М.А. Шишкін
В.О. Кабаченко

Запорізький державний медичний університет
Запоріжжя, Україна

Надійшла: 18.04.2022
Прийнята: 25.05.2022

DOI: https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.2.51-59

УДК 616.37-006.6-002.17-079.2

ОСОБЛИВОСТІ ФІБРОЗНОЇ СТРОМИ В ПРОТОКОВІЙ АДЕНОКАРЦИНОМІ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД РОЗМІРУ ПУХЛИНИ

Shyshkin M.A., Kabachenko V.O. ✉ Characteristics of the fibrous stroma in ductal adenocarcinoma of the pancreas depending on tumor size.
Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDAC) is characterized by a pronounced dense fibrous stroma. There are conflicting data on the role of fibrous stroma in carcinogenesis, as the final mechanisms of interaction of cancer cells and stroma have not been definitively studied. **Objective**: to substantiate the strategic importance of timely comprehensive assessment of histochemical and immunohistochemical parameters of expression of mesenchymal markers of fibrous stroma response (α-SMA, vimentin) in PDAC in tumors up to 3 cm and more than 3 cm. **Methods.** Complex pathomorphological and immunohistochemical study of 49 cases of surgical material (tumors larger than 3 and less than 3 cm) in patients with ductal adenocarcinoma of the pancreas. All research results are processed in the program "STATISTICA 13.0" (StatSoft Inc., license No. JPZ804I382130ARCN10-J). **Results.** Histological examination revealed that the histoarchitectonics of PDAC consists of a cancer-duct compartment and fibrous stroma. Histochemical examination (Masso-trichrome staining) revealed a significantly significant development of fibrous stroma in tumors larger than 3 cm - Me=73.15% (Q1= 59.46; Q3=77.69), in tumors less than 3 cm - Me=28.73% (Q1=15.88; Q3=42.43) ($p<0,05$). The increase in the area of the fibrous stroma with the progression of the oncological process is accompanied by a significant increase in the expression of α-SMA in fibroblasts and activated pancreatic stellate cells that had diffuse brown membrane-cytoplasmic staining. The relative area of the marker in tumors less than 3 cm was Me=19.49% (Q1=12.71; Q3=28.85), in the second group - Me=27.78% (Q1=18.03; Q3=34, 24) ($p<0,05$). Vimentin expression was also manifested by diffuse membrane-cytoplasmic brown staining in fibroblasts and myofibroblasts without significant difference in groups. Relative area in the first group - Me=27.62% (Q1=21.34; Q3=43.82), in the second group - Me=24.39% (Q1=13.19; Q3=34.62) ($p> 0.05$). **Conclusion.** PDAC is characterized by significant development of fibrous stroma, more pronounced in tumors larger than 3 cm, where there is a significant prevalence of fibrous stroma over the cancerous duct compartment of the tumor, compared with tumors less than 3 cm.

Key words: ductal adenocarcinoma, pancreas, fibrous stroma, immunohistochemistry, alpha-SMA, vimentin.

Citation:
Shyshkin MA, Kabachenko VO. [Characteristics of the fibrous stroma in ductal adenocarcinoma of the pancreas depending on tumor size]. Morphologia. 2022;16(2):51-9. Ukrainian.
DOI: https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.2.51-59

Shishkin M.A. 0000-0001-6010-7916
Kabachenko V.O. 0000-0002-7219-6634
✉ leranaumenkokabachenko@gmail.com
© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Протокова аденокарцинома підшлункової залози (ПАПЗ) є не тільки одним з найбільш агресивних злоякісних новоутворень, але і завдяки своєму «тихому» клінічному перебігу діагностується на пізніх стадіях і має поганий прогноз. Вважається, що від початку мутацій до розвитку ПАПЗ може пройти до 20 років. Однак, якщо процес експоненціального збільшення ракових клітин є пізньою подією в канцерогенезі, то ремоделювання строми яскраво виражено ще на преінвазивних стадіях. В порівнянні з іншими солідними пухлинами ПАПЗ відрізняється найбільшою кількістю строми – до 90% [1,2,3]. Остання представляє складне середовище непухлинних клітин, факторів росту, цитокінів, білків екстрацелюлярного матриксу (ECM), який складає до 70% мікросередовища пухлини і відіграє важливу роль в канцерогенезі. Патофізіологічне збільшення вмісту білків ECM призводить до фіброзної строми, однієї з основних аберацій строми, що обумовлює утворення фіброзної,

щільної, багатої на колаген сполучної тканини [1,4,5].

Прогресування ПАПЗ пов'язують зі збільшенням фіброзної строми, яка залежить від складності і кількості ECM (Tian та ін., 2019). В науковій літературі наводяться суперечливі дані про роль фіброзної строми в канцерогенезі, так як остаточні механізми взаємодії ракових клітин і строми остаточно не вивчені. Згідно одних даних, пригнічення стромальних клітин призводить до розвитку пухлин низького ступеню диференціації, відповідно, до швидкого прогресування і поганого прогнозу. Існують дані про супресорний ефект строми при ПАПЗ. Крім того, ефект строми пов'язують зі стадією онкопроцесу. На ранній стадії строма може пригнічувати, а на пізній – стимулювати канцерогенез [3,5,6,7].

Сучасна наукова література виділяє різні підтипи строми при ПАПЗ, такі як строма, що характеризується профілями експресії зірчастих клітин, або більш агресивна строма, що характеризується активованими фібробластами і альтернативно активованими макрофагами [3,4,8].

Основними типами клітин фіброзної строми, які є критично важливими для продукції і ремоделювання позаклітинного матриксу, є активовані зірчасті клітини [9-12]. Останні перетворюються на міофібробластні клітини, що схожі з веретеноподібними стромальними клітинами [5,13]. Міофібробласти експресують α-гладком'язовий актин (SMA) і секретують білки ECM, відіграючи найважливішу роль у ремоделюванні строми та фіброзі [5,14,15,16.]. Зірчасті клітини відрізняються функціональною неоднорідністю, існують різні субпопуляції цих клітин, для яких характерний різний рівень експресії маркерів, зокрема віментину, α-SMA.

