

**FEATURES AND STAGING OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION
IN SMALL CELL CANCER OF LUNGS**

Lugansk State Medical University (Rivne, Ukraine)

yanchevskiyalex1985@gmail.com

Small cell lung cancer (SCLC), according to the modern morphological classification of the WHO (2021), is a separate histological type of lung cancer, the morphological criteria of which are the characteristics of cancers with epithelial-mesenchymal transformation (EMT). The study aimed to improve the morphological criteria for predicting the course of SCLC based on the EMT study at the molecular biological level. To determine the prognostic criteria of SCLC, research groups were formed: localized SCLC (L-SCLC) – cases of tumor localization within one area of the chest, including lymph nodes, and widespread forms (W-SCLC) – tumors with damage to the other lung, distant lymph nodes or bones and internal organs. An immunohistochemical (IHC) study of primary tumors was performed using monoclonal antibodies to pancytokeratin, vimentin, E-cadherin, and N-cadherin. The average time from diagnosis to death among L-SCLC was 19.7±1.9 months, among W-SCLC – 9.1±1.3 months. IHC signs of the EMT process in the form of expression of mesenchymal phenotype markers vimentin or N-cadherin were observed in 69.3% of SCLC. When comparing L-SCLC and W-SCLC, it was established that the presence of EMT is associated with widespread forms of SCLC ($p<0.01$), however, there was no correlation in the distribution of SCLC by stage of EMT. It has been proven that SCLC with signs of EMT have a shorter overall survival (OS) ($p<0.01$), and tumors of patients with OS less than 1 year in comparison with longer OS had more severe stages of EMT ($p<0.01$). EMT was established in 69.3% of SCLC, its appearance was characteristic of W-SCLC ($p<0.01$). Among L-SCLC, the presence of EMT was more often observed among metastasizing SCLC ($p<0.01$). The OS of patients depended on the presence of EMT ($p<0.01$) and its stage ($p<0.01$), which defines the IHC criteria of EMT SCLC as prognostically significant.

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

Connection of the publication with planned research works.

This publication is part of the research work of the Department of Pathological Anatomy of the Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education: "Pathohistological and immunohistochemical diagnosis and prognosis of malignant tumors of different localization, taking into account their biological properties and clinical course" (state registration number 0117U000594).

Introduction.

Small cell lung cancer (SCLC) accounts for about 15% of lung cancers and is one of the most aggressive malignant neoplasms among all tumors of the human body, in particular, it is characterized by rapid growth and metastasis, a temporary response to chemoradiotherapy [1]. SCLCs have features characteristic of cancers with epithelial-mesenchymal transformation (EMT): loss of intercellular connections, a structure of small immature rounded and spindle-shaped cells, characterized by high mitotic activity, initial sensitivity to chemotherapy and subsequent resistance to it [2]. EMT is a process of loss of epithelial characteristics by acquiring a mesenchymal phenotype. EMT promotes tumor invasion and cancer progression and is associated with metastasis and poorer survival in lung cancer patients [3]. Currently, the scientific literature mainly highlights the prognostic value of EMT in non-small cell lung cancer, while the data on the processes of EMT and its clinical significance (SCLC) remains insufficiently studied [3].

The aim of the study.

Improvement of morphological criteria for predicting the course of SCLC based on EMT research at the molecular-biological level.

Object and research methods.

39 SCLC cases of surgically removed and deceased patients after autopsy were selected. All studies were conducted in compliance with the main provisions of the GSR (1996), the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine (from 04.04.1997), the Helsinki Declaration of the World Medical Association on Ethical Principles of Scientific Medical Research with Human Participation (1964-2013), orders of the Ministry of Health of Ukraine No. 690 dated 23.09.2009, No. 616 dated 03.08.2012 and according to methodological recommendations and the "Procedure for the removal of biological objects from the dead, whose bodies are subject to forensic medical examination and pathological examination, for scientific purposes."

To determine the prognostic criteria of SCLC, research groups were formed: localized SCLC (L-SCLC) – cases of tumor localization within one area of the chest, including lymph nodes, and widespread forms of SCLC (W-SCLC) – tumors with damage to the other lung, distant lymphatic nodes or bones and internal organs at the time of diagnosis and verified morphologically. Separately, there was a division of L-SCLC into two subgroups – L-SCLC without lymph node metastases, 7 cases, and L-SCLC with metastases, 7 cases.

The average time from diagnosis to death was 10.5±1.3 months, the shortest was 1 month, the longest was 28 months. The average time from diagnosis to death among L-SCLC was 19.7±1.9 months, among W-SCLC – 9.1±1.3 months.

An immunohistochemical (IHC) study of primary tumors was performed using monoclonal antibodies to pancytokeratin, vimentin, E-cadherin, and N-cadherin. Staining 1% or more cancer cells was considered a pos-

itive reaction. A semi-quantitative scale was used to assess the degree of expressiveness of the IHC reaction: 0 – negative, 1 – weak, 2 – moderate, 3 – pronounced reaction with calculating the percentage of cells expressing the marker in the tumor.

