

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ШИШКІН МАКСИМ АНДРІЙОВИЧ



УДК: 616.345-006.5/006.6]-091.8-008.9-092.18

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ
ПАРАМЕТРИ ПРОГРЕСУВАННЯ ПОЛІПІВ ТА
РАКУ ТОВСТОЇ КИШКИ**

14.03.02 – патологічна анатомія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Запоріжжя – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий консультант – заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Туманський Валерій Олексійович**, проректор з наукової роботи, професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

Офіційні опоненти:

заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Шпонька Ігор Станіславович**, перший проректор, професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини Дніпровського державного медичного університету МОЗ України;

заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Гичка Сергій Григорович**, завідувач кафедри патологічної анатомії №2 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України;

доктор медичних наук, професор **Яковцова Ірина Іванівна**, завідувач кафедри патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України.

Захист відбудеться « 13 » травня 2021 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету МОЗ України (69035, м. Запоріжжя, просп. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 31 » березня 2021 року.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.мед.н., доцент



Т.В. Іваненко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Колоректальна аденокарцинома (КРА) є найбільш поширеною злоякісною пухлиною шлунково-кишкового тракту, при якій виживаність хворих залежить від її діагностики та радикального лікування на ранніх стадіях розвитку пухлини. П'ятирічна виживаність лікованих хворих з першою стадією КРА сягає 90 %, в той час як за наявності метастатичного ураження цей показник коливається в діапазоні 10-20 % [Ravla P. et al., 2019].

Предметом актуальних патоморфологічних досліджень останніх років є діагностичні параметри товстокишкових поліпів і аденом та їх взаємозв'язок з розвитком КРА. Сьогодні відомо, що певні різновиди товстокишкових поліпів не мають злоякісного потенціалу і ніколи не трансформуються в рак [Anderson J. C. et al., 2018]. Є також поліпи, що мають злоякісний потенціал, і їх трансформація в КРК є лише питанням часу. На сьогодні відомо два основні шляхи малігнізації таких поліпів – послідовність «аденома – карцинома» і зубчастий шлях, що активуються у випадках трансформації аденом і зубчастих поліпів, відповідно [Asadzadeh Aghdaei H. et al., 2018]. Проте, питання оцінки потенціалу злоякісності виявленого поліпа все ще лишаються відкритим. Поки що не виконані систематизовані імуногістохімічні (ІГХ) дослідження кожного гістологічного варіанту епітеліальних поліпів товстої кишки. Недостатньо вивчені закономірності змін активності проліферації та апоптозу, неоангіогенезу і стовбурових клітин в прогресуванні товстокишкових поліпів.

Незважаючи на певні успіхи, пов'язані із впровадженням скринінгових програм ранньої діагностики КРА та вдосконаленням техніки ендоскопічного дослідження товстої кишки, залишається остаточно не вирішеною низка питань стосовно патоморфологічного прогнозування прогресування КРА, особливо – в колонобіоптатах хворих. Основним є те, що гістологічне дослідження біопсійного матеріалу, вилученого при колоноскопії, не дає можливості точно визначити стадію КРА та наявність метастазів. Ці питання частково вирішуються при комп'ютерній томографії, а остаточно – при хірургічному видаленні пухлини та при поглибленому патоморфологічному дослідженні операційного матеріалу. Проте, потенційна можливість ранньої доопераційної діагностики стадії КРА, базуючись на дослідженні біоптатів первинної пухлини, є перспективною для визначення оптимальної тактики індивідуалізованого передопераційного променевого або хіміопроменевого лікування хворих та наступного радикального хірургічного вилучення злоякісної пухлини. Окрім того, в усьому світі сьогодні інтенсивно розробляються молекулярно-генетичні (МГ) та ІГХ параметри прогнозування перебігу КРП [Siegel R. L. et al., 2020]. Найбільш перспективними є ІГХ дослідження ролі стовбурових клітин та епітеліально-мезенхімальної трансформації в прогресуванні КРА, а також МГ дослідження активності генів, що відповідають за реалізацію інвазивно-метастатичного потенціалу ракових клітин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом двох НДР Запорізького державного медичного університету «Раннє молекулярно-генетичне та імуногістохімічне прогнозування схильності до прогресування раку легенів та органів травлення» 2017–2019 рр (№ державної реєстрації 0117U002580) та «Коморбідні стани, серцево-судинні та онкологічні захворювання в загальноклінічній практиці: розробка сучасних діагностичних та лікувальних заходів» 2020-2023рр (№ державної реєстрації 0120U101587). Тема дисертації затверджена вченою радою Запорізького державного медичного університету 19 квітня 2016 року (протокол № 9 від 19/04.2016 р.) та ПК МОЗ та НАМН України «Морфологія людини» (протокол № 26 від 20.06.2016 р.).

Мета дослідження: удосконалити патоморфологічне прогнозування прогресування аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки та агресивного перебігу колоректального раку на основі молекулярно-генетичного та імуногістохімічного аналізу біопсійного і операційного матеріалу.

Завдання дослідження:

1. Визначити і порівняти імуногістохімічні параметри проліферативно-апоптотичних властивостей та неоангіогенезу в аденомах дистальної товстої кишки (тубулярних, ворсинчастих, тубуло-ворсинчастих) низького та високого ступеня дисплазії.

2. Вивчити і порівняти імуногістохімічні особливості зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки (гіперпластичних поліпів, традиційних зубчастих аденом, зубчастих утворень на широкій основі) низького та високого ступеня дисплазії.

3. Охарактеризувати особливості імуногістохімічної експресії маркерів стовбурових клітин в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки низького та високого ступеня дисплазії.

4. Порівняти імуногістохімічні параметри проліферативно-апоптотичних властивостей, неоангіогенезу та стовбурових клітин в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки високого ступеня дисплазії з аналогічними параметрами високодиференційованої колоректальної аденокарциноми.

5. В паралельному дослідженні вивчити і порівняти рівні експресії мРНК генів *KRAS*, *Ki-67*, *TP53* та імуногістохімічної експресії маркерних білків проліферації і апоптозу в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її прогресування.

6. Провести паралельне молекулярно-генетичне дослідження рівнів експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1* та імуногістохімічної експресії кодованих ними білків міжклітинної адгезії (E-кадгерину і β -катеніну) в динаміці стадійного прогресування колоректальної аденокарциноми.

7. Вивчити зміни імуногістохімічних параметрів муцинового фенотипу та неоангіогенезу на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми.

8. Визначити зміни імуногістохімічних показників епітеліо-мезенхімальної трансформації в динаміці прогресування колоректальної аденокарциноми

9. Дослідити особливості імуногістохімічної експресії маркерів стовбурових клітин в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її прогресування.

10. Визначити основні молекулярно-генетичні і імуногістохімічні відмінності метастатичної колоректальної аденокарциноми товстої кишки від неметастатичної карциноми.

Об'єкт дослідження: аденоми і зубчасті новоутворення товстої кишки, колоректальна аденокарцинома.

Предмет дослідження: проліферативно-апоптотичні властивості, неоангіогенез та стовбурові клітини в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки різного ступеня дисплазії; зміни молекулярно-імуногістохімічних показників проліферації, апоптозу і мезенхімально-епітеліальної трансформації та параметрів муцинового фенотипу, неоангіогенезу і стовбурових клітин на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми.

Методи дослідження: гістологічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, морфометричні (МФМ) дослідження біопсійного матеріалу новоутворень дистальної товстої кишки (ДТК) і операційного матеріалу колоректальної аденокарцином для визначення дисплазії і стовбурових клітин, проліферативно-апоптотичних, муцин-фенотипічних та інвазивних властивостей клітин новоутворень, мезенхімально-епітеліальної трансформації та неоангіогенезу; статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в порівняльному аналізі визначені імуногістохімічні параметри проліферації та апоптозу, експресії маркерів неоангіогенезу та стовбурових клітин в кожному гістологічному виді аденом і зубчастих утворень дистальної товстої кишки (за останньою класифікацією ВООЗ 2019 р.). Подальшого розвитку набуло положення про важливу роль стовбурових клітин в прогресуванні тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом: встановлено що при зростанні ступеня дисплазії епітелію від низького до високого в цих аденомах достовірно зростає експресія ЕрСМ епітеліоцитами та кількість ALDH1-позитивних епітеліоцитів і клітин строми (на тлі незмінної експресії маркерів неоангіогенезу). Визначено, що в гіперпластичних поліпах, традиційних зубчастих аденомах і зубчастих утвореннях на широкій основі при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня достовірно зростають імуногістохімічні показники проліферативно-апоптотичної активності клітин та не змінюються рівні експресії VEGF-A і VEGFR-2.

Вперше в паралельних молекулярно-генетичних (методом ПЛР) і імуногістохімічних дослідженнях визначені найбільш значущі відмінності

транскрипційної активності генів *Ki-67*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS* та проліферативно-апоптотичних властивостей клітин, експресії маркерів епітеліально-мезенхімальної трансформації, неоангіогенезу ракових і стромальних стовбурових клітин, які визначаються на I, II, III і IV TNM стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми. Уточнені дані щодо змін муцинового фенотипу колоректальної аденокарциноми (за рівнями експресії MUC1, MUC2, MUC4 та Cdx-2) на I, II і III TNM стадіях її прогресування. Нового змісту набула концепція прогресування колоректальної аденокарциноми: доведено, що значна активація епітеліо-мезенхімальної трансформації та ракових і стромальних стовбурових клітин має місце вже на II стадії розвитку пухлини і в подальшому зростає до IV стадії прогресування карциноми.

Отримані нові дані щодо відмінностей неметастатичної та метастатичної колоректальної аденокарциноми, згідно з якими метастатична карцинома відрізняється нижчим рівнем експресії мРНК гену *Ki-67* та нижчим рівнем проліферації клітин, вищою транскрипційною активністю генів *TP53* і *KRAS*, вищою експресією онкопротеїну p53 і маркерів неоангіогенезу, та вищим рівнем маркерів епітеліально-мезенхімальної трансформації, а також більшим відсотком ракових та стромальних стовбурових клітин.

Отримано патент України на корисну модель «Спосіб прогнозування схильності до прогресування зубчастих поліпів дистальної товстої кишки».

Практичне значення одержаних результатів. Для практичного використання в патологоанатомічній діагностиці встановлені відмінності імуногістохімічних параметрів клітинної проліферації та апоптозу, неоангіогенезу та стану стовбурових клітин, які визначаються при прогресуванні колоректальних тубулярних, ворсинчастих, тубуло-ворсинчастих аденом, а також гіперпластичних поліпів, традиційних зубчастих аденом та зубчастих утворень на широкій основі (*sessile serrated lesion*). Результати проведених досліджень довели, що колоректальні традиційні і зубчасті аденоми та гіперпластичні поліпи з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої G1 колоректальної аденокарциноми I-II стадії достовірно нижчими показниками експресії *Ki-67*, p53, VEGF-A, VEGFR-2 і значно меншою кількістю клітин з стовбуровими властивостями.