Запуск перепрограмування зірчастих клітин в міофібробласти є одним з механізмів індукції здатності ініціювати пухлину для епітеліально-мезенхімального переходу (EMT) [7,8,13,17]. Вважається, що адгезія пухлин є органоспецифічною і модифікується умовами мікрооточення, яке відрізняється інтенсивною фіброзною стромою. Саме розвинена фіброзна строма сприяє утворенню міцних зв'язків туморасоційованих фібробластів з раковими клітинами, що забезпечує переваги для обох типів клітин. Тобто, з одного боку ракові клітини ініціюють і підтримують активацію туморасоційованих фібробластів, в свою чергу останні підтримують ріст, рухливість та інвазію ракових клітин, і цій взаємодії сприяє фіброзна строма [10,18,19,20]. Вважається, що саме зростання тумор-асоційованих фібробластів в карциномах є наслідком EMT злоякісних клітин [6,9,12] і призводить до ущільнення пухлинної строми [5,8,20]. Проліферація фібробластів та перетворення фібробластів у міофібробласти є ключовими подіями, що відповідають за надмірне відкладення білків ECM, зокрема колагену [21]. В результаті багата колагеном сітка створює сприятливе середовище для виживання та розмноження ракових клітин. В роботі [22] показано, що фіброзні компоненти ракової строми формують так звані «треки», визначаючи тим самим напрямок міграції відокремлених ракових клітин.

Таким чином, щільна фіброзна строма при ПАПЗ має важливу багатофакторну, при цьому суперечливу роль в прогресуванні патології (Ligorio et al., 2019). Це є вагомим аргументом подальшого вивчення стромальних маркерів для більш глибокого розуміння ролі строми та її зміни на різних стадіях ПАПЗ.

Мета

Обгрунтувати стратегічну значущість своєчасної комплексної оцінки гістохімічних та імуногістохімічних показників експресії мезенхімальних маркерів фіброзної строми (α-SMA, віментин) при ПАПЗ в залежності від розміру пухлини для прогнозування перебігу захворювання.

Матеріали та методи

Проведено комплексне патоморфологічне дослідження операційного матеріалу 49 пацієнтів віком 39-83 роки, хворих на ПАПЗ. Пацієнти поділені на дві групи: першу групу склали пацієнти з розміром пухлини менше 3 см, до другої групи – пацієнти з розмірами пухлини більше 3 см. В групі контролю вивчено аутопсійний матеріал підшлункової залози 10 померлих пацієнтів віком 56-73 років, які не страждали захворюваннями підшлункової залози. В кожному випадку підшлункова залоза досліджувалася патоморфологічними методами на поперечних зрізах головки, тіла та хвоста залози. Шматочки тканини ПЗ фіксували в 10% забуференому формаліні і заливали в парафін. На прецезійному ротаційному мікротомі HM 3600 («MICROM Laborgerate GmbH» - Німеччина) виготовляли серійні зрізи товщиною 4-5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином, за Ван-Гізон, методом Массон-трихром та ШИК-альціановий синій, який дозволяє визначити наявність муцинів в апікальній цитоплазмі клітин ракових проток та в стромі пухлини. Імуногістохімічні (ІГХ) дослідження виконували в серійних парафінових зрізах товщиною 4-5 мкм, розміщених на адгезивних предметних скельцях «SUPER FROST PLUS» («DAKO», Данія).

При ІГХ дослідженні після депарафінізації і регідратації зрізів виконували високотемпературне демаскування антигенів нагріванням зрізів на скельцях на водяній бані в Трис-ЕДТА (pH=9,0) буфері, пригнічували активність ендогенної пероксидази 3% розчином перекису водню та наносили блокуючу сироватку. Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників. В ІГХ дослідженнях використовували первинні антитіла проти гладко-м'язового актину α-SMA (Mo Alpha Smooth

Muscle Actin, *Clone 1A4*, «DAKO», Данія), віментину (Mo a Hu Vimentin Ab-2, «Thermo Scientific», США). Результати ІГХ-реакції візуалізували в залежності від типу застосованих антитіл або з використанням системи детекції UltraVision Quanto HRP + DABSystem ("Thermo Scientific", США). Зрізи дозабарвлювали гематоксиліном Майєра.

Результати ІГХ дослідження оцінювали в мікроскопі Axioplan 2 («Carl Zeiss», Німеччина), зрізи фотографували цифровою фотокамерою «Axiocam 105 Color ZEIZZ» (Німеччина) в 5 полях стандартизованого поля зору мікроскопу (СПЗМ) при збільшенні ×200.

Кількісне вимірювання рівня експресії мезенхімальних маркерів (досліджуваних) проведено за допомогою медичної програми обробки цифрового зображення ImageJ [13], використовувався плагін Colour Deconvolution та схема аналізу фарбування "HDAB" (гематоксилін+DAB) в автоматичному режимі. Для морфометричного вимірювання відносної площі імунопозитивних структур (стромальні маркери гладко-м'язовий актин, віментин; гістохімічне дослідження Массон-трихром) у відфільтрованому DAB-каналі зображення встановлювали стандартизований поріг чутливості (інструмент «Threshold») для сегментації зображення, яке розподіляє усі пікселі на два типи: біле та чорне. Наступний крок, проведення обчислення відносної площі, що займають імунопозитивні структури, як відсоткове співвідношення кількості пікселей цифрового зображення позитивної ІГХ-реакції до загальної кількості пікселей в зображенні. Градували на три групи: низький показник відносної площі ІГХ-позитивних клітин - 0-25%, площа від 26% до 75% імунопозитивно-забарвлених клітин - помірний показник, та високий показник відносної площі дорівнював від 76% до 100%.

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 квартилі (Q1; Q3). Для кореляційного аналізу використаний коефіцієнт Пірсона. Результати вважалися статистично достовірними при значенні $p<0,05$.