The response was evaluated in 6 tumor zones – 3 central and 3 peripheral. Subsequently, for each tumor, a comparison of the difference between the level of expression of epithelial and mesenchymal markers was carried out with the calculation of the Mann-Whitney U-criterion, which made it possible to assign cancers to the appropriate stage of EMT: stage 0 – cancers without signs of EMT (do not express mesenchymal markers); 1 – cancers with signs of EMT, mainly epithelial phenotype (expression of epithelial markers significantly prevails overexpression of mesenchymal markers, $p < 0.05$); 2 – cancers with an intermediate epithelial phenotype (the expression of epithelial markers slightly prevails over the expression of mesenchymal markers, $p > 0.05$); 3 – cancers with an intermediate mesenchymal phenotype; 4 – cancers with a predominantly mesenchymal phenotype; 5 – cancers with a mesenchymal phenotype.

The relationship between traits was evaluated using the non-parametric Pearson's χ^2 test. The Kaplan-Meier procedure evaluated the overall survival (OS) analysis at a fixed time. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Research results.

EMT of SCLC was monitored, the degree of which we estimated by the co-expression of 4 markers. The response of epithelial phenotype markers pancytokeratin and E-cadherin was observed in 40% and 58.9% (16/39) of SCLC, respectively. Mesenchymal phenotype markers – vimentin and N-cadherin – appeared in 34% and 89%, respectively.

It was established that the epithelial immunophenotype without co-expression of mesenchymal markers was observed in 30.7% (12/39), corresponding to the absence of signs of EMT. Expression of one of the mesenchymal phenotype markers – vimentin or N-cadherin – was observed in 69.3%, respectively. Statistically significant predominance of the expression of markers of the epithelial phenotype over the mesenchymal, which corresponds to the 1 st. EMT was determined in 28.2% (11/39) of cases. The complete absence of expression of epithelial markers with a positive mesenchymal reaction was observed in one case (2.5%), in 2 cases (5.1%) the expression of mesenchymal markers statistically significantly prevailed over epithelial ones.

The relationship between the presence and stage of EMT and the prognosis of the disease was revealed. Thus, when comparing L-SCLC and W-SCLC, it was established that the appearance of EMT is associated with W-SCLC ($p < 0.01$). Thus, the absence of EMT was observed in 57.2% of L-SCLC and 16.0% of W-SCLC, while the appearance of EMT (stages 0-5) – in 42.8% and 84.0% (see table). As seen from the table, the difference between the study groups for each stage of EMT is smaller.

All 14 observations of L-SCLC had EMT stage from 0 to 2: stage 0 – in 7 cases, stage 1 – in 5 cases, stage 2 – in 2 cases. When comparing metastasizing L-SCLC with non-metastasizing ones according to the EMT stage criterion, a statistically significant difference was found

Table – Number of SCLC with signs of EMT among study groups

Signs	L-SCLC, n=14	W-SCLC, n=25	Certainty
0	8 (57,2%)	4 (42,8%)	χ^2 as amended by Yates = 5,4, $p=0,3$
1	4 (28,6%)	7 (28%)	
2	2 (14,2%)	6 (24%)	
3	0	5 (20%)	
4	0	2 (8%)	
5	0	1 (4%)	
Absence of EMT	8 (57,1%)	4 (16,0%)	$\chi^2=7,1, p<0,01$
EMT 1-5 st.	6 (42,9%)	21(84,0%)	

($\chi^2=7.3, p < 0.05$). Thus, the relative number of cases of EMT of stages 0, 1 and 2 among non-metastasizing SCLC was 85.7% (6/7), 14.3% (1/7), 0, among metastasizing 14.2% (1/7), 57.2% (4/7), 28.6% (2/7). Accordingly, the presence of EMT (1-2 stages) is associated with L-SCLC metastasis ($\chi^2=7.1, p < 0.01$).

A statistically significant relationship was observed between the presence of EMT, the stage of EMT and the term of the fatal outcome.

Thus, an inverse relationship was established between the term OS and the appearance of EMT ($\chi^2=7.6, p < 0.01$), as well as an increase in its degree when comparing observations with a flying effect up to 1 year and longer according to the stages of EMT ($\chi^2=16, 6, p < 0.01$) (see fig.). Thus, OS of more than 1 year was among all 7 cases of SCLC without signs of EMT. The relative number of observations with 1 stage of EMT was the same among cases with ZV more than 1 year and up to 1 year – 30% (6/20) and 30.6% (4/13), respectively. All patients with EMT stage 3-5 SCLC had an OS of less than 1 year. Accordingly, OS for more than 1 year was associated with the absence of SCLC EMT ($p < 0.001$), and death within 1 year was associated with stage 3-5 EMT ($p < 0.001$).

Discussion of research results.

EMT is observed among lung cancers at the very initial stages of tumor growth. According to Taichi Matsubara et al. [3], stage IA lung adenocarcinomas had vimentin and E-cadherin expression in 18.6% and 68.3%, respectively, and EMT had an effect on decreasing the OS of patients.

