

М.А.Шишкін  
В.О.Кабаченко





Запорізький державний  
медико-фармацевтичний  
університет  
Запоріжжя, Україна

Надійшла: 15.11.2023  
Прийнята: 20.12.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.4.60-73>

УДК: 616.37-006.6-074/078

## МІКРОСКОПІЧНА ТА ІМУНОГІСТОХІ- МІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕПТЕЛІА- ЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОЇ ТРАНСФОР- МАЦІЇ В ПРОТОВОКОВІЙ АДЕНОКАРЦИ- НОМІ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПОМІР- НОГО ТА НИЗЬКОГО СТУПЕНЮ ДИФЕ- РЕНЦІЮВАННЯ

Shishkin M.A.  , Kabachenko V.O.   Microscopic and immunohistochemical characteristics of epithelial-mesenchymal transformation in ductal adenocarcinoma of the pancreas of moderate and low degrees of differentiation.

Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University, Zaporizhzhia, Ukraine.

**ABSTRACT. Background.** To date, there is no single protocol or guideline for the macro- and microscopic description of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which is due to the heterogeneity within the tumor and its dispersed growth associated with the process of epithelial-mesenchymal transformation (EMT). Also, there are no data on the expression of EMT markers at different degrees of differentiation and features of their expression in the PDAC ducts and the EMT zone in the literature. **Aim:** quantitative immunohistochemical analysis of the expression of epithelial and mesenchymal markers in the glandular-ductal compartment and in the EMT zone of the PDAC of a moderate (G2) and low (G3) degree of differentiation. **Methods.** A complex pathomorphological, immunohistochemical study of operative and biopsy material of 49 patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas with a moderate (G2) and low (G3) degree of differentiation was conducted. All research results were processed in the program «STATISTICA 13.0» (StatSoft Inc., license No. JPZ804I382130ARCN10-J). **Results.** During the histological examination, it was established that the histoarchitectonics of the PDAC consists of glandular-ductal and stromal compartments. According to the Masson-trichrome method, a statistically significant decrease in the area of trabecular and tubular structures and a statistically significant increase in the area of the fibrous stroma from G2 to G3 were established. In the G2-G3 sequence of the differentiation stage, a statistically significant decrease in the relative expression area of E-cadherin, CK7 and CK18 in the EMT zones was established in comparison with the glandular-ductal compartment, an inversely proportional expression of  $\beta$ -catenin in the transformation zones and in singly transformed cells, a statistical increase relative expression area of  $\alpha$ SMA and vimentin in the stromal compartment. With a decrease in the relative expression area of epithelial markers in the EMT zones, there was an increase in the relative expression area of  $\alpha$ SMA and vimentin in the G2-G3 sequence of the differentiation stage. **Conclusion.** From a moderate (G2) to a low (G3) degree of differentiation, a statistically significant ( $p < 0.05$ ) inversely proportional expression of epithelial and mesenchymal markers in the cells of the EMT zones is noted.


**Key words:** immunohistochemistry, epithelial-mesenchymal, transformation, ductal adenocarcinoma, pancreas, differentiation, E-cadherin,  $\beta$ -catenin, CK7, CK18,  $\alpha$ SMA, vimentin.

### Citation:

Shishkin MA, Kabachenko VO. [Microscopic and immunohistochemical characteristics of epithelial-mesenchymal transformation in ductal adenocarcinoma of the pancreas of moderate and low degrees of differentiation]. Morphologia. 2023;17(4):60-73. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.4.60-73>

 Shishkin M.A. 0000-0001-6010-7916;  Kabachenko V.O. 0000-0002-7219-6634

 [shishkin.stomat@gmail.com](mailto:shishkin.stomat@gmail.com); [leranaumenkokabachenko@gmail.com](mailto:leranaumenkokabachenko@gmail.com)

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

### Вступ

Гістопатологічна оцінка (ПАПЗ) є важливим фактором у виборі плану лікування і в прогнозі її агресивності. Внутрішньопухлинна неоднорідність, дисперсний ріст ПАПЗ ускладнюють гіс-

тологічну діагностику. В даний час не існує єдиного протоколу або керівництва для макроскопічної і мікроскопічної оцінки раку підшлункової залози. Згідно літературним даним, ПАПЗ можна класифікувати за різними, біологічно релевант-

ними, категоріями [1], зокрема, за ступенем диференціації ПАПЗ в літературі наводяться різні системи градації.

Одні автори [2] пропонують в якості критеріїв ступінь цитоядерної атипії, ступінь мітозу, тип архітектури пухлини, наявність муцину. На підставі цих критеріїв виділяють три ступені диференціювання в залежності від типу архітектури тканини. Низький ступінь диференціювання характеризується твердою архітектурою тканини з масивними структурами або ізольованими клітинами без видимих залозистих структур площею більш 50% пухлини. При цьому цей ступінь автори поділяють на два класи, які відрізняються ступенем цитоядерної атипії та ступенем мітозу. Помірно диференційований ступінь включає пухлини з обома типами архітектури. Добре диференційований ступінь характерний для пухлин з залозистою архітектурою більш ніж у 95% випадків без твердого компонента. Цей ступінь автори також поділяють на два класи, які відрізняються не тільки ступенем атипії, а і наявністю муцину в залозах.

Інші автори [3] також виділяють 5 гістологічних класів, враховуючи наступні критерії: клітинна атипія від помірної до високої, ядра, що перекриваються/тривимірні скупчені групи, ядерна дезорганізація, ізольовані одиночні осередки, збільшення ядер, анізонуклеоз, макронуклеоли, нерегулярний розподіл хроматину (злипання та очищення парахроматину), нерівність ядерної мембрани, збільшення ядерно-цитоплазматичного коефіцієнту, цитоплазматичні муцинові вакуолі, фоновий некроз, мітози, пухлинні клітини, вбудовані в десмопластичні фрагменти строми. При цьому зазначається, що, незалежно від кількості оціночних критеріїв пухлини, цитологічних або архітектурних особливостей, може бути кількісно або якісно недостатньо для остаточного діагнозу.

В системі класифікації Клеппеля виділені 3 ступені диференціації від G1 (добре диференційована) до G3 (слабо диференційована) на основі чотирьох критеріїв: ступінь залозистої диференціації, продукція муцину (нижчий ступінь - більше муцину), мітоз (<5/10HPF, 6-10/10HPF, >10/10HPF) і ядерні особливості.

Згідно класифікації AJCC (AJCC - American Joint Committee on Cancer - Американське об'єднане співтовариство з дослідження раку) Cancer Staging Manual 8th 2017 та ВООЗ 2019 р [5,11,14-15] визначаються 4 ступені диференціювання ПАПЗ на підставі 4 критеріїв (наявність трубчастих структур порівняно із солідним ростом, наявність муцину, ядерний поліморфізм і ядерний мітоз): G1 - високий, G2 - помірний, G3 - низький, G4 недиференційований ступінь або анапластична карцинома ПЗ. Змішаний тип недиференційованих пухлин ПЗ відображає змішану мікроскопічну картину перших двох форм [5,

11, 14]. Десмопластична стромальна реакція менш розвинена і відсутня у погано диференційованих ПАПЗ [11]. При цьому основним критерієм визначення гістологічного ступеню ПАПЗ пропонується ступінь диференціювання залоз: добре диференційована пухлина більше ніж на 95% складається з залоз; 50-95% залоз - пухлина помірно диференційована; менше 50% залоз - погано диференційована [4].

Система гістологічної класифікації TNM, рекомендована Коледжем американських патологів, також заснована на ступені диференціювання залоз: G1 - добре диференційована (> 95% пухлина складається із залоз), G2 - помірно диференційована (50-95% залоз), G3 - слабо диференційована (<49 залоз), G4 - ні або мінімальне диференціювання [5].

Незважаючи на те, що ступінь диференціювання вважається ключовим показником виживання після видалення пухлини, а також агресивність пухлини, ці критерії, запропоновані AJCC, не мають чіткої кореляції з виживаністю пацієнтів.

Головною особливістю ПАПЗ є наявність основних ракових епітеліальних клітин, які утворюють клітинні скупчення, залозистоподібні та протокоподібні структури, а також наявність значного об'єму фібропластичної [4] строми, яка відіграє важливу роль у прогресуванні ПАПЗ та обумовлює її агресивний перебіг [3,4]. Мікроскопічно для високого ступеню диференціювання ПАПЗ (G1) характерна збережена гістоархітектоніка з трубчастими, протокоподібними новоутвореннями середніх розмірів, що вислані сосочковими відростками, дуктули вислані муцинопродукуючими клітинами, схожими на клітини циліндричного епітелія, але відрізняються від них більшими розмірами з еозинофільною або оптично порожньою цитоплазмою, поліморфізм ядер виражений слабо, розміри їх незначно варіюють, зберігають базальне розташування в клітинах, кількість мітозів не перевищує 5 [3,4].

Пухлини ПАПЗ з помірним ступенем диференціювання (G2) відрізняються порушенням гістоархітектоніки ПЗ, протокоподібні новоутворення від середнього до малого розмірів, вислані кубічним епітелієм, кількість муцину, що продукується спотвореними клітинами протокового епітелія, помітно знижена, характерний помірний поліморфізм ядер та ядерець, розмішених на різному рівні, кількість мітозів сягає 10.