Результати досліджень

При морфологічному дослідженні (забарвлення гематоксиліном та еозином, гістохімічним методом Массон-трихром) ПАПЗ характеризується неоднорідністю структури. В ній було виявлено два патерни: раковий залозисто-протоковий та стромальний. При гістологічному дослідженні перший компартмент в пухлинах розміром до 3 см складався з залозистоподібних, дрібних трабекулярних та тубулярних комплексів, дуктулоподібних та дрібних груп пухлинних клітин, що мають мономорфну будову. Другий компартмент був представлений фіброзною стромою, включаючи фібробласти, міофібробласти, запальні клітини. В другій групі мікроскопічна будова залозисто-протокового компартменту представлена дрібними тубулоподібними комплексами та великими трабекулярними структурами, замурованими в рясну фіброзну строму, що представлена видовженими веретеноподібними клітинами. Перший компартмент більш виражений на периферії, ніж в центрі пухлини, а стромальний компартмент, навпаки, в пухлинах різного розміру виражений більше в центрі. Мікроскопічна картина фіброзної строми представлена щільним інфільтратом неракових стромальних клітин та компонентів екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), який є відмінною рисою ПАПЗ (рис. 1А). При цьому в пухлинах більше 3 см розвиток фіброзної строми був більш виражений (площа складала 13-89%), аніж в пухлинах менше 3 см (площа складала 10-46%).

При дослідженні мікропрепаратів ПАПЗ, забарвлених за Массон-трихром (рис. 1Б), що виявляє рівень розвитку сполучної тканини в ПЗ, відносна площа фіброзної строми в першій групі склала Me=28,73% (Q_1=15,88; Q_3=42,43), мінімальний показник відносної площі 10,19%, максимальний – 46,03%. В другій групі відносна площа фіброзної строми перевищувала показник групи порівняння в 2,54 р. і склала Me=73,15% (Q_1=59,46; Q_3=77,69), мінімальний показник відносної площі 13,67%, максимальний – 89,24%. Відносна площа стромального компартменту підшлункової залози в групі контролю склала Me=15,02% (Q_1=6,69; Q_3=26,17) і була достовірно нижча, ніж в основних групах ($p<0,05$) (таб.1).

Таблиця 1

Відносна площа експресії мезенхімальних маркерів в пухлинах ПАПЗ в залежності від їх розміру

Групи	Віментин	Гладко-м'язовий актин	Массон-трихром
ПАПЗ <3см	27,62%* (Q_1=21,34; Q_3=43,82)	19,49%* (Q_1=12,71; Q_3=28,85)	28,73%* (Q_1=15,88; Q_3=42,49)
ПАПЗ >3см	24,39%* (Q_1=13,19; Q_3=34,62)	27,78%* (Q_1=18,03; Q_3=34,24)	73,15%* (Q_1=59,46; Q_3=77,69)
Група контролю	12,43%* (Q_1=6,69; Q_3=26,17)	19,71% (Q_1=11,87; Q_3=23,60)	15,02%* (Q_1=6,69; Q_3=26,17)

Примітка: * - статистично значуща достовірність ($p<0,05$).

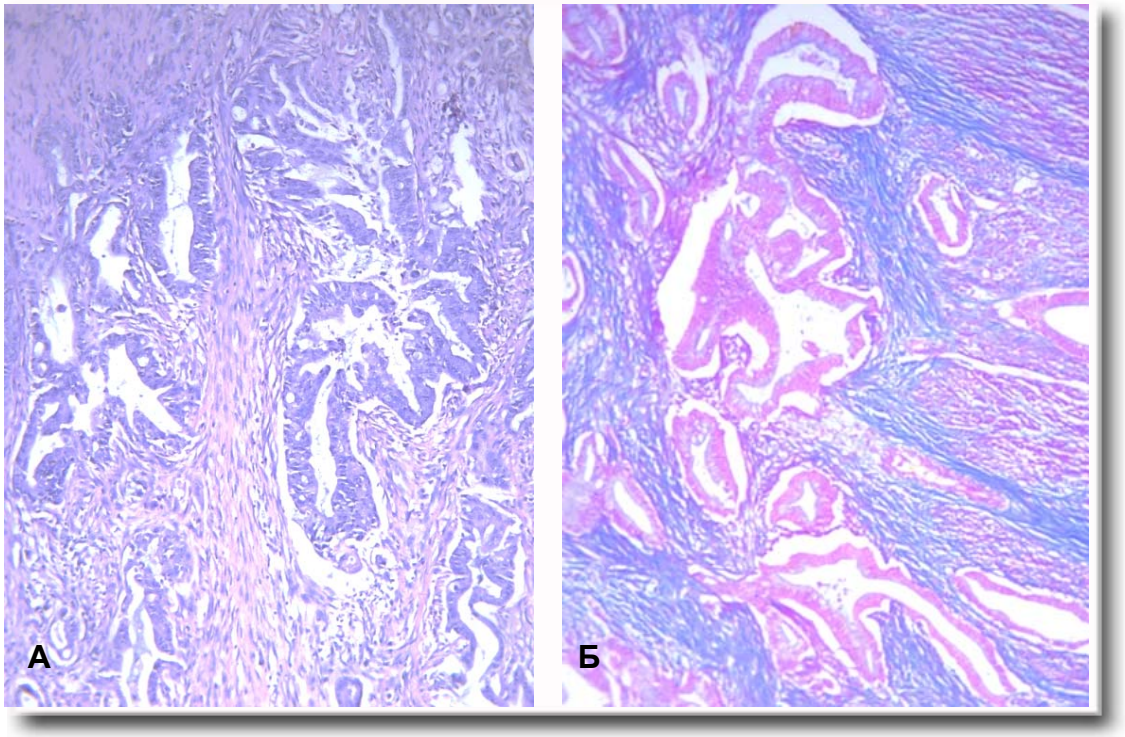

Рис. 1. Протокова аденокарцима підшлункової залози. Забарвлення: А – гематоксилін та еозин, Б – метод Массон-трихром. ×200.