Much unclear and conflicting data remains regarding the morphological, molecular biological, genetic features, and clinical significance of EMT among SCLC.

According to morphological features at the level of world microscopy, EMT is characterized by processes of dissociation of epithelial cell junctions, loss of apical-basal polarity with the acquisition of anterior-posterior polarity, reorganization of architecture with changes in the cytoskeleton and shape of cells, increase in cell protrusions and mobility, increase in the ability of cells to proteolysis of the extracellular matrix and, accordingly, invasion [2, 4]. These features are primarily characteristic of SCLC, namely, these tumors consist of small, immature-looking cells with a rounded or spindle-shaped shape, loss of apical-basal polarity, irregular and discontinuous basal lamina, weak intercellular adhesion. Even one of the names of SCLC previously used was oat-cell sarcoma, emphasizing the mesenchymal morphology of the tumor [2].

Molecular characteristics of SCLC also show signs of EMT due to decreased expression of E-cadherin, in-

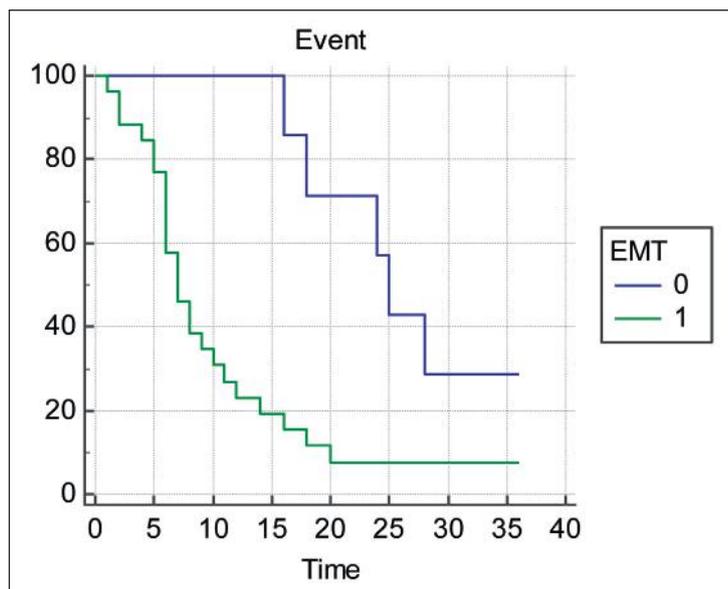


Figure – Overall survival of patients depending on the presence (1) and absence (0) of EMT ($p < 0.01$).

creased expression of N-cadherin and activity of metalloproteinases [2, 5, 6].

Many primary transcription factors can cause the downregulation of epithelial gene expression and activation of mesenchymal phenotype genes, including SNAIL transcription factors, zinc-finger E-box-binding (ZEB), basic helix–loop–helix transcription (bHLH), transforming factor signaling pathways growth-beta (TGF β), Notch, etc. [4].

Notch is a signaling pathway that determines intratumoral heterogeneity, the development of EMT, regulates neuroendocrine differentiation, proliferation, intercellular adhesion, and chemoresistance [7]. The loss of intercellular connections is realized through Notch1 regulation of E-cadherin expression. At the same time, chemotherapy and radiation therapy activate Notch signaling pathways, suppressing neuroendocrine differentiation, the emergence of EMT processes, and the development of chemoradiation resistance [2, 7, 8]. Also, the implementation of EMT and neuroendocrine differentiation is associated with ASCL1 (achaete-scute complex homologue 1), which Notch1 regulates in SCLC. SCLC also positively reacts to SNAIL, SLUG and ZEB2 [5].

There is no developed and unified method for assessing the appearance and degree of SCLC EMT, which may be due primarily to the different activity of the molecular manifestations of the process and the variability of the implementation of specific signaling pathways [9, 10]. EMT is a dynamic process, often found in part of the tumor cells and can be reversible under certain conditions. In addition, EMT is not a binary process with strictly defined epithelial or mesenchymal phenotypes but instead is defined by a spectrum of states from partial loss of epithelial characteristics, disruption of intercellular contacts, change in cell polarity, to a full stage in which mesenchymal genes increase

cell motility and invasive capacity by formation of lamellipodia [2, 4].

This work proposed determining the degree of EMT based on the appearance of immunohistochemical criteria of mesenchymal phenotype and statistical calculation of the ratio level between epithelial and mesenchymal characteristics in tumor cells.

It was shown that the degree of EMT among SCLC was variable, observed in 69.3% (27/39) and EMT was mostly intermediate or incomplete.

An important conclusion was the proven prognostic significance of EMT regarding the overall survival of patients and its influence on the spread of the tumor process.

According to isolated data in the scientific literature, certain molecular and biological signs of EMT impact the clinical course of SCLC. In particular, according to Li Xiao-Xia et al. [6] CXCR4, involved in CD133-induced EMT of lung cancers [11], is an independent prognostic factor for survival in SCLC patients.

