



Проф. І.І. Яковцова¹, ас. О.В. Янчевський²

¹ Харківський національний медичний університет

² Луганський державний медичний університет (м. Рівне)

Імуногістохімічні критерії прогнозу епітеліально-мезенхімальної трансформації та стовбурового фенотипу дрібноклітинних раків легень

Дрібноклітинні раки легень (ДКРЛ) становлять близько 15% від злоякісних новоутворень (ЗН) легень та визначаються як одні з найбільш агресивних пухлин людського організму [1]. Прогноз перебігу ДКРЛ залежить перш за все від стадії пухлинного процесу згідно системи TNM, проте індивідуалізований підхід до лікування пацієнтів повинен спиратися на урахуванні низки молекулярно-генетичних критеріїв. Саме диференціально-діагностичні та прогностичні фактори ДКРЛ можуть мати вагомий роль у визначенні клінічної поведінки пухлини та обрання лікувальної тактики.

Одними з факторів, що мають вплив на біологічну поведінку та перебіг пухлин різної локалізації, резистентність до променевої та хіміотерапії є епітеліально-мезенхімальна трансформація (ЕМТ) ракових клітин та тісно з нею пов'язана поява у пухлині субпопуляції клітин з стовбуровим фенотипом [2, 3]. ЕМТ є процесом втрати епітеліальних характеристик з набуттям мезенхімального фенотипу. ЕМТ сприяє інвазії пухлини та прогресуванню раку, а також пов'язана із метастазуванням і гіршою виживаністю пацієнтів на рак легень [3].

Наразі в науковій літературі переважно висвітлено прогностичне значення ЕМТ недрібноклітинного раку легень, тоді як дані щодо процесів ЕМТ та його клінічного значення серед ДКРЛ залишається недостатньо дослідженим [3]. Одним з маркерів стовбурового фенотипу є CD44, який локалізується у клітинній мембрані та приймає участь у регуляції проліферації, диференціювання, рухливості та інвазії ракових клітин [2, 3, 4]. Залишається недостатньо висвітленим питання особливостей експресії та прогностичного значення CD44 серед ДКРЛ [4, 5].

Мета: дослідження прогностичного значення ЕМТ та експресії CD44 для визначення біологічної поведінки та летального наслідку хворих на ДКРЛ.

Матеріали та методи. Були обрані 39 випадків ДКРЛ хірургічно видалених та після аутопсії померлих пацієнтів.

Для визначення прогностичних критеріїв ДКРЛ були сформовані групи дослідження: локалізовані ДКРЛ (Л-ДКРЛ) — випадки локалізації пухлини в межах однієї ділянки грудної клітини, включно лімфатичні вузли, та розповсюджені форми ДКРЛ (Р-ДКРЛ) — пухлини з ураженням іншої легені, віддалених лімфатичних вузлів чи кісток та внутрішніх органів на момент встановлення діагнозу та верифікованого морфологічно. Окремо був поділ Л-ДКРЛ на дві підгрупи — Л-ДКРЛ без метастазів у лімфатичні вузли, 7 випадків, та Л-ДКРЛ з метастазами, 7 випадків.

Середній термін з моменту встановлення діагнозу до смерті склав $10,5 \pm 1,3$ місяців, найменший — 1 місяць, найбільший — 28 місяців. Середній термін з моменту встановлення діагнозу до смерті серед Л-ДКРЛ склав $19,7 \pm 1,9$ місяців, серед Р-ДКРЛ — $9,1 \pm 1,3$ місяців.

Проведено імуногістохімічне (ІГХ) дослідження первинних пухлин з використанням моноклональних антитіл до панцитокератину, віментину, Е-кадгерину, N-кадгерину, CD44. Позитивною реакцією вважалось забарвлення 1% та більше ракових клітин. Для оцінки ступеню виразності ІГХ реакції застосовувалась напівкількісна шкала: 0 — негативна, 1 — слабка, 2 — помірна, 3 — виражена реакція з підрахунком в пухлині відсотка клітин, що експресують маркер.