Визначена сукупність показників транскрипційної активності генів *Ki-67*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS* та імуногістохімічних параметрів проліферації, апоптозу, епітеліально-мезенхімальної трансформації, неоангіогенезу, вісотку ракових і стромальних стовбурових клітин, яка може бути застосована в обласних патологоанатомічних бюро, патологоанатомічних відділеннях КНП, НДІ і онкологічних диспансерах для уточнення прогнозу колоректального раку та вибору оптимальної тактики лікування хворих.

Результати дисертаційного дослідження з позитивним діагностичним ефектом впроваджені в практичну роботу КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро» ООР, КНП «Чернігівське обласне патологоанатомічне

бюро» ЧОР, КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро» ДОР, КУ «Запорізьке обласне бюро судово-медичної експертизи» ЗОР. Нові теоретичні положення дисертації використовуються в навчальному процесі на кафедрах патологічної анатомії Харківського національного медичного університету МОЗ України, Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, кафедрі патологічної анатомії Сумського державного університету МОН України, на кафедрі патологічної анатомії з секційним курсом «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава), на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, на кафедрі патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

Особистий внесок дисертанта. Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим консультантом визначена тема, мета і завдання роботи. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук і аналіз літератури, а також патогістологічні, ІГХ і МФМ дослідження матеріалу всіх хворих; провів статистичний аналіз отриманих даних, систематизував та інтерпретував отримані результати; написав всі розділи дисертації; сформулював висновки та практичні рекомендації. МГ дослідження патоморфологічного матеріалу виконані дисертантом в ПЛР-лабораторії Запорізького державного медичного університету (свідоцтво про технічну компетентність № 033/18 від 26 грудня 2018р.). У наукових працях, опублікованих у співавторстві, викладено матеріал досліджень здобувача, не були використані результати та ідеї співавторів.

Апробація результатів дисертації. Апробація дисертації відбулась на засіданні кафедр патологічної анатомії і судової медицини; онкології та онкохірургії; анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; гістології, цитології та ембріології; патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології; мікробіології, вірусології та імунології; клінічної лабораторної діагностики Запорізького державного медичного університету МОЗ України 21.01.2021р.

Основні положення роботи були представлені та обговорені на X Конгресі патологів України «Перспективи розвитку сучасної патології» (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 р.); III Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.); IV International Scientific and Practical Conference «Actual trends of modern scientific research» (Munich, Germany, October 11-13, 2020); III International Scientific and Practical Conference «The world of science and innovation» (London, United Kingdom, October 14-16, 2020); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, 4-6 листопада 2020 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука у практику охорони здоров'я» (м. Полтава, 27 листопада 2020 р.).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 28 наукових праць, серед яких 18 статей у провідних фахових журналах України (з них 7 – без співавторів) і 3 статті в закордонному науковому фаховому журналі, що індексуються міжнародними наукометричними базами, зокрема 10 з них в базі Web of Science CC; 6 тез в матеріалах міжнародних і всеукраїнських науково-практичних конференцій. Отримано 1 патент України на корисну модель № 128509.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 311 сторінках машинопису і складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Робота ілюстрована 89 рисунками та 31 таблицею. Список літератури містить 227 джерел (19 кирилицею та 208 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Виконано комплексне патоморфологічне вивчення операційного матеріалу видаленої колоректальної аденокарциноми (КРА) 120 осіб 39-91 років, які склали I групу досліджень; біопсійного матеріалу новоутворень (аденом і поліпів) ДТК 110 пацієнтів віком 25-87 років, які склали II групу досліджень, а також секційного матеріалу незміненої слизової оболонки (НСО) дистальної товстої кишки 10 померлих хворих 22-38 років без наявності онкологічних захворювань, які склали III групу умовного контролю.

В I групі досліджень, відповідно до TNM стадій прогресування КРА, виділені 4 підгрупи: 1 підгрупа – I стадія КРА ($T_{1-2} N_0 M_0, G_{1-2}$), 24 випадки; 2 підгрупа – II стадія КРА ($T_{3-4} N_0 M_0, G_{1-3}$), 32 випадки; 3 підгрупа – III стадія КРА ($T_{1-4} N_{1-3} M_0, G_{2-4}$), 36 випадків; 4 підгрупа – IV стадія КРА ($T_{1-4} N_{1-3} M_1, G_{2-4}$), 28 випадків. В цій групі вивчені ІГХ і молекулярно-генетичні параметри неметастатичної карциноми (56 випадків КРА I і II стадій) та метастатичної карциноми (64 випадки КРА III і IV стадій) з наявністю регіонарних та / або віддалених метастазів.

II групу новоутворень ДТК склали підгрупа з 56 аденом ДТК: тубулярні (28 випадків), ворсинчасті (14 випадків) та тубуло-ворсинчасті аденоми (14 випадків); а також підгрупа з 54 зубчастих утворень ДТК: традиційні зубчасті аденоми (16 випадків), гіперпластичні поліпи (24 випадків) та зубчасті новоутворення на широкій основі (14 випадків). В цій групі вивчені зубчасті новоутворення на широкій основі (7 випадків), аденоми, поліпи і зубчасті утворення з легкою low-grade дисплазією (55 випадків), а також аденоми і поліпи з дисплазією епітелію високого ступеня (48 випадків).

Дифференційно-діагностичні параметри новоутворень ДТК з дисплазією епітелію високого ступеня і високодиференційованої КРА вивчені в підгрупі аденом і гіперпластичних поліпів ДТК (48 випадків) і в підгрупі високодиференційованої G_1 неметастатичної КРА (28 випадків).

МГ дослідження виконані методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в матеріалі 50 осіб: у видаленій КРА 40 хворих (КРА I, II, III, IV стадій – по 10 випадків) і в 10 зразках секційного матеріалу НСО дистальної товстої кишки.

Для гістологічних, ІГХ і МФМ досліджень шматочки шматочки КРА, новоутворень ДТК, НСО фіксували в 10 % забуференому формаліні, заливали в парафін. З парафінових блоків на прецезійному ротаційному мікротомі НМ 3600 («MICROM Laborgerate GmbH» – Німеччина) виготовляли серійні стандартні зрізи завтовшки 4 μ m, які розміщали на звичайні предметні скельця для оглядового мікроскопічного дослідження та на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» («DAKO», Данія) для проведення ІГХ досліджень. При мікроскопічному дослідженні зрізів, забарвлених гематоксином та еозином, визначали: тип новоутворень ДТК, наявність дисплазії епітелію та її ступінь; ступінь гістологічного диференціювання КРА та глибину її інвазії, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах та віддалених метастазів. Слизоутворення епітеліоцитами та раковими клітинами визначали ШИК-реакцією.

В ІГХ дослідженнях депарафінізацію, регідратацію та високотемпературне демаскування антигенів проводили в РТ-модулі з використанням NIER буферу (pH=9,0), після чого пригнічували активність ендогенної пероксидази 3 % розчином перекису водню та наносили блокуючу сироватку. Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників, візуалізацію ІГХ-реакції виконували з використанням системи детекції DAKO EnVision+ System з діамінобензидином («DAKO», США). Зрізи дозбарвлювали гематоксином Майєра та заключали в канадський бальзам. Використовували наступні антитіла: *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6* («DAKO», Данія); *Mo a-Hu p53 Protein, Clone SP5* («DAKO», Данія); *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP* («ThermoScientific», США); *Mo a Hu Mucin 2 (MUC2) Ab-2, Clone M53* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Po Rb A-Hu MUC4* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a Hu Mucin 5AC (MUC5AC), Clone 45M1* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a Hu CDX2, Clone DAK-CKX2* («DAKO», Данія); *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone 43 EP 700 Y* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a Hu Beta-Catenin* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США); *Mo a-Hu Cytokeratin 20, Clone Ks20.8* (ThermoScientific, США), *Mo a Hu Vimentin Ab-2* (ThermoScientific, США), *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4* (ThermoScientific, США); *Mo a-Hu VEGF Ab-3, Clone JH121* (ThermoScientific, США), *Rb a Hu VEGFR-1* (abcam, Великобританія), *Rb a Hu VEGFR2 Ab-1* (ThermoScientific, США); *Mo a-Hu CD34, Clone QBEnd/10* (ThermoScientific, США); *Mo a Hu CD44 Std./HSCAM Ab-4 Clone 156-3C11*, (ThermoScientific, США); *Rb a Hu ALDH1A1* (ThermoScientific, США) і *Rb a Hu EpCAM* (ThermoScientific, США).

Оцінку результатів всіх ІГХ реакцій виконували в стандартизованому полі зору мікроскопа (СПЗМ) Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Німеччина), при збільшенні $\times 200$ (окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 20$). Для оцінки ІГХ експресії

Ki-67 і p53 у кожному випадку рахували відсоток імунопозитивних (ІМПЗ) клітин у п'яти СПЗМ. Для оцінки рівня експресії клітинами Ki-67 і p53 в програмі Adobe Photoshop CS інструментом «counter» підраховували в кожному випадку відсоток імунопозитивних (ІМПЗ) клітин в 5 СПЗМ. Рівень експресії Ki-67 і p53 розцінювали як низький за наявності менш ніж 25 % ІМПЗ клітин в СПЗМ, як середній – за наявності 25-75 % ІМПЗ клітин в СПЗМ та як високий – за наявності більш ніж 75 % ІМПЗ клітин в СПЗМ (Uhlén M., 2015). Медіану кількості мікросудин визначали в кожному випадку шляхом підрахунку кількості CD34-позитивних мікросудин в 5 СПЗМ за методом S. Bosari et al. (1992).

Рівні експресії каспази-3, MUC1, MUC2, MUC4, Cdx-2, E-кадгерину, β -катеніну, цитокератину 20, віментину, Alpha SMA, VEGF, VEGFR-1, VEGFR2, ЕрСАМ визначали в кожному випадку в 5 СПЗМ методом фотоцифрової МФМ із використанням програми Image J і градуювали їх умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ) на 4 рівня: негативна реакція – 0-20 УООЩ; низький рівень експресії – 21-50 УООЩ; помірний рівень – 51-100 УООЩ; високий рівень експресії – більше 100 УООЩ.

Відсоток CD44-позитивних і ALDH1A1-позитивних клітин визначали в 5 СПЗМ методом фотоцифрової МФМ із використанням програми Image J як співвідношення кількості пікселів ІМПЗ зображення відповідного маркеру до загальної кількості пікселів в СПЗМ.

Паралельні МГ дослідження транскрипційної активності генів *Ki-67*, *KRAS*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1* та ІГХ експресії раковими клітинами Ki-67, p53, E-кадгерину, β -катеніну проводили в матеріалі, фіксованому в 10 % забуференому формаліні, залитому в парафін. Для виділення з тканини тотальної РНК використовували «Trizol RNA Prep 100» (Ізоген Lab., LTD, Росія), для отримання кДНК – набір «OT-1» (Синтол, Росія). Рівень експресії мРНК досліджуваних генів визначали в ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) із застосуванням набору реактивів для полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі (ПЛР-РЧ) в присутності SYBR Green R-402 (Синтол, Росія). Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів фірми Thermo Scientific (США) підібрані в програмі Primer-BLAST (НИН, США). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta C_t$. Статистичний аналіз даних ПЛР-РЧ проводили в пакеті програм CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Усі реакції ампліфікації виконували у трьох повторях.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили в програмі «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли за критерієм Шапіро-Уїлка. Обчислювали медіану, нижній та верхній квартилі, дані представляли у вигляді Me (Q₁; Q₃). Порівняння отриманих даних у 2 групах проводили за U-критерієм Манна-Уїтні, отриманих

даних у 3 групах – з використанням однофакторного дисперсійного аналізу Краскела-Уоліса. Значимість різниці між частотою позитивної ІГХ реакції в 2 групах перевіряли за критерієм χ^2 . Для оцінки зв'язків між досліджуваними ознаками розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона (r), значення якого від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак, від 0,3 до 0,69 – про середній зв'язок ознак, від 0,7 і вище – про сильний зв'язок ознак. Для всіх видів аналізу відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Нами досліджені звичайні колоректальні аденоми (тубулярні, ворсинчасті та тубуло-ворсинчасті), а також зубчасті новоутворення ДТК: гіперпластичні поліпи, традиційні зубчасті аденоми та зубчасті утворення на широкій основі (класифікація ВООЗ 2019 р.).

