



АНАТОМИЯ. ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ

ANATOMY. PATHOLOGICAL ANATOMY

DOI 10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337


ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Влияние микроокружения на развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации в раке легкого

Р.Б. Кондратюк¹  , И.С. Греков¹ , Е.А. Селезнёв² 

¹Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк, Донецкая народная республика

²Амвросиевская центральная районная больница, г. Амвросиевка, Донецкая народная республика

 rbkondrat@gmail.com

Аннотация. *Актуальность.* Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) во многом определяет биологическое поведение и прогноз раков различных локализаций. Известно, что определяющее значение в контроле и реализации перехода эпителиального фенотипа в мезенхимальный принадлежит микроокружению. Вместе с тем остается не совсем понятным гистохимические и микроскопические характеристики стромальных элементов, поэтому целью нашего исследования было установление морфологических особенностей стромы, влияющих на развитие ЭМТ в раке легкого. *Материалы и методы.* Нами было исследовано 32 случая рака легкого с окраской срезов гематоксилином и эозином, альциановым синим при рН 1,0 и 2,5, PAS-реакцией, а также с иммуногистохимическим исследованием с моноклональными антителами к HMW, AE1/AE3, цитокератину 18, c-erb B2, виментину E-кадгерину, альфа-гладкомышечному актину, GFAP и хромогранину A, Ki-67. В 16 случаях была распространённая эпителиально-мезенхимальная трансформация, в 14 случаях — очаговая и в 2 случаях ЭМТ отсутствовала. В половине случаев распространённой ЭМТ она была полной, среди случаев очаговой ЭМТ полная не встречалась. Переходу от эпителиального к мезенхимальному фенотипу способствовала активизация стромы, а именно: наличие миофибробластов и альцианофилия экстрацеллюлярного матрикса, воспалительная клеточная инфильтрация, экспрессия в клетках стромы рецептора к эпидермальному фактору роста (c-erb B2), пролиферация и нейрогенная дифференцировка клеток стромы. *Результаты и обсуждение.* Активизированная строма коррелирует с частотой ЭМТ. Так, более часто встречаются крупные участки активизированной стромы с наличием миофибробластов и альцианофилией экстрацеллюлярного матрикса в случаях

© Кондратюк Р.Б., Греков И.С., Селезнёв Е.А., 2022



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

распространенной ЭМТ (14 из 16—87,5 %), чем в случаях очаговой (4 из 14—28,6 %). Различия статистически достоверны, $p < 0,01$. Воспалительная клеточная инфильтрация, являющаяся источником сигнала для трансформации, экспрессия в клетках стромы рецептора к эпидермальному фактору роста (с-erb B 2), пролиферация, нейрогенная дифференцировка клеток стромы также коррелировали с частотой ЭМТ. Во всех случаях различия статистически достоверны, $p < 0,01$. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о несомненном влиянии сигналов из активированной стромы на развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак легкого, эпителиально-мезенхимальная трансформация, микроокружение, строма, патологическая анатомия

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования—Р.Б. Кондратюк, И.С. Греков. Сбор и обработка материала—Р.Б. Кондратюк, И.С. Греков, Е.А. Селезнёв. Написание текста—И.С. Греков, Р.Б. Кондратюк. Редактирование—И.С. Греков, Р.Б. Кондратюк, Е.А. Селезнёв. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение—неприменимо.

Благодарности—неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki—Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), обработку персональных данных и согласие на публикацию.

Поступила 01.08.2022. Принята 07.09.2022.


Для цитирования: Кондратюк Р.Б., Греков И.С., Селезнёв Е.А. Влияние микроокружения на развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации в раке легкого // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2022. Т. 26. № 3. С. 325—337. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337

Microenvironment influence on the development of epithelial-mesenchymal transformation in lung cancer

Roman B. Kondratyuk¹  , Ilya S. Grekov¹ , Evgenii A. Seleznev² 

¹ M. Gorky Donetsk national medical University, Donetsk, Donetsk People Republic

² Amvrosievsky Central District Hospital, Amvrosievka, Donetsk People Republic

 rbkondrat@gmail.com

Abstract. Relevance. Epithelial-mesenchymal transformation (EMT) largely determines the biological behavior and prognosis of cancers of various localizations. It is known that the determining role in the control and implementation of the transition of the epithelial phenotype to the mesenchymal belongs to the microenvironment. At the same time, the histochemical and microscopic

characteristics of stromal elements remain unclear; therefore, the aim of our study was to establish the morphological features of the stroma that affect the development of EMT in lung cancer. *Materials and Methods*. We studied 32 cases of lung cancer with hematoxylin and eosin staining of sections, Alcian blue at pH 1.0 and 2.5, PAS reaction, as well as immunohistochemical studies with monoclonal antibodies to HMW, AE 1 / AE 3, cytokeratin 18, c-erb B 2, vimentin E-cadherin, alpha-smooth muscle actin, GFAP and chromogranin A, Ki-67. In 16 cases, there was widespread epithelial-mesenchymal transformation (EMT), in 14 cases—focal and in 2 cases EMT was absent. In half of the cases of widespread EMT, it was complete; among the cases of focal EMT, it was not complete. The transition from the epithelial to the mesenchymal phenotype was facilitated by the activation of the stroma, namely, the presence of myofibroblasts and alcianophilia of the extracellular matrix, inflammatory cell infiltration, expression of the epidermal growth factor receptor (c-erb B 2) in stromal cells, proliferation and neurogenic differentiation of stromal cells of stromal cells. *Results and Discussion*. The activated stroma correlates with the frequency of EMT. Thus, large areas of activated stroma with the presence of myofibroblasts and alcianophilia of the extracellular matrix are more common in cases of widespread EMT (14 out of 16—87.5 %) than in cases of focal EMT (4 out of 14—28.6 %). The differences are statistically significant, $p < 0.01$. Inflammatory cell infiltration, which is the source of a signal for transformation, expression of the epidermal growth factor receptor (c-erb B 2) in stromal cells, proliferation, and neurogenic differentiation of stromal cells also correlated with the frequency of EMT. In all cases, the differences are statistically significant, $p < 0.01$. *Conclusions*. The data obtained indicate the undoubted influence of signals from the activated stroma on the development of epithelial-mesenchymal transformation of tumor cells.