Оцінку реакції урахували в 6 зонах пухлини — 3х центральних та 3х периферичних. В подальшому для кожної пухлини порівняння різниці між рівнем експресії епітеліальних та мезенхімальних маркерів було проведено з розрахунком U-критерію Мана-Уїтні, що дозволяло відносити раки до відповідної

стадії епітеліально-мезенхімальної трансформації (ЕМТ): 0 стадія — раки без ознак ЕМТ (не експресують мезенхімальні маркери); 1 — раки з ознаками ЕМТ, переважно епітеліальним фенотипом (експресія епітеліальних маркерів значно переважає над експресією мезенхімальних, $p < 0,05$); 2 — раки з проміжним епітеліальним фенотипом (експресія епітеліальних маркерів незначно переважає над експресією мезенхімальних, $p > 0,05$); 3 — раки з проміжним мезенхімальним фенотипом; 4 — раки з переважно мезенхімальним фенотипом; 5 — раки з мезенхімальним фенотипом.

Зв'язок між ознаками оцінювався за непараметричним критерієм χ^2 Пірсона. Аналіз показника загальної виживаності (ЗВ) на протязі фіксованого часу оцінювався за процедурою Каплана-Мейера. Статистично значущим вважалося значення $p < 0,05$.

Результати дослідження

Простежено ЕМТ ДКРЛ, ступень якої ми оцінили за коекспресією 4х маркерів.

Позитивна реакція до панцитокератину спостерігалась в 69,2% (27/39) зі слабким рівнем експресії в 43,5% (17/39). При порівнянні Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ за рівнем експресії маркеру встановлено, що відсутність та слабка експресія панцитокератину спостерігалось дещо частіше серед Р-ДКРЛ ніж серед Л-ДКРЛ, а виражена та помірна реакція — серед Л-ДКРЛ ніж серед Р-ДКРЛ, проте різниця між групами дослідження не достовірна. Спостерігалась також відсутність залежності між виживаністю пацієнтів та рівнем експресії панцитокератину ($\chi^2 = 0,5$, $p > 0,05$).

Експресія віментину спостерігається в 28,2% (11/39) ДКРЛ, з яких в 90,9% (10/11) реакція була слабкою у цитоплазмі до 33% ракових клітин. Простежена тенденція до появи експресії віментину серед Р-ДКРЛ в порівнянні з Л-ДКРЛ, проте отримані дані свідчать про відсутність статистично значущої залежності між Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ за рівнем експресії віментину. Як видно з графіку (рис. 1), середній термін виживаності пацієнтів без реакції ДКРЛ до віментину склав $16,9 \pm 2,2$ міс., при позитивній реакції — $6,2 \pm 1,7$ міс., різниця достовірна ($p < 0,001$).

Експресія Е-кадгерину спостерігається в 43,5% (17/39) ДКРЛ. Реакція була мембранною, переважно слабкою, вираженою — в 7,6%. Не виявлено залежності між втратою експресії Е-кадгерину та приналежністю ДКРЛ до групи Р-ДКРЛ, проте відсутність реакції до Е-кадгерину дещо частіше спостерігалось серед Р-ДКРЛ.

При урахуванні позитивної/негативної реакції Е-кадгерину встановлено, що ЗВ пацієнтів була біль-

шою при позитивній експресії маркеру. ($\chi^2 = 9,3$, $p < 0,01$). Середній термін виживаності пацієнтів при негативній реакції Е-кадгерину ДКРЛ становила $8,1 \pm 1,4$ міс., при позитивній реакції Е-кадгерину — $19,1 \pm 3,0$ міс. ($p < 0,01$).