Тубулярні аденоми характеризуються переважанням округло-овальних крипт, вистелених диспластичним епітелієм, та наявністю сполучнотканинних ворсин на поверхні, вкритих диспластичним епітелієм, які складають менше 20% площі зрізу новоутворення. Ворсинчасті аденоми відрізняються переважанням стрижнів сполучної тканини, вкритих диспластичним епітелієм, які складають більше 75 % площі зрізу пухлини, а також наявністю нечисленних овально-тубулярних крипт в базальній частині аденоми. В тубуло-ворсинчастих аденомах присутні і тубулярні і ворсинчасті структури, при цьому останні складають 20-75 % від площі зрізу новоутворення. Звичайні аденоми ДТК характеризуються середнім рівнем клітинної проліферації (за ІГХ експресією Ki-67) та експресії p53, а також низьким рівнем апоптозу (за ІГХ експресією каспази-3) (табл. 1). Цим аденомам властивий низький рівень експресії VEGF-A, відсутність експресії VEGFR-1, середній рівень експресії VEGFR-2 і медіана кількості CD34+ мікросудин, що варіює від 42,50 до 58,00 в СПЗМ (табл. 1). В цих аденомах має місце середній рівень експресії EpCAM, медіана кількості CD44+ клітин строми варіює від 55,73 % до 60,02 %, медіана кількості CD44+ епітеліоцитів коливається від 19,14 % до 41,68 %, медіана кількості ALDH1+ клітин строми варіює від 20,61 % до 37,18 %, а медіана кількості ALDH1+ епітеліоцитів – від 17,22 % до 30,63 % (табл. 2).

В 50 % звичайних аденом визначена низька дисплазія епітелію з частковою втратою базальної орієнтації подовжених ядер, наявністю виразних ядерць і нечисленних мітозів, а також збереженим муциновим шаром на поверхні клітин. В 50% звичайних аденом виявлена тяжка дисплазія епітелію з виразною втратою базальної орієнтації гіперхромних ядер та наявністю численних мітозів; архітектонікою залоз «спинка до спинки», що формують крибріформні структури, та помітним потоншенням муцинового шару на поверхні епітелію. Встановлено, що при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня рівні клітинної проліферації зростають на 30 % в тубулярних аденомах і на 37 % – в тубуло-ворсинчастих аденомах (табл. 1). При прогресуванні дисплазії епітелію в ворсинчастих аденомах рівень клітинної проліферації достовірно не зростає, але в цих аденомах, навіть при низькій дисплазії епітелію, рівень проліферації клітин є

близьким до високого. За даними W. L. Smit et al. (2020) зростання проліферативної активності клітин при прогресії аденом в 70 % випадків обумовлено мутаціями APC, що призводять до перманентної активації Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду, одним із ефектів якої є надлишкова активація проліферації. За даними T. Murakami et al. (2018) ворсинчасті аденоми мають найбільший злоякісний потенціал. Тому можна припустити, що в ворсинчастих аденомах мутації, що активують надлишкову проліферацію клітин, відбуваються вже на стадії низької дисплазії епітелію. Нами встановлено, що при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня в тубулярних, тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах показники експресії p53 зростають на 49 %, 34 %, 41 %, відповідно; рівні апоптозу зростають на 51 %, 50 %, 65 %, відповідно; а ПХ параметри неангіогенезу в усіх аденомах суттєво не змінюються (табл.1).

Таблиця 1 – Імуногістохімічні параметри проліферативно-апоптотичних властивостей і неангіогенезу в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК з низькою (low-grade) дисплазією епітелію і дисплазією епітелію високого (high-grade) ступеня

Гістологічний різновид новоутворень	Me (Q ₁ ;Q ₃) рівня експресії					Медіана CD34+ мікросудин в СПЗМ
	Ki-67 (%)	p53 (%)	каспаза-3 (УООЩ)	VEGF-A (УООЩ)	VEGFR-2 (УООЩ)	
1	2	3	4	5	6	7
low-grade тубулярна аденома	49,19 (43,08;65,39)	22,70 (15,26;30,42)	20,38 (18,08;26,52)	30,44 (22,92;36,77)	51,72 (46,14;66,53)	42,50 (32,50;57,00)
high-grade тубулярна аденома	*73,85 (72,15;85,36)	*44,47 (30,45;52,34)	*41,25 (35,69;55,03)	28,20 (23,33;37,85)	56,22 (50,69;60,22)	51,00 (49,00;55,00)
low-grade тубуло-ворсинчаста аденома	48,48 (42,16;52,13)	25,75 (15,25;30,14)	20,74 (15,20;32,15)	36,81 (25,35;48,15)	50,41 (38,64;61,46)	51,00 (40,00;56,00)
high-grade тубуло-ворсинчаста аденома	*76,23 (52,28;76,23)	*38,63 (30,22;52,54)	*41,03 (37,01;48,89)	39,14 (26,81;48,30)	51,63 (40,22;70,22)	58,00 (41,00;66,00)
low-grade ворсинчаста аденома	65,15 (62,44;70,22)	31,45 (25,15;35,94)	22,36 (21,17;41,25)	28,14 (20,61;37,68)	51,36 (35,89;52,17)	49,00 (42,00;54,00)
high-grade ворсинчаста аденома	78,96 (75,81;82,37)	*53,20 (49,13;60,38)	*63,26 (50,24;71,29)	28,97 (21,34;30,22)	58,14 (40,02;71,36)	50,50 (42,00;61,00)
low-grade зубчаста аденома	40,22 (36,14;45,39)	25,36 (18,21;25,38)	20,85 (18,52;26,52)	28,44 (20,02;32,15)	55,21 (46,15;60,25)	42,00 (42,00;51,00)
high-grade зубчаста аденома	#68,96 (59,52;70,25)	#40,67 (31,16;45,36)	#46,32 (32,15;55,26)	30,67 (27,70;36,79)	61,15 (40,21;62,56)	44,50 (32,00;52,00)
low-grade гіперпластичний поліп	38,52 (30,98;41,15)	2,86 (1,25;5,49)	21,74 (11,97;28,15)	22,97 (20,28;25,45)	42,15 (41,52;52,13)	35,00 (30,00;39,00)
high-grade гіперпластичний поліп	#50,03 (45,25;55,15)	#27,52 (20,15;30,41)	#34,89 (25,14;40,25)	25,78 (19,90;30,68)	50,69 (41,38;60,32)	#51,00 (48,00;55,00)
зубчасте утворення на широкій основі без дисплазії	22,20 (22,19;25,27)	-	12,24 (11,48;16,48)	20,22 (20,06;21,48)	48,44 (30,19;50,25)	30,00 (22,00;43,00)

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5	6	7
low-grade зубчасте утворення на широкій основі	##39,14 (38,15;40,25)	-	##38,82 (30,64;39,85)	25,80 (16,21;31,36)	50,26 (42,13;61,39)	36,00 (25,00;57,50)

Примітка 1. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з аналогічною low-grade аденомою;

Примітка 2. # – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з аналогічним low-grade зубчастим поліпом;

Примітка 3. ## – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з зубчастим утворенням на широкій основі без дисплазії.

Нами отримані дані щодо збільшення кількості клітин зі стовбуровими властивостями при прогресуванні дисплазії епітелію в аденомах. При прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня в тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах достовірно зростає експресія ALDH1 клітинами строми (на 45 % і 40 %, відповідно), а також епітеліоцитами (на 33 % і 39 %, відповідно); експресія цього маркера статистично значущо не змінюється в тубулярних аденомах (табл. 2). N. M Abdullah. et al. (2016) встановили збільшення кількості ALDH1+ клітин в поліпах товстої кишки у порівнянні з нормальною слизовою оболонкою; дані щодо збільшення кількості таких при прогресуванні дисплазії товстокишкових поліпів іншими дослідниками не опубліковані. Нами встановлено, що при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня в тубулярних, тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах також достовірно зростає експресія ЕрСМ епітеліоцитами (на 13,68 %, 20,49 %, 21,71 %, відповідно) (табл. 2).

Таблиця 2 - Імуногістохімічні параметри експресії маркерів стовбурових клітин в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК з низькою (low-grade) дисплазією епітелію і дисплазією епітелію високого (high-grade) ступеня

Гістологічний різновид новоутворень	Me (Q ₁ ; Q ₃) рівня експресії				
	CD44 строма (%)	CD44 епітелій (%)	ALDH1 строма (%)	ALDH1 епітелій (%)	ЕрСМ (УООЩ)
1	2	3	4	5	6
low-grade тубулярна аденома	59,15 (55,13;71,18)	19,14 (11,25;25,15)	23,59 (19,28;28,64)	17,36 (11,23;21,15)	58,40 (55,14;60,22)
high-grade тубулярна аденома	57,35 (50,01;64,71)	23,75 (20,03;28,91)	26,32 (21,22;29,87)	19,13 (15,63;21,17)	*67,65 (62,47;71,15)
low-grade тубуло-ворсинчаста аденома	55,73 (48,13;62,15)	29,85 (22,05;31,15)	20,61 (16,97;25,36)	20,79 (18,34;25,22)	58,50 (50,58;65,46)
high-grade тубуло-ворсинчаста аденома	57,74 (50,25;62,54)	34,19 (28,16;38,96)	*37,18 (28,15;39,65)	*30,63 (29,17;32,15)	*73,57 (68,15;78,15)
low-grade ворсинчаста аденома	58,76 (42,13;70,31)	34,50 (30,01;42,15)	22,19 (12,46;25,14)	17,22 (15,22;21,15)	57,29 (50,15;64,55)
high-grade ворсинчаста аденома	60,02 (43,29;74,36)	41,68 (30,22;45,23)	*36,63 (28,05;41,15)	*28,18 (25,17;30,04)	*73,17 (66,36;80,34)

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5	6
low-grade зубчаста аденома	52,23 (48,04;68,13)	47,05 (38,47;56,87)	22,15 (19,94;25,36)	16,90 (11,14;18,24)	57,10 (48,26;58,55)
high-grade зубчаста аденома	65,56 (48,22;71,15)	48,93 (42,47;52,15)	#32,25 (28,03;36,45)	#22,65 (21,15;25,04)	68,48 (65,21;74,15)
low-grade гіперпластичний поліп	36,65 (32,46;40,22)	24,10 (18,46 ; 28,23)	26,75 (21,56;29,47)	13,74 (11,15;18,25)	62,34 (59,24;65,24)
high-grade гіперпластичний поліп	38,18 (25,34;42,13)	32,35 (28,34;37,65)	22,15 (21,17;29,36)	14,15 (12,22;20,04)	67,65 (64,32;73,24)
зубчасте утворення на широкій основі	39,23 (32,15;45,51)	5,25 (3,24;8,44)	20,80 (18,91;23,69)	-	30,84 (25,15;36,58)
low-grade зубчасте утворення на широкій основі	39,86 (26,54;42,13)	8,74 (6,23;10,46)	26,75 (21,56;29,47)	10,69 (9,41;15,05)	38,29 (25,26;49,24)

Примітка 1. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з аналогічною low-grade аденомою;

Примітка 2. # – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з аналогічним low-grade зубчастим поліпом;

Примітка 3. ## – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з зубчастим утворенням на широкій основі без дисплазії.