Key words: lung cancer, epithelial-mesenchymal transformation, microenvironment, stroma, pathological anatomy

Funding. The authors received no financial support for the research, authorship, and publication of this article.

Author contributions. The concept and design of the study—R.B. Kondratyuk, I.S. Grekov. Collection and processing of material—R.B. Kondratyuk, I.S. Grekov, E.A. Seleznev. Writing the text—I.S. Grekov, R.B. Kondratyuk. Editing—I.S. Grekov, R.B. Kondratyuk, E.A. Seleznev.

Conflicts of interest statement. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval—not applicable.

Acknowledgements—not applicable.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for the investigation and publication of relevant medical information according to WMA Declaration of Helsinki—Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013.

Received 01.08.2022. Accepted 07.09.2022.

For citation: Kondratyuk RB, Grekov IS, Seleznev EA. Microenvironment influence on the development of epithelial-mesenchymal transformation in lung cancer. *RUDN Journal of Medicine*. 2022;26(3):325—337. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-3-325-337

Введение

Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) представляет собой сложный молекулярно-детерминированный процесс перехода клеток эпителиального фенотипа в мезенхимальное состояние. Данный процесс является необходимым этапом нормального гисто- и органогенеза во время эмбрионального развития организма, а также лежит в основе многих патологических процессов, в осо-

бенности склеротических изменений и прогрессии опухолевого роста [1, 2]. Как правило, индукторами ЭМТ являются сигналы, поступающие в клетку из микроокружения, т.е. из стромы [3]. Так миофибробласты, клетки воспалительного инфильтрата, продуцируют цитокины, факторы роста, интерлейкины, активные формы кислорода, которые также являются индукторами ЭМТ. И, несмотря на то, что многие из индукторов идентифицированы

на генетическом уровне, остается неясным, какие морфологические особенности стромы опухоли влияют на развитие ЭМТ, а следовательно и на прогноз [3, 4].

К настоящему времени установлено, что для развития ЭМТ необходима так называемая «активизированная» строма, богатая клетками фибробластами и миофибробластами, с рыхло расположенными тонкими волокнами, базофилией экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). Миофибробласты отличаются крупным светлым овальным ядром и наличием маркеров соединительной (виментина) и мышечной ткани (альфа-гладкомышечного актина и/или десмина) [5]. На установление морфологических особенностей стромы, влияющих на развитие ЭМТ в раке легкого, направлено данное исследование.

Материал и методы

Нами изучены 32 случая рака легкого с использованием иммуногистохимии во всех исследуемых случаях. У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki—Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), обработку персональных данных и согласие на публикацию. По морфологическим признакам это были 6 случаев плоскоклеточного рака, 8 случаев аденокарциномы, 8 случаев нейроэндокринных опухолей (6 случаев составляли карциноиды и 2 случая мелкоклеточного рака), а также 10 крупноклеточных опухолей (6 с выраженной и 4 со слабой и очаговой нейроэндокринной дифференцировкой).

При иммуногистохимическом исследовании использовали моноклональные антитела к высокомолекулярному цитокератину (HMW), панцитокератину AE1/AE3, цитокератину 18, который является прямой мишенью Snail, а также к рецептору эпидермального фактора роста c-erb B2, виментину, E-кадгерину, альфа-гладкомышечному актину, глиальному фибриллярному кислом протеину (GFAP) и хромогранину А (маркерам нейроэндокринной

дифференцировки), для оценки пролиферативной активности использовался маркер Ki-67 (mib-1).

Длину сосудистого русла опухоли определяли стереометрическим методом по Г.Г. Автандилову, подсчитывали число концов сосудов в срезе после иммуногистохимического мечения эндотелия сосудов с маркером CD34. Более 20 концов в поле зрения при увеличении 100х оценивали как большое количество сосудов. Качественный состав воспалительного и иммунноклеточного инфильтрата стромы оценивался с использованием маркеров к общелейкоцитарному антигену CD45, Т-лимфоцитам CD3, CD4, CD8, В-лимфоцитам CD20, макрофагам CD68.

Для изучения всех микропрепаратов был использован светооптический микроскопом Olympus BX-40 с цифровой фотокамерой Olympus U-TV1X на соответствующем программном обеспечении Olympus DP-Soft.

Статистический анализ полученных результатов проводился в программе Medstat с применением стандартных методов математической статистики. Статистические показатели отличаются от нормального (на уровне $p < 0,001$), поэтому при проведении дальнейшего статистического расчета применялись непараметрические критерии. Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения двух независимых выборок.

Результаты и обсуждение

Ключевым морфологическим признаком ЭМТ служит обособление опухолевых клеток из-за частичной или полной утраты экспрессируемого E-кадгерина, приводящей к локальному нарушению клеточно-клеточной адгезии. В нашем материале этот признак присутствовал в мелкоклеточном раке с выраженной экспрессией хромогранина А, где также резко снижена, вплоть до полного отсутствия экспрессия мембранного E-кадгерина (Рис. 1). Вместе с тем в этом конкретном случае отсутствовали другие типичные признаки трансформации, а именно снижения активности пролиферации неопластических клеток (здесь в больше половины клеток обнаруживали экспрессию Ki-67 в ядрах) [6].