Для низького ступеню диференціювання (G3) ПАПЗ характерна зруйнована гістоархітектоніка, поява солідних структур, поодинокі клітинних інфільтрацій, клітини набувають спотворену, поліморфну, полігональну форму. Відбувається перехід клітин з епітеліального до мезенхімального типу з відповідною веретеноподібною формою і втратою до продукції муцину. Характерні виражений поліморфізм ядер і яде-

рець, збільшення кількості мітозів більше 10 в 5 полях зору [1,2].

Добре диференційований: рожева апікальна смуга, що складається з гранул муцину, може здаватися доброякісною, але має неправильну форму та розподіл; десмоплазія, виражений ядерний плеоморфізм з ядерцями, втрата полярності, мітотичні фігури. Від помірної до слабодиференційованої: спостерігається у більшості пухлин; абортивні трубочасті структури, глибоко інфільтративний характер зростання, часті мітози, нерегулярне та абортивне виробництво муцину.

В прогресуванні ПАПЗ, як і багатьох видів раку, значна роль належить епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) [4].

Численні дослідження продемонстрували, що інвазивність раку підшлункової залози корелює з епітеліально-мезенхімальним переходом (EMT) [6–9]. EMT виникає на інвазійному фронті пухлини, який функціонально відрізняється від основної маси пухлини [4,5] і демонструє залучення ракових стовбурових клітин (CSC) [16]. EMT не тільки призводить до підвищеної інвазивності клітин, але також, в свою чергу, може спричинити утворення стовбурових клітин [6].

Особливості EMT при різних видах раку вивчаються за експресією маркерів епітеліального (E-кадгерин,  $\beta$ -катенін, цитокератини) і мезенхімального (віментин,  $\alpha$ -SMA) фенотипів [4]. Для більшості злоякісних пухлин характерні втрата або різке зниження експресії E-кадгерину і ядерна транслокація  $\beta$ -катеніну. За літературними даними встановлено, що зниження експресії E-кадгерину в протокових структурах та в клітинах, що вступають у процес EMT, корелюється з гіршим ступенем диференціювання, інвазивністю пухлини, метастазуванням і, відповідно, поганим клінічним прогнозом [17–20]. Відповідно інших даних, клітини ПАПЗ підтримують мембранну експресію E-кадгерину, навіть у місцях метастазування [5]. Різну роль E-кадгерину в літературі пояснюють утворенням різних комплексів E-кадгерину: базолатеральний комплекс білка індукує пропухлинні сигнали, апікальний пригнічує їх [4].

Вважається, що кадгерин-катеніновий комплекс пов'язаний із цитоскелетом, що впливає на баланс між клітинною диференціацією і адгезією з одного боку та ростом і рухливістю клітин з іншого, а також на деградацію позаклітинного матриксу [4]. Одночасно зі зниженням експресії E-кадгерину знижується і рівень маркерів цитокератинової панелі (СК7 та СК18). Паралельно із цим феноменом відбувається підвищення експресії  $\beta$ -катеніну та маркерів мезенхімального профілю (віментин та  $\alpha$ -гладенько-м'язовий актин). Підвищення  $\beta$ -катеніну пов'язують із плюрипотентним фенотипом, самовідновленням як нормальних, так і CSC. Останні через стійкість до всіх видів терапії сприяють рецидиву ПАПЗ.

Жорсткість матриці також пов'язана з підвищеною агресивністю раку через активацію  $\beta$ -катеніну [4].

Незважаючи на те, що EMT вважається вирішальною подією інвазії та розповсюдження карциноми, через його складні регуляторні мережі відсутні прямі докази, що зв'язують дисемінацію, метастазування та EMT. Деякі автори піддають сумніву, чи є EMT передумовою метастазування, особливо колонізації [11-12]. Також вважається, що при різних видах раку EMT відрізняється різноманітністю функцій і, навпаки, виявлена різна схильність раку до різних станів EMT в залежності від стадії та різна роль EMT при різних раках [5-7]. При ПАПЗ первинні пухлини відрізняються низькою кількістю ракових клітин, що піддаються EMT, в той час як більшість циркулюючих клітин експресують епітеліальні і мезенхімальні маркери, що свідчить про інфільтрацію та дисемінацію під час EMT. Цей фактор та притаманні для EMT проміжні гібридні фенотипи EMT обумовлюють високу агресивність та низьку виживаність при ПАПЗ, незалежно від клінічної стадії та характерного превалювання для ПАПЗ помірного ступеню диференціювання [2,4,5].

Суперечливість даних експресії EMT-маркерів при різних ступенях диференціювання ПАПЗ, відсутність достатніх даних про особливості експресії епітеліальних і мезенхімальних маркерів в протоках ПАПЗ і зоні EMT обумовлює актуальність досліджень, спрямованих на остаточне з'ясування ролі EMT у розвитку та прогресуванні ПАПЗ.

**Мета роботи:** кількісний мікроскопічний та імуногістохімічний аналіз експресії епітеліальних і мезенхімальних маркерів в залозисто-протоковому компартменті та в зоні EMT ПАПЗ помірного (G2) та низького (G3) ступеню диференціювання.

#### **Матеріали та методи**

Проведене комплексне патоморфологічне дослідження ПАПЗ у 49 хворих віком від 39 до 83 років (середній вік пацієнтів дорівнював  $62,15 \pm 2,34$ р.). У 26 хворих досліджено хірургічно видалену ПАПЗ, у 23 пацієнтів - інтраопераційні біоптати ПАПЗ. Пацієнти розділені на дві групи: перша група – хворі на ПАПЗ помірного (G2) ступеню диференціювання (26 хворих або 54,35% всіх досліджених випадків), друга група – хворі на ПАПЗ низького (G3) ступеню диференціювання (23 хворих або 45,65% всіх досліджених випадків). Забір матеріалу виконувався з дотриманням усіх принципів біоетики, що викладені в Міжнародній етичній рекомендації щодо досліджень, пов'язаних із здоров'ям, за участю людей, розроблені Радою міжнародних організацій медичних наук (CIOMS) у співпраці з ВООЗ, Конвенції про права людини та біомедицину (1997) та Гельсінської декларації Всесвіт-

ньої медичної асоціації "Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження".

Шматочки тканини ПАПЗ фіксували в 10% забуференому формаліні і заливали в парафін. На прецизійному ротаційному мікромомі HM 3600 («MICROMLaborgerateGmbH» – Німеччина) виготовляли серійні зрізи товщиною 4  $\mu\text{m}$ , які після депарафінування забарвлювали гематоксиліном та еозином для вивчення мікроскопічних особливостей ПАПЗ, методом Масон-трихром для визначення стромального компартменту ПАПЗ, а також використовували для проведення відповідних ІГХ реакцій. Мікроскопічні особливості ПАПЗ вивчали в мікроскопі AxioPlan 2 («Carl Zeiss», Німеччина).

В ІГХ дослідженнях депарафінування, регітрацію та високотемпературне демаскування антигенів проводили в РТ-модулі з використанням NIER буферу (pH=9,0), після чого пригнічували активність ендогенної пероксидази 3 % розчином перекису водню та наносили блокуючу сироватку. Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників. Використовували наступні первинні антитіла: *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone 43 EP 700 Y* («ThermoFisherScientificInc.», США); *Mo a Hu Beta-Catenin, Clone E-247* («ThermoFisherScientificInc.», США); *Mo a Hu Keratine 7, Clone OV-TL 12/30* («ThermoScientific», США); *Mo a-Hu Cytokeratine 18, Clone DC10* («ДАКО», Данія); *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4* (ThermoScientific, США); *Mo a Hu Vimentin Ab-2* («ThermoScientific», США). Для візуалізації ІГХ-реакцій використовували систему детекції DAKOEnVision+ System з діамінобензидином («ДАКО», США). Зрізи дозбарвлювали гематоксиліном Майєра та заключали в канадський бальзам.

Рівні експресії досліджуваних ІГХ-маркерів оцінювали методом фотоцифрової морфометрії з використанням медичної програми обробки цифрового зображення ImageJ [13]. Оцінку результатів кожної ІГХ реакції виконували в п'яти стандартизованих полях зору мікроскопа (СПЗМ) AxioScoreA1 («CarlZeiss», Німеччина), при збільшенні  $\times 400$  (окуляр  $\times 10$ , об'єктив  $\times 40$ ), отриманих цифровою фотокамерою «Axiosam 105 Color ZEISS» (Німеччина). Для фотоцифрової морфометрії використовували плагін Colour Deconvolution та схема аналізу фарбування "HDAB" (hematoxylin+DAB) в автоматичному режимі. Для морфометричного вимірювання відносної площі імунопозитивних структур епітеліальних маркерів (Е-кадгерин,  $\beta$ -катенін, цитокератин 7 (СК7), цитокератин 18 (СК18) та мезенхімальних маркерів (гладенько-м'язовий актин ( $\alpha$ SMA), віментин (Vim)) у відфільтрованому DAB-каналі зображення встановлювали стандартизований поріг чутливості (інструмент

«Threshold») для сегментації усіх пікселів зображення на чорні (імуногістохімічно позитивні) та білі (імунонегативні). Відносну площу, що займають імунопозитивні структури, обчислювали як відсоткове співвідношення кількості пікселів цифрового зображення позитивної ІГХ-реакції до загальної кількості пікселів в зображенні та градували на три групи: низький рівень відносної площі ІГХ-позитивних клітин - 0-25%, помірний рівень - від 26% до 75%, та високий рівень - від 76% до 100% відносної площі імунопозитивних клітин.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері в програмі «STATISTICA 13.0» (StatSoft Inc., license No. JPZ804I382130ARCN10-J). Обчислювали медіану (Me), нижній і верхній квантилі ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ). Порівняльний аналіз в досліджуваних групах проводили за допомогою критерія Манна-Уїтні. Для кореляційного аналізу використаний коефіцієнт Пірсона. Результати вважалися статистично достовірними при значенні  $p < 0,05$ .