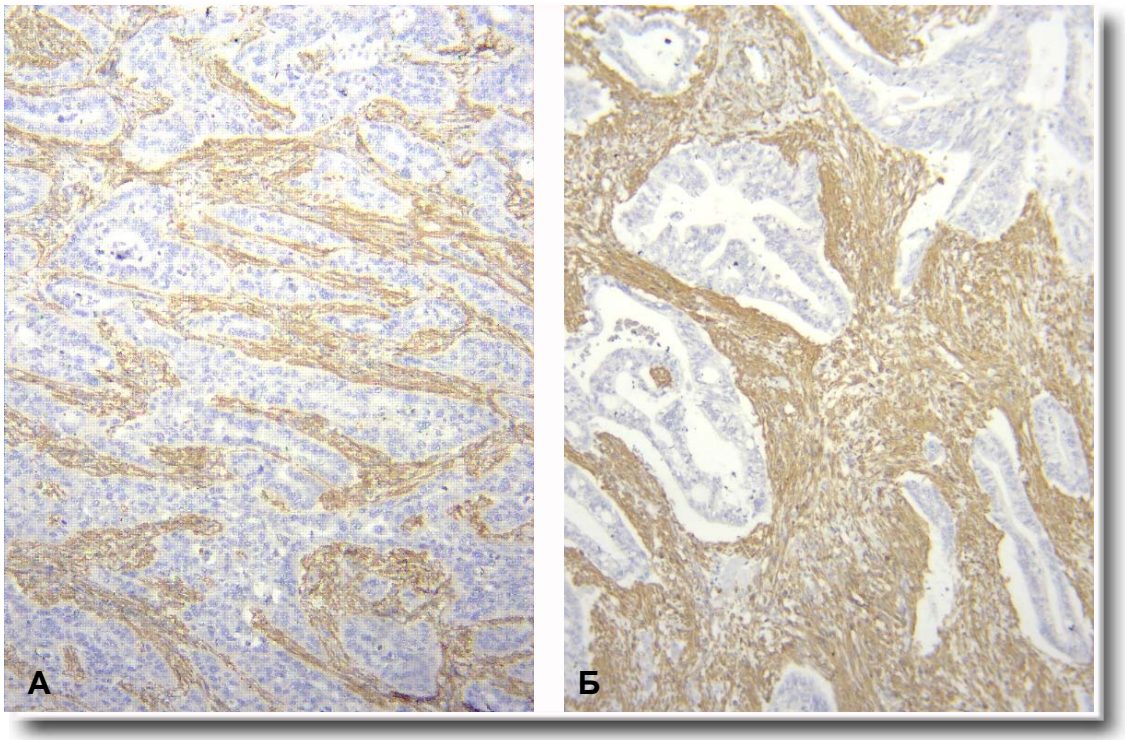

Рис. 2. Експресія Mo Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4 клітинами фіброзної строми протокової аденокарциими підшлункової залози : А- пухлина розміром менше 3см, Б – пухлина розміром більше 3см. ×200.

Експресія α-SMA в усьому досліджуваному матеріалі проявлялася у вигляді дифузного мембрано-цитоплазматичного коричневого забарвлення фібробластів та активованих панкреатичних зірчастих клітин (ПЗК) строми навколо тубулоподібних, трабекулярних структур та окремих ракових клітин (рис. 2А, Б). В пухлинах розміром менше 3 см (рис. 2А) показник маркеру коливався в інтервалі від 5,04 до 62,21 і склав Me=19,49% (Q_1=12,71; Q_3=28,85). З прогресуван-

ням онкопроцесу (в пухлинах більше 3 см) (рис. 2Б) відзначене достовірне зростання експресії онкомаркеру Me=27,78% (Q_1=18,03; Q_3=34,24) (p<0,05) з коливанням показника від 2,84% до 45,00%. В групі контролю рівень α-SMA склав Me=19,71% (Q_1=11,87; Q_3=23,60), не відрізнявся від показника в першій групі і був достовірно нижчий, ніж в групі пухлин більше 3 см (p<0,05).

При ІГХ-дослідженні ЕМТ-залежного маркеру - віментину спостерігалося мембрано-цитоплазматичне коричневе забарвлення веретеноподібних клітин строми (фібробластів та міофібробластів) навколо тубулоподібних та трабекулярних структур та фібрилярного компоненту фіброзної строми (рис. 3А, Б). Відносна площа експресії віментину в пухлинах менше 3 см (рис. 3А) склала Me=27,62% (Q_1=21,34; Q_3=43,82), показник коливався від 4,43% до 53,52%. В другій досліджуваній групі (рис. 3Б) медіана відносної площі експресії віментину склала Me=24,39% (Q_1=13,19; Q_3=34,62) з діапазоном 3,59% - 44,39% і була недостовірно нижча, ніж в першій групі (p>0,05). В групі контролю медіана відносної площі експресії віментину дорівнювала 12,43% (Q_1=6,69; Q_3=26,17) і була вдвічі нижча, ніж в основних групах (p<0,05) (таб. 1).