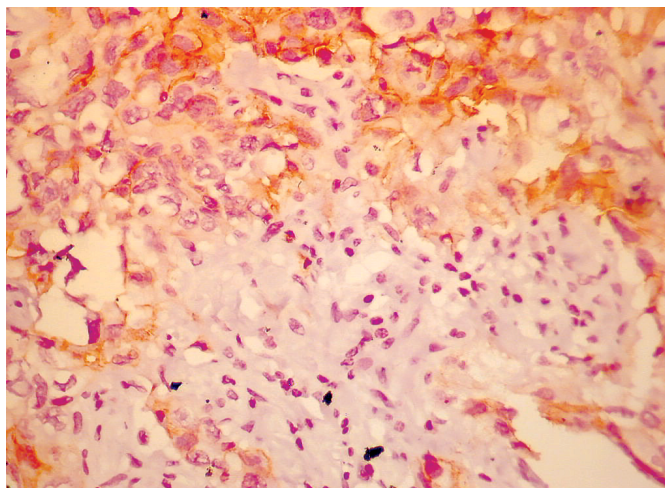


Рис. 1. Один из главных признаков развития ЭМТ — снижение экспрессии мембранного E-кадгерина (окраска антителами к E-кадгерину, x400)

Fig. 1. One of the main signs of the development of EMT is a decrease in the expression of membrane E-cadherin (staining with antibodies to E-cadherin, x400)

В остальных случаях новообразований легкого экспрессия E-кадгерина сохраняется в более крупных клеточных комплексах опухоли и/или является цитоплазматической с тенденцией к полному исчезновению в мелких клеточных группировках, которые инвазируют строму.

Обособление неопластических клеток часто сопровождается изменением их формы, приобретением ими фибробластоподобной формы с последующей

стромальной инвазией. Данный признак хорошо заметен уже при обычной окраске микропрепаратов гематоксилином и эозином.

Еще одним характерным признаком ЭМТ является потеря опухолевыми клетками специфических эпителиальных цитокератинов, в частности потеря маркера AE1/AE3 в тяжах эпителия, инвазирующих строму при сохранении его экспрессии в основном пласте клеток (Рис. 2).

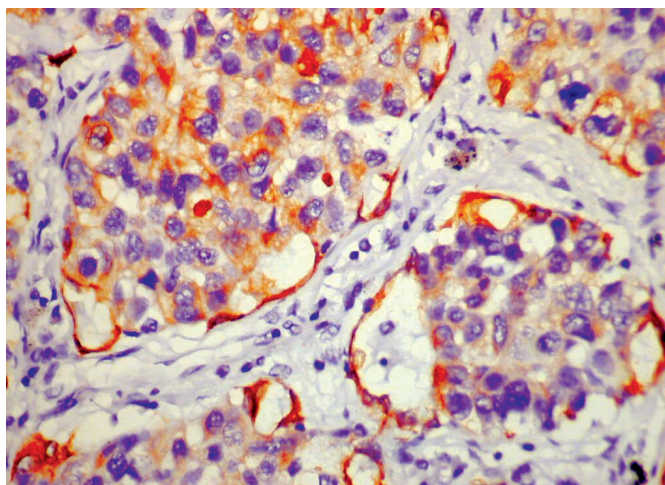


Рис. 2. Снижение экспрессии панцитокератина AE 1/AE 3 в опухолевых клетках (окраска антителами к панцитокератину AE 1/AE 3 x400)

Fig. 2. Reduced expression of pan-cytokeratin AE 1/AE 3 in tumor cells (staining with antibodies to pan-cytokeratin AE 1/AE 3 x400)

Нередко наблюдается и его цитоплазматическая экспрессия. В целом нарушение экспрессии цитокератинов иногда коррелирует с изменением самой морфологии клеток, а именно приобретением последними вытянутой, фибробластоподобной формы. Вместе с тем иногда экспрессия цитокератинов сохраняется и в резко вытянутых фибробластоподобных клетках с потерей таковой в неопластических клетках солидных или железистых структур.

Также наблюдается потеря и другого цитокератина (цитокератин 18), который служит мишенью фактора транскрипции Snail и реализует многие молекулярно-генетические пути ЭМТ, в том числе подавляет синтез E-кадгерина [3, 7]. В таком случае одновременно можно видеть и обособление клеток с приобретением ими вытянутой фибробластоподобной формы и снижение и/или полную потерю синтеза цитокератина 18.

Описанные выше признаки с изменением морфологии клеток являются достоверными критериями приобретения мезенхимального фенотипа. Если

при этом часть клеток экспрессирует виментин, то в таком случае следует говорить о полной мезенхимальной трансформации (полная ЭМТ). При неполной ЭМТ эпителиальные клетки теряют свои признаки и свойства, однако не экспрессируют каких-либо мезенхимальных маркеров (Рис. 3).

Необходимо также различать распространенную и очаговую ЭМТ. В первом случае процесс трансформации может занимать всю опухоль или имеет крупных локусов в пределах новообразования. Очаговая отличается тем, что имеются единичные, мелкие очаги чаще всего на границе опухолевых клеток и нормальной ткани.

В нашем исследовании распространенная ЭМТ обнаруживалась в 16 случаях, а в 14 случаях трансформация была очаговой и в 2 случаях типичного карциноида ЭМТ отсутствовала вовсе. В половине препаратов с распространенной ЭМТ трансформация была полной, однако среди препаратов с очаговой ЭМТ полная трансформация не наблюдалась.