За результатами мікроскопії встановлено, що зубчасті новоутворення ДТК сформовані криптами, які вистелені епітеліальним шаром «зубчастого» виду. Відмінною рисою гіперпластичних поліпів є наявність значно подовжених кишкових крипт з «зубчастим» епітелієм виключно у верхній (апикальній) половині крипт, в той час як у зубчастих аденомах шар епітелію «зубчастої» структури вистилає крипти по всій їх довжині. Традиційні зубчасті аденоми характеризуються помірно-виразною ворсинчастою архітектонікою, що поєднується із «зубчастістю» епітелію. Зубчасті новоутворення на широкій основі відрізняють множинні архітектурно спотворені зубчасті крипти з виразною їх базальною дилатацією та латеральне горизонтальне розповсюдження крипт вздовж м'язової пластинки слизової оболонки. Визначено, що зубчасті новоутворення ДТК характеризуються середнім рівнем клітинної проліферації, середнім рівнем експресії p53, низьким рівнем апоптозу, низьким рівнем експресії VEGF-A, відсутністю експресії VEGFR-1, середнім рівнем експресії VEGFR-2 та медіаною кількості CD34+ мікросудин, що варіює в діапазоні від 30,00 до 51,00 в СПЗМ (див. табл. 1). В зубчастих утвореннях ДТК має місце середній рівень експресії ЕрСAM; медіана кількості CD44+ клітин строми варіює від 36,65 % до 65,56 %, медіана кількості CD44+ епітеліоцитів коливається від 5,25 % до 48,93 %, медіана кількості ALDH1+ клітин строми варіює в діапазоні від 20,80 % до 32,25 %, а медіана кількості ALDH1+ епітеліоцитів варіює від 10,69 % до 22,65 % (див. табл. 2).

В 50 % традиційних зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів визначена низька дисплазія епітелію, в 37 % цих зубчастих новоутворень виявлена дисплазія епітелію високого ступеня; більшість зубчастих утворень на широкій основі характеризується відсутністю дисплазії епітелію і тільки в 13 % зубчастих утворень на широкій основі визначена дисплазія епітелію низького ступеня.

При прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня достовірно зростає рівень проліферації клітин (на 42 % - в традиційних зубчастих аденомах і на 24 % - в гіперпластичних поліпах) та рівень апоптозу, визначений за експресією каспази-3 (на 55 % в традиційних зубчастих аденомах і на 38 % в гіперпластичних поліпах); а також зростає експресія p53 (на 38 % в традиційних зубчастих аденомах і на 90 % – в гіперпластичних поліпах) (див. табл. 1). За даними S. D. Crockett et al. (2019) прогресування зубчастих новоутворень найчастіше обумовлюють мутації генів *KRAS* або *BRAF*, які призводять до метилювання CpG острівців, внаслідок чого відбувається сайленсинг низки тумор-супресорних генів і втрата контролю над рівнями проліферації. Між показниками клітинної проліферації, апоптозу і експресії p53 в досліджених нами зубчастих новоутвореннях має місце прямий кореляційний зв'язок, що вказує на те, що при прогресуванні звичайних аденом і зубчастих новоутворень, запускаються механізми не тільки надлишкової проліферації клітин, а й блокування шляхів апоптозу.

При прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня ІГХ параметри неоангіогенезу статистично значущо не змінюються в традиційних зубчастих аденомах і в гіперпластичних поліпах. Але гіперпластичні поліпи відрізняються від інших досліджених зубчастих новоутворень достовірним збільшенням на 32 % кількості CD34+ мікросудин в СПЗМ (див. табл. 1). Це підтверджує концепцію гетерогенності зубчастих новоутворень (Crockett S. D. et al., 2019). Встановлено, що при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня в традиційних зубчастих аденомах і в гіперпластичних поліпах статистично значущо не змінюється експресія EpCAM, а також експресія CD44 клітинами строми та епітеліоцитами (див. табл. 2). Не змінюються також параметри експресії ALDH1 клітинами строми та епітеліоцитами в гіперпластичних поліпах (табл. 2). Однак, при прогресуванні дисплазії епітелію до високого ступеня в традиційних зубчастих аденомах достовірно зростає на 32 % експресія ALDH1 клітинами строми та на 26 % зростає експресія ALDH1 епітеліоцитами (див. табл. 2).

В порівняльному аналізі визначено, що при прогресуванні дисплазії епітелію до низького ступеня в зубчастих утвореннях на широкій основі рівень клітинної проліферації зростає на 44 %, вкрай низькі показники експресії p53 не змінюються, рівень апоптозу (за експресією каспази-3) зростає на 69 %, ІГХ параметри неоангіогенезу, експресії CD44 і ALDH1 клітинами строми та епітеліоцитами статистично значущо не змінюються, експресія EpCAM не зростає (див. табл. 1,2). З використанням маркерів CD44 і Ki-67 показано, що в зубчастих утвореннях на широкій основі і в гіперпластичних поліпах з низьким ступенем дисплазії епітелію зберігається нормальний розподіл клітин-попередників і зон проліферації в базальних відділах кишкових крипт.

Встановлено, що КРА характеризується підвищеною експресією мРНК гену *Ki-67*, що знижується в прогресуванні карциноми від I до IV стадії в 6 разів і

корелює із результатами паралельно проведеного ІГХ дослідження експресії Ki-67 (табл. 3, 4), а також характеризується підвищеною експресією мРНК гену *TP53*, що зростає майже в 4 рази при прогресуванні карциноми від I до IV стадії та корелює із результатами паралельно проведеного ІГХ дослідження експресії p53 (табл. 3, 4). Окрім того, визначено, що в КРА при прогресуванні від I до IV стадії знижується медіана рівня експресії каспази-3 на 53,01 % (табл. 3), що прямо корелює із медіаною середнього рівня експресії Ki-67 ($r = 0,71$, $p < 0,05$). Транскрипційна активність гену *KRAS* при прогресуванні КРА від I до IV стадії зростає майже в 7 разів, за наявності «стрибка» підвищення медіани експресії мРНК цього гену на II стадії прогресування (табл. 4). А. Т. Boutin et al. (2017) також було показано достовірне зростання транскрипційної активності *KRAS* в послідовності «аденома – карцинома» (колоректальної локалізації). Інші дослідники (Xiuli L. et al., 2015, Margetis N. et al., 2017, Pfeiffer C. M. et al., 2018) отримали суперечливі дані щодо залучення аномальної активності *KRAS* до дисрегуляції проліферації та апоптозу в прогресуванні колоректального раку.

Таблиця 3 – Характеристика транскрипційної активності генів на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми (КРА)

Стадія КРА	Me (Q ₁ ;Q ₃) рівня відносної нормалізованої експресії мРНК				
	гену <i>KRAS</i>	гену <i>Ki-67</i>	гену <i>TP53</i>	гену <i>CDH1</i>	гену <i>CTNNB1</i>
I	0,42 (0,36;0,43)	3,20 (2,31;3,59)	2,15 (0,82;2,30)	0,88 (0,42;1,14)	2,88 (2,38;5,38)
II	*1,31 (1,09;2,91)	2,92 (1,80;3,50)	2,80 (1,32;4,50)	0,48 (0,23;1,13)	3,83 (2,59;5,99)
III	1,75 (1,31;2,93)	1,27 (1,19;2,08)	*3,80 (2,32;6,50)	*0,15 (0,09;0,36)	2,02 (1,38;6,95)
IV	2,91 (1,85;3,50)	0,52 (0,28;1,04)	*7,80 (5,99;8,92)	0,08 (0,04;0,41)	2,27 (1,23;2,93)

Примітка. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з попередньою стадією.

Таблиця 4 – Медіани рівнів ІГХ експресії маркерів проліферативно-апоптотичних властивостей клітин і неоангіогенезу на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми (КРА)

Стадія КРА	Me (Q ₁ ;Q ₃) рівня експресії						Медіана CD34+ мікросудин в СПЗМ
	Ki-67 (%)	p53 (%)	каспаза-3 (УООЩ)	VEGF-A (УООЩ)	VEGFR-1 (УООЩ)	VEGFR-2 (УООЩ)	
I	73,95 (61,57;81,38)	25,39 (13,56;30,32)	54,60 (52,53;62,48)	37,80 (30,22;56,89)	-	52,75 (39,14;70,22)	91,50 (51,00;111,00)
II	*43,54 (38,77;53,16)	29,16 (22,10;61,64)	53,82 (39,38;67,73)	*88,50 (63,00;115,00)	19,58 (15,78;23,02)	*82,71 (63,14;111,19)	88,50 (63,00;115,00)
III	38,88 (27,39;41,27)	*58,72 (49,66;86,35)	*33,63 (26,84;35,34)	79,34 (63,14;84,99)	23,15 (22,29;30,02)	104,17 (96,04;111,02)	96,50 (72,00;128,00)
IV	27,37 (20,96;39,24)	*80,31 (68,08;91,48)	25,66 (18,03;26,27)	84,69 (80,66;110,28)	28,74 (15,64;33,17)	99,91 (86,15;120,29)	95,00 (80,00;115,00)

Примітка. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з попередньою стадією.

Нами встановлена наявність статистично значущих кореляцій між підвищеними показниками транскрипційної активності *KRAS* і низьким рівнем

ПГХ експресії каспази-3 ($r = -0,44$, $p < 0,05$), а також підвищеними показниками транскрипційної активності *KRAS* і *TP53* ($r = 0,43$, $p < 0,05$). Кореляцій між показниками транскрипційної активності *KRAS* і *Ki-67*, а також ПГХ експресії *Ki-67* не встановлено, що вказує на те, що зниження проліферативної активності клітин КРА в прогресуванні пухлини опосередковується сигнальними шляхами, не пов'язаними із RAS-протеїном. При цьому встановлені кореляції вказують на залучення цих сигнальних шляхів до блокування апоптозу в КРА. Виявлений кореляційний зв'язок між рівнями мРНК *KRAS* і *TP53* знаходить обґрунтування в сучасних уявленнях щодо функціонування РІЗК/АКТ/mTOR-сигнального каскаду, активація якого опосередковується RAS-протеїном. Відомо, що експресія мутантного p53 регулюється кількома факторами транскрипції, зокрема – E2F і FOXO3a. Останні є також мішенями для фосфорилляції кіназою АКТ, що є ключовим ланцюгом РІЗК/АКТ/mTOR-сигнального каскаду, одним з ефектів активації якого є блокування апоптозу (Temraz S. et al., 2015). Це підтверджує визначена нами кореляція між рівнями мРНК *KRAS* і ПГХ експресією каспази-3. Отримані дані узгоджуються з результатами досліджень останніх років, в яких було показано достовірне зростання рівня експресії p53 (Oh H. J. et al., 2019, Nakayama M. et al., 2019), а також зниження рівня експресії каспази-3 (Asadi M. et al., 2018) при прогресуванні КРА.