#### Результати дослідження

При мікроскопічному дослідженні в препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином, ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання характеризувалася наявністю дрібних та середнього розміру залозисто-тубулярних/дуктулоподібних структур різної форми (циліндричної, округлої, грушоподібної), трабекулярно-клітинних структур, а також фібропластичної стромі між ними (рис. 1А). Залозисто-тубулярні/дуктулоподібні структури вистелені кубічними та циліндричними раковими клітинами з еозинофільною цитоплазмою та помірно поліморфними ядрами з ядерцями. Дво/трирядні трабекулярні структури формували спотворені ракові клітини різного розміру та форми, в цитоплазмі 5% клітин відмічалась наявність крапель слизу. В ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання в щільній фібропластичній стромі визначалися дрібні, розгалужені, а також бруньковані залозисто-тубулярні/дуктулоподібні структури, вистелені плейоморфними раковими клітинами з гіперхромними поліморфними ядрами, розташованими на різному рівні від базальної мембрани, а також солідноклітинні структури з невпорядкованих скупчень полігональних ракових клітин різного розміру, з виразно атипівими та гігантськими спотвореними ядрами (рис. 1Б).

За даними фотоцифрової морфометрії в ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання середня відносна площа залозисто/дуктулоподібних структур складала  $Me=32,71\%$  (27,61; 63,38)% СПЗМ, трабекулярних структур - дорівнювала  $Me=9,59\%$  (8,45; 11,01)% СПЗМ, а фібропластичної стромі – складала  $Me=57,40\%$  (24,93; 63,03)% СПЗМ (табл. 1). На відміну від помірного G2 ступеню, в ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання середня відносна



площа залозисто-тубулярних/дуктулоподібних структур складала всього Me=4,57% (3,85; 5,97)% СПЗМ. Натомість, середня відносна площа трабекулярних структур значно переважала

(у 5 разів, Me=21,69% (15,30; 31,30)% СПЗМ) площу залозисто-тубулярних/дуктулярних структур. Площа фібропластичної строми дорівнювала Me=68,06% (63,56; 80,02)% СПЗМ (табл. 1).

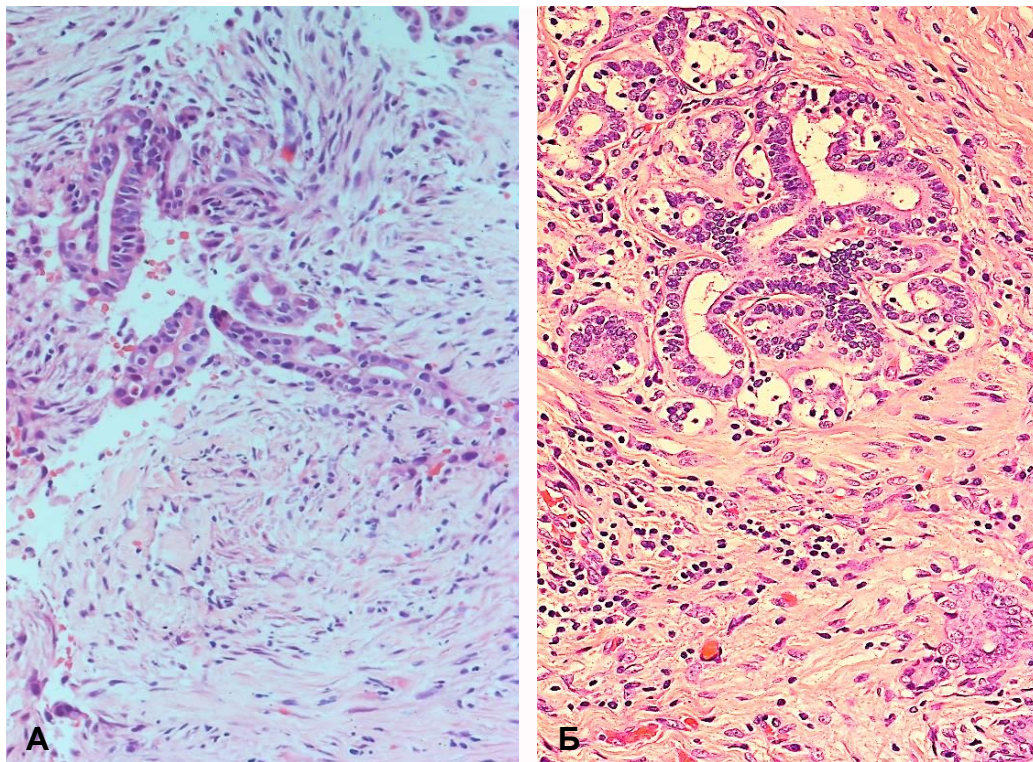


Рис. 1. А. Гістоструктура протоково-залозистого компартменту ПАПЗ: паралельні залозисто-тубулярні/дуктулоподібні структури ПАПЗ з фібробластиами і волокнами строми між ними. Б. Гістоструктура зони ЕМТ ПАПЗ: брудні протоки і залозисті структури ПАПЗ з відокремленням від них та інвазією в прилеглу строма фібробластоподібних клітин. Забарвлення гематоксилином та еозином.  $\times 400$ .

Таблиця 1

Показники відносної площі залозисто/дуктулоподібних, трабекулярно/солідноклітинних структур та фіброзної строми протокової аденокарциноми підшлункової залози (ПАПЗ) помірного (G2) та низького (G3) ступеню диференціювання. Me (Q1; Q3)(забарвлення за методом Массон-трихром)

Групи	Тубули	Трабекули	Строма
Помірний ступінь G2	32,71%*● (Q <sub>1</sub> =27,61; Q <sub>3</sub> =63,38)	9,59%*● (Q <sub>1</sub> =8,45; Q <sub>3</sub> =11,01)	57,40%* (Q <sub>1</sub> =24,93; Q <sub>3</sub> =63,03)
Низький ступінь G3	4,57%*● (Q <sub>1</sub> =3,85; Q <sub>3</sub> =5,97)	21,69%*● (Q <sub>1</sub> =15,30; Q <sub>3</sub> =31,30)	68,06%*● (Q <sub>1</sub> =63,56; Q <sub>3</sub> =80,02)
Контрольна група	84,92%*● (Q <sub>1</sub> =72,81; Q <sub>3</sub> =92,13)	–	15,02%*● (Q <sub>1</sub> =6,69; Q <sub>3</sub> =26,17)

Примітка 1 \*: статистична достовірна відмінність між мікроструктурами та стромою в I та II групах та групою порівняння (p<0.05).

Примітка 2 ●: статистична достовірна відмінність між мікроструктурами та стромою в I та II групах та групою порівняння (p<0.05)

В ПАПЗ помірного G2 і низького G3 ступеню диференціювання в ракових клітинах залозисто-тубулярних і дуктулоподібних структур визначалася мембранна експресія СК7, СК18, Е-кадгерину і  $\beta$ -катеніну. В ПАПЗ помірного G2

ступеню диференціювання в ракових клітинах залозисто-тубулярних і дуктулоподібних структур медіана відносної площі експресії СК7 складала Me=19,51 (10,70; 27,24) %, медіана площі експресії СК18 становила Me=21,34 (9,68; 29,96)

% (табл. 2). В ракових клітинах залозисто-тубулярних і дуктулоподібних структур ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання медіана відносної площі експресії СК7 складала Me=26,19 (20,93; 30,05)%, медіана площі експресії СК18 дорівнювала - Me=22,50 (8,24; 40,08)%. Між відносною площею експресії СК7 та СК18 в залозисто-протоковому компартменті ПАПЗ помірного G2 та низького G3 ступеню диференціювання статистично-достовірної різниці не виявлено.

В шарах ракових клітин залозисто-тубулярних і дуктулоподібних структур залозисто-протокового компартменту ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання медіана відносної площі експресії E-кадгерину дорівнювала Me=37,61 (Q<sub>1</sub>-30,59; Q<sub>3</sub>-41,38) %, площа експресії β-катеніну складала Me=10,23 (Q<sub>1</sub>=5,80;

Q<sub>3</sub>=13,99) % (табл. 2). В ракових клітинах аналогічних структур ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання медіана відносної площі експресії E-кадгерину становила Me=27,79% (Q<sub>1</sub>-24,55; Q<sub>3</sub>-35,54) %, медіана відносної площі експресії β-катеніну складала Me=4,71 (Q<sub>1</sub>=2,25; Q<sub>3</sub>=8,75) % (табл. 2). Тобто, в залозисто-протоковому компартменті ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання визначається достовірне (p<0,05) зниження відносної площі експресії E-кадгерину в шарах ракових клітин залозисто-тубулярних і дуктулоподібних структур, в порівнянні з ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання. Одночасно в аналогічних структурах ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання також відмічається достовірне (p<0,05) зниження відносної площі експресії β-катеніну в порівнянні з ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання.