Мембранна експресія N-кадгерину спостерігається в 64,1% (25/39) ДКРЛ. Реакція була переважно слабкою, лише в 5,1% (2/39) — помірною та не було випадків вираженої експресії маркеру. Більше відносно число випадків наявної експресії N-кадгерину було серед Р-ДКРЛ, проте достовірно значущої відмінності між групами дослідження за рівнем експресії маркеру не встановлено. Встановлено також залежність між появою експресії N-кадгерину ДКРЛ та ЗВ ($\chi^2 = 5,8$, $p < 0,03$) (див. рис. 1).

Позитивна реакція до CD44 визначалась в 30,7% (12/39) та була переважно слабкою з рівнем експресії маркеру вище за 1% ракових клітин. При порівнянні рівня відносного числа експресуючих маркер ДКРЛ серед груп дослідження, встановлено відсутність залежності між позитивним CD44 статусом та приналежності пухлини до розповсюдженої чи локалізованої форми при наявності тенденції до підвищення експресії маркера серед Р-ДКРЛ (див. табл. 1).

Не виявлено також статистично значущої залежності між позитивною реакцією маркеру та терміном ЗВ пацієнтів ($p = 0,7$). Середній термін виживаності пацієнтів з негативним CD44 статусом становив $14,5 \pm 11,3$ міс., тоді як з позитивним статусом — $12,2 \pm 10,0$ міс., $p > 0,05$.

При урахуванні коекспресії маркерів та визначенні стадії ЕМТ встановлено, що епітеліальний імунофенотип без коекспресії мезенхімальних маркерів спостерігався в 30,7% (12/39), що відповідало відсутності ознак ЕМТ. Поява експресії одного з маркерів мезенхімального фенотипу — віментину чи N-кадгерину спостерігалось відповідно в 69,3%.

Статистично значуще переважання експресії маркерів епітеліального фенотипу над мезенхімальним, що відповідає 1 ст. ЕМТ, визначало в 28,2% (11/39) випадків. Повна відсутність експресії епітеліальних маркерів при позитивній реакції мезенхімальних спостерігалось в одному випадку (2,5%), в 2 випадках (5,1%) експресія мезенхімальних маркерів статистично значущо переважала над епітеліальними.

Виявлена залежність між наявністю та стадією ЕМТ та прогнозом захворювання. Як видно з таблиці 1, при порівнянні Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ встановлено, що поява ЕМТ асоціюється з Р-ДКРЛ ($p < 0,01$). Так відсутність ЕМТ спостерігалась в 57,2% Л-ДКРЛ та 16,0% Р-ДКРЛ, тоді як поява ЕМТ (0–5 ст.) — в 42,8% та 84,0%. Різниця між групами дослідження за кожною із стадій ЕМТ менша.

Таблиця 1

Число ДКРЛ з ознаками ЕМТ та позитивним CD44 статусом серед груп дослідження

Ознаки	Л-ДКРЛ	Р-ДКРЛ	Достовірність
Відсутність ЕМТ ЕМТ 1–5 ст.	8 (57,1%) 6 (42,9%)	4 (16,0%) 21 (84,0%)	$p < 0,01$
CD44 + CD44 –	3 (21,4%) 11 (78,6%)	9 (36%) 16 (64%)	$p > 0,05$