Also unfavorable criteria for SCLC are a high expression level of MMP-9, TGF- β 1, flotillin-1, a decrease in the expression of E-cadherin, which are EMT factors [6, 12]. There are works based on the study of DCRL cell lines, which also prove the effect of EMT on the biological behavior of tumors [2, 13].

On the other hand, according to Pore M [14] SCLC with EMT, namely with high expression of c-MET and low E-cadherin, are characterized by longer OS and fewer circulating cancer cells.

The data we obtained allowed us to provide a more systematic approach to the assessment of SCLC EMT and to define it as an unfavorable prognostic criterion. The study's results make it possible to recommend separating SCLC into tumors with and without EMT and the expediency of determining its degree.

Conclusions.

1. IGC signs of the EMT process in the form of expression of mesenchymal phenotype markers vimentin or N-cadherin were observed in 69.3% of SCLC.

2. When comparing localized and widespread SCLC, it was established that EMT is associated with widespread forms of SCLC ($p < 0.01$), however, the absence of a correlation was found in the distribution of DCRL by stage of EMT.

3. Among the localized forms of SCLC, EMT was present in 50% (7/14) and was 1-2 stages. EMT among L-SCLC was associated with metastasis to regional lymph nodes ($p < 0.01$).

4. The overall survival rate of patients with SCLC depended on the presence of EMT ($p < 0.01$) and its stage ($p < 0.01$), which determines EMT of SCLC as a prognostic criterion of the disease.

Prospects for further research.

Currently, the study of the EMT processes of SCLC at the molecular-biological and genetic levels, using a wide range of IHC markers, remains relevant.

**ОСОБЛИВОСТІ ТА СТАДІЮВАННЯ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОЇ
ТРАНСФОРМАЦІЇ ДРІБНОКЛІТИННИХ РАКІВ ЛЕГЕНЬ**

Державний заклад «Луганський державний медичний університет» (м. Рівне, Україна)

yanchevskiyalex1985@gmail.com

Дрібноклітинні раки легень (ДКРЛ) відповідно до сучасної морфологічної класифікації ВООЗ (2021р) є окремим гістологічним типом РЛ, морфологічними критеріями яких є ознаки притаманні ракам з епітеліально-мезенхімальною трансформацією (ЕМТ). Метою дослідження було вдосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ДКРЛ на підставі дослідження ЕМТ на молекулярно-біологічному рівні. 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 (Р-ДКРЛ) – пухлини з ураженням іншої легені, віддалених лімфатичних вузлів чи кісток та внутрішніх органів. Проведено імуногістохімічне (ІГХ) дослідження первинних пухлин з використанням моноклональних антитіл до панцитокератину, віментину, Е-кадгерину, N-кадгерину. 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. ІГХ ознаки процесу ЕМТ у вигляді появи експресії маркерів мезенхімального фенотипу віментину чи N-кадгерину спостерігалось в 69,3% ДКРЛ. При порівнянні Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ встановлено, що наявність ЕМТ асоціюється з розповсюдженими формами ДКРЛ ($p < 0,01$), проте виявлено відсутність кореляційного зв'язку при розподіл ДКРЛ за стадією ЕМТ. Доведено, що ДКРЛ з ознаками ЕМТ мають коротший термін ЗВ ($p < 0,01$), також пухлини пацієнтів з ЗВ меншою до 1 року в порівнянні з ЗВ більшого терміну мали більш тяжкі стадії ЕМТ ($p < 0,01$). Наявність ЕМТ встановлена в 69,3% ДКРЛ, її поява була характерна для Р-ДКРЛ ($p < 0,01$). Серед Л-ДКРЛ наявність ЕМТ частіше спостерігалась серед метастазуючих ДКРЛ ($p < 0,01$). ЗВ пацієнтів залежала від наявності ЕМТ ($p < 0,01$) та її стадії ($p < 0,01$), що визначає ІГХ критерії ЕМТ ДКРЛ як прогностично значущі.

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

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Ця публікація є частиною науково-дослідної роботи кафедри патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти: «Патогістологічна та імуногістохімічна діагностика і прогноз зл�якісних пухлин різної локалізації з урахуванням їх біологічних властивостей та клінічного перебігу» (№ державної реєстрації 0117U000594).

Вступ.

Дрібноклітинні раки легень (ДКРЛ) становить близько 15% від раків легень та є однією з найбільш агресивних зл�якісних новоутворень серед усіх пухлин людського організму, зокрема характеризуються швидким ростом та метастазуванням, тимчасовою відповіддю до хіміопроменевої терапії [1]. ДКРЛ мають ознаки, притаманні ракам з епітеліально-мезенхімальною трансформацією (ЕМТ), а саме: втрата міжклітинних зв'язків, будова з дрібних незрілоподібних округлих та веретеноподібних клітин, характеризуються високою мітотичною активністю, початковою чутливістю до хіміотерапії з подальшою до неї резистентністю [2].