Таблиця 2

Показники відносної площі експресії СК7, СК18, E-кадгерину і β-катеніну в залозисто-протоковому компартменті (залоз/прот комп) та в зоні епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) протокової аденокарциноми підшлункової залози помірного (G2) та низького (G3) ступеню диференціювання

Зони експресії	СК7	СК18	E-кадгерин	β-катенін
G2 залоз/прот комп	19,51% <sup>Ⓐ</sup> (10,70;27,24)	21,34% <sup>Ⓑ</sup> (9,68;29,96)	37,61%* (30,59;41,38)	10,23% <sup>Ⓒ</sup> (5,80;13,99)
G2EMT: клітини і скупчення	10,62% <sup>Ⓐ</sup> (8,42;16,22)	5,69% <sup>Ⓑ</sup> (4,17;7,00)	15,66% (12,62; 17,14)	18,28% <sup>Ⓒ</sup> (6,24;31,45)
G2EMT: залоз/прот комп	15,69% (10,65; 26,82)	17,43% (14,22; 21,04)	17,31%* (9,26;22,68)	8,88% (4,77; 12,52)
G3 залоз/прот комп	26,19% <sup>Ⓐ</sup> (20,93; 30,05)	22,50% <sup>Ⓑ</sup> (8,24;40,08)	27,79%* (24,55;35,54)	4,71% <sup>Ⓒ</sup> (2,25;8,75)
G3EMT: клітини і скупчення	4,09% <sup>Ⓐ</sup> (1,09; 6,99)	0,22% <sup>Ⓑ</sup> (0,03;0,98)	16,09%* (7,84;19,09)	19,42% <sup>Ⓒ</sup> (17,72;23,22)
G3 EMT: залоз/прот комп	7,16% (5,82; 8,09)	7,71% (4,44; 10,37)	18,75% (6,09; 26,69)	8,23% (7,34; 11,81)

Примітка 1 <sup>Ⓐ</sup>: статистична достовірна відмінність між раковим залозисто-протоковим компартментом та зоною EMT в ПАПЗ G2 таG3 (p<0.05).

Примітка 2 <sup>Ⓑ</sup>: статистична достовірна відмінність між раковим залозисто-протоковим компартментом та зоною EMT в ПАПЗ G2 таG3 (p<0.05).

Примітка 3: \* статистична достовірна відмінність між раковим залозисто-протоковим компартментом та зоною EMT в ПАПЗ G2 таG3 (p<0.05).

Примітка 4: <sup>Ⓒ</sup> статистична достовірна відмінність між раковим залозисто-протоковим компартментом та зоною EMT в ПАПЗ G2 таG3(p<0.05).

В пухлинах помірного G2 і низького G3 ступеню диференціювання, на межі стромально-го і залозисто-тубулярного/дуктулоподібного компартменту, а також в поширених осередках сполучної тканини між залозисто-тубулярними і дуктулоподібними структурами визначалися зони EMT. При мікроскопії зони EMT ПАПЗ характеризувалися наявністю брунькованих і фрагментованих залозисто-тубулярних/дуктулоподібних структур, та наявністю біля них в прилеглий стромі відокремлених епітеліоподібних атипичних ракових клітин або їх солідноклітинних скупчень, присутністю великих атипичних ракових

клітин з поліморфними ядрами, а також атипичних фібробластоподібних клітин з поліморфними гіперхромними ядрами (рис. 2).

Строма між епітеліоподібними та фібробластоподібними атипичними клітинами в зонах EMT частіше за все локально розпушена, рідше – мала фібропластичну структуру.

В зонах EMT в ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання медіана відносної площі експресії СК7 в поодиноких трансформованих клітинах та їх скупченнях дорівнювала Me=10,62 (8,42; 16,22) %, а медіана відносної площі експресії СК18 становила Me=5,69 (4,17; 7,00)%. У



залозисто-тубулярно/дуктулоподібному компартменті (поза зоною ЕМТ) відносні площі експресії СК7 і СК18 дорівнювали 19,51 (10,70;27,24)% та 21,34 (9,68;29,96)%, відповідно. В залозисто-потоковому компоненті зон ЕМТ в ПАПЗ помір-

ного G2 ступеню диференціювання відмічається поступова втрата експресії СК7 Me= 15.69% (10.65; 26.82)%, та СК18 Me=17,43% (14.22; 21.04)% у порівнянні із залозисто-протоковим компартментом поза зоною ЕМТ, (p<0.05).

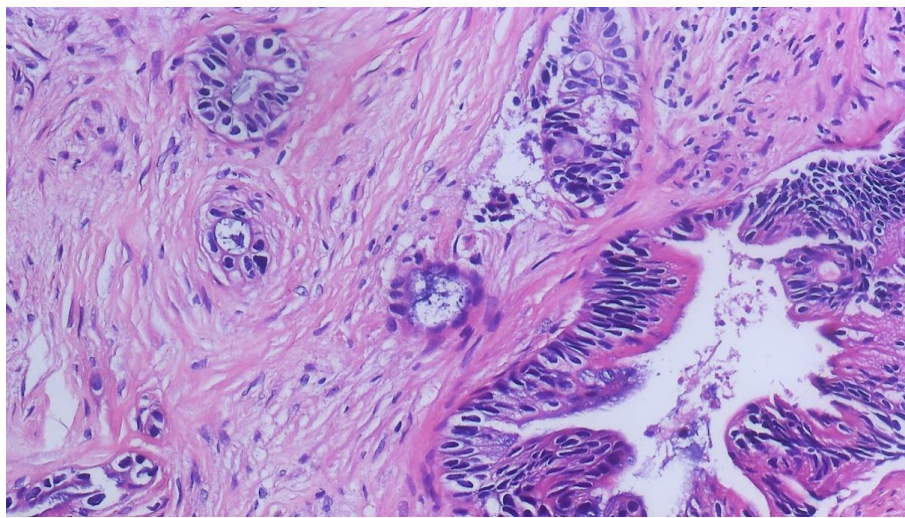


Рис. 2. Гістоструктура зони ЕМТ ПАПЗ: брунькованіх фрагментованих залозисто-тубулярних/дуктулоподібних структур, та наявності біля них в прилеглий стромі відокремлених епітеліоподібних атипичних ракових клітин або їх солідноклітинних скупчень, присутністю великих атипичних ракових клітин з поліморфними ядрами, а також атипичних веретеноподібних фібробластоподібних клітин з поліморфними гіперхромними ядрами. Забарвлення гематоксилином та еозинном.  $\times 400$ .

В зонах ЕМТ в ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання (рис. 3) медіана відносної площі експресії СК7 в поодиноких трансформованих клітинах та їх скупченнях дорівнювала Me=4,09 (1,09; 6,99) %, а медіана відносної площі експресії СК18 становила Me=0,22 (0,03; 0,98)%. У залозисто-тубулярно/дуктулоподібному компартменті (поза зоною ЕМТ) відносні площі експресії СК7 і СК18 дорівнювали 26,19 (20,93; 30,05)% та 22,50 (8,24; 40,08)%, відповідно. В залозисто-потоковому компоненті зон ЕМТ в ПАПЗ низького G3 ступеню диференціювання відмічається втрата експресії СК7 (Me= 7,16%(5,82; 8,09)) та СК18 (Me= 7,71%(4,44; 10,37)) майже у 3 рази, у порівнянні із залозисто-протоковим компартментом поза зоною ЕМТ (p<0.05). Із погіршенням ступеню диференціювання пухлин (G2-G3) визначалась статистично достовірною різниця між значеннями цитокератинів (СК7 та СК18) в залозисто-протоковому компоненті зон ЕМТ (p<0.05).

В зонах ЕМТ ПАПЗ помірного G2 ступеню диференціювання в ракових клітинах фрагментованих залозисто-тубулярних і дуктулоподібних структур, а також у відокремлених від них поодиноких епітеліоподібних атипичних клітинах та у їх скупченнях спостерігалась достовірною втрата мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину (Me=17,31% (Q<sub>1</sub>-9,26; Q<sub>3</sub>-22,68)%) (табл. 2) у порівнянні із залозисто-

тубулярним/дуктулоподібним компартментом поза зоною ЕМТ (Me=37,61 (Q<sub>1</sub>-30,59; Q<sub>3</sub>-41,38)), p<0.05. Паралельно в залозисто-протоковому компоненті зон ЕМТ відзначалось недостовірне зниження експресії  $\beta$ -катеніну (Me=8,88% (Q<sub>1</sub>=4,77; Q<sub>3</sub>=12,52)%, (p>0,05) у порівнянні з залозисто-тубулярно/дуктулоподібним компартментом поза зоною ЕМТ (Me=10,23% (Q<sub>1</sub>=5,80; Q<sub>3</sub>=13,99)) (табл. 2).

Зони ЕМТ в ПАПЗ помірного G2 і низького G3 ступеню диференціювання характеризуються статистично достовірною втратою експресії Е-кадгерину в шарах ракових клітин (G2 – Me=15,66% (12,62; 17,14), G3 – Me=16,09% (7,84; 19,09)) (рис. 4, 5) у порівнянні із залозисто-протоковим компартментом (G2 – Me=37,61% (30,59; 41,38), G3 – Me=27,79% (24,55; 35,54)), (p<0.05).

