це відповідає даним про те, що клітини первинної пухлини ПАПЗ проходять ЕМТ [10,15].

ІГХ-аналіз підтвердив роль СК7 як оптимального маркера протоково-ракового компартменту, в якому спостерігали дифузну мембранну експресію білка.

Експресія СК18 також очікувана. Згідно з даними фахової літератури, втрата експресії цитокератинів недостатня для індукції ЕМТ, а отже й підвищення інвазивності, метастазування [10]. Вважають, що клітини, які експресують Е-кадгерин, експресують і СК18. Це характерно для клітин просвітнього епітелію залозистої тканини. Аберантна експресія епітеліальних маркерів Е-кадгерину, СК7, СК18 зумовлює підвищення рухливості й інвазивності клітин, а регуляція цих маркерів спричиняє зворотний процес [13,14]. У кількох ракових захворюваннях людини, включаючи ПАПЗ, аберантна передача сигналів Wnt/ β -катеніну є одним з основних чинників прогресування раку [15,16].

Дослідження, що здійснили, підтверджують зв'язок між аналізованими епітеліальними маркерами. Зростання експресії СК18 асоціюється з прогресуванням різних видів раку, корелює з поганою диференціацією, занедбанною стадією при плоскоклітинному раку стравоходу, нирково-клітинному раку, карциномі ротової порожнини, раку легенів. При деяких аденокарциномах (рак молочної залози, колоректальний рак, носоглоткова карцинома) зниження експресії СК18 навпаки корелює з прогресуванням процесу, низькою диференціацією [13,14]. Повідомляли, що змінена схема експресії кератину під час та після злоякісної трансформації модулює різні сигнальні шляхи, що беруть участь у прогресуванні пухлини, залежно від контексту [14].

Експресія мезенхімальних маркерів віментину та α -SMA характеризує стромальний компонент пухлини. Її виявляють у веретеноподібних клітинах: активованих зірчастих клітинах, тумор-асоційованих фібробластах. Вважають, що віментин сприяє міграції клітин, які зазнали ЕМТ, шляхом інтеграції механічного надходження з навколишнього середовища та модуляції динаміки мікротрубочок і мережі актоміозину. Відомо, що віментин є не тільки структурним білком, але й активним учасником різних сигнальних каскадів [14,15,16].

Імунопозитивні α -SMA міофібробластоподібні клітини визначають як репрезентативну форму активованих канцер-асоційованих фібробластів. Однак більшість веретеноподібних клітин у стромі пухлини також експресували α -SMA. Згідно з відомостями наукової літератури, канцер-асоційовані міофібробласти з α -SMA-позитивним фенотипом спричиняють прогресування пухлини, а експресія маркера корелює з низьким рівнем виживання [15,16].

Висновки

1. У протоковій аденокарциномі підшлункової залози виявлено слабкий прямий кореляційний зв'язок між епітеліальними маркерами в центрі пухлини ($r = +0,24$), сильний – у зоні ЕМТ ($r = +0,87$). Це свідчить про взаємопов'язаний процес втрати експресії Е-кадгерину і накопичення β -катеніну, більш виражений у протоках пухлини.

2. Виявили посилення прямого кореляційного зв'язку між епітеліальними маркерами в зоні ЕМТ і послаблення кореляції від сильної до слабкої в протоках при зниженні диференціації пухлини.

3. Оптимальним маркером для визначення ракового залозисто-протокового компартменту протокової адено-

карциноми підшлункової залози є СК7, експресія якого чітко визначає залозистоподібні та протокові пухлинні структури, а також відокремлені ракові клітини та їх скупчення в пухлині.

4. Епітеліально-мезенхімальна трансформація при протоковій аденокарциномі підшлункової залози характеризується накопиченням α -SMA і віментин-позитивних веретеноподібних клітин у стромі. При цьому не виявлена різниця за α -SMA при різних ступенях диференціації пухлин, але встановлено достовірне зниження віментину з градацією злоякісності процесу ($p < 0,05$).

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні мікроскопічного та імуногістохімічного профілів епітеліально-мезенхімальної трансформації в залозисто-протоковому компартменті та в зоні ЕМТ у розвитку протокової аденокарциноми підшлункової залози помірного (G2) та низького (G3) ступенів диференціювання.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР «Коморбідні стани, серцево-судинні та онкологічні захворювання в загальноклінічній практиці: розробка сучасних діагностичних та лікувальних заходів», держреєстрація № 0120U101587 (2020–2023).