ЕМТ є процесом втрати епітеліальних характеристик з набуттям мезенхімального фенотипу. ЕМТ сприяє інвазії пухлини та прогресуванню раку, а також пов'язаний із метастазуванням і гіршою виживаністю пацієнтів на рак легень [3]. Наразі в науковій літературі переважно висвітлюється прогностичне значення ЕМТ недрібноклітинного раку легень, тоді як дані щодо процесів ЕМТ та його клінічного значення (ДКРЛ) залишається недостатньо дослідженим [3].

Мета дослідження.

Вдосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ДКРЛ на підставі дослідження ЕМТ на молекулярно-біологічному рівні.

Об'єкт і методи дослідження.

Були обрані 39 випадків ДКРЛ видалених хірургічно та після аутопсії померлих пацієнтів. Усі дослідження проведено з дотриманням основних положень GCP (1996), Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997), Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2013), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009, № 616 від 03.08.2012 та згідно методичних рекомендацій і «Порядку вилучення біологічних об'єктів від померлих, тіла яких підлягають судово-медичній експертизі і патологоанатомічному дослідженню, для наукових цілей».

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

Таблиця – Число ДКРЛ з ознаками ЕМТ серед груп дослідження

Ознаки	Л-ДКРЛ, n=14	Р-ДКРЛ, n=25	Достовірність
0	8 (57,2%)	4 (42,8%)	χ^2 з поправкою Йейтса = 5,4, p=0,3
1	4 (28,6%)	7 (28%)	
2	2 (14,2%)	6 (24%)	
3	0	5 (20%)	
4	0	2 (8%)	
5	0	1 (4%)	
Відсутність ЕМТ 1-5 ст.	8 (57,1%) 6 (42,9%)	4 (16,0%) 21(84,0%)	$\chi^2=7,1$, p<0,01

серед Л-ДКРЛ склав 19,7±1,9 місяців, серед Р-ДКРЛ – 9,1±1,3 місяців.

Проведено імуногістохімічне (ІГХ) дослідження первинних пухлин з використанням моноклональних антитіл до панцитокератину, віментину, Е-кадгерину, N-кадгерину. 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 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 значимим вважалось значення p<0,05.

Результати дослідження.

Простежено ЕМТ ДКРЛ, ступень якої ми оцінили за коекспресією 4х маркерів. Реакція маркерів епітеліального фенотипу панцитокератину та Е-кадгерину спостерігалась в 40% та 58,9% (16/39) ДКРЛ відповідно. Поява маркерів мезенхімального фенотипу – віментину та N-кадгерину – в 34% та 89% відповідно.

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. Так 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% (див. табл.). Як видно з таблиці, різниця між групами дослідження за кожною із стадій ЕМТ менша.

Всі 14 спостережень Л-ДКРЛ мали стадію ЕМТ від 0 до 2: 0 стадія – в 7 випадках, 1 стадія – 5 випадках, 2 стадія – в 2 випадках. При порівнянні метастазуючих Л-ДКРЛ з неметастазуючими за критерієм стадії ЕМТ – виявлена статистично значуща відмінність ($\chi^2=7,3$, p<0,05). Так відносне число випадків ЕМТ 0, 1, 2 стадій серед неметастазуючих ДКРЛ склало 85,7% (6/7), 14,3% (1/7), 0, серед метастазуючих 14,2% (1/7), 57,2% (4/7), 28,6% (2/7). Відповідно наявність ЕМТ (1-2 стадії) асоціюється з метастазуванням Л-ДКРЛ ($\chi^2=7,1$, p<0,01).

Простежена статистично значуща залежність між наявністю ЕМТ, а також стадією ЕМТ та терміном летального наслідку.

Так встановлена зворотна залежність між терміном ЗВ та появою ЕМТ ($\chi^2=7,6$, p<0,01), а також зростання її ступеню при порівнянні спостережень з літальним наслідком до 1 року та більшого терміну відповідно до стадій ЕМТ ($\chi^2=16,6$, p<0,01) (див. рис.). Так ЗВ більше 1 року була серед усіх 7 випадків ДКРЛ без ознак ЕМТ. Відносне число спостережень з 1 стадією ЕМТ 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 ЕМТ 3-5 стадії ДКРЛ мали ЗВ меншу за 1 рік. Відповідно, ЗВ більше за 1 рік асоціювалася з відсутністю ЕМТ ДКРЛ (p<0,001), а летальний наслідок впродовж 1 року – з 3-5 стадією ЕМТ (p<0,001).

Обговорення результатів дослідження.

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

Залишається багато нез'ясованих та суперечливих даних щодо морфологічних, молекулярно-біологічних, генетичних особливостей та клінічного значення ЕМТ серед ДКРЛ.