Встановлено статистично достовірне зниження відносної площі експресії Е-кадгерину в зонах ЕМТ у послідовності G2-G3 ступеню диференціювання. Зворотно-пропорційна експресія  $\beta$ -катеніну відмічалась у зонах трансформації та в поодинокі трансформованих клітинах. Спостерігалась втрата відносної площі експресії СК7 та СК18 у зонах ЕМТ у порівнянні із залозисто-протоковим компартментом. (поза зоною ЕМТ). Встановлено статистично достовірне зниження експресії СК7 та СК18 у зонах ЕМТ у послідовності G2-G3.



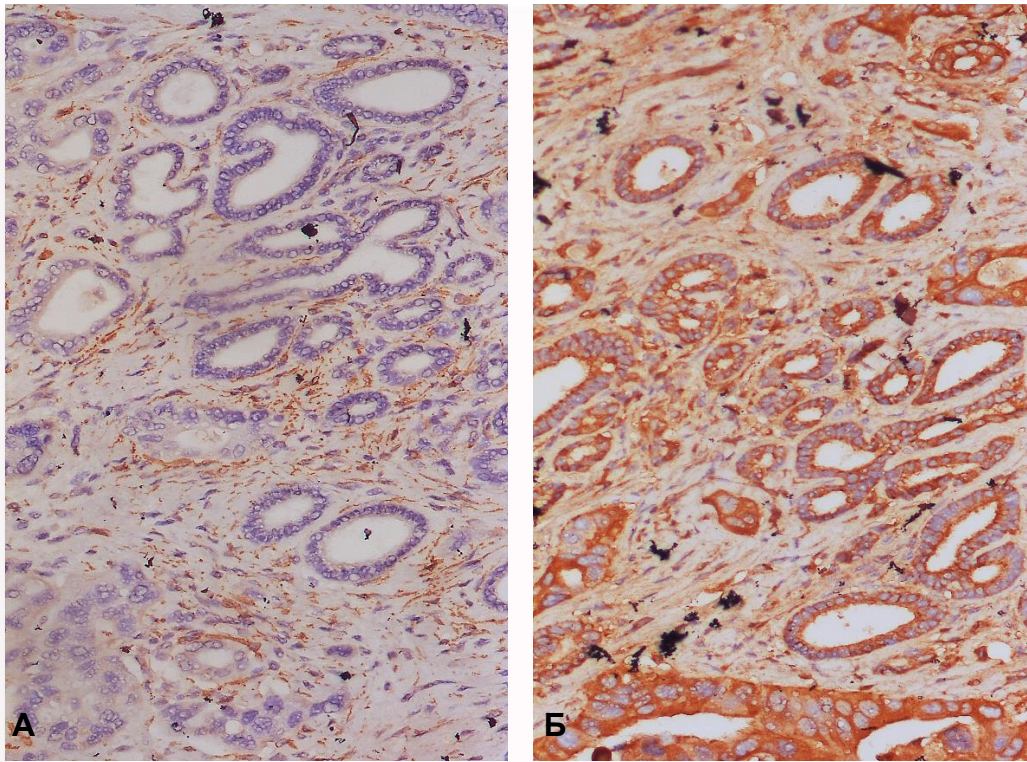


Рис. 3. Протокова аденокарцинома підшлункової залози низького G3 ступеню диференціювання: А - мембранна експресія Е-кадгерину в клітинах залозисто-тубулярних структур; Б – мембранна експресія  $\beta$ -катеніну в клітинах залозисто-тубулярних структур. ІГХ реакція: А - *Mo a-HuE-Cadherin, CloneEP 700 Y*, Б - *Mo aHuBeta-Catenin, CloneE-247*.  $\times 400$ .

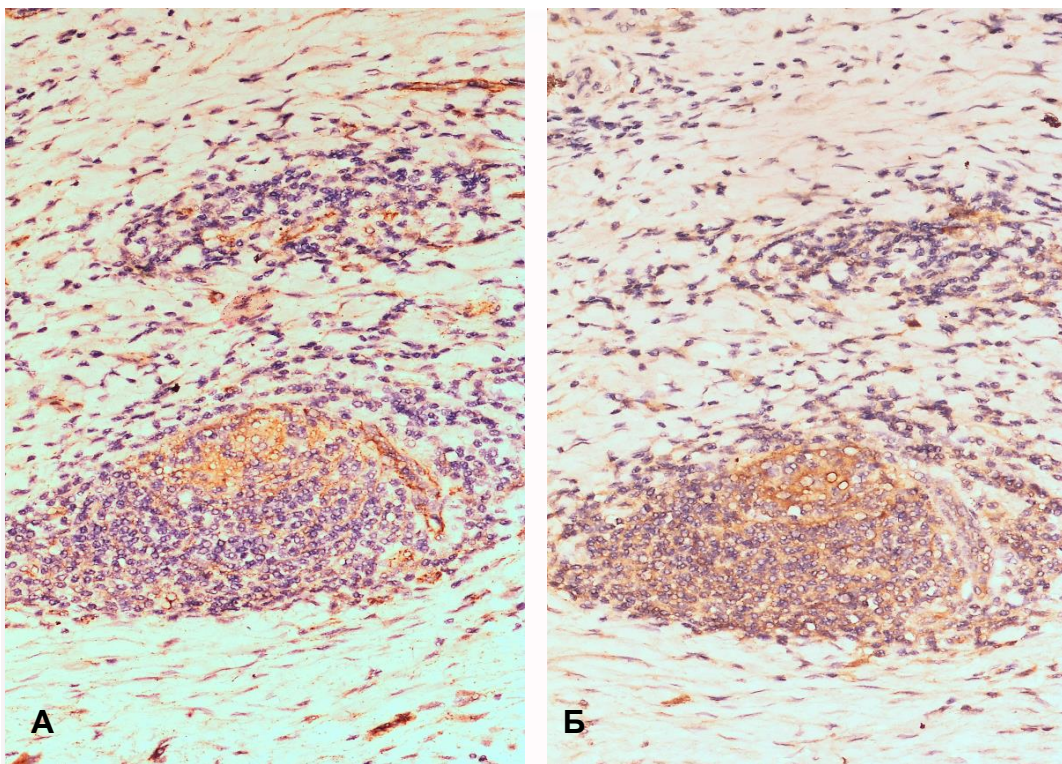


Рис. 4. Протокова аденокарцинома підшлункової залози помірного (G2) ступеню диференціювання: А – низький рівень мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину в клітинах епітеліально-мезенхімальної трансформації ПАПЗ; Б – помірний рівень мембранно-цитоплазматичної експресії  $\beta$ -катеніну в клітинах епітеліально-мезенхімальної трансформації ПАПЗ. Забарвлення: А - *Mo a-HuE-Cadherin, CloneEP 700 Y*, Б - *Mo aHuBeta-Catenin, CloneE-247*.  $\times 400$ .



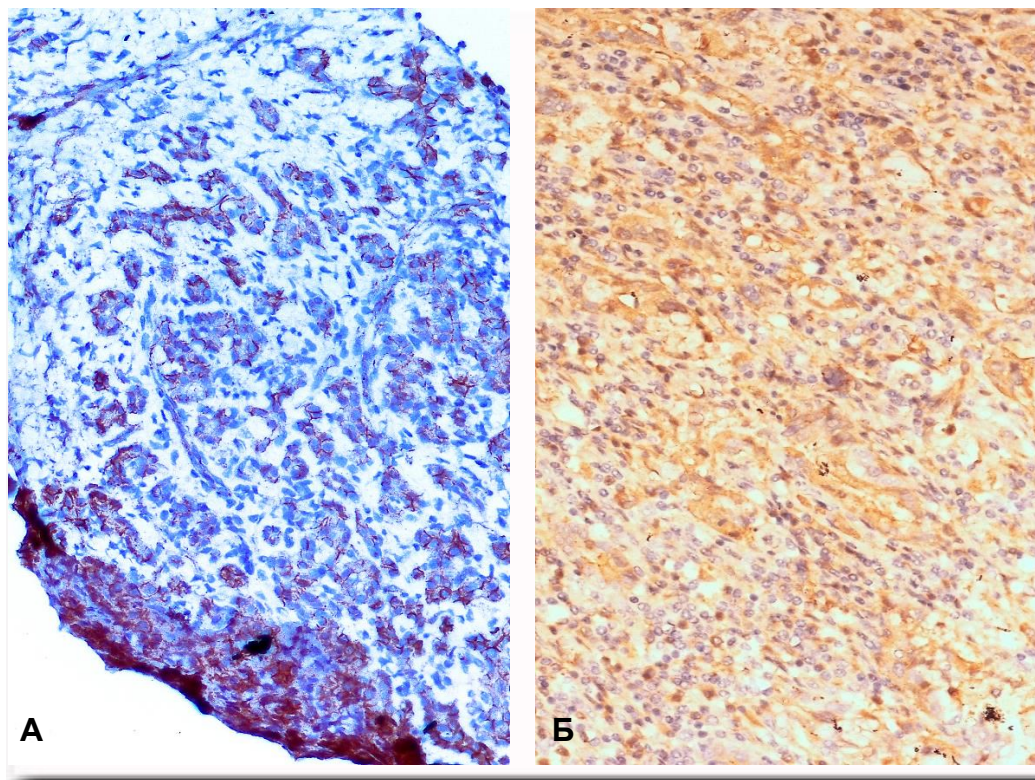


Рис. 5. А – низький рівень мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину в клітинах епітеліально-мезенхімальної трансформації ПАП3 низького (G3) ступеня диференціювання. Б – помірний рівень мембранно-цитоплазматичної експресії  $\beta$ -катеніну в клітинах епітеліально-мезенхімальної трансформації ПАП3 низького (G3) ступеня диференціювання. А: Мо a-HuE-Cadherin, CloneEP 700 Y, Б: MoaHuBeta-Catenin, CloneE-247.  $\times 400$ .