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 23.01.2024

Після доопрацювання / Revised: 08.02.2024

Схвалено до друку / Accepted: 19.02.2024

Відомості про авторів:

Шишкін М. А., д-р мед. наук, доцент ЗВО, професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-8979-8463

Кабаченко В. О., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медико-фармацевтичний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-7219-6634

Information about the authors:

Shyshkin M. A., MD, PhD, DSc, Associate Professor, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

Kabachenko V. O., MD, Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Ukraine.

References

1. Safa AR. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in pancreatic cancer stem cell migration, metastasis formation, and drug resistance. *J Cancer Metastasis Treat.* 2020;6:36. doi: [10.20517/2394-4722.2020.55](https://doi.org/10.20517/2394-4722.2020.55)
2. Ribatti D, Tamma R, Annesse T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol.* 2020;13(6):100773. doi: [10.1016/j.tranon.2020.100773](https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773)
3. Lee AYL, Dubois CL, Sarai K, Zarei S, Schaeffer DF, Sander M, et al. Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut.* 2019;68(3):487-98. doi: [10.1136/gutjnl-2017-314426](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314426)
4. Romeo E, Caserta CA, Rumio C, Marcucci F. The Vicious Cross-Talk between Tumor Cells with an EMT Phenotype and Cells of the Immune System. *Cells.* 2019;8(5):460. doi: [10.3390/cells8050460](https://doi.org/10.3390/cells8050460)

5. Liao TT, Yang MH. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. *Cells*. 2020;9(3):623. doi: [10.3390/cells9030623](https://doi.org/10.3390/cells9030623)
6. Monkman JH, Thompson EW, Nagaraj SH. Targeting Epithelial Mesenchymal Plasticity in Pancreatic Cancer: A Compendium of Preclinical Discovery in a Heterogeneous Disease. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1745. doi: [10.3390/cancers11111745](https://doi.org/10.3390/cancers11111745)
7. Rodríguez Gil Y, Jiménez Sánchez P, Muñoz Velasco R, García García A, Sánchez-Arévalo Lobo VJ. Molecular Alterations in Pancreatic Cancer: Transfer to the Clinic. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):2077. doi: [10.3390/ijms22042077](https://doi.org/10.3390/ijms22042077)
8. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84. doi: [10.1038/s41580-018-0080-4](https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4)
9. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*. 2019;8(10):1118. doi: [10.3390/cells8101118](https://doi.org/10.3390/cells8101118)
10. Yu W, Yang L, Li T, Zhang Y. Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Front Oncol*. 2019;9:989. doi: [10.3389/fonc.2019.00989](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00989)
11. Sommariva M, Gagliano N. E-Cadherin in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Multifaceted Actor during EMT. *Cells*. 2020;9(4):1040. doi: [10.3390/cells9041040](https://doi.org/10.3390/cells9041040)
12. Dmello C, Srivastava SS, Tiwari R, Chaudhari PR, Sawant S, Vaidya MM. Multifaceted role of keratins in epithelial cell differentiation and transformation. *J Biosci*. 2019;44(2):33
13. Cheng Y, Qin K, Huang N, Zhou Z, Xiong H, Zhao J, et al. Cytokeratin 18 regulates the transcription and alternative splicing of apoptotic-related genes and pathways in HeLa cells. *Oncol Rep*. 2019;42(1):301-12. doi: [10.3892/or.2019.7166](https://doi.org/10.3892/or.2019.7166)
14. Sousa B, Pereira J, Paredes J. The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1933. doi: [10.3390/ijms20081933](https://doi.org/10.3390/ijms20081933)
15. Palamaris K, Felekouras E, Sakellariou S. Epithelial to Mesenchymal Transition: Key Regulator of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression and Chemoresistance. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5532. doi: [10.3390/cancers13215532](https://doi.org/10.3390/cancers13215532)
16. Sánchez-Ramírez D, Medrano-Guzmán R, Candanedo-González F, De Anda-González J, García-Ríos LE, Pérez-Koldenkova V, et al. High expression of both desmoplastic stroma and epithelial to mesenchymal transition markers associate with shorter survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Histochem*. 2022;66(1):3360. doi: [10.4081/ejh.2022.3360](https://doi.org/10.4081/ejh.2022.3360)