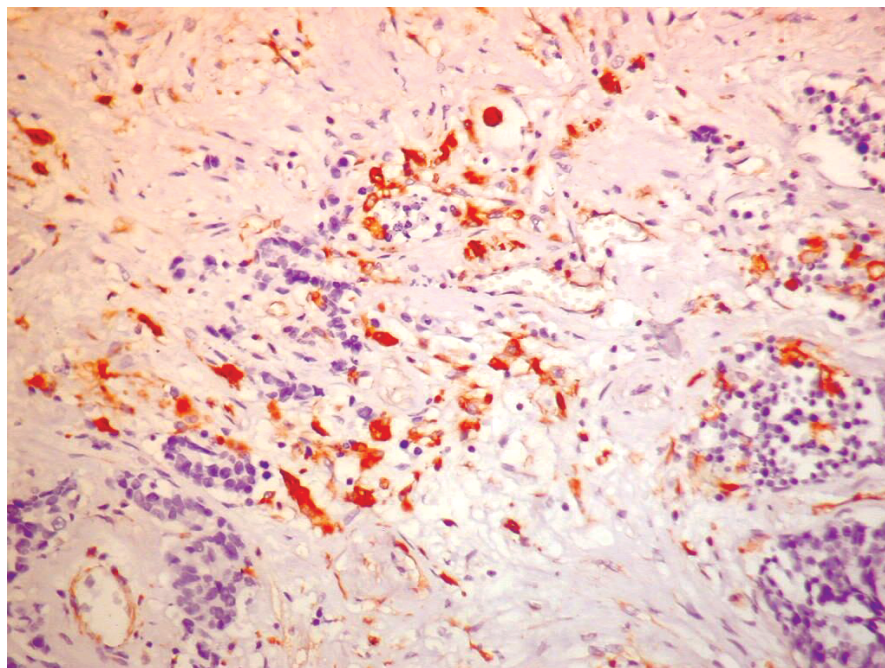


Рис. 3. Появление участков экспрессии виментина в опухолевых клетках, признак полной ЭМТ (окраска антителами к виментину, x200)

Fig. 3. Appearance of a site of vimentin expression in tumor cells, a sign of complete EMT (staining with antibodies to vimentin, x200)

Уже при окраске гематоксилином и эозином можно видеть в опухоли часто крупные очаги рыхлой волокнистой соединительной ткани с большим числом вытянутых крупных клеток с дисперсным хроматином в овальной формы ядрах, что характерно для миофибробластов. Это подтверждается при иммуногистохимическом исследовании с антителами к альфа-гладкомышечному актину, обнаруживающему разных размеров пучки, скопления миофибробластов (Рис. 4); очень редко, по одному случаю в каждой группе, обнаруживалась экспрессия десмина в единичных группах клеток. Миофибробласты являются главным стромальным компонентом и прогностическим маркером многих опухолей [8, 9]. Они секретируют цитокины, протеазы и матриксные белки, обнаруживаются чаще в инвазивном крае опухоли [8, 10]. Ответственными за трансдифференцировку фибробластов в миофи-

бробласты является трансформирующий фактор роста β (TGF β), один из экстрацеллюлярных сигналов, индуцирующих ЭМТ [11, 12]. TGF β стимулирует синтез в миофибробластах гепатоцитарного фактора роста (HGF), называемого также «фактором расщепления», который вовлечен в процессы инвазии и метастазирования опухолей, быть может также путем включения ЭМТ [13—15]. Редко, только в 4 случаях распространенной ЭМТ и 2 случаях без ЭМТ в клетках стромы встречалась экспрессия гепатоцитарного фактора роста (HGF), при этом только в 2 случаях она была высокой, сравнимой с экспрессией в паренхиме.

Характерна для таких очагов базофилия экстрацеллюлярного матрикса, в основе которой лежит накопление в строме гликозаминогликанов, дающих альцианофилию разной степени выраженности от слабой, умеренной до резко выраженной.

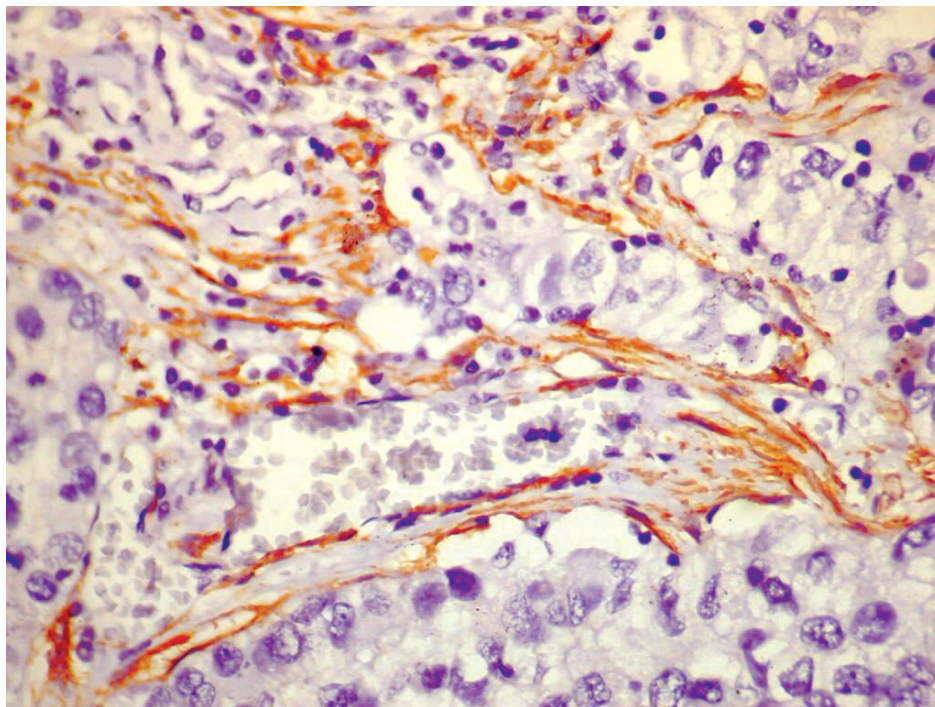


Рис. 4. Экспрессия α -актина гладких мышц в «активированной» строме (окраска антителами к гладкомышечному α -актину, $\times 400$)

Fig. 4. Expression of α -actin smooth muscle actin in the «activated» stroma (staining with antibodies to smooth muscle α -actin, $\times 400$)

Более часто встречаются крупные участки активизированной стромы в случаях распространенной ЭМТ (14 из 16—87,5 %), чем в случаях очаговой (4 из 14—28,6 %). Различия статистически достоверны, $p < 0,01$.