Встановлено статистичне підвищення відносної площі експресії мезенхімальних маркерів у стромальному компартменті у послідовності від помірного (G2) до низького (G3) ступеню диференціювання  $\alpha$ SMA (Me=32,23% (25,04; 39,98), Me=41,34% (30,17; 46,96) відповідно) та віментину (Me=27,04% (19,59; 36,77), Me=37,08% (35,18; 45,00) відповідно) (табл. 3).

При зниженні відносної площі експресії епітеліальних маркерів в зонах EMT відмічалось зростання показників відносної площі експресії  $\alpha$ SMA та віментину у послідовності від помірного (G2) до низького (G3) ступеню диференціювання (рис. 6).

Кореляційний аналіз показав слабкий прямий кореляційний зв'язок між рівнями експресії Е-кадгерину і  $\beta$ -катеніну в залозисто-протоковому компартменті (коефіцієнт Пірсона  $r=+0,24$ ) і сильний – в зоні EMT (коефіцієнт Пірсона  $r=+0,87$ ). В пухлинах із помірним (G2) ступенем диференціації також виявлений слабкий прямий кореляційний зв'язок між рівнями експресії Е-кадгерину і  $\beta$ -катеніну в залозисто-протоковому компартменті пухлини (коефіцієнт Пірсона  $r=+0,10$ ) і виражений в зоні EMT (коефіцієнт Пірсона  $r=+0,36$ ) і помірний прямий кореляційний зв'язок між залозисто-протоковим та зонами EMT в пухлинах при низькому (G3) ступеню диференціювання (коефіцієнт Пірсона  $r=+0,36$ ).

Таблиця 3

Показники відносної площі експресії мезенхімальних маркерів в стромальному компартменті та зоні епітеліально-мезенхімальної трансформації протокової аденокарциноми підшлункової залози помірного (G2) та низького (G3) ступеню диференціювання

Зони експресії	$\alpha$ SMA	Vim
G2	32,23% $\blacklozenge$	27,04% $\blacksquare$
стромальний компартмент	(25,04;39,98)	(19,59;36,77)
G2	18,03% $\blacklozenge$	17,79% $\blacksquare$
EMT	(13,19;21,34)	(12,67;21,34)
G3	41,34% $\blacklozenge$	37,08% $\blacksquare$
стромальний компартмент	(30,17;46,96)	(35,18;45,00)
G3	19,18% $\blacklozenge$	21,43% $\blacksquare$
EMT	(14,83;25,25)	(9,96;24,30)

Примітка 1  $\blacklozenge$ : статистична достовірна відмінність між раковим залозисто-протоковим компартментом та зоною EMT в I та II групах ( $p<0.05$ ).

Примітка 2  $\blacksquare$ : статистична достовірна відмінність між раковим залозисто-протоковим компартментом та зоною EMT в I та II групах ( $p<0.05$ ).



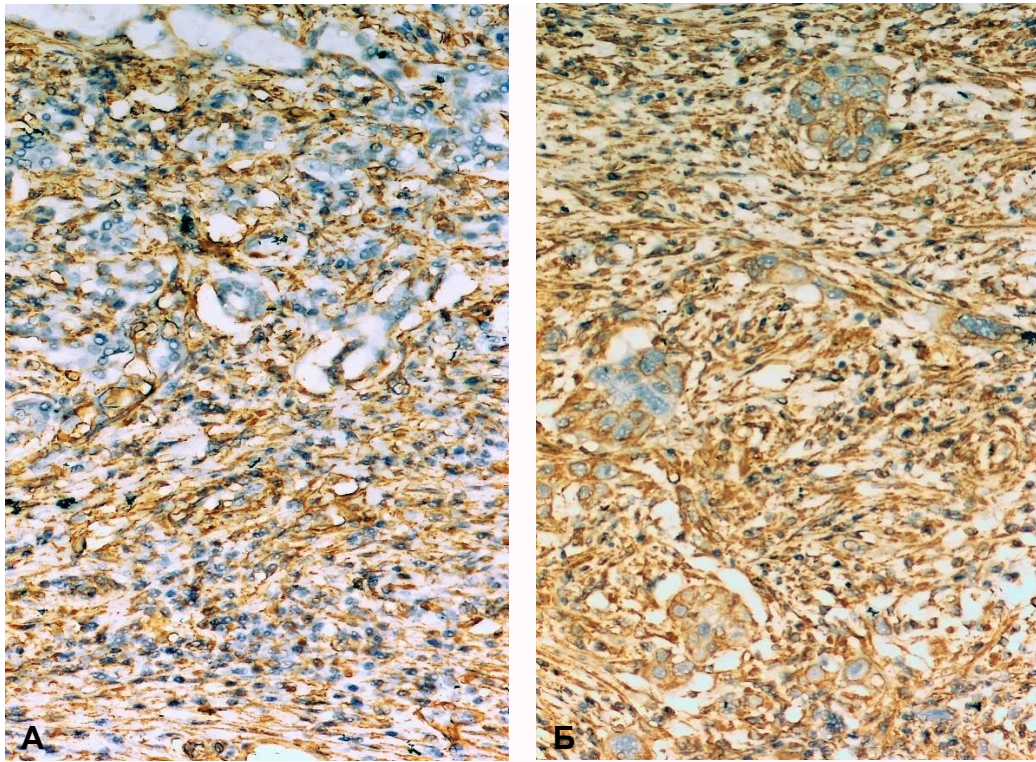


Рис. 6. Експресія гладенько-м'язового актину в зоні ЕМТ ПАПЗ помірного (G2) (А) та низького (G3) (Б) ступеню диференціювання. А,Б: Мо Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4.  $\times 400$ .

Кореляційний аналіз Пірсона між СК7 та СК18 в пухлинах з помірним (G2) ступенем диференціювання показав прямий помірний зв'язок  $r=+0,60$ , при  $p<0,05$ , та в пухлинах із низьким (G3) ступенем диференціювання – прямий помірний зв'язок  $r=+0,41$ , при  $p<0,05$ .

#### Обговорення результатів

Отримані дані підтверджують, що ранньою важливою подією ЕМТ є втрата епітеліального фенотипу, полярності та адгезії клітин при ПАПЗ. Процес ЕМТ включає генетичні та епігенетичні зміни, що ступінчасто призводять до генерації клітин у проміжних станах від епітеліального до мезенхімального фенотипу [22]. За результатами дослідження було виявлено поодинокі клітини та їх скупчення, що проникають у нормальну тканину. Під час гістологічного та ІГХ-дослідження частіше спостерігались групи клітин, аніж поодинокі клітини, що втрачали свою когезію (втрата епітеліального фенотипу), що проявлялося зниженням експресії Е-кадгерину і може свідчити про активацію інвазивного росту та узгоджується з даними літератури [2,4,11-13, 22].

Згідно літературних даних, при ПАПЗ відбувається редукція і зміна полярності експресії Е-кадгерину з мембранної локалізації на повну цитоплазматичну [12]. В проведених дослідженнях, навпаки, виявлена дифузна мембрано-цитоплазматична і мембранна експресія маркера зі зміною полярності експресії та посилення пе-

редньо-задньої полярності, також спостерігалась зміна полярності маркера на вертикальний тип, що також узгоджується з літературними даними. Також, згідно літератури, зміна полярності експресії епітеліальних маркерів в залозисто-протоковому компартменті корелює із погіршенням ступеню диференціювання пухлини [22]. Змінна експресія Е-кадгерину в раку підшлункової залози людини була підтверджена в дослідженні, яке показало, що в деяких зразках Е-кадгерин був втрачений, тоді як в інших була виражена мембранна експресія [11, 12]. В останньому випадку, як і в проведених дослідженнях, раки ПАПЗ відрізнялись диференційованим фенотипом, низькодиференційовані раки характеризувались повною втратою Е-кадгерину [11, 12]. Інше дослідження виявило часткову або повну втрату маркерів міжклітинної адгезії [22]. Виявлена в проведених дослідженнях виключно мембранна локалізація маркера може відображати прогресування злоякісного процесу [12,13], так як така морфологічна характеристика не виключає інвазивної поведінки, оскільки клітини пухлини можуть дистрибувати в навколишні тканини, приймаючи різні морфологічні та міграційні схеми при збереженні експресії Е-кадгерину в мембрані клітини [22]. Це обумовлено також і клітинною неоднорідністю більшості пухлин людини і, відповідно, відсутністю домінування певного фенотипу. Крім того, збереження Е-кадгерину не виключає, що клітини не пройшли



EMT [12-14].