За даними виконаних ПГХ досліджень показники неоангіогенезу при прогресуванні КРА мають такі особливості. КРА характеризується середніми рівнями експресії VEGF-A і VEGFR-2, що зростають при прогресуванні пухлини від I до IV стадії на 55,37 % і на 47,21 %, відповідно, (табл. 4) і прямо корелюють між собою ($r = 0,85$, $p < 0,05$). В роботах Liu Z. et al. (2017), Zhong M. et al. (2020) також було показано зростання рівнів експресії VEGF-A і VEGFR-2 в прогресуванні КРА від I до IV стадії. За отриманими результатами, максимальний достовірний «стрибок» рівнів експресії VEGF-A і VEGFR-2 спостерігається при прогресії КРА від I до II стадії, що може бути обумовлено залученням сигнальних шляхів, які забезпечують реалізацію інвазивного потенціалу пухлини. Зокрема, нами показано, що при прогресії КРА від I до II стадії також відбувається статистично значуще зростання рівня транскрипційної активності *KRAS*. Базуючись на цих даних можна припустити, що активація неоангіогенезу на перших двох стадіях КРА опосередковується залученням MAPK/ERK- і РІЗК/АКТ/mTOR сигнальних каскадів, функціонально пов'язаних із RAS-протеїном, який забезпечує передачу сигналів із тирозінкіназних рецепторів до цих каскадів (Bhattacharya R. et al., 2016). Експресія VEGFR-1 визначається лише в КРА II-IV стадій, за відсутності достовірного зростання на окремих стадіях прогресування. В дослідженні Nagano H. et al. (2019) було показано, що експресія VEGFR-1 виявляється в 90 % випадків КРА IV стадії, в 50 % і 47 % випадків КРА III і II стадій, відповідно, і не виявляється в КРА I стадії. Також було показано, що КРА властивий низький/середній рівень експресії VEGFR-1, що не корелює із показником стадії пухлинного процесу і узгоджується із

отриманими нами даними. Встановлена також відсутність достовірного зростання показників експресії CD34 при прогресуванні КРА від I до IV стадії (табл. 4). S. C. Toma et al. (2018) також не встановили достовірної різниці між показником кількості мікросудин, оціненим за експресією CD34, в неметастатичній та метастатичній КРА. M. Chabowski et al. (2018) показали відсутність достовірної різниці між показником щільності мікросудин, оціненим за експресією CD34 і Nestin, в КРА I-II стадій, порівняно із КРА III-IV стадій, а також в КРА N₀, порівняно із КРА N₁₋₃. За їх даними, активація неоангіогенезу (за рівнями експресії VEGF-A, VEGFR-1 і VEGFR-2) при прогресуванні КРА, є пропорційною збільшенню об'єму пухлинної тканини і не асоціюється із збільшенням відносної кількості / щільності мікросудин в стандартизованому полі зору.

Встановлено, що прогресування КРА супроводжується зростанням експресії маркерів стовбурових клітин з наступними особливостями: при прогресуванні від I до II стадії в пухлині достовірно на 27,65 % збільшується кількість CD44+ клітин строми, а також на 19,68 % зростає кількість ALDH1+ клітин строми. При прогресуванні карциноми від II до III стадії в ній на 42,69 % зростає кількість ALDH1+ клітин строми, а також на 9,07 % збільшується рівень експресії EPCAM раковими клітинами. При прогресуванні аденокарциноми від III до IV стадії в пухлині на 32,26 % збільшується кількість ALDH1+ ракових клітин, а також на 14,40 % – рівень експресії EPCAM раковими клітинами (табл. 5).

Зростання рівня експресії CD44 в КРА обумовлено більшою кількістю молекул CD44 в структурі клітинних мембран через збільшену потребу в них, а також наявністю пула ракових стовбурових клітин, що відсутній в нормальній слизовій оболонці та в доброякісних утвореннях (Morath I. et al., 2016). В залежності від щільності клітинного мікрооточення пухлини, молекули CD44 здатні як стимулювати, так і пригнічувати проліферативну активність ракових клітин (Senbanjo L. T. et al., 2017). При низькій щільності клітинного мікрооточення пухлини фосфорилюється білок merlin і утворює комплекси із CD44, які зв'язуються із відповідними рецепторами та активують Ras/Raf/Mek/Erk-сигнальний каскад, одним із ефектів якого є стимуляція клітинної проліферації. При високій щільності клітинного мікрооточення пухлини, фосфориляція білка merlin зупиняється, активація Ras/Raf/Mek/Erk-сигнального каскаду призупиняється і клітинна проліферація знижується. Таким чином CD44 контролює щільність клітинного складу карцином, забезпечуючи оптимальні умови для прогресії ракових клітин (Senbanjo L. T. et al., 2017). Нами було встановлено наявність зворотного середньої сили зв'язку між медіанами експресії CD44 і рівню клітинної проліферації ($r = -0,62$, $p < 0,05$), що узгоджується із описаним механізмом та пояснює зниження експресії Ki-67 при прогресуванні КРА. В мета-аналізі Wang Z. et al. (2019) було показано варіабельність сучасних літературних даних щодо достовірного зростання показників експресії CD44 в прогресуванні КРА: в низці робіт знайдено достовірне зростання кількості CD44+ клітин на ранніх (I-II) стадіях карциноми, в

окремих роботах – достовірне зростання кількості CD44+ клітин за умов метастазування пухлини. Висновком цього мета-аналізу є несприятлива прогностична значимість зростання кількості CD44+ клітин, що достовірно асоціюється зі зниженням ступеня диференціювання пухлини, а також із реалізацією її метастатичного потенціалу. Нами отримані дані щодо значущого збільшення кількості CD44+ клітин строми і зниження експресії Ki-67 при прогресуванні КРА саме від I до II стадії.

За результатами ІГХ дослідження встановлене достовірне зростання кількості ALDH1+ клітин строми при прогресуванні КРА від I до III стадії, а також достовірне зростання кількості ALDH1+ ракових клітин при прогресуванні КРА від III до IV стадії (табл. 5). N. S. Nolah et al. (2017) показали, що ріст кількості ALDH1+ клітин строми асоціюється із лімфо-васкулярною інвазією в КРА. Поява перших регіонарних метастазів пухлини є індикатором переходу від II до III стадії КРА, що узгоджується із отриманими нами даними. Дані щодо зростання кількості ALDH1+ ракових клітин на окремих стадіях прогресування КРА в літературі відсутні. Нами також встановлені кореляції між кількістю ALDH1+ клітин строми і низьким рівнем апоптозу ($r = -0,49$, $p < 0,05$), а також між кількістю ALDH1+ ракових клітин і середнім рівнем накопичення онкопротеїну p53 ($r = 0,44$, $p < 0,05$) в КРА. Отримані дані вказують на те, що пул ALDH1+ клітин залучений пригнічення апоптозу ракових клітин. J.Chen et al. (2015) виявили в ALDH1+ клітинах КРА коекспресію з анти-апоптотичними молекулами Bcl-2 і ABCG2. Окрім того, був описаний зворотний зв'язок між TRAIL-індукованим апоптозом та кількістю ALDH1+ клітин в недрібноклітинній карциномі легені (Tian S. et al., 2018).

Таблиця 5 – Медіани рівнів ІГХ експресії маркерів стовбурових клітин на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми (КРА)

Стадія КРА	Me (Q ₁ ;Q ₃) рівня експресії			
	CD44+ клітини строми (%)	ALDH1+ клітини строми (%)	ALDH1+ ракові клітини (%)	ErCAM (УООЩ)
I	31,41 (19,87;42,15)	20,66 (18,51;21,47)	-	76,18 (72,69;80,24)
II	*48,26 (35,44;61,45)	*25,75 (20,56;32,86)	37,17 (31,07;47,18)	83,96 (78,17;90,55)
III	78,36 (61,13;80,06)	*44,93 (41,17;50,01)	34,25 (26,47;42,15)	*92,33 (91,18;105,34)
IV	75,75 (69,35;80,33)	48,36 (42,15;55,17)	*50,56 (45,84;61,38)	*107,85 (96,78;120,34)

Примітка. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з попередньою стадією.

Нами встановлена мембрано-цитоплазматична експресія ErCAM в КРА, в той час як нормальній слизовій оболонці товстої кишки притаманна мембранна експресія ErCAM. Причиною зміни експресії ErCAM з мембранної на мембранно-цитоплазматичну є протеоліз інтрацелюлярних доменів цих молекул з наступною їх олігомеризацією (Keller L. et al., 2019). Відомо також, що ці інтрацелюлярні домени ErCAM взаємодіють із RAS-протеїном, активуючи таким чином PI3K-Akt-сигнальний шлях (Boesch M. et al., 2018). Ці дані, що

узгоджуються із нашими результатами, вказують на залучення РІЗК-Акт-сигнального шляху до реалізації прогресування КРА від II до IV стадій. М. Mokhtari et al. (2017) також встановили, що рівень експресії ЕрСМ в КРА варіює від низького до середнього. Проте, літературні дані щодо асоціації між експресією ЕрСМ і стадією КРА варіюють: М. Mokhtari et al. (2017) визначили, що більші рівні експресії ЕрСМ властиві пізнім метастатичним (III-IV) стадіям прогресування пухлини, в той час як S. Han et al. (2017) встановили, що рівень експресії цього маркера не корелює із стадією пухлинного процесу.

При порівнянні ІГХ-параметрів новоутворень ДТК з дисплазією епітелію високого ступеня і високодиференційованої КРА виявлено низку статистично значущих відмінностей. Звичайні тубулярні, тубуло-ворсинчасті і ворсинчасті аденоми ДТК з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої КРА статистично значущо меншими медіанами експресії p53 [на 37,09 % для тубулярних аденом і на 45,35 % – для тубуло-ворсинчастих аденом, відповідно (за винятком ворсинчастих аденом, які суттєво не відрізняються від карциноми за цим показником)], меншими медіанами експресії VEGF-A (на 53,18%, 35,01 % і 51,90 %, відповідно) і VEGFR-2 (на 31,20 %, 36,82 %, 28,85 %, відповідно), а також меншою медіаною кількості CD44+ і ALDH1+ клітин строми (на 19,42 %, 18,88 %, 15,27 % і на 50,43 %, 29,97 %, 31,01 %, відповідно). High-grade Зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи ДТК з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої КРА статистично значущо меншими медіанами експресії Ki-67 (на 13,44% і 37,20 %, відповідно), p53 (на 42,46 % і 61,07 %, відповідно), VEGF-A (на 49,08 % і 57,20 %, відповідно) і VEGFR-2 (на 25,17 % і 37,97 %, відповідно), а також меншою медіаною кількості CD44+ (на 7,89 % і 46,36 %, відповідно) і ALDH1+ клітин строми (на 39,22 % і 58,28 %, відповідно).