В строме опухоли, особенно часто по периферии ее, обнаруживается выраженная воспалительная инфильтрация, включающая клетки с экспрессией CD 45, CD 3, CD 20, чаще в виде крупных скоплений, а также CD 68-положительные гистиоциты-макрофаги. Иногда CD 3-положительные Т-лимфоциты кажутся более крупными, т.е., возможно, они незрелые. Инфильтрация клетками с экспрессией общего лейкоцитарного антигена была выраженной во 100 % случаях с распространенной ЭМТ и в 28,6 % случаев с очаговой ЭМТ. Резкая инфильтрация гистиоцитами (CD 68-положительные клетки) была обнаружена в 50 % случаев распространенной ЭМТ и лишь в 2 случаях из 14 с очаговой трансформацией.

Иммуногистохимическое исследование часто обнаруживает в клетках стромы экспрессию рецептора к эпидермальному фактору роста (c-erb B 2) разной степени выраженности, от слабой до высокой, во всех случаях распространенной ЭМТ, достигая выраженной в половине случаев (Рис. 5). Только в 4 из 14 случаев с очаговой ЭМТ в строме встречались единичные клетки с экспрессией c-erb B 2.

В клетках стромы обнаруживались признаки пролиферации с экспрессией Ki-67, в половине всех препаратов с распространенной трансформацией она была умеренно выраженной (в одном из них даже выраженной), в половине случаев слабой (Рис. 6). Среди случаев с очаговой — только в одном экспрессия Ki-67 была умеренно выраженной, в остальных случаях слабой, а в 4-х случаях карциноидов (2 с очаговой, 2 — без ЭМТ) она отсутствовала.

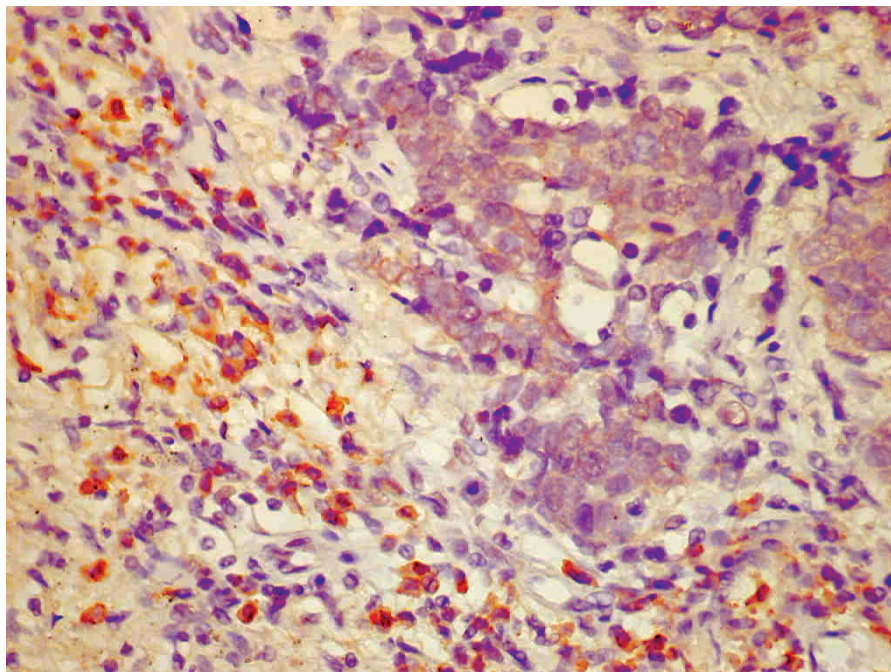


Рис. 5. Высокая экспрессия эпидермального фактора роста (c-erb B 2) в строме и низкая экспрессия в опухолевых клетках (окраска антителами к c-erb B 2, x 400)

Fig. 5. High expression of epidermal growth (c-erb B 2) in the stroma and reduced expression in tumor cells (staining with antibodies to c-erb B 2, x 400)

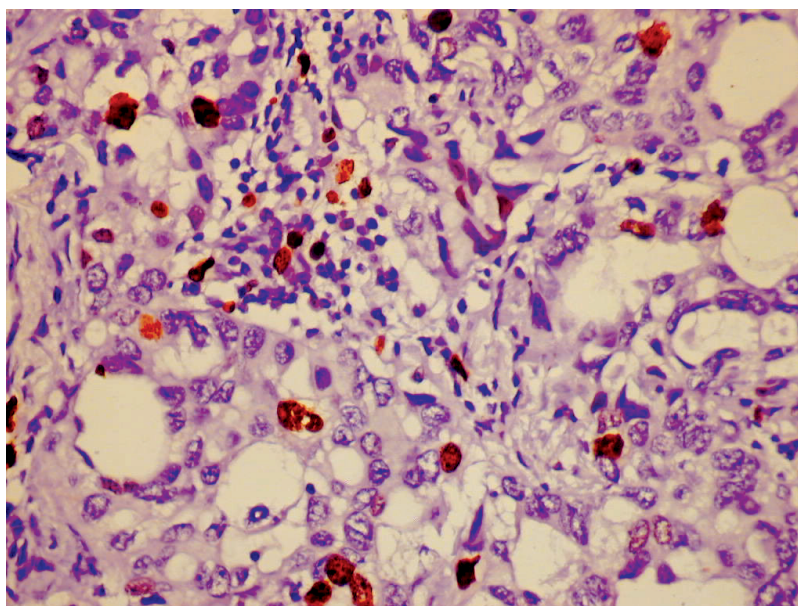


Рис. 6. Слабая пролиферативная активность стромы (окраска антителами к Ki-67, x400)
Fig. 6. Weak proliferative activity of the stroma (staining with antibodies to Ki-67, x400)