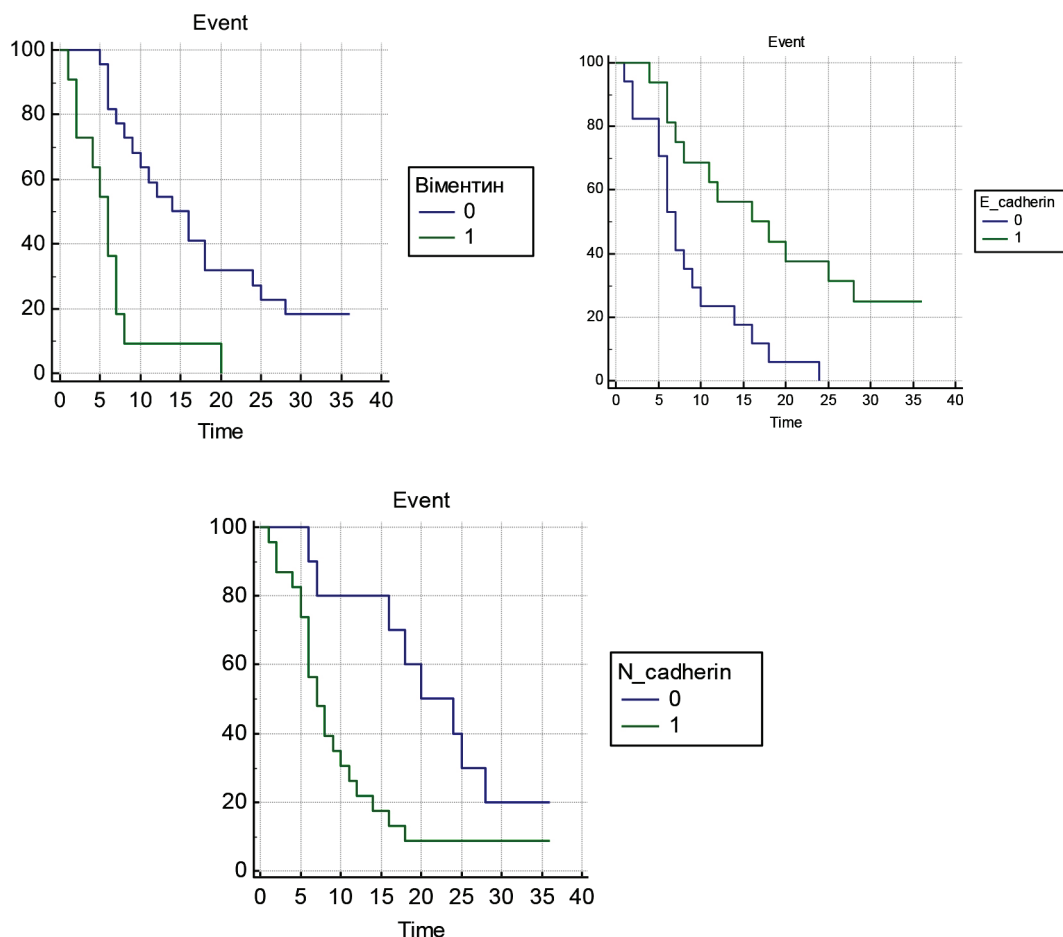


Рис. 1. Загальна виживаність пацієнтів в залежності від позитивної (1) та негативної (0) експресії віментину, $p < 0,001$ (зліва зверху), Е-кадгерину, $p < 0,01$ (справа зверху) та N-кадгерину, $p < 0,03$ (знизу зліва)

Простежена статистично значуща залежність між наявністю EMT, а також стадією EMT та терміном летального наслідку (див. рис.2).

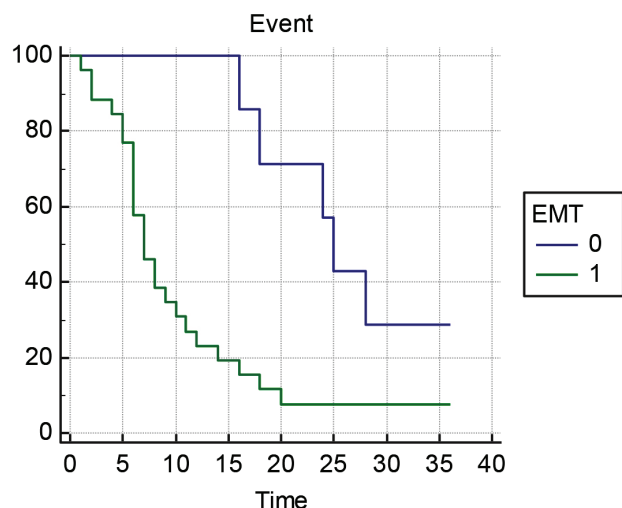


Рис. 2. Загальна виживаність пацієнтів в залежності від наявності (1) та відсутності (0) EMT ($p < 0,01$)