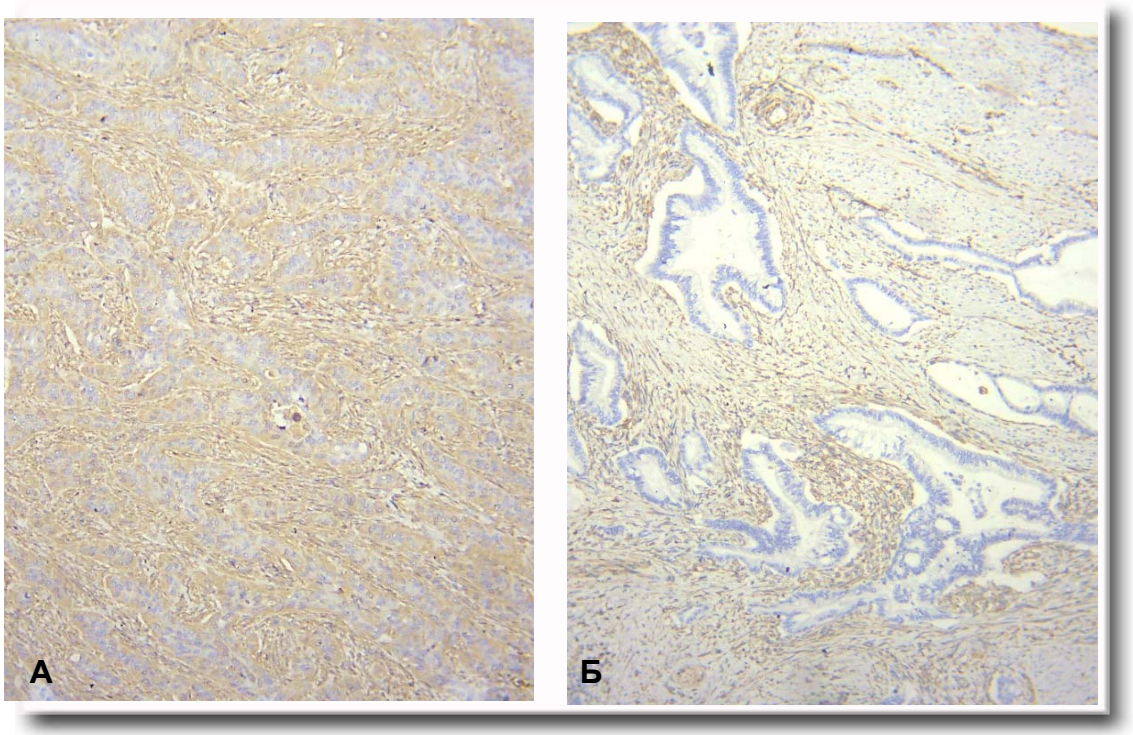

Рис. 3. Експресія Mo a Hu Vimentin Ab-2 клітинами фіброзної строми протокової аденокарциими підшлункової залози : А- пухлина розміром менше 3см, Б – пухлина розміром більше 3см. ×200.

Кореляційний аналіз виявив помірний прямий зв'язок між мезенхімальними маркерами в пухлинах менше і більше 3 см. В першій групі коефіцієнт Пірсона склав r=0,59 (p<0,05), в другій r=0,62 (p<0,05) (таб. 2).

Таблиця 2

Кореляційний зв'язок між рівнями експресії стромальних маркерів (коефіцієнт Пірсона)

Групи	αSMA Vim	Vim Mas	αSMA Mas
ПАПЗ <3	+0.59*	+0.32	+0.12
ПАПЗ >3	+0.62*	-0.16	-0.21

Примітка: * - статистично значуща кореляція (p<0,05).

Кореляційний аналіз між показниками розвинутої строми (гістохімічне забарвлення за методом Массон-трихром) і її маркерів характеризується слабким прямим кореляційним зв'язком при пухлинах до 3 см (p>0,05) і слабким негативним при пухлинах більше 3 см (p>0,05).

Обговорення результатів

Мікроскопічно ПАПЗ характеризуються добре розвиненими залозистими структурами, які тією чи іншою мірою нагадують нормальні панкреатичні протоки, але відрізняються вираженим розвитком фіброзної строми, яка свідчить, що при ПАПЗ патологічний процес перебігає не тільки в самому раковому вузлі [1,2,4,8]. Частка фіброзної строми в проведених дослідженнях в пухлинах більше 3 см склала 13-89%, в пухлинах менше 3 см - 10-46%, в середньому 58,23%, що відповідає літературним даним (50-80%), і є значно вищим аніж, наприклад, при колоректальній карциномі – 30-60% [2,11]. Крім того, отримані результати підтверджують літературні дані про

накопичення фіброзної строми зі збільшенням розмірів ураження [5]

Саме фіброзна строма обумовлює кам'янисту щільність ПАПЗ. Розвиток стромального компоненту при ПАПЗ пов'язаний із активацією великої кількості тумор-асоційованих фібробластів зірчастих клітин ПЗ, які синтезують надлишок волокнисто-молекулярного матриксу [2,15,16,19]. Саме активовані α-SMA-позитивні зірчасті клітини відіграють ключову роль в формуванні фіброзної строми. Експериментально доведено, що щільність тканин залежить від зрілості фіброзної строми і туморасоційованих фібробластів і пов'язана зі ступенем агресивності раку [2,8,16]. Ущільнення строми за рахунок зростання тиску на кластери клітин може бути додатковим фактором, окрім механізмів ЕМТ, роз'єднання і інвазії ракових клітин, поганої васкуляризації. Також було показано, що інтерстиціальний тиск призводить до активації сигнальних шляхів запуску онкопроцесу і заважає проникненню хіміопрепаратів до пухлини [1,6,9,18,19].

Розвиток фіброзної строми супроводжується накопиченням α-SMA-імунопозитивних клітин, кількісний показник яких різниться при різних видах раку і, згідно літературним даним, асоціюється зі ступенем злоякісності пухлини [6]. При колоректальному раку, раку молочної залози накопичення α-SMA-імунопозитивних клітин коливається в межах 28,54±6,09 [2,17,22]. Проведені дослідження виявили імунопозитивну реакцію α-SMA при ПАПЗ в 100%. Експресія гладенько-м'язового актину спостерігалась у вигляді коричневого дифузного мембрано-цитоплазматичного забарвлення клітин строми (фібробластів та панкреатичних зірчастих клітин). В пухлинах менше 3 см накопичення α-SMA-імунопозитивних клітин навколо тубулоподібних та трабекулярних структур Me=19,49%, а в пухлинах більше 3 см медіана була в півтора рази вище 27,78% ($p<0.05$). При порівнянні першої групи та групи контролю не було встановлено достовірної різниці експресії α-SMA клітинами строми протокової аденокарциноми підшлункової залози. При порівнянні другої групи з групою контролю була встановлена достовірна різниця експресії α-SMA клітинами строми ПАПЗ ($p<0,05$). Міофібробластичний (α-SMA-імунопозитивний) фенотип туморасоційованих фібробластів характеризується можливістю регулювати подовження колагенових волокон в стромі пухлини, що пов'язують з ущільненням строми і низьким рівнем виживання. Наукові дослідження доводять, що саме ПАПЗ відрізняється більш видовженими волокнами матриці, які регулюються α-SMA-імунопозитивними фібробластими, обумовлюючи ущільнення ЕЦМ і агресивність процесу [15]. Дійсно, рівень активації ПЗК в стромі сильно корелює з відкладенням колагену**.** Однак, в літературі є дані, які не вважають α-SMA переважаючим мезенхімальним маркером ЕМТ при ПАПЗ [4,24].