Антиапоптотический bcl-2 экспрессировался в высокой степени в 12 из 16 случаев и в низкой степени в 2 случаях при распространенной ЭМТ, а также только в 4 случаях с низкой и умеренной

выраженностью среди 16 случаев очаговой ЭМТ и отсутствия таковой. Экспрессия локализовалась в ядрах лимфоцитов, иногда на внутренней поверхности кариолеммы (Рис. 7).

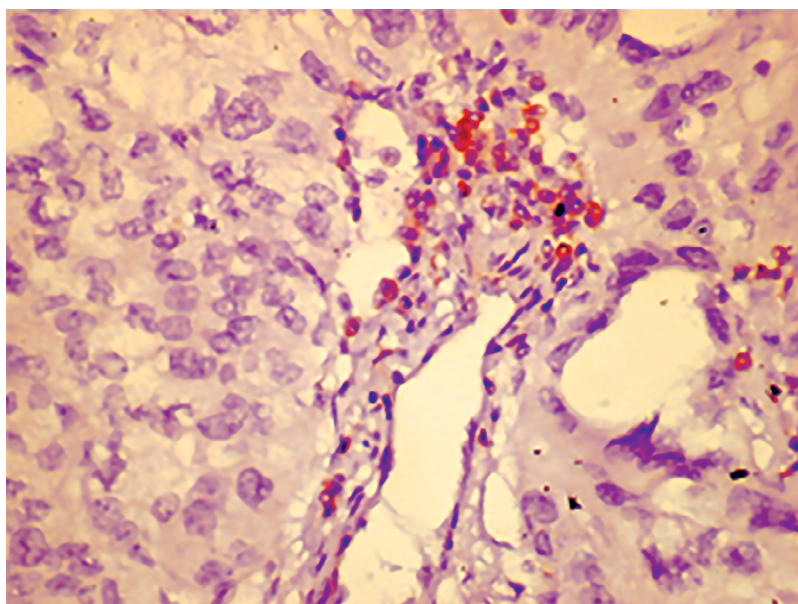


Рис. 7. Умеренно выраженная экспрессия антиапоптотического белка bcl-2 в строме (окраска антителами к антиапоптотическому белку bcl-2, x400)
Fig. 7. Moderate expression of the anti-apoptotic protein bcl-2 in the stroma (staining with antibodies to the anti-apoptotic protein bcl-2, x400)

Основываясь на выявлении новообразованных сосудов по экспрессии CD 34 определяли длину сосудистого русла в 1 мм^3 по Г.Г. Авгандилову. В преобладающем большинстве случаев она была высокой независимо от наличия и распространенности ЭМТ и составляла от 150 до $360 \text{ мм}/\text{мм}^3$. Только в одном наблюдении она была низкой ($72 \text{ мм}/\text{мм}^3$) в случае с распространенной ЭМТ, но это был единственный случай без инвазии сосудов и метастазирования в этой группе. Качественная оценка показала не только большое число сосудов в опухоли, но и часто выраженную пролиферацию эндотелия в виде тяжёлой его без просвета, наличия утолщений стенки сосудов, выбухания эндотелия в просвет сосудов (Рис. 8).

Следует отметить, что экспрессия CD 34 в эндотелии помогает выявлению инвазии сосудов опухолевыми клетками, наличия опухолевых эмболов даже в мелких сосудах.

В 14 из 16 случаев с распространенной ЭМТ в строме обнаруживались признаки нейрогенной дифференцировки по наличию разной степени выраженности экспрессии глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) (12 случаев) и/или хромогранина А (10 случаев); при очаговой ЭМТ или отсутствии ее только в 2 случаях обнаружены следы экспрессии GFAP и в одном случае следы экспрессии хромогранина А.

Для оценки влияния характера стромы и ее особенностей на развитие ЭМТ нами разработана шкала признаков активации стромы. При этом каждый признак оценивался полуколичественно: 0 — отсутствие признака; 1 — слабая выраженность; 2 — умеренная выраженность; 3 — высокая выраженность признака).