Отримані нами дані свідчать про те, що починаючи із переходу КРА від I до II стадії і далі – до III і IV стадії прогресування в карциномі активується епітеліально-мезенхімальна трансформація (EMT), в яку з самого початку залучаються гени *CDH1* і *CTNNB1*, а також *KRAS*. При прогресуванні КРА від I до IV стадії базово низька транскрипційна активність гену *CDH1* в карциномі зменшується в 11 разів (див.табл.3) і паралельно на цих стадіях прогресування КРА також достовірно знижується на 71,83 % експресія Е-кадгерину (табл. 6). При цьому підвищена транскрипційна активність гену *CTNNB1*, притаманна КРА, достовірно не змінюється при її прогресуванні від I до IV стадії (див.табл.3) і корелює з високим рівнем експресії β-катеніну, який залишається достовірно високим на цих стадіях прогресування КРА (табл. 6). Встановлено прямий середньої сили зв'язок ($r = 0,41$, $p < 0,05$) між підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS* і високим рівнем експресії β-катеніну та зворотній середньої сили зв'язок ($r = -0,47$, $p < 0,05$) - між підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS* і низьким рівнем експресії Е-кадгерину.

Таблиця 6 – Медіани рівнів ІГХ експресії маркерів епітеліального і мезенхімального фенотипів на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми (КРА)

Стадія КРА	Ме (Q ₁ ;Q ₃) рівня експресії (в умовних одиницях оптичної щільності)				
	Е-кадгерин	β-катенін	СК-20	віментин	α-SMA
I	88,09 (60,22;112,34)	116,73 (112,28;120,06)	84,17 (73,17;92,63)	70,22 (61,15;78,65)	41,15 (31,71;48,98)
II	*55,70 (41,15;98,07)	120,23 (116,06;135,16)	*62,15 (54,14;70,27)	*86,65 (80,22;97,55)	*70,21 (55,47;80,22)
III	*32,58 (30,21;44,58)	115,85 (110,09;120,23)	*46,82 (41,24;53,48)	*103,88 (90,31;115,24)	*88,74 (75,54;95,14)
IV	24,82 (23,02;40,81)	115,59 (111,11;120,37)	*33,72 (24,14;41,59)	108,45 (96,33;119,15)	90,84 (80,34;96,35)

Примітка. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з попередньою стадією.

Виявлені кореляції пояснюються наступним. Після зв'язування епідермального фактору росту з екстрацеллюлярним доменом Е-кадгерину, що забезпечує міжепітеліальні взаємодії, відповідний сигнал передається на внутрішньоклітинний білок RAS (Wong S. H. M. et al., 2018), який є продуктом гену *KRAS*, що виконує центральну роль перемикача між процесами проліферації та апоптозу клітин відповідно до сигналів з міжклітинного середовища (Clinical relevance of KRAS in human cancers / [S. Jancík, J. Drábek, D. Radzioch et al.]. // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2010. – Vol.2010. – P. 1546–1554.). При активації *KRAS* через фосфорилування Dvl-молекул блокуються сигнали з Fz-рецепторів клітин, що унеможлиблює активацію канонічного Wnt/β-катенінового каскаду і молекули β-катеніну своєчасно деградують в протеасомах без їх накопичення в цитоплазмі та ядрі клітин (Lemieux E. et al. 2015).

Таким чином, отримані результати свідчать про суттєве зниження адгезивних зв'язків між раковими клітинами при переході КРА до II стадії, та набуття ними умов для міграції, що є однією з складових ЕМТ. Відомо, що найбільш «ранніми» промоторами ЕМТ є фактори транскрипції Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1, Twist2, які знижують активність гену *CDH1* (Wong S. H. M. et al., 2018), що призводить до зниження експресії Е-кадгерину (Vu T. et al., 2017). Таким чином, зниження експресії Е-кадгерину є індикатором запуску ЕМТ. На відмінність від наших результатів, Christou N. et al. (2017), Daugala A. S. et al. (2019) встановили зниження експресії Е-кадгерину при переході пухлини в пізню метастатичну стадію прогресування. Літературні дані відносно експресії β-катеніну при прогресуванні КРА значно варіюють: N. Yoshida et al. (201), G. M. Bourgoul et al. (2016) визначили збільшення експресії цього маркеру при прогресуванні карциноми, в той час як Bhattacharya et al. (2019), A. Arnold et al. (2020) не знайшли достовірних відмінностей між показниками експресії β-катеніну на окремих стадіях прогресування КРА.

Нами встановлено, що зниження експресії Е-кадгерину при прогресуванні КРА від I до IV стадії відбувається паралельно із зниженням на 59,94 %

експресії маркеру епітеліального фенотипу – СК-20. Якщо експресія Е-кадгерину виявляється виключно групах ракових клітинах, то експресія СК-20 виявляється не тільки в ракових клітинах, але й у вільно розташованих в стромі клітинах різних форм та розмірів. Ці клітини, вірогідно, є раковими клітинами, що вже втратили адгезивні властивості (за відсутністю експресії Е-кадгерину), але все ще зберігають ознаки епітеліального фенотипу (за експресією СК-20). Саме такі клітини з найбільшою вірогідністю залучені у ЕМТ (Ribatti D. et al., 2020).

Більш «пізними» промоторами ЕМТ в КРА вважаються фактори транскрипції PROX1, FOXQ1, FOXC2, FOXM1, які активуються переважно на II-III стадіях прогресування карциноми і забезпечують появу ракових клітин мезенхімального фенотипу (Vu T. et al., 2017). Згідно отриманих нами даних, зростання показників експресії маркерів мезенхімального фенотипу в КРА починається вже із переходу КРА від I до II стадії, та прогресує на подальших стадіях. При прогресуванні карциноми від I до IV стадії достовірно на 35,26 % підвищуються рівні експресії віментину і на 54,71 % підвищуються рівні експресії α -SMA (див. табл. 6). Скупчення віментин⁺ і α -SMA⁺ клітин виявляються поблизу груп дрібних ракових залоз. J. Chen et al. (2017), R. Nishishita et al. (2018) також визначили зростання рівня експресії α -SMA при переході КРА від I до II стадії, та від II до III стадії. R. Nishishita et al. (2018) встановили збільшення рівня експресії віментину при стадійній прогресії КРА, в той час, як S. N. Meyer et al. (2019) не знайшли достовірного зростання рівня експресії віментину при прогресуванні КРА. За даними проведеного нами кореляційного аналізу є прямий сильний зв'язок між низьким рівнем експресії Е-кадгерину і середнім рівнем експресії СК-20 ($r = 0,74$, $p < 0,05$) та прямий середньої сили зв'язок між рівнями експресії віментину і α -SMA ($r = 0,53$, $p < 0,05$), а також має місце зворотній середньої сили зв'язок між середніми рівнями експресії СК-20 і віментину ($r = -0,65$, $p < 0,05$), а також середнім рівнем експресії α -SMA ($r = -0,69$, $p < 0,05$).

Встановлено, що прогресування КРА асоціюється із зростанням рівня експресії MUC1 і Cdx-2, а також зі зниженням рівня експресії MUC2 і MUC4. При цьому рівень експресії MUC1 статистично значуще зростає на 35,69 % на II стадії КРА [від 42,15 (38,14 ; 55,26) до 65,54 (55,39 ; 70,04) УООЩ] (табл. 7); рівень експресії Cdx-2 достовірно зростає на 25,06 % на III стадії КРА [від 66,21 (55,22 ; 76,25) УООЩ до 88,35 (80,04 ; 98,16) УООЩ]; на II стадії КРА достовірно знижується рівень експресії MUC2 на 45,13 % [від 42,17 (35,54 ; 55,26) до 23,14 (17,26 ; 28,46) УООЩ, а також знижується рівень експресії MUC4 на 45,13 % [від 50,06 (40,04 ; 59,86) до 31,41 (21,15 ; 40,04) УООЩ (табл. 7).

Таблиця 7 – Медіани рівнів ІГХ експресії муцинів MUC-1, MUC-2, MUC-4, MUC-5AC і Cdx-2 на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми (КРА)

Стадія КРА	Ме (Q ₁ ;Q ₃) рівня експресії (в умовних одиницях оптичної щільності)				
	MUC-1	MUC-2	MUC-4	MUC-5AC	Cdx-2
I	42,15 (38,14;55,26)	42,17 (35,54;55,26)	50,06 (40,04;59,86)	61,68 (42,15;70,25)	54,15 (41,96;59,43)
II	*65,54 (55,39;70,04)	*23,14 (17,26;28,46)	*31,41 (21,15;40,04)	60,26 (40,51;69,35)	66,21 (55,22;76,25)
III	65,42 (60,24;71,24)	21,41 (17,47;27,46)	36,41 (24,46;38,84)	71,87 (61,23;78,79)	*88,35 (80,04;98,16)
IV	67,71 (55,26;78,29)	22,44 (18,14;26,35)	32,42 (22,46;38,84)	60,26 (50,03;68,13)	88,34 (80,36;95,12)

Примітка. * – достовірна різниця ($p < 0,05$) порівняно з попередньою стадією.

За даними літератури зростання показників експресії MUC1 пов'язано із активним глікозилюванням екстрацелюлярного домену цих молекул, яке відбувається в карциномах за досі не ясних причин (Krishn S. R. et al., 2016). Проте, відомо, що гіперглікозилювані форми MUC1 відіграють суттєву роль в регуляції генів, що контролюють протипухлинну імунну відповідь і, як наслідок, пригнічують проліферацію Т-лімфоцитів; саме цим пояснюється слабка інфільтрація імуніцитами тканини КРА (Zhang Y. et al., 2020). Причина зниження експресії MUC2 в КРА все ще точно не встановлена: вона може бути обумовлена мутаціями генів *SIMP*, *V600E*, *BRAF* (Betge J. et al., 2016) або зниженням експресії гену *MUC2* (Kasprzak A. et al., 2018). Молекулярні основи зниження експресії MUC4 в КРА лишаються не відомими. Експресія MUC5AC не властива нормальній слизовій оболонці товстої кишки, але в КРА вона обумовлена перманентною активацією MAPK-сигнального каскаду, що залучає фактор транскрипції E2F/DP до активації декількох генів, включаючи *MUC5AC* (Hryniuk A. et al., 2018).