В результаті багата колагеном сітка створює сприятливе середовище для виживання та розмноження ракових клітин [23].

Ракові клітини активно діляться і синтезують набагато більше віментину, тому підвищення експресії віментину характерне для багатьох видів раку, в тому числі молочної залози, легень, кишечника, меланоми, підшлункової залози. Це також лежить в основі мезенхімальної та поганої диференціації [25].

Ракові клітини, тумор-асоційовані фібробласти продукують віментин, експресія якого спостерігається в різних епітеліальних пухлинах [26]. Рівень експресії віментину пов'язують не тільки зі ступенем агресивності процесу, а і з джерелом ембріонального розвитку органу [2,17,27]. Так, відносно прогностично сприятливі світлоклітинні раки нирок характеризуються дуже високою частотою експресії маркеру [17,27,28]. Залежність частоти експресії віментину від гістологічної будови пухлини відзначається в раках шлунку і легень, що пов'язують або з гістогенезом при раку легень або з особливостями онкогенезу при раку шлунку [17,27,28]. В клітинах карциноїдів легень ІГХ-експресія віментіну складає 26,5% і повна відсутність забарвлення в 73,5% [17,27,28]. При раку молочної залози доля віментин-позитивних клітин складає 40±3,1% і вважається найвищим критерієм прогнозу метастазів. Проведені дослідження демонструють експресію віментину в 100% клітин стромального компартменту пухлини. Експресія віментину спостерігалась в клітинах строми ПАПЗ у вигляді коричневого мембрано-цитоплазматичного забарвлення. В першій групі медіана експресії віментину дорівнювала 27,62%, що у порівнянні із групою контролю (Me=12,43%) вдвічі вище, при $p<0.05$. В групі пацієнтів з розміром пухлини ПАПЗ більше 3 см медіана експресії віментину дорівнювала 24,39%, що також демонструє у два раза вище показник, аніж в групі контролю ($p<0.05$). З прогресією росту пухлин не відзначено зростання маркеру, хоча, згідно літературних даних, більш просунуті стадії раку, зокрема молочної залози, прямої кишки, характеризуються зростанням віментину і асоціюється з віддаленими метастазами і гіршим прогнозом, є однією з ключових ланок ініціації ЕМТ [2,17,29]. Віментин синтезується переважно раковими клітинами, які активно діляться. На відміну, αSMA є специфічним для міофібробластів і ніколи не експресується в ракових клітинах, які пройшли ЕМТ [5] Відсутність підвищення експресії віментину зі збільшенням розміру пухлини в проведених дослідженнях можна пояснити відсутністю зростання кількості ракових клітин на тлі достовірного зростання αSMA і фібро-

зної строми. Гістологічно відсоток злоякісних клітин значно нижчий за строму при раку підшлункової залози, який утворює фіброзну мережу, що містить імунні клітини, ендотеліальні клітини, пов'язані з раком фібробласти, перицити та зірчасті клітини підшлункової залози (PSC) [4–7,30].

Деякі літературні джерела позиціонують віментин-позитивні імуноцити як такі, що можуть забезпечувати протипухлинну імунну відповідь, пригнічуючи пухлинний ріст, і, відповідно, виступати в якості прогностично сприятливого маркеру [2,25,31].

Проведений статистичний аналіз показав, що експресія віментину пов'язана з поганою гістологічною диференціацією незалежно від відсотка позитивних новоутворених клітин, а також не виявлено статистичної різниці між експресією віментину та розміром пухлини, що узгоджується з даними літератури [25]. Між тим є дані про зв’язок рівня експресії маркеру з прискореним ростом пухлини [32].

Кореляції між відсотком клітин, що експресують віментин та α-SMA, у стромі пухлини не було (коефіцієнт кореляції Пірсона: r = 0,171). Кореляційний аналіз між показниками розвинутої строми (гістохімічне забарвлення за методом Массон-трихром) і її маркерів характеризується слабким прямим корелятивним зв’язком при пухлинах до 3 см (p>0,05) і слабким негативним при пухлинах більше 3 см (p>0,05), відображаючи переважний розвиток саме фіброзної строми.

Точні механізми взаємодій ракових клітин і елементів строми остаточно не вивчені. Результати проведених досліджень узгоджуються з науковими даними про складний вплив строми на ПАПЗ, який залежить від багатьох факторів, в тому числі від функціонального стану стромальних компонентів і ракових клітин. Також отримані результати доводять , що взаємодія зірчастих клітин зі стромою та раковими клітинами є динамічною та залежить від прогресування ПАПЗ [32,33].

Таким чином, інтенсивний розвиток щільної фіброзної строми, аномальне накопичення мезенхімальних маркерів свідчать і про більш виражений мезенхімальний перехід, який асоціюється з агресивністю злоякісного процесу, обумовлює високу смертність, відповідно низьку виживаність, стійкість до хіміотерапії, незважаючи на помірний рівень диференціації ПАПЗ [1,5,8]. Особливості мікрооточення відображають пластичність, органоспецифічність EMT, її різну роль при різних видах раку. Отримані результати доводять прогностичну роль визначення мезенхімальних маркерів в діагностиці і терапії ПАПЗ.

Висновки

1. Із використанням забарвлення Массон-трихром в матеріалі протокової аденокарциноми підшлункової залози встановлено, що пухлини більше 3 см відрізняють достовірно більшою відносною площею фіброзної строми (Me=73,15% (Q_1=59,46; Q_3=77,69)) в порівнянні з пухлинами менше 3 см (Me=28,73% (Q_1=15,88; Q_3=42,43)).

2. Відносна площа α-SMA-імунопозитивних клітин в пухлинах більше 3 см (Me=27,78% (Q_1=18,03; Q_3=34,24)) є достовірно вищою за відносну площу α-SMA-імунопозитивних клітин в нормальній підшлунковій залозі (Me=19,71% (Q_1=11,87; Q_3=23,60)), в той час як відносна площа α-SMA-імунопозитивних клітин в пухлинах менше 3 см (Me=19,49% (Q_1=12,71; Q_3=28,85)) достовірно не відрізняється від показників норми.