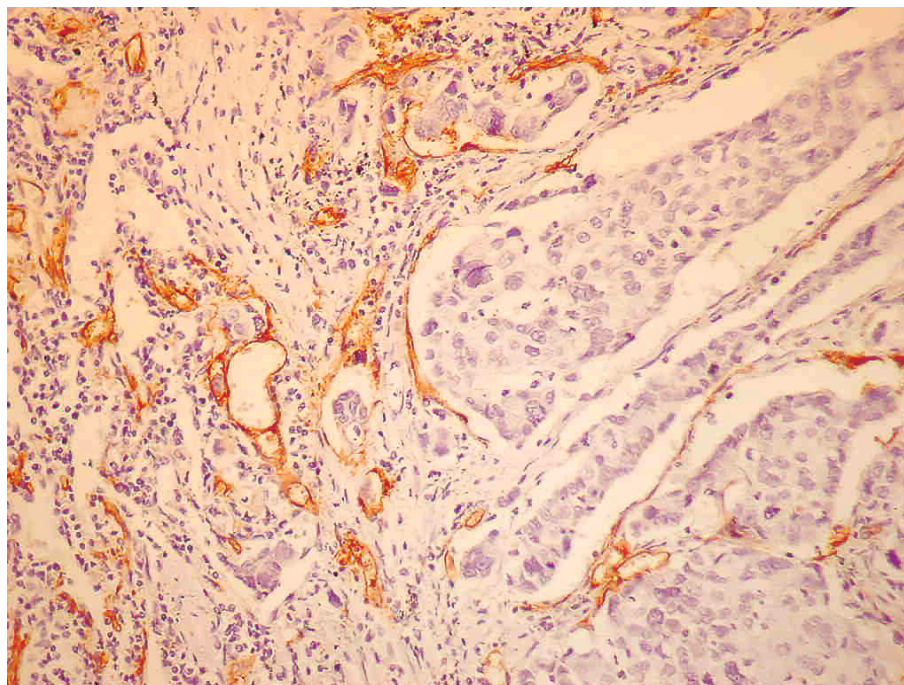


Рис. 8. Опухолевые сосуды, с очаговой пролиферацией эндотелия и наличием опухолевых эмболов (окраска антителами к CD-34, x200)

Fig. 8. Tumor vessels, with focal endothelial proliferation and the presence of tumor emboli (staining with antibodies to CD-34, x200)

1. Количество стромы (малое, умеренное, большое) с наличием рыхлой волокнистой соединительной ткани.

2. Базофилия экстрацеллюлярного матрикса, наличие альцианофилии его (слабая, умеренная, выраженная).

3. Наличие в строме миофибробластов с экспрессией альфа-гладкомышечного актина (малое количество их, умеренное, большое), экспрессия десмина в них (есть, нет).

4. Выраженность воспалительной клеточной инфильтрации в строме с экспрессией CD 45, CD 3 и CD 20 (также 3 степени выраженности). Инфильтрация стромы гистиоцитами-макрофагами с экспрессией CD 68, S-100-протеина (разной степени выраженности).

5. Наличие в клетках стромы экспрессии факторов роста и их рецепторов (c-erb B 2, HGF), оценка пролиферативной (Ki-67) и антиапоптотической активности (bcl-2) в них разной степени выраженности.

6. Количество сосудов по экспрессии CD 34, признаки пролиферации эндотелия (очаговые утолщения его).

7. Признаки нейроэндокринной дифференцировки клеток стромы с экспрессией GFAP, хромогранина А.

Полуколичественная оценка выраженности этих признаков позволила суммировать баллы в каждом случае. В двух случаях распространенной ЭМТ в каждом из них были очаги 2-х разных типов ее (по морфологическим проявлениям) и соответственно им различная выраженность активации стромы в этих участках.

Был оценен в баллах каждый признак активации стромы и суммирован. Если в одном случае были колебания выраженности отдельных признаков в разных участках опухоли, число баллов усредняли.

При распространенной ЭМТ число баллов колебалось от 36,5 до 15,5, в среднем составляя 25,6 баллов. При очаговой ЭМТ или отсутствии ее оно колебалось от 23,5 до 8 баллов, в среднем — 12,6 баллов, т.е. в 2 раза ниже, чем при распространенной ЭМТ. Следует отметить, что при распространенной ЭМТ

в половине случаев она была полной, тогда как при очаговой полная ЭМТ не встречалась. Таким образом, можно сделать вывод, что распространенность и полнота ЭМТ связана с выраженностью активации стромы. Следовательно, активность стромы может быть мишенью терапевтических воздействий на опухоль.

Знание механизмов развития и морфологических проявлений ЭМТ помогают понять механизмы возникновения инвазии и метастазирования. Результаты многих исследований показывают, что в первичной опухоли не может быть селекции клеток, направленных на метастазирование (обычно клетки первичной опухоли и метастазов имеют сходный фенотип). Кроме того, диссеминация из первичного новообразования является почти случайным побочным эффектом в первичной опухоли. В первичной опухоли постепенно происходят изменения в строме, ее активация, и она становится источником сигналов для ЭМТ в соседних раковых клетках. После ЭМТ опухолевые клетки приобретают способность к инвазии сосудов из-за клеточной подвижности и освобождения многих ферментов для расщепления экстрацеллюлярного матрикса, способность сохраняться во время циркуляции в крови или лимфе из-за резистентности к апоптозу, и способность к экстравазации. Однако они «поселяются» в различных органах, строма которых не изменена. К ней опухолевые клетки не адаптированы, отсутствие совместимости между вновь пришедшими раковыми клетками и окружающими тканями объясняет низкую частоту успеха последнего этапа метастазирования — роста микрометастазов в макрометастазы (возможно за счет обратимости ЭМТ в противоположный процесс — мезенхимально-эпителиальную трансформацию). Таким образом, возникающая на определенном генетическом фоне в процессе прогрессии и длительного взаимодействия паренхимы и стромы эпителиальных опухолей ЭМТ ведет к резкому усилению инвазивных и метастатических потенциалов опухоли, приобретение устойчивости к химиотерапии благодаря резистентности к апоптозу, а также определяет неблагоприятный прогноз таких новообразований.

Выводы

1. Активизированная строма коррелирует с частотой ЭМТ. Так, более часто встречаются крупные участки активизированной стромы с наличием миофибробластов и альцианофилией экстрацеллюлярного матрикса в случаях распространенной ЭМТ (14 из 16—87,5 %), чем в случаях очаговой (4 из 14—28,6 %). Различия статистически достоверны, $p < 0,01$.

2. Воспалительная клеточная инфильтрация, являющаяся источником сигнала для трансформации, также коррелировала с частотой ЭМТ. Инфильтрация клетками с экспрессией общего лейкоцитарного антигена была выраженной во всех случаях с распространенной ЭМТ и в 28,6 % случаев с очаговой. Резкая инфильтрация гистиоцитами (CD 68-положительные клетки) была выявлена в половине случаев с распространенной ЭМТ и только в 2 случаях из 14 с очаговой. Различия статистически достоверны, $p < 0,01$.