В порівняльному аналізі встановлено, що метастатична КРА відрізняється від неметастатичної достовірно нижчим рівнем проліферації (на 36,49 % за експресією Ki-67) і нижчим на 42,38 % рівнем експресії мРНК гену *Ki-67*, статистично значущо вищими рівнями мРНК гену *TP53* (на 23,34 %) і експресії онкопротеїну p53 (на 45,18 %) та вищою транскрипційною активністю гену *KRAS* (на 55,27 %), достовірно вищими рівнями експресії VEGF-A (на 32,04 %) і VEGFR-2 (на 35,30 %); значущо нижчими рівнями експресії пухлинними клітинами маркерів епітеліального фенотипу (Е-кадгерину – на 63,30 % і СК-20 – на 40,97 %) та вищими – маркерів мезенхімального фенотипу (віментину – на 23,26 % і α -SMA – на 38,64 %); достовірно вищими рівнями експресії MUC1 (на 16,05 %) і Cdx-2 (на 36,64 %) та нижчими рівнями експресії MUC2 (на 28,14 %) і MUC4 (на 14,07 %); а також статистично значущо більшим відсотком клітин із властивостями стовбурових: ЕрСМ-позитивних ракових клітин (на 18,97 %), CD44-позитивних клітин строми (на 45,74 %) і ALDH1-позитивних клітин строми

(на 51,61 %). Іншими дослідниками також встановлено, що метастатична КРА відрізняється від неметастатичної значущо більшими показниками транскрипційної активності гену *KRAS* (Pfeffer C. M. et al., 2018), значущо більшими показниками експресії p53 (Oh H. J. et al., 2019, Nakayama M. et al., 2019), значущо більшими показниками експресії VEGF-A і VEGFR-2 (Ding C. et al., 2016), достовірно більшою кількістю CD44+ клітин стромы (Wang Z. et al., 2019) і ALDH1+ клітин стромы (Nolah N. S. et al., 2017), значущо більшими показниками експресії EpCAM (Mokhtari M. et al., 2017), а також значущо нижчим рівнем експресії E-кадгерину (Christou N. et al., 2017, Kim S. A. et al., 2016, Daugala A. C. et al., 2019) і значущо вищими показниками експресії α -SMA (J. Chen et al., 2017, R. Nishishita et al., 2018) і віментину (R. Nishishita et al., 2018). Таким чином, отримані нами дані підкреслюють наявність маркерних молекулярно-імуногістохімічних параметрів метастатичної КРА.

ВИСНОВКИ

Однією з найбільш поширених злоякісних пухлин шлунково-кишкового тракту є колоректальна аденокарцинома, при якій виживаність хворих залежить від діагностики та радикального лікування на ранніх стадіях розвитку пухлини. Факторами ризику її розвитку є аденоми і поліпи дистальної товстої кишки, що зазнають диспластичних змін. Молекулярно-генетичні і імуногістохімічні критерії прогресування цих новоутворень розроблені недостатньо. В дисертаційній роботі вирішується актуальна проблема щодо патоморфологічних параметрів прогресування аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки, а також стадійного прогресування колоректальної аденокарциноми для їх використання в патологоанатомічній діагностиці та при виборі оптимальної тактики лікування хворих.

1. В тубулярних і тубуло-ворсинчастих аденомах дистальної товстої кишки при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня значущо зростає рівень клітинної проліферації (на 33,40 % і 36,41 %, відповідно) та апоптозу клітин з накопиченням p53 в ядрах (на 48,96 %, 33,35 %, відповідно) і зростанням рівня експресії каспази-3 (на 50,60 % і 49,46 %, відповідно). В ворсинчастих аденомах з нормально високим рівнем клітинної проліферації, при зростанні ступеня дисплазії до високого, зростають показники експресії p 53 і каспази-3 на 40,89 % і на 64,66 % відповідно. При цьому імуногістохімічні параметри неоангіогенезу в усіх аденомах дистальної товстої кишки суттєво не змінюються.

2. В гіперпластичних поліпах, традиційних зубчастих аденомах і зубчастих утвореннях на широкій основі при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня достовірно зростає показник клітинної проліферації (за експресією Ki-67) (на 23,01 %, 41,68 %, 43,29 %, відповідно); збільшується рівень експресії каспази-3 (на 37,69 %, 54,99 %, 68,47 %, відповідно); зростає рівень експресії p53 (в гіперпластичних поліпах - на 89,61 %, в традиційних

зубчастих аденомах – на 37,65 % і залишається вкрай низьким в зубчастих утвореннях на широкій основі); рівні експресії VEGF-A і VEGFR-2 достовірно не змінюються. Кількість мікросудин (за експресією CD34) значущо зростає на 31,38 % в гіперпластичних поліпах і не змінюється в інших зубчастих утвореннях.

3. В тубулярних, тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах при прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня достовірно зростає експресія ЕрСАН епітеліоцитами (на 13,68 %, 20,49 %, 21,71 %, відповідно); а в тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих і традиційних зубчастих аденомах достовірно збільшується кількість ALDH1-позитивних епітеліоцитів (на 32,13 %, 38,90 %, 25,39 %, відповідно) і ALDH1-позитивних клітин строми (на 44,57 %, 39,43 %, 31,26 %, відповідно).

4. Класичні тубулярні, тубуло-ворсинчасті і ворсинчасті аденоми дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої G1 колоректальної аденокарциноми значущо меншими середніми показниками експресії p53 (на 37,09 % і 45,35 %, за винятком ворсинчастих аденом, які не мають відмінностей за цим показником), VEGF-A (на 53,18%, 35,01 % і 51,90 %) і VEGFR-2 (на 31,20 %, 36,82 %, 28,85 %), а також меншою середньою кількістю CD44+ і ALDH1+ клітин строми (на 19,42 %, 18,88 %, 15,27 % і на 50,43 %, 29,97 %, 31,01 % відповідно). Зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої G1 колоректальної аденокарциноми значущо меншими середніми показниками експресії Ki-67 (на 13,44% і 37,20 %), p53 (на 42,46 % і 61,07 %), VEGF-A (на 49,08 % і 57,20 %) і VEGFR-2 (на 25,17 % і 37,97 %), а також меншою середньою кількістю CD44+ клітин строми (на 7,89 % і 46,36 %) і ALDH1+ клітин строми (на 39,22 % і 58,28 %).

5. При прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії зростає транскрипційна активність гену *KRAS* [медіана експресії мРНК гену *KRAS* в I стадії складає 0,42 (0,36 ; 0,43), в IV стадії дорівнює 2,91 (1,85 ; 3,50)], за наявності «стрибка» підвищення медіани експресії мРНК цього гену до 2,92 (1,80 ; 3,50) на II стадії прогресування. При прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії знижується медіана експресії мРНК гену *Ki-67* [від 3,20 (2,31 ; 3,59) в I стадії до 0,52 (0,28 ; 1,04) в IV стадії] та знижується медіана експресії Ki-67 клітинами пухлини [від 73,95 (61,57 ; 81,38) % в I стадії до 27,37 (20,96 ; 39,24) % в IV стадії]; підвищується медіана експресії мРНК гену *TP53* [від 2,15 (0,82 ; 2,30) в I стадії до 7,80 (5,99 ; 8,92) в IV стадії] та медіана експресії p53 клітинами пухлини [від 25,39 (13,56 ; 30,32) % в I стадії до 80,31 (68,08 ; 91,48) % в IV стадії]; а також знижується рівень експресії клітинами каспази-3 [від 54,60 (52,53 ; 62,48) УООЩ в I стадії до 25,66 (18,03 ; 26,27) УООЩ в IV стадії].

6. При прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії знижуються адгезивні зв'язки між раковими клітинами, що обумовлює зростання їх інвазивних властивостей: достовірно знижується медіана експресії мРНК гену

CDH1 (в 11 разів – від 0,88 (0,42 ; 1,14) до 0,08 (0,04 ; 0,41), відповідно) і рівень експресії Е-кадгерину (на 71,83 % – від 88,09 (60,22 ; 112,34) УООЩ до 24,82 (23,02 ; 40,81) УООЩ, відповідно) та залишаються достовірно підвищеними медіана експресії мРНК гену *CTNNB1* (2,88 (2,38 ; 5,38) і 2,27 (1,23 ; 2,93), відповідно) і рівні експресії β-катеніну (116,73 (112,28 ; 120,06) УООЩ і 115,59 (111,11 ; 120,37) УООЩ, відповідно). Між підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS* і високим рівнем експресії β-катеніну має місце прямий середньої сили зв'язок ($r = 0,41$, $p < 0,05$) та зворотній середньої сили зв'язок зі зниженим рівнем експресії Е-кадгерину ($r = -0,47$, $p < 0,05$).

7. При прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до II стадії в пухлині статистично значуще збільшується на 35,69 % рівень експресії MUC1 (від 42,15 (38,14 ; 55,26) до 65,54 (55,39 ; 70,04) УООЩ, відповідно), знижуються рівні експресії MUC2 - на 45,13 % (від 42,17 (35,54 ; 55,26) до 23,14 (17,26 ; 28,46) УООЩ, відповідно) і MUC4 – на 37,26 % (від 50,06 (40,04 ; 59,86) до 31,41 (21,15 ; 40,04) УООЩ, відповідно), а також зростають рівні експресії VEGF-A – на 57,29 % (від 37,80 (30,22 ; 56,89) до 88,50 (63,00 ; 115,00) УООЩ, відповідно) і VEGFR-2 – на 36,23 % (від 52,75 (39,14 ; 70,22) до 82,71 (63,14 ; 111,19) УООЩ, відповідно), в той час як при прогресування пухлини від II до III стадії в ній достовірно збільшується на 25,06 % рівень експресії Cdx-2 (від 66,21 (55,22 ; 76,25) до 88,35 (80,04 ; 98,16) УООЩ, відповідно).

8. При прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії в пухлині зростають показники епітеліально-мезенхімальної трансформації: статистично значуще знижуються рівні експресії СК-20 - на 59,94 % (від 84,17 (73,17 ; 92,63) до 33,72 (24,14 ; 41,59) УООЩ, відповідно) і Е-кадгерину – на 70,52 % (від 84,17 (73,17 ; 92,63) до 24,82 (23,02 ; 40,81) УООЩ, відповідно) та достовірно підвищуються рівні експресії віментину - на 35,26 % (від 70,22 (61,15 ; 78,65) до 108,45 (96,33 ; 119,15) УООЩ, відповідно) і α-SMA – на 54,71 % (від 41,15 (31,71 ; 48,98) до 90,84 (80,34 ; 96,35) УООЩ, відповідно). Наявний прямий сильний зв'язок між низьким рівнем експресії Е-кадгерину і середнім рівнем експресії СК-20 ($r = 0,74$, $p < 0,05$) та прямий середньої сили зв'язок між рівнями експресії віментину і α-SMA ($r = 0,53$, $p < 0,05$), а також має місце зворотній середньої сили зв'язок між середніми рівнями експресії СК-20 і віментину ($r = -0,65$, $p < 0,05$), а також середнім рівнем експресії α-SMA ($r = -0,69$, $p < 0,05$).

9. При стадійному прогресуванні в колоректальній аденокарциномі достовірно зростає рівень експресії маркерів стовбурових клітин: рівень експресії ЕРСАМ раковими клітинами збільшується від 83,96 (78,17 ; 90,55) УООЩ на II стадії до 92,33 (91,18 ; 105,34) УООЩ на III стадії (на 9,07 %), і до 107,85 (96,78 ; 120,34) УООЩ на IV стадії (на 14,40 %); відсоток ALDH1-позитивних ракових клітин в пухлині зростає від III до IV стадії на 32,26 % (від 34,25 (26,47 ; 42,15) % до 50,56 (45,84 ; 61,38) %, відповідно). При розвитку від I до II стадії в пухлині на 34,92 % збільшується відсоток CD44-позитивних клітин строми (від 31,41 (19,87 ; 42,15) % до 48,26 (35,44 ; 61,45) %, відповідно); а відсоток ALDH1-позитивних

клітин строми зростає від 20,66 (18,51 ; 21,47) % (на I стадії) до 25,75 (20,56 ; 32,86) % (на II стадії) і до 44,93 (41,17 ; 50,01) % та до 48,36 (42,15 ; 55,17) % (на III та на IV стадіях, відповідно).