Так ЗВ більше 1 року була серед усіх 7 випадків ДКРЛ без ознак EMT. Відносне число спостережень з 1 стадією EMT було однаковим серед випадків з ЗВ більше 1 року та до 1 року — 30% (6/20) та 30,6%

(4/13) відповідно. Всі пацієнти з EMT 3–5 стадії ДКРЛ мали ЗВ меншу за 1 рік. Відповідно, ЗВ більше за 1 рік асоціювалася з відсутністю EMT ДКРЛ ($p < 0,001$), а летальний наслідок впродовж 1 року — з 3–5 стадією EMT ($p < 0,001$).

Обговорення результатів дослідження

EMT спостерігається серед раків легень на самих початкових етапах росту пухлини. За даними Taichi Matsubara та співавт. [3], аденокарциноми легень IA стадії мали експресію віментину та Е-кадгерину у 18,6% та 68,3% відповідно, при цьому EMT мала вплив на зниження ЗВ пацієнтів.

Питання щодо особливостей та прогностичного значення EMT серед ДКРЛ залишається недостатньо дослідженим. За поодинокими даними наукової літератури, окремі молекулярно-біологічні ознаки EMT мають вплив на клінічний перебіг ДКРЛ. Зокрема за даними Li Xiao-Xia та співавт. [6] CXCR4, що залучений до CD133-індукованої EMT раків легень [7], є незалежним прогностичним фактором виживаності пацієнтів на ДКРЛ. Також несприятливими критеріями ДКРЛ є високий рівень експресії MMP-9, TGF- β 1, flotillin-1, зниження експресії Е-кадгерину, які є факторами EMT [6, 8].

Існують роботи на підставі дослідження ліній клітин ДКРЛ, що також доводять вплив EMT на біологічну поведінку пухлин [9, 10]. З іншого боку, за

даними Pore M. [11] ДКРЛ з ЕМТ, а саме з високою експресією с-MET та низькою Е-кадгерину — характеризуються довшою ЗВ та меншою кількістю циркулюючих ракових клітин.

Слід зазначити, що робот, в яких досліджується CD44 саме в ДКРЛ також недостатньо. За даними Wang Y. et al., 2021 [4] високий рівень експресії CD44 корелює з гіршим загальним статусом (poor performance status) та коротшою безрецидивною виживаністю пацієнтів на ДКРЛ, проте була відсутня значуща залежність щодо показника ЗВ при тенденції до меншого терміну ЗВ серед пацієнтів з позитивною експресією маркеру.

Наявні дані щодо експресії CD44 серед недрібно-клітинних раків легень (НДКРЛ) дозволяє стверджувати інше і навіть протилежне прогностичне значення CD44 в НДКРЛ та ДКРЛ [12, 13].

В даній роботі було запропоновано визначення ступеню ЕМТ за ознаками появи ІГХ критеріїв мезенхімального фенотипу та статистичного підрахунку рівня співвідношення між епітеліальними та мезенхімальними характеристиками в клітинах пухлини. В той же час встановлено закономірності змін молекулярного фенотипу ДКРЛ в процесі набуття раковими клітинами стовбурового фенотипу.

Було показано, що ступінь ЕМТ серед ДКРЛ була варіабельною, спостерігалась в 69,3% (27/39) та ЕМТ була здебільше проміжною або неповною.

Важливим висновком стало доведена прогностична значущість ЕМТ щодо загальної виживаності па-

цієнтів, та її вплив на розповсюдженість пухлинного процесу.

Висновки:

1. Серед ДКРЛ при дослідженні маркерів епітеліального фенотипу панцитокератину та Е-кадгерину, мезенхімального фенотипу — віментину, N-кадгерину та стовбурового фенотипу — CD44 жоден з маркерів не мав прогностичне значення щодо приналежності до Л-ДКРЛ чи Р-ДКРЛ. Загальна виживаність залежала від експресії віментину, Е-кадгерину та N-кадгерину.