Отримані результати підтверджують також і відсутність абсолютної зворотної кореляції між маркером і агресивністю ПАПЗ і може підтверджувати факт високоінвазивної і агресивної поведінки клітин ПАПЗ при збереженні диференційованого фенотипу [9-11]. Також ця невідповідність може свідчити на користь існуючої в науковій літературі думці, що EMT швидше багаторушного процесу, що складається з багатьох фенотипових змін і є проявом часткового фенотипу EMT [7-9]. За літературними даними, був проведений експеримент *in vivo*, що доводить, транскрипційні перепрограмування EMT синтезують різні популяції злоякісних пухлин, які відповідають проміжним станам клітин між епітеліальним та мезенхімальним фенотипом, при цьому зустрічаються гібридні форми трансформованих клітин [22]. Саме гібридні форми, або субпопуляції клітин, що знаходяться на одному з етапів EMT пов'язують зі ступенем диференціювання самої пухлини. В проведених дослідженнях було встановлено, що клітини, які знаходяться на периферії скупчень плейоморфних клітин (зони EMT) піддавались або частковій, або повній EMT, набували потенціалу саме мезенхімальних клітин для інвазивного росту. За даними літератури, встановлений зв'язок між EMT та прогресуванням пухлини в ПАПЗ за рахунок зменшення або повної втрати експресії E-кадгерину [22]. Отримані дані ІГХ-дослідження експресії маркерів адгезії (E-кадгерину) підтверджують літературними даними, де описується корелятивний зв'язок експресії E-кадгерину зі ступенем диференціювання пухлини. При погіршенні мікроскопічної будови пухлини від помірного G2 до низького G3 ступеню диференціювання спостерігалась часткова або повна деградація експресії E-кадгерину в клітинах, що формували не тільки залозисто-протоковий/духтулоподібний компартмент, але й зони EMT [22].

Слабкий прямий кореляційний зв'язок між маркерами в залозисто-протоковому компартменті пухлини ( $r=+0,24$ ) і сильний в зоні EMT ( $r=+0,87$ ) свідчить про взаємопов'язаний процес втрати експресії E-кадгерину і накопичення  $\beta$ -катеніну, більш виражений в зоні EMT, і сприяє швидкій інвазії і метастазуванню ПАПЗ. Виявлене посилення прямого кореляційного зв'язку між епітеліальними маркерами в зоні EMT і послаблення кореляції від сильної до слабкої в протоках при зниженні диференціації пухлини. Літературні дані підтверджують залежність кореляції між епітеліальними маркерами від ступеню диференціації пухлини. При низькому G3 ступені диференціації ПАПЗ спостерігається суттєве підвищення експресії  $\beta$ -катеніну на фоні зниження експресії E-кадгерину. Також, експресія  $\beta$ -катеніну мала полярність експресії в мембрані клітин в залежності від зміни полярності експре-

сії E-кадгерину. Зміна полярності експресії маркерів при ІГХ-дослідженні демонструвалась градієнтом забарвлення мембрани клітин. В залежності від ступеню диференціювання, градієнт забарвлення мав певну інтенсивність. При помірному ступені диференціювання зворотна імуногісохімічна реакція епітеліальних маркерів виражена менше [22]. Отримані результати підтверджують суттєвий зв'язок між епітеліальними маркерами в первинних пухлинах, залежність маркерів від гістологічного ступеню диференціювання [20]. Це узгоджується з даними літератури, що клітини первинної пухлини ПАПЗ проходять EMT [11,12].

Із втратою адгезії епітеліальними клітинами, втрачається або відбувається ремоделювання цитоскелету, що формується мікротрубочками та мікрофіламентами. Саме в мікротрубочках та мікрофіламентах відбувається експресія маркерів цитокератинової панелі (СК7 та СК18) [22]. Проведене ІГХ-дослідження підтвердило роль СК7 як оптимального маркеру залозисто-протокового/духтулярного компартменту, в якому спостерігалась дифузна мембранна експресія білка. Експресія СК18 також була очікуваною. За літературними даними встановлено, що зміна фенотипових характеристик епітеліальних клітин на мезенхімальні, втрачається також і експресія не тільки E-кадгерину, але й СК7 та СК18 [22]. Ці клітини починають демонструвати втрату апікально-базальної полярності, що підтверджується частковою чи повною втратою експресії E-кадгерину та втратою маркерів цитоскелету. Зв'язок між рівнем експресії цитокератинів та ступенем диференціювання пухлини, також прослідковуються, як і при ІГХ-дослідженні ПАПЗ на E-кадгерин та  $\beta$ -катенін. Із зниженням ступеню диференціювання пухлини від помірного G2 до низького G3 ступеню диференціювання пухлини відмічається втрата експресії цитокератинів в клітинах, що формують EMT. Згідно науковим даним, втрата експресії цитокератинів недостатня для індукції EMT і, відповідно, підвищення інвазивності, метастазування [6]. Вважається, що клітини, які експресують E-кадгерин, експресують і СК18, що характерно для клітин просвітнього епітелія залозистої тканини. Аберантна експресія епітеліальних маркерів E-кадгерину, СК7, СК18 обумовлює підвищення рухливості та інвазивності клітин. Навпаки, регуляція цих маркерів сприяє зворотному процесу [17, 18]. Також є дані про роль СК18 в регулюванні Wnt сигналізації, зокрема при раку передміхурової залози. У кількох ракових захворюваннях людини, включаючи ПАПЗ, аберантна передача сигналів Wnt/ $\beta$ -катеніну є одним із основних чинників прогресування раку [11]. Проведені дослідження підтверджують зв'язок між аналізованими епітеліальними маркерами.

Експресія мезенхімальних маркерів вімен-

тину і  $\alpha$ -SMA характеризує стромальний компонент пухлини, відзначається в веретеноподібних клітинах - активованих зірчастих клітинах, туморасоційованих фібробластах. Вважається, що віментин сприяє міграції клітин, які зазнали ЕМТ, шляхом інтеграції механічного надходження з навколишнього середовища та модуляції динаміки мікротрубочок та мережі актоміозину. Також віментин є не тільки структурним білком, але і активним учасником різних сигнальних каскадів [14-16].

Імунопозитивні  $\alpha$ -SMA міофібробластоподібні клітини вважаються репрезентативною формою активованих канцерасоційованих фібробластів, але більшість веретеноподібних клітин у стромі пухлини також експресували  $\alpha$ -SMA. Згідно літературним даним, канцерасоційовані міофібробласти з  $\alpha$ -SMA-позитивним фенотипом сприяють прогресуванню пухлини, експресія маркеру корелює з низьким рівнем виживання [14-15]. Також згідно літературних даних зростання показників експресії мезенхімальних маркерів (віментину та гладко-м'язового актину) в стромальному компартменті залежить від ступеню диференціювання пухлини. Так в пухлинах із низьким G3 ступенем диференціювання показник стромальних маркерів буде вищим, аніж в пухлинах з помірним G2 ступенем диференціювання [23].

#### Висновки

1. При мікроскопічному дослідженні протокової аденокарциноми підшлункової залози біло встановлено статистично достовірну різницю між показниками відносної площі тубулярних структур в пухлинах помірного G2 (Me=32,71% (27,61; 63,68)) та низького G3 (Me=4,57% (3,85; 5,97)) ступеню диференціювання ( $p < 0,05$ ). Між показниками відносної площі трабекулярних структур в пухлинах помірного G2 (Me=9,59% (8,45; 11,01)) та низького G3 (Me=21,69% (15,30; 31,30)) ступеню диференціювання також встановлено статистично достовірну відмінність ( $p < 0,05$ ). При мікроскопічному дослідженні стромального компоненту було встановлено статистично достовірно вище розвинену строму в пухлинах низького G3 ступеню диференціювання, аніж в пухлинах помірного G2 ступеню диференціювання ( $p < 0,05$ ).

2. При ІГХ-дослідженні ПАПЗ з помірним G2 ступенем диференціювання було встановлено статистично достовірну відмінність у показниках відносної площі експресії СК7 в залозисто-протоковому компартменті (Me=19,51% (10,50; 27,24)) та зоною ЕМТ (Me=10,62% (8,42; 16,22)), ( $p < 0,05$ ). Відносна площа експресії СК18 в пухлинах помірного G2 ступеню диференціювання була статистично вищою у 4 рази в залозисто-протоковому компартменті, аніж в зоні ЕМТ. При дослідженні на Е-кадгерин та  $\beta$ -катенін відмічалась зворотно-пропорційна статисти-

чно-достовірна різниця між показниками відносної площі експресії в залозисто-протоковому компартменті та зоні ЕМТ.

3. При ІГХ-дослідженні ПАПЗ з низьким G3 ступенем диференціювання було також встановлено статистично-достовірну відмінність у показниках відносної площі експресії СК7 в залозисто-протоковому компартменті (Me=26,19% (20,93; 30,05)) та зоні ЕМТ (Me=4,09% (1,09; 6,99)), ( $p < 0,05$ ). Відносна площа експресії СК18 в цих же пухлинах була суттєво вищою в залозисто-протоковому компартменті, аніж в зоні ЕМТ ( $p < 0,05$ ). При дослідженні на Е-кадгерин та  $\beta$ -катенін відмічалась зворотно-пропорційна статистично достовірна різниця між показниками відносної площі експресії в залозисто-протоковому компартменті та зоні ЕМТ.