10. Метастатична колоректальна аденокарцинома відрізняється від неметастатичної достовірно нижчим на 36,49 % рівнем проліферації клітин (за експресією Ki-67) і нижчим на 42,38 % рівнем експресії мРНК гену *Ki-67*; статистично значущо вищими рівнями експресії мРНК гену *TP53* (на 23,34 %) і онкопротеїну p53 (на 45,18 %) та вищою на 55,27 % транскрипційною активністю гену *KRAS*; достовірно вищими рівнями експресії VEGF-A (на 32,04 %) і VEGFR-2 (на 35,30 %); значущо нижчими рівнями експресії пухлинними клітинами маркерів епітеліального фенотипу (Е-кадгерину – на 63,30 % і СК-20 – на 40,97 %) та вищими – маркерів мезенхімального фенотипу (віментину – на 23,26 % і α -SMA – на 38,64 %); достовірно вищими рівнями експресії MUC1 (на 16,05 %) і Cdx-2 (на 36,64 %) та нижчими рівнями експресії MUC2 (на 28,14 %) і MUC4 (на 14,07 %); а також статистично значущо більшим відсотком стовбурових клітин: ЕрСМ-позитивних ракових клітин (на 18,97 %), CD44-позитивних клітин строми (на 45,74 %) і ALDH1-позитивних клітин строми (на 51,61 %).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

При визначенні наявності прогресування аденом і зубчастих новоутворень ДТК та колоректальної аденокарциноми доцільно врахувати наступні параметри:

1. Про стан прогресування звичайних аденом ДТК вказує наявність дисплазії епітелію високого ступеня, високі рівні експресії Ki-67 і p53 епітеліоцитами, а також підвищений рівень експресії ЕрСМ епітеліоцитами та висока кількість ALDH1+ епітеліоцитів і ALDH1+ клітин строми.

2. Про стан прогресування зубчастих новоутворень ДТК вказують дисплазія епітелію високого ступеня, високі рівні експресії Ki-67 і p53 епітеліоцитами, а для гіперпластичних поліпів – також і збільшена кількість мікросудин.

3. При прогресуванні від I до IV стадії в КРА зростає транскрипційна активність генів *KRAS* і *TP53* та експресія p53, має місце підвищена транскрипційна активність *CTNNB1* та експресія β -катеніну, знижена транскрипційна активність генів *Ki-67* і *CDH1* та знижена експресія Е-кадгерину, а також визначаються показники епітеліально-мезенхімальної трансформації: знижується рівень експресії СК-20, зростають рівні експресії віментину і α -SMA.

4. На прогресування КРА від I до II стадії вказує підвищення показників експресії MUC1, VEGF-A, VEGFR-2, CD44 (і ALDH1 клітинами строми), а також зниження показників експресії MUC2 і MUC4. На прогресування КРА від II до III стадії вказує підвищення показників експресії Cdx-2 і ЕрСМ; на прогресування карциноми від III до IV стадії вказує підвищення показників експресії ЕрСМ та ALDH1 (раковими і стромальними клітинами).

5. Про високий метастатичний потенціал КРА свідчить сукупність ІГХ ознак: підвищені показники експресії мРНК *KRAS*, мРНК *TP53* і *p53*, *VEGF-A* і *VEGFR-2*, віментину і α -*SMA*, *MUC1*, *ErCAM*, *CD44* (і *ALDH1* клітинами строми), а також знижені показники експресії мРНК *Ki-67* і *Ki-67*, Е-кадгерину, *CK-20*, *MUC2* і *MUC4*.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шишкін М. А., Кабаченко В. О. Епідеміологія раку товстого кишечника в умовах великого промислового міста. *Патологія*. 2015. №3(35). С. 61–65. DOI: 10.14739/2310-1237.2015.3.55611. (Дисертант виконав відбір та аналіз архівного матеріалу, статистичну обробку даних).

2. Шишкін М. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии маркера клеточной пролиферации *Ki-67* в опухолевых и стромальных клетках колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2016. №2(37). С. 76–81. DOI: 10.14739/2310-1237.2016.2.80898.

3. Шишкін М. А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2016. №3(38). С. 65–72. DOI: 10.14739/2310-1237.2016.3.87497.

4. Шишкін М. А. Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2018. Т. 15, №1(42). С. 49–56. DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129447.

5. Шишкін М. А., Туманський В. О. Особливості транскрипційної активності генів *CDH1*, *CTNNB1* та експресії кодованих ними молекул Е-кадгерину, β -катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми. *Патологія*. 2018. Т. 15, №2(43). С. 221–228. DOI: 10.14739/2310-1237.2018.2.141432. (Дисертант виконав гістологічні та ІГХ дослідження, аналіз результатів ІГХ і молекулярно-генетичних досліджень, статистичну обробку даних).

6. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Морфологія*. 2019. Т. 13, №1. С. 67–75. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.1.67-75. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).

7. Шишкін М. А. *MUC1*, *MUC2*, *MUC4*, *MUC5AC*, *Cdx2*: характеристика иммуногистохимической экспрессии в полипах и аденокарциноме дистальных отделов толстого кишечника. *Патологія*. 2019. Т.16, №1 (45). С. 73–80. DOI: 10.14739/2310-1237. 2019.1.166313.

8. Туманський В. О., Шишкін М. А. Особливості транскрипційної активності гену *KRAS* та його значення в колоректальній карциномі. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2019. Т.23, №1 С. 153–157. DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-27. (Дисертант виконав ІГХ дослідження, аналіз результатів ІГХ і молекулярно-генетичного досліджень, статистичну обробку даних).

9. Шишкин М. А. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2019. Т.16, №2 (46). С. 148–154. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177075.
10. Shyshkin M. A. Comparative immunohistochemical study of Ki-67, p53, caspase-3 in distal colonic polyps and colorectal adenocarcinoma. *Морфологія*. 2019. Т. 13, №3. С. 149–155. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.3.149-155.
11. Шишкин М. А., Христенко Т. А. Иммуногистохимическая характеристика неоангиогенеза в полипах и аденокарциноме дистальных отделов толстой кишки. *Морфологія*. 2019. Т. 13, №4. С. 43–49. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.4.43-49. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).
12. Шишкин М. А., Туманский В. А., Христенко Т. А. Значение CD44- и ALDH1-позитивных стволовых клеток в прогрессии колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2020. Т. 17, № 2(49). С. 170–177. DOI: 10.14739/2310-1237.2020.2.212819. (Дисертант виконав збір даних, аналіз та інтерпретацію отриманих результатів).
13. Шишкин М. А., Христенко Т. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии CD44 в колоректальной аденокарциноме. *Морфологія*. 2020. Т. 14, № 2. С. 44–50. DOI: 10.26641/1997-9665.2020.2.44-50. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).
14. Шишкин М. А., Фень С. В. Эпителиально-мезенхимальный переход в прогрессии колоректальной аденокарциномы. *Запорожский медицинский журнал*. 2020. Т. 22, № 5(122). С. 694–700. DOI: 10.14739/2310-1210.2020.5.214747. (Дисертант виконав аналіз та інтерпретацію результатів ІГХ дослідження та статистичну обробку даних).
15. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Comparative study of Ki-67 and CD44 expression in serrated polyps of the distal colon. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. N 10(7). P. 358–365. DOI: 10.5281/zenodo.3497436. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).
16. Шишкин М. А., Христенко Т. О. Порівняльна характеристика експресії EPCAM в поліпах і аденокарциномі дистальної товстої кишки. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2020. Т. 24, №2. С. 208–214. DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(2)-02. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).
17. Shyshkin M. A. Comparative analysis of CD44 expression in polyps and adenocarcinoma of the distal colon. *Вісник Української медичної стоматологічної академії «Актуальні проблеми сучасної морфології»*. 2020. Т. 20, № 3(71). С. 173–178. DOI: 10.31718/2077-1096.20.3.173.
18. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Epithelial-mesenchymal transition and stem cells in colorectal cancer progression. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. N 10(10). P. 201–211. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.10.018. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).

19. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression in serrated colonic polyps. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. N 10(11). P. 219–225. DOI: 10.12775/JEHS.2020.10.11.021. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).

20. Шишкин М. А., Христенко Т. А. Анализ уровней пролиферации и апоптоза, а также экспрессии MUC-1 и Cdx-2 в полипах дистальной толстой кишки. *Морфологія*. 2020. Т. 14, № 3. С. 124–131. DOI: 10.26641/1997-9665.2020.3.124-131. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).

21. Shyshkin M. A., Khrystenko T. O. Comparative analysis of aldehyde dehydrogenase 1 expression in polyps and adenocarcinoma of the distal colon. *Медичні перспективи*. 2020. Т. XXV, № 4. С. 94-98. DOI: 10.26641/2307-0404.2020.4.221242. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).

22. Туманський В. О., Шишкін М. А. Характеристика транскрипційної активності гена KRAS та експресії маркерів апоптозу в клітинах колоректальної аденокарциноми. *Перспективи розвитку сучасної патології: матеріали Х Конгресу патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 р.)*. Івано-Франківськ, 2018. С.194-195. (Дисертант виконав аналіз результатів ІГХ і молекулярно-генетичного досліджень, статистичну обробку даних).

23. Shyshkin M. A. Comparative immunohistochemical study of Ki-67, p53, caspase-3 in distal colonic polyps and colorectal adenocarcinoma. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.)*. Дніпро, 2019. С.150.

24. Shyshkin M. A. Histopathological study of distal colonic polyps. *Actual trends of modern scientific research: Abstracts of IV International Scientific and Practical Conference (Munich, Germany, October 11-13, 2020)*. Munich, 2020. P. 53–55.

25. Шишкин М. А. Патогистологический мониторинг зубчатых полипов дистальной толстой кишки. *The world of science and innovation: Abstracts of III International Scientific and Practical Conference (London, United Kingdom, October 14-16, 2020)*. London, 2020. P. 616–620.

26. Shyskin M. A., Khrystenko T. O. Analysis of proliferation and apoptosis, MUC-1 and CDX-2 expression in distal colonic polyps. *Теорія та практика сучасної морфології: матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Дніпро, 4-6 листопада 2020р.)*. Дніпро, 2020. С.126–127. (Дисертант виконав ІГХ дослідження і аналіз їх результатів та статистичну обробку даних).

27. Шишкін М. А. Імуногістохімічна характеристика експресії ALDH1 в зубчастих поліпах дистальної товстої кишки. *Медична наука у практику охорони здоров'я: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених (м. Полтава, 27 листопада 2020р.)*. Полтава, 2020. С. 37–38.

28. Патент на корисну модель № 128509 Україна, МПК G01N 21/01 (2006.01). Спосіб прогнозування схильності до прогресування зубчастих поліпів дистальних відділів товстої кишки / Туманський В. О., Шишкін М. А., заявник та патентовласник Запорізький державний медичний університет. – № u201802219; заявл. 05.03.18; опубл. 25