За морфологічними ознаками на рівні світової мікроскопії ЕМТ характеризується процесами дисоціації з'єднань епітеліальних клітин між собою, втратою апікально-базальної полярності з придбанням передньо-задньої полярності, реорганізацію архітектури зі зміною цитоскелету та форми клітин, збільшенням клітинних протрузій і рухливості, збільшенням здатності клітин до протеолізу позаклітинного матриксу та відповідно інвазії [2, 4]. Вказані ознаки є здебільше характерними для ДКРЛ, а саме ці пухлини складаються з дрібних незрілих на вигляд клітин з округлою чи веретеноподібною формою, втратою апікально-базальної полярності, нерегулярною та переривчастою базальною пластинкою, слабкою міжклітинною адгезією. Навіть одною з назв ДКРЛ, що раніше використовувалася, була віссяноклітин-

на саркома, що підкреслює мезенхімальну морфологію пухлини [2].

Молекулярні характеристики ДКРЛ також демонструють ознаки EMT за рахунок зниження експресії E-кадгерину, підвищена експресія N-кадгерину та активності метало-протеїназ [2, 5, 6].

Зниження регуляції експресії епітеліальних генів і активація генів мезенхімального фенотипу може бути обумовленим низкою основних факторів транскрипції, включаючи фактори транскрипції SNAIL, zinc-finger E-box-binding (ZEB), basic helix-loop-helix transcription (bHLH), сигнальними шляхами трансформуючого фактору росту-beta (TGF β), Notch, тощо [4].

Notch є сигнальним шляхом, який обумовлює внутрішньопухлинну гетерогенність, розвиток EMT, регулює нейроендокринне диференціювання, проліферацію, міжклітинну адгезію та хіміорезистентність [7]. Втрата міжклітинних зв'язків реалізується через регуляцію Notch1 експресії E-кадгерину. При цьому хіміо- та променева терапія активує Notch сигнальні шляхи, що має супресивний ефект до нейроендокринного диференціювання, появи процесів EMT та розвитку хіміопрорезистентності [2, 7, 8]. Також реалізація EMT та нейроендокринного диференціювання пов'язана з ASCL1 (achaete-scute complex homologue 1), що регулюється Notch1 в ДКРЛ. ДКРЛ також демонструють позитивну реакцію до SNAIL, SLUG та ZEB2 [5].

Не є розробленою та уніфікованою методика оцінки появи та оцінка ступеню EMT ДКРЛ, що може бути обумовлено перш за все різною активністю молекулярних проявів процесу та варіабельністю реалізації тих чи інших сигнальних шляхів [9, 10]. EMT є динамічним процесом, часто виявляється в частині клітин пухлини та за певних умов може бути оборотним. Крім того, EMT не є бінарним процесом зі строго визначеним епітеліальним чи мезенхімальним фенотипами, а натомість визначається спектром станів від часткової втрати епітеліальних характеристик, порушенням міжклітинних контактів, зміною клітинної полярності, до повної стадії, на якій мезенхімальні гени збільшують рухливість клітин та інвазивну здатність шляхом утворення ламеліподій [2, 4].

В даній роботі було запропоновано визначення ступеню EMT за ознаками появи імуністохімічних критеріїв мезенхімального фенотипу та статистичного підрахунку рівня співвідношення між епітеліальними та мезенхімальними характеристиками в клітинах пухлини.

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

Важливим висновком стало доведена прогностична значущість EMT щодо загальної виживаності пацієнтів, та її вплив на розповсюдженість пухлинного процесу.

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 [11], є незалеж-

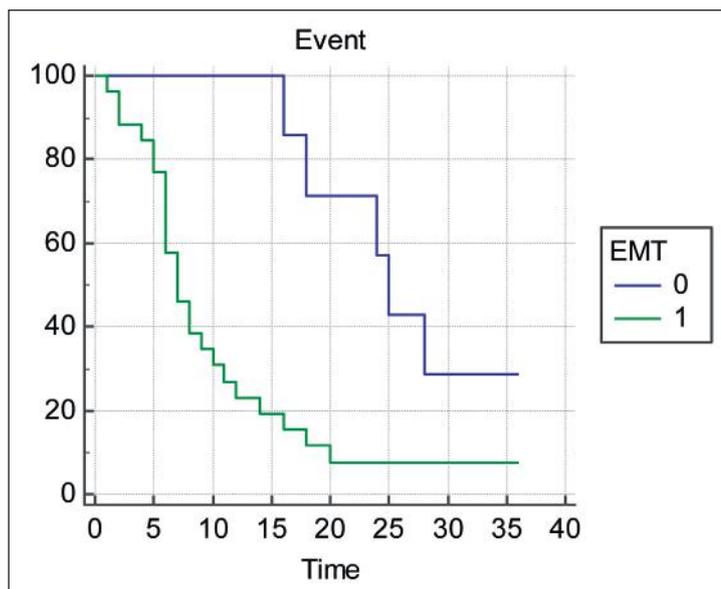


Рисунок – Загальна виживаність пацієнтів в залежності від наявності (1) та відсутності (0) EMT ($p < 0,01$).

ним прогностичним фактором виживаності пацієнтів на ДКРЛ. Також несприятливими критеріями ДКРЛ є високий рівень експресії MMP-9, TGF- β 1, flotillin-1, зниження експресії E-кадгерину, які є факторами EMT [6, 12]. Існують роботи на підставі дослідження ліній клітин ДКРЛ, що також доводять вплив EMT на біологічну поведінку пухлин [2, 13]. З іншого боку, за даними Pore M [14] ДКРЛ з EMT, а саме з високою експресією c-MET та низькою E-кадгерину – характеризуються довшою ЗВ та меншою кількістю циркулюючих ракових клітин.