3. Відносна площа експресії віментину в пухлинах менше 3 см (Me=27,62% (Q_1=21,34; Q_3=43,82)) і більше 3 см (Me=24,39% (Q_1=13,19; Q_3=34,62)) є достовірно вищою за показник відносної площі експресії віментину в нормальній підшлунковій залозі (Me=12,43% (Q_1=6,69; Q_3=26,17)).

4. Встановлено наявність прямого помірного кореляційного зв’язку між рівнями експресії гладенько-м’язового актину та віментину в протоковій аденокарциномі підшлункової залози (в пухлинах як менше 3 см, так і більше 3 см).

Перспективи подальших досліджень

Визначення рівнів експресії різних стромальних маркерів для більш глибокого розуміння ролі строми та її зміни на різних стадіях ПАПЗ.

Інформація про конфлікт інтересів

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

Літературні джерела
References

1. Tumanskiy VA, Evseyev AV, Kovalenko IS. Kolichestvennye pokazateli ekspressii stromal'nykh markerov v podzheludochnoi zheleze pri protokovoi adenokartsinome i khronicheskom pankreatite [Quantitative indexes of stromal markers expression in the patcreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis]. Pathologia. 2015;2:26-30. Russian. doi.org/10.14739/2310-1237.2015.2.48621.

2. Shyshkin MA, Fen SV. Epitelialno-mezenkhimalnyi perekhod v progressii kolorektalnoi adenokartsinomy [Epithelial-mesenchymal transition in colorectal adenocarcinoma progression]. *Zaporozhye Medical Journal. 2020;22*(5):694-700. Russian. doi.org/10.14739/2310-1210.2020.5.214747.

3. Ercan G, Karlitepe A, Ozpolat B. Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches. Anticancer Res. 2017;37(6):2761-75. DOI: 10.21873/anticanres.11628

4. Front. Cell Dev. Biol., 25 November 2021 https://doi.org/10.3389/fcell.2021.787485 Targeting Tumor-Stromal Interactions in Pancreatic Cancer: Impact of Collagens and Mechanical Traits Parniyan Maneshi, James Mason, Mitesh Dongre and Daniel Öhlund

5 Aiello N. M. et al. Metastatic progression is associated with dynamic changes in the local microenvironment. Nat. Commun. 7:12819 doi: 10.1038/ncomms12819 (2016). Nat Commun 7, 12819 (2016). https://doi.org/10.1038/ncomms12819 Metastatic progression is associated with dynamic changes in the local microenvironment Nicole M. Aiello, David L. Bajor, Robert J. Norgard, Amine Sahmoud, Neha Bhagwat, Minh N. Pham, Toby C. Cornish,Christine A. Iacobuzio-Donahue, Robert H. Vonderheide Ben Z. Stanger

6. Biomark Res. 2021; 9: 47. Published online 2021 Jun 10. doi: 10.1186/s40364-021-00305-9 PMCID: PMC8194104 PMID: 34112258 Metastasis-associated fibroblasts: an emerging target for metastatic cancer Zimu Wang, Jiaxin Liu, Hairong Huang, Mingxiang Ye, Xinying Li, Ranpu Wu, Hongbing Liu, and Yong Song

7. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies Aleksandra Adamska, Alice Domenichini and Marco Falasca Int. J. Mol. Sci. 2017, 18(7), 1338; https://doi.org/10.3390/ijms18071338

8. Saini, F.; Argent, R.H.; Grabowska, A.M. Sonic Hedgehog Ligand: A Role in Formation of a Mesenchymal Niche in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cells 2019, 8, 424. [CrossRef]

9. Cannon, A.; Thompson, C.; Hall, B.R.; Jain, M.; Kumar, S.; Batra, S.K. Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: Insight into pathological function and therapeutic potential. Genes Cancer 2018, 9, 78–86. PMID: 30108679 PMCID: PMC6086006 doi: 10.18632/genesandcancer.171. [PubMed]

10. Alkasalias, T.; Moyano-Galceran, L.; Arsenian-Henriksson, M.; Lehti, K. Fibroblasts in the tumor microenvironment: Shield or spear? Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 1532. [CrossRef] [PubMed]

11. Kuzet S. E., Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. Cell and Tissue Research. 2016. Vol. 365. Issue 3. P. 607-619. https://doi.org/10.1007/s00441-016-2467-x

12. Cells. 2018 Oct 5;7(10):158. doi: 10.3390/cells7100158. Tumor-Stroma Cross-Talk in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Focus on the Effect of the Extracellular Matrix on Tumor Cell Phenotype and Invasive Potential Patrizia Procacci 1, Claudia Moscheni 2, Patrizia Sartori 3, Michele Sommariva 4, Nicoletta Gagliano 5 PMID: 30301152 PMCID: PMC6209911 DOI: 10.3390/cells7100158 Cells 2018, 7(10), 158; https://doi.org/10.3390/cells7100158

13. Topalovski M., Brekken R.A. Matrix control of pancreatic cancer: New insights into fibronectin signaling. Cancer Lett. 2016 Oct 10; 381 (1): 252–8. doi: 10.1016/j.canlet.2015.12.027.

14. Liu, T.; Zhou, L.; Li, D.; Andl, T.; Zhang, Y. Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. Front. Cell Dev. Biol. 2019, 7, 60. [CrossRef]

15. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes Mayra Paolillo and Sergio Schinelli Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 4947; doi:10.3390/ijms20194947 www.mdpi.com/journal/ijms

16. Wells, A.; Nuschke, A.; Yates, C.C. Skin tissue repair: Matrix microenvironmental influences. Matrix Biol. 2016, 49, 25–36. [CrossRef]

17. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies Aleksandra Adamska, Alice Domenichini and Marco Falasca Int. J. Mol. Sci. 2017, 18(7), 1338; https://doi.org/10.3390/ijms18071338

18. Høye, A.M.; Erler, J.T. Structural ECM components in the premetastatic and metastatic niche. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2016, 310, 955–967. [CrossRef] [PubMed]

19. Walker, C.; Mojares, E.; Del Río Hernández, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3028. [CrossRef]

20. Oxford, J.T.; Reeck, J.C.; Hardy, M.J. Extracellular Matrix in Development and Disease. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 205. [CrossRef]

21. M. Son et al. (2019) Comparisons of cancer-associated fibroblasts in the intratumoral stroma and invasive front in colorectal cancer / G. M. Son et al. Medicine. 2019. Vol. 98. Issue 18. P. e15164. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000015164.