3. Также с ЭМТ коррелирует экспрессия в клетках стромы рецептора к эпидермальному фактору роста (с-erb B2): она была во всех случаях распространенной ЭМТ, достигая выраженной в половине случаев и только в 4 из 14 случаев с очаговой ЭМТ в строме встречались единичные клетки с экспрессией с-erb B2. Различия статистически достоверны, $p < 0,01$.

4. Такой признак активизации стромы, как пролиферация ее клеток, имел тенденцию к прямо пропорциональной связи с ЭМТ: признаки пролиферации с экспрессией Ki-67 в клетках стромы были умеренно выражены и выражены в половине случаев распространенной ЭМТ, а среди случаев с очаговой ЭМТ только в одном.

5. Четкая корреляция обнаружена между нейрогенной дифференцировкой клеток стромы и ЭМТ. В 14 из 16 случаев с распространенной ЭМТ в строме обнаруживались признаки нейрогенной дифференцировки; при очаговой ЭМТ или отсутствии ее только в 2 случаях обнаружены следы экспрессии GFAP и в одном случае следы экспрессии хромогранина А.

6. При суммировании баллов по 7 признакам активации стромы две независимые выборки (случаи с полной ЭМТ и случаи с очаговой и без ЭМТ) статистически достоверно отличаются на уровне $p < 0,01$, из чего следует вывод о несомненном влиянии сигналов из активированной стромы на развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации опухолевых клеток.

Библиографический список / References

1. Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2005;1;118(19):325—326. doi: 10.1242/jcs.02552
2. Mnihovich MV, Vernigorodskij SV, Bun'kov KV, Mishina ES. Jepitelial'no-mezenhimal'nyj perehod, transdifferenciacija, reprogramirovanie i metaplazija: sovremennyj vzgljad na problemu. *Vestnik Nacional'nogo mediko-hirurgicheskogo Centra im. N.I. Pirogova.* 2018;13(2):145—152 (In Russian). [Мнихович М.В., Вернигородский С.В., Буньков К.В., Мишина Е.С. Эпителиально-мезенхимальный переход, трансдифференциация, репрограммирование и метаплазия: современный взгляд на проблему // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2018. Т. 13. № 2. С. 145—152].
3. Kondratjuk RB, Grekov IS, Jarkov A.M., Rusika A.A., Shvoro D.S. Rol' jepitelial'no-mezenhimal'noj transformacii v rakah razlichnoj lokalizacii (Chast' 1). *Novoobrazovanie.* 2021;13(2):91—95. doi: 10.26435/neoplas.v13i2.376 (In Russian). [Кондратюк Р.Б., Греков И.С., Ярков А.М., Русика А.А., Швороб Д.С. Роль эпителиально-мезенхимальной трансформации в раках различной локализации (Часть 1) // Новообразование. 2021. Т. 13. № 2. С. 91—95. doi: 10.26435/neoplas.v13i2.376]
4. Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2):115—130. doi: 10.1101/cshperspect.a011908.
5. Chou MY. Interplay of Immunometabolism and Epithelial-Mesenchymal Transition in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22 (18):110—118.
6. Lung cancer-associated mesenchymal stem cells promote tumor metastasis and tumorigenesis by induction of epithelial-mesenchymal transition and stem-like reprogram. *Aging (Albany NY).* 2021;13(7):9780—9800.
7. Vasilenko IV, Kondratyuk RB, Grekov IS, Yarkov AM. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. *Clin Exp Morphol.* 2021;10(2):13—20. doi: 10.31088/CEM2021.10.2.13—20
8. Wanna-Udom S. KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF- β -induced epithelial- mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines. *J. Biol. Chem.* 2021;296(1): 345—348.
9. Shi J, Liu F, Zhang W, Liu X, Lin B, Tang X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2015;33(6):2972—2980.

10. Chuang WI, Yeh CJ, Chao YK, Liu YH, Chang IS, Treng CK. Concozdant podoplanin expression in cancer-associated fibroblast and tumor cells is an adverse prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(8):4847—4856.
11. Ramesh V, Brabletz T, Ceppi P. Targeting EMT in Cancer with Repurposed Metabolic Inhibitors. *Trends Cancer*. 2020;6(11):942—950.
12. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem*. 2018;164(4):257—264. doi: 10.1093/jb/mvy047
13. Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol*. 2009;53(1):1541—1547. doi: 10.1387/ijdb.072410mn
14. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transition in development of disease. *Cell*. 2009;139(5):871—890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
15. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006;66(17):8319—8326. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410

Ответственный за переписку: Кондратюк Роман Борисович — кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии, Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецкая народная республика, 83003, г. Донецк, пр. Ильича, 16. E-mail: rbkondrat@gmail.com
Кондратюк Р.Б. SPIN-код 5926-0286; ORCID 0000-0001-5928-8799
Греков И.С. SPIN-код 1887-6655; ORCID 0000-0001-5928-8799
Селезнёв Е.А. SPIN-код 1887-6655; ORCID 0000-0002-2413-8843

Corresponding author: Roman Borisovich Kondratyuk — PhD, MD, Associate Professor at the Department of pathological anatomy, M. Gorky Donetsk National Medical University, 83003, Ilyich Ave., 16, Donetsk, Donetsk People Republic. E-mail: rbkondrat@gmail.com
Kondratyuk R.B. ORCID 0000-0001-5928-8799
Grekov I.S. ORCID 0000-0001-5928-8799
Seleznev E.A. ORCID 0000-0002-2413-8843