Отримані нами дані дозволили надати більш систематизованого підходу до оцінки EMT ДКРЛ та визначити його як несприятливий критерій прогнозу. Отримані результати дослідження дозволяють робити рекомендації щодо відокремлення ДКРЛ на пухлини з та без EMT та доцільність визначати її ступінь.

Висновки.

1. ІГХ ознаки процесу EMT у вигляді появи експресії маркерів мезенхімального фенотипу віментину чи N-кадгерину спостерігалось в 69,3% ДКРЛ.

2. При порівнянні локалізованих та розповсюджених ДКРЛ встановлено, що наявність EMT асоціюється з розповсюдженими формами ДКРЛ ($p < 0,01$), проте виявлено відсутність кореляційного зв'язку при розподіл ДКРЛ за стадією EMT.

3. Серед локалізованих форм ДКРЛ EMT була присутня в 50% (7/14) та була 1-2 стадій. Наявність EMT серед Л-ДКРЛ асоціювалося з метастазуванням у регіонарні лімфатичні вузли ($p < 0,01$).

4. Показник загальної виживаності пацієнтів на ДКРЛ залежав від наявності EMT ($p < 0,01$) та її стадії ($p < 0,01$), що визначає EMT ДКРЛ як прогностичний критерій захворювання.

Перспективи подальших досліджень.

Наразі актуальним залишається дослідження процесів EMT ДКРЛ на молекулярно-біологічному та генетичному рівнях, використання широкого спектру ІГХ маркерів.

- Lokuhetty D. Thoracic tumours. WHO Classification of Tumours. Vol. 5. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. 565 p. Available from: <https://publications.iarc.fr/595>.
- Ito T, Kudo 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](https://doi.org/10.1007/s13577-016-0149-3).
- Taichi M, Tetsuzo T, Kazuki T, Gouji T, Mototsugu S, Yuka K, et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2019.04.006>.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15:178-96.
- Galva'n JA, Astudillo A, Vallina A, Crespo G, Folgueras MV, Gonzalez MV1. Prognostic and diagnostic value of epithelial to mesenchymal transition markers in pulmonary neuroendocrine tumors. BMC Cancer. 2014;14:855. DOI: [10.1186/1471-2407-14-855](https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-855).
- Li XX, Li RJ, Zhao LJ, Liu NB, Wang P. Expression of molecular factors correlated with metastasis in small cell lung cancer and their significance. Int J Clin Exp Pathol. 2015;8:14676-84.
- Lim JS, Ibaseta A, Fischer MM, Cancilla B, O'Young G, Cristea S, et al. Intratumoural heterogeneity generated by Notch signalling promotes small-cell lung cancer. Nature. 2017;545:360-4.
- Marignol L. Notch signalling: the true driver of small cell lung cancer? Transl Cancer Res. 2017;6(7):S1191-S1196.
- Karacosta LG, Anchang B, Ignatiadis N, Kimmey SC, Benson JA, Shrager JB, et al. Mapping lung cancer epithelial-mesenchymal transition states and trajectories with single-cell resolution. Nat Commun. 2019;10:5587. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13441-6>.
- Chakraborty P, George J, Tripathi S, Levine H, Jolly M. Comparative Study of Transcriptomics-Based Scoring Metrics for the Epithelial-Hybrid-Mesenchymal Spectrum. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2020;8:220. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00220>.
- Tu Z, Xie S, Xiong M, Liu Y, Yang X, Tembo K, et al. CXCR4 is involved in CD133-induced EMT in non-small cell lung cancer. International journal of oncology. 2017;50(2):505-514. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3812>.
- Zhao L, Li J, Liu Y, Zhou W, Shan Y, Fan X, et al. 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](https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0053).
- Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. Nat Rev Cancer. 2019 May;19(5):289-297.
- Pore M, Meijer C, de Bock GH, Boersma-van Ek W, Terstappen LW, Groen HJ, et al. Cancer stem cells, epithelial to mesenchymal markers, and circulating tumor cells in small cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2016;17:535-542.

ОСОБЛИВОСТІ ТА СТАДІЮВАННЯ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДРІБНОКЛІТИННИХ РАКІВ ЛЕГЕНЬ

Янчевський О. В.

Резюме. Дрібноклітинні раки легень (ДКРЛ) становить близько 15% від раків легень та є однією з найбільш агресивних злоякісних новоутворень серед усіх пухлин людського організму, що має морфологічні ознаки, притаманні ракам з епітеліально-мезенхімальною трансформацією (EMT).

Мета дослідження – вдосконалення морфологічних критеріїв прогнозу перебігу ДКРЛ на підставі дослідження EMT на молекулярно-біологічному рівні.