2. ІГХ ознаки процесу ЕМТ у вигляді появи експресії маркерів мезенхімального фенотипу віментину чи N-кадгерину спостерігались в 69,3% ДКРЛ.

3. Наявність ЕМТ асоціюється з розповсюдженіми формами ДКРЛ ($p < 0,01$). Поява стовбурового імунофенотипу (позитивного CD44 статусу) не мала впливу на приналежність пухлин до груп Р-ДКРЛ чи Л-ДКРЛ.

4. Доведено, що показник загальної виживаності пацієнтів на ДКРЛ залежав від наявності ЕМТ ($p < 0,01$) та її стадії ($p < 0,01$).

Перспективи подальших досліджень. Залишається актуальним подальше дослідження ЕМТ та стовбурового фенотипу ДКРЛ на молекулярному та генетичному рівнях з пошуком його впливу на активацію сигнальних шляхів та формування агресивної поведінки пухлин.

Список використаної літератури

- Lokuhetty D (2021), WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. (5th ed.; vol. 5) (pp. 29–36, 139–143) Lyon (France): International Agency for Research on Cancer. <https://publications.iarc.fr/595>.
- Inoue K, Fry E. Aberrant splicing of estrogen receptor, HER2, and CD44 genes in breast cancer. *Genet Epigenet.* 2015; 7:19–32. doi:10.4137/geg.s3550.
- Taichi M, Tetsuzo T, Kazuki T, Gouji T, Mototsugu S, Yuka K, Takaki A, Akira H, Atsushi O, Masaki M. Clinical and Prognostic Significance of the Epithelial–Mesenchymal Transition in Stage IA Lung Adenocarcinoma: A Propensity Score–Matched Analysis. *Clinical Lung Cancer.* 2019; 20(4):e504–e513. ISSN 1525-7304, <https://doi.org/10.1016/j.clc.2019.04.006>.
- Wang Y, Guo Y, Lin H, Zhang L, Zhang H, Wang Q, Hu F, Li J, Li B, Zhang T. Expression of CD44 in Tumor Tissue and Serum of Small Cell Lung Cancer and Its Clinical Prognostic Significance. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2021 Aug 20;24(8):583–590. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2021.104.10.
- Song JM, Im J, Nho RS, Han YH, Upadhyaya P, Kassie F. Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells. *Mol Carcinog.* 2019;58(3):321–333. doi:10.1002/mc.22930.
- Li Xiao-Xia, Li Rui-Jian, Zhao Lu-Jun, Liu Ning-Bo, Wang Ping. Expression of molecular factors correlated with metastasis in small cell lung cancer and their significance. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8:14676–84.
- Tu Z, Xie S, Xiong M, Liu Y, Yang X, Tembo K, Huang J, Hu W, Huang X, Pan S, Liu P, Altaf E, Kang G, Xiong J, & Zhang Q. CXCR4 is involved in CD133-induced EMT in non-small cell lung cancer. *International journal of oncology.* 2017; 50(2), 505–514. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3812>.
- Zhao L, Li J, Liu Y, Zhou W, Shan Y, Fan X, Zhou X, Shan B, Song Y, Zhan Q. Flotillin1 promotes EMT of human small cell lung cancer via TGF- β signaling pathway. *Cancer Biol Med.* 2018; 15(4):400–414. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0053. PMID: 30766750; PMCID: PMC6372910.
- Ito T, Kudoh S, Ichimura T, Fujino K, Hassan WA, Udaka N. Small cell lung cancer, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like cancer: significance of inactive Notch signaling and expression of achaete-scute complex homologue 1. *Hum Cell.* 2017; 30(1):1–10. doi: 10.1007/s13577-016-0149-3. Epub 2016 Oct 26. PMID: 27785690.
- Zhao L, Li J, Liu Y, Zhou W, Shan Y, Fan X, Zhou X, Shan B, Song Y, Zhan Q. Flotillin1 promotes EMT of human small cell lung cancer via TGF- β signaling pathway. *Cancer Biol Med.* 2018; 15(4):400–414. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0053. PMID: 30766750; PMCID: PMC6372910.
- Pore M, Meijer C, de Bock GH, Boersma-van Ek W, Terstappen LW, Groen HJ, Timens W, Kruijff FA, Hiltermann TJ. Cancer stem cells, epithelial to mesenchymal markers, and circulating tumor cells in small cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2016; 17:535–542.
- Sung WJ, Park KS, Kwak SG, Hyun DS, Jang JS, Park KK. Epithelial-mesenchymal transition in patients of pulmonary adenocarcinoma: correlation with cancer stem cell markers and prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):8997–9009. Published 2015 Aug 1.
- Song JM, Im J, Nho RS, Han YH, Upadhyaya P, Kassie F. Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells. *Mol Carcinog.* 2019;58(3):321–333. doi:10.1002/mc.22930.