22. Laklai, H.; Miroshnikova, Y.A.; Pickup, M.W.; Collisson, E.A.; Kim, G.E.; Barrett, A.S.; Hill, R.C.; Lakins, J.N.; Schlaepfer, D.D.; Mouw, J.K.; et al. Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. Nat. Med. 2016, 22, 497–505. [CrossRef]

23. J. Hanley et al. (2016), 15 A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers Oncotarget. 2016; 7:6159-6174. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6740 https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsvimentin.html

24. Hyun Ju Hwang, Min-Suk Oh, Dong Woo Lee, Hyo-Jeong Kuh Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate

cells J Exp Clin Cancer Res 2019 Jun 14;38(1):258. doi: 10.1186/s13046-019-1225-9. PMID: 31200779 PMCID: PMC6567511 DOI: 10.1186/s13046-019-1225-924.

25. Myoteri D, Dellaportas D, Lykoudis PM, Apostolopoulos A, Marinis A, Zizi-Sermpetzoglou A. Prognostic Evaluation of Vimentin Expression in Correlation with Ki67 and CD44 in Surgically Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Gastroenterol Res Pract. 2017:9207616. Published online 2017 Mar 22. doi: 10.1155/2017/9207616.

26. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. Faculty Rev. Research. 2018;7:1796. https://doi.org/10.12688/ f1000research.15967.

27. Meyer SN. Co-expression of cytokeratin and vimentin in colorectal cancer highlights a subset of tumor buds and an atypical cancer-associated stroma. Human Pathology. 2019;87:18-27. doi.org/10.1016/j.humpath.2019.02.002

28. Du L, Li J, Lei L. High vimentin expression predicts a poor prognosis and progression in colorectal cancer: a study with meta-analysis and TCGA database. Biomed Res Int. 2018;2018:6387810. DOI: 10.1155/2018/6387810.

29. Najafi M,, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. J. Cell Biochem. 2019;120:2782–90.

30. Wu Q, Tian Y, Zhang J, Zhang H, Gu F, Lu Y. Functions of pancreatic stellate cell-derived soluble factors in the microenvironment of pancreatic ductal carcinoma. Oncotarget. 2017;8:102721–38 doi: 10.18632/oncotarget.21970 PMCID: PMC5731993 PMID: 29254283.

31. Danielsson F. Vimentin Diversity in Health and Disease. Cells. 2018;7(10):147. doi.org/10.3390/cells7100147.

32. Maehira H, Miyake T, Iida H, Tokuda A, Mori H, Yasukawa D, Mukaisho K, Shimizu K, Tani M. Vimentin Expression in Tumor Microenvironment Predicts Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Heterogeneity in Fibroblast Population. Ann Surg Oncol. 2019;26(13):4791-4804. doi: 10.1245/s10434-019-07891-x.

33. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15:366–81. doi: 10.1038/s41571-018-0007-1.

Шишкін М.А., Кабаченко В.О. Особливості фіброзної строми в протоковій аденокарциномі підшлункової залози в залежності від розміру пухлини.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Протокова аденокарцинома підшлункової залози (ПАПЗ) відрізняється вираженою щільною фіброзною стромою. Існують суперечливі дані про роль фіброзної строми в канцерогенезі, так як остаточні механізми взаємодії ракових клітин і строми остаточно не вивчені. **Мета** роботи: обгрунтувати стратегічну значущість своєчасної комплексної оцінки гістохімічних та імуногістохімічних показників експресії мезенхімальних маркерів фіброзної строми (α-SMA, віментин) при ПАПЗ в пухлинах до 3 см та більше 3 см. **Методи.** Комплексне патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження 49 випадків операційного матеріалу (пухлини більше 3 та менше 3см) хворих на протокову аденокарциному підшлункової залози. Усі результати досліджень оброблені в програмі «STATISTICA 13.0» (StatSoft Inc., license No. JPZ804I382130ARCN10-J). **Результати.** При гістологічному дослідженні встановлено, що гістоархітектоніка ПАПЗ складається з раково-протокового компартменту та фіброзної строми. При гістохімічному дослідженні (забарвлення за методом Массон-трихром) виявлено достовірно значущий розвиток фіброзної строми в пухлинах більше 3 см - Me=73,15% (Q1=59,46; Q3=77,69), в пухлинах менше 3 см - Me=28,73% (Q1=15,88; Q3=42,43) ($p<0,05$). Збільшення площі фіброзної строми з прогресуванням онкопроцесу супроводжується достовірним зростанням експресії α-SMA в фібробластах та активованих панкреатичних зірчастих клітинах, які мали дифузне коричневе мембранно-цитоплазматичне забарвлення. Відносна площа маркеру в пухлинах менше 3 см склала Me=19,49% (Q1=12,71; Q3=28,85), в другій групі - Me=27,78% (Q1=18,03; Q3=34,24) ($p<0,05$). Експресія віментину також проявлялася дифузним мембранно-цитоплазматичним коричневим забарвленням у фібробластах та міофібробластах без достовірної різниці в групах. Відносна площа в першій групі - Me=27,62% (Q1=21,34; Q3=43,82), в другій групі - Me=24,39% (Q1=13,19; Q3=34,62) ($p>0,05$). **Підсумок**. ПАПЗ відрізняється суттєвим розвитком фіброзної строми, більш вираженим в пухлинах більше 3 см, де спостерігається суттєве превалювання фіброзної строми над раково-протоковим компартментом пухлини, в порівнянні з пухлинами менше 3 см.

Ключові слова: протокова аденокарцинома, підшлункова залоза, фіброзна строма, імуногістохімія, alpha-SMA, віментин.