Об'єкт і методи дослідження. Сформовані група локалізованих ДКРЛ (Л-ДКРЛ) – при пухлинному рості в межах однієї ділянки грудної клітини, та розповсюджених форми ДКРЛ (Р-ДКРЛ) – при ураженні іншої легені, віддалених лімфатичних вузлів чи внутрішніх органів. Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження проводилось з використанням моноклональних антитіл до панцитокератину, віментину, Е-кадгерину, N-кадгерину.

Результати. Реакція маркерів епітеліального фенотипу панцитокератину та Е-кадгерину спостерігались в 40% та 58,9% ДКРЛ відповідно. Поява маркерів мезенхімального фенотипу – віментину та N-кадгерину – в 34% та 89% відповідно. Встановлено, що епітеліальний імунофенотип без коекспресії мезенхімальних маркерів спостерігався в 30,7% (12/39), що відповідало відсутності ознак EMT. При порівнянні Л-ДКРЛ та Р-ДКРЛ встановлено, що наявність EMT асоціюється з розповсюдженими формами ДКРЛ ($p < 0,01$), проте виявлено відсутність кореляційного зв'язку при розподіл ДКРЛ за стадією EMT. 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. Встановлена зворотну залежність між терміном ЗВ та появою EMT ($\chi^2 = 7,6$, $p < 0,01$), а також зростання її ступеню при порівнянні спостережень з летальним наслідком до 1 року та більшого терміну відповідно до стадій EMT ($\chi^2 = 16,6$, $p < 0,01$).

Висновки. ІГХ ознаки процесу EMT спостерігались в 69,3% ДКРЛ. Наявність EMT асоціюється з Р-ДКРЛ ($p < 0,01$). Наявність EMT серед Л-ДКРЛ асоціювалося з метастазуванням у регіонарні лімфатичні вузли ($p < 0,01$). Показник загальної виживаності пацієнтів на ДКРЛ залежав від наявності EMT ($p < 0,01$) та її стадії ($p < 0,01$), що визначає EMT ДКРЛ як прогностичний критерій захворювання.

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

FEATURES AND STAGING OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IN SMALL CELL CANCER OF LUNGS

Yanchevskiy O. V.

Abstract. Small cell lung carcinoma (SCLC) representing 15% of all lung cancers and is one of the most aggressive malignant tumor among all tumors of human body, which has features relevant to cancers with epithelial-to-mesenchymal transformation (EMT).

The aim of our study to improve morphological criteria for the prognosis of SCLC based on the study of EMT at the molecular-biological level.

Materials and methods. A group of localized SCLC (L-SCLC) was formed – in cases with tumor growth within one area of the chest, and extensive forms of SCLC (E-SCLC) – with tumor spread into the other lung, with metastases in distant lymph nodes, or visceral organs. Immunohistochemical (IHC) research was made using monoclonal antibodies to pancytokeratin, vimentin, E-cadherin, and N-cadherin.

The results. The expression of epithelial phenotype markers pancytokeratin and E-cadherin was observed in 40% and 58.9% of SCLC, respectively. Appearance of mesenchymal phenotype markers – vimentin and N-cadherin

– in 34% and 89%, respectively. It was established that the epithelial immunophenotype without co-expression of mesenchymal markers was observed in 30.7% (12/39), which corresponded to the absence of signs of EMT. During comparing L-SCLC and E-SCLC, it was defined that the presence of EMT is associated with extensive forms of SCLC ($p < 0.01$), however, the absence of correlation was found during SCLC distribution according to the stage of EMT. The average term from diagnosis to death among L-SCLC was 19.7 ± 1.9 months, among E-SCLC – 9.1 ± 1.3 months. An inverse correlation was found between the term of the OS and the appearance of EMT ($\chi^2 = 7.6$, $p < 0.01$), as well as an increase in EMT stage during comparing cases with lethal outcome up to 1 year and longer according to the stages of EMT ($\chi^2 = 16.6$, $p < 0.01$).

Conclusions. IHC signs of EMT process were observed in 69.3% of SCLC. The presence of EMT is associated with E-SCLC ($p < 0.01$). The presence of EMT among L-SCLC was associated with metastasis to regional lymph nodes ($p < 0.01$). The overall survival rate of patients with SCLC depended on the presence of EMT ($p < 0.01$) and its stage ($p < 0.01$), which determines EMT of SCLC as a prognostic feature of the disease.

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

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Yanchevskiy O. V.: [0000-0002-1243-598X](https://orcid.org/0000-0002-1243-598X)^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Yanchevskiy Oleksandr Valeriyovych / Янчевський Олександр Валерійович

Lugansk State Medical University / Державний заклад «Луганський державний медичний університет»

Ukraine, 33028, Rivne, 16 Lypnya 36 str / Адреса: Україна, 33028, м. Рівне, вул. 16 Липня 36

Tel.: +380954562139 / Тел.: +380954562139

E-mail: yanchevskiyalex1985@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 16.08.2022 / Стаття надійшла 16.08.2022 року
Accepted 01.02.2023 / Стаття прийнята до друку 01.02.2023 року