4. Із погіршенням ступеню диференціації пухлин від помірного G2 до низького G3 було встановлено мінімальні статистично-достовірні ( $p < 0,05$ ) відмінності між показниками відносної площі експресії Е-кадгерину у зоні ЕМТ. Міні-мально-статистично достовірні відмінності спостерігались в показниках відносної площі експресії  $\beta$ -катеніну у зоні ЕМТ, при  $p < 0,05$ .

5. Із погіршенням ступеню диференціації пухлин від помірного G2 до низького G3 в зоні ЕМТ було визначено статистично достовірне зниження експресії СК7 (Me=10,62% (8,42; 16,22); (Me=4,09% (1,09; 6,99)) відповідно, при  $p < 0,05$ , та СК18, при  $p < 0,05$ .

6. Із погіршенням ступеню диференціації пухлин від помірного G2 до низького G3 у зоні ЕМТ було встановлено мінімальні статистично достовірні ( $p < 0,05$ ) відмінності між показниками відносної площі експресії  $\alpha$ -SMA та статистично достовірна різниця в показниках відносної площі експресії віментину ((G2 (Me=17,79% (12,67; 21,34)), G3 (Me=21,43% (9,96; 24,30))), при  $p < 0,05$ .

#### Перспективи подальших розробок

Доцільні подальші дослідження мікроскопічного та імуногістохімічного профілю епітеліально-мезенхімальної трансформації в залозисто-протоковому компартменті та в зоні ЕМТ у розвитку протокової аденокарциноми підшлункової залози помірного (G2) та низького (G3) ступеню диференціювання.

#### Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

#### Джерела фінансування

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми: «Коморбідні стани, серцево-судинні та онкологічні захворювання в загальноклінічній практиці: розробка сучасних діагностичних та лікувальних заходів» (номер державної реєстрації 0120U101587).



## Літературні джерела References

1. Nicolle R, Blum Y, Duconseil P, Vanbrughe C, Brandone N, Poizat F, Roques J, Bigonnet M, Gayet O, Rubis M, Elarouci N, Armenoult L, Ayadi M, de Reyniès A, Giovannini M, Grandval P, Garcia S, Canivet C, Cros J, Bournet B, Buscail L; BACAP Consortium; Moutardier V, Gilabert M, Iovanna J, Dusetti N. Establishment of a pancreatic adenocarcinoma molecular gradient (PAMG) that predicts the clinical outcome of pancreatic cancer. *EBioMedicine*. 2020;57:102858. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102858. PMID: PMC7334821.
2. Ren B, Liu X, Suriawinata AA. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. *Am J Pathol*. 2019;189(1):9-21. doi:10.1016/j.ajpath.2018.10.004. PMID: 30558727.
3. Haeberle L, Esposito I. Pathology of pancreatic cancer. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2019;4:50. doi:10.21037/tgh.2019.06.02. PMID: 31304427; PMID: PMC6624347.
4. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res*. 2017;358(1):78-85. doi:10.1016/j.yexcr.2017.04.006. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28412244; PMID: PMC5544584.
5. 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. Epub 2020 Sep 27. PMID: 34841087; PMID: PMC8623975.
6. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*. 2020;13(6):100773. doi:10.1016/j.tranon.2020.100773. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32334405; PMID: PMC7182759.
7. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med*. 2018;12(4):361-373. doi:10.1007/s11684-018-0656-6. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30043221; PMID: PMC6186394.
8. Lee AYL, Dubois CL, Sarai K, Zarei S, Schaeffer DF, Sander M, Kopp JL. Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*. 2019;68(3):487-498. doi:10.1136/gutjnl-2017-314426. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29363536.
9. 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. PMID: 31096701; PMID: PMC6562673.
10. Aiello NM, Maddipati R, Norgard RJ, Balli D, Li J, Yuan S, Yamazoe T, Black T, Sahnoud A, Furth EE, Bar-Sagi D, Stanger BZ. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev Cell*. 2018;45(6):681-695.e4. doi:10.1016/j.devcel.2018.05.027. PMID: 29920274; PMID: PMC6014628.
11. 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. PMID: 32143517; PMID: PMC7140395.
12. 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. PMID: 31703358; PMID: PMC6896204.
13. 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. PMID: 33669845; PMID: PMC7923218.
14. 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. PMID: 30459476.
15. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res*. 2017;358(1):78-85. doi:10.1016/j.yexcr.2017.04.006. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28412244; PMID: PMC5544584.
16. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY. 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. PMID: 31547193; PMID: PMC6830116.
17. 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. PMID: 31637214; PMID: PMC6788064.
18. Sommariva M, Gagliano N. E-Cadherin in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Multifaceted Actor during EMT. *Cells*. 2020;9(4):1040. doi:10.3390/cells9041040. PMID: 32331358; PMID: PMC7226001.
19. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;121:11-22. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.11.010. Epub 2017 Nov 20. PMID: 29279096.
20. Baczynska D, Bombik I, Malicka-Błaszkiwicz M.  $\beta$ -Catenin Expression Regulates Cell Migration of Human Colonic Adenocarcinoma Cells Through Gelsolin. *Anticancer Res*.

2016;36(10):5249-5256.

doi:10.21873/anticancerres.11095. PMID: 27798885.

21. 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. PMID: 31180046.

22. Cheng Y, Qin K, Huang N, Zhou Z, Xiong H, Zhao J, Zhang Y, Yu S. Cytokeratin 18 regulates the transcription and alternative splicing of apoptotic-related genes and pathways in HeLa cells. *Oncol Rep.* 2019;42(1):301-312. doi:10.3892/or.2019.7166. Epub 2019 May 22. PMID: 31115582; PMCID: PMC6549092.

23. 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. PMID: 31010154; PMCID: PMC6515343.

24. Chen W, Hoffmann AD, Liu H, Liu X. Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precis Oncol.* 2018;2(1):4. doi:10.1038/s41698-018-0047-0. PMID: 29872722; PMCID: PMC5871901.

25. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res.* 2018;7:1000. doi:10.12688/f1000research.15967.1. PMID: 30505430; PMCID: PMC6241562.

26. 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. PMID: 34771695; PMCID: PMC8582651.

27. Sánchez-Ramírez D, Medrano-Guzmán R, Candanedo-González F, De Anda-González J, García-Rios LE, Pérez-Koldenkova V, Gutiérrez-de la Barrera M, Rodríguez-Enríquez S, Velasco-Velázquez M, Pacheco-Velázquez SC, Piña-Sánchez P, Mayani H, Gómez-Delgado A, Monroy-García A, Martínez-Lara AK, Montesinos JJ. 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. PMID: 35174683; PMCID: PMC8883614.

**Шишкін М.А., Кабаченко В.О. Мікроскопічна та імуногістохімічна характеристика епітеліально-мезенхімальної трансформації в протоковій аденокарциномі підшлункової залози помірного та низького ступеню диференціювання.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** На сьогоднішній день не прийнято єдиного протоколу або керівництва для макро- і мікроскопічного опису протокової аденокарциноми підшлункової залози (ПАПЗ), що обумовлено неоднорідністю всередині пухлини та її дисперсним ростом, пов'язаним з процесом епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT). Також в літературі відсутні дані експресії маркерів EMT при різних ступенях диференціювання та особливості їх експресії в протоках ПАПЗ та зоні EMT. **Мета:** кількісний мікроскопічний та імуногістохімічний аналіз експресії епітеліальних і мезенхімальних маркерів в залозисто-протоковому компартменті та в зоні епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT) протокової аденокарциноми підшлункової залози (ПАПЗ) помірного (G2) та низького (G3) ступеню диференціювання. **Методи.** Проведено комплексне патоморфологічне, імуногістохімічне дослідження операційного та біопсійного матеріалу 49 хворих на ПАПЗ з помірним (G2) та низьким (G3) ступенем диференціювання. Результати досліджень оброблені в програмі «STATISTICA 13.0» (StatSoft Inc., license No. JPZ804I382130ARCN10-J). **Результати.** При гістологічному дослідженні встановлено, що гістоархітекtonіка ПАПЗ складається із залозисто-протокового та стромального компартментів. За методом Массон-трихром встановлено статистично достовірне зниження площі трабекулярних та тубулярних структур та статистично достовірне підвищення площі фіброзної стромі від G2 до G3. У послідовності G2-G3 ступеню диференціювання встановлено статистично достовірне зниження відносної площі експресії Е-кадгерину, СК7 та СК18 в зонах EMT у порівнянні із залозисто-протоковим компартментом, зворотно-пропорційна експресія β-катеніну у зонах трансформації та в поодинокі трансформованих клітинах, статистично достовірне підвищення відносної площі експресії α-SMA та віментину у стромальному компартменті. При зниженні відносної площі експресії епітеліальних маркерів в зонах EMT відмічалось зростання показників відносної площі експресії α-SMA та віментину у послідовності G2-G3 ступеню диференціювання. **Підсумок.** Від помірного (G2) до низького (G3) ступеню диференціювання відмічається статистично достовірне ( $p < 0,05$ ) зворотно-пропорційна експресія епітеліальних та мезенхімальних маркерів в клітинах зон EMT.

**Ключові слова:** імуногістохімія, епітеліально-мезенхімальна трансформація, протокова аденокарцинома, підшлункова залоза, диференціація, Е-кадгерин, β-катенін, СК7, СК18, α-SMA, віментин.