Імуногістохімічні критерії прогнозу епітеліально-мезенхімальної трансформації та стовбурового фенотипу дрібноклітинних раків легень

Проф. І.І. Яковцова¹, ас. О.В. Янчевський²

¹ Харківський національний медичний університет

² Луганський державний медичний університет (м. Рівне)

Дрібноклітинні раки легень (ДКРЛ) є одними з найбільш агресивних злоякісних новоутворень людського організму та мають морфологічні ознаки, притаманні ракам з епітеліально-мезенхімальною трансформацією (ЕМТ). Мета дослідження — удосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ДКРЛ на підставі дослідження ЕМТ та стовбурового фенотипу на молекулярно-біологічному рівні. Встановлено прогностичну значущість експресії панцитокератину, віментину, Е-кадгерину та N-кадгерину, стадії ЕМТ та експресії CD44 щодо загальної виживаності пацієнтів, та їх вплив на розповсюдженість пухлинного процесу. Доведено, що наявність ЕМТ асоціюється з розповсюдженими формами ДКРЛ ($p < 0,01$), показник загальної виживаності пацієнтів на ДКРЛ залежав від наявності ЕМТ ($p < 0,01$) та її стадії ($p < 0,01$).

Ключові слова: дрібноклітинний рак легень, епітеліально-мезенхімальна трансформація, CD44.

Immunohistochemical features for prognosis of epithelial-mesenchymal transformation and stem cell phenotype of small cell lung cancers

Prof. Irina Yakovtsova¹, PhD Oleksandr Yanchevskyi²

¹ Kharkov National Medical University

² Luhansk State Medical University (Rivne)

Small cell lung cancer (SCLC) is one of the most aggressive tumor of the human body and has morphological features of cancers with epithelial-mesenchymal transformation (EMT). The aim of our study to improve morphological features for SCLC course prediction based on researching of EMT and stem cells phenotype at the molecular-biological level. The prognostic significance of pancytokeratin, vimentin, E-cadherin and N-cadherin expression, EMT stage and expression of CD44 for overall survival and their influence on the spread of the tumor were established. It was proved that the presence of EMT is associated with extensive forms of SCLC ($p < 0.01$), the overall survival of patients with SCLC depended on the presence of EMT ($p < 0.01$) and its stage ($p < 0.01$).

Key words: small cell lung cancer, epithelial-mesenchymal transformation, CD44.

Контактна інформація: Яковцова Ірина Іванівна —
д. мед. наук, професорка, завідувачка кафедри патологічної анатомії
та судово-медичної експертизи Харківського національного медичного університету,
м. Харків, вул. Героїв Харкова, 195, Тел: +380675711811
e-mail: kaf.1med.patologianatomii@knmu.edu.ua

Стаття до редакції надійшла 22.12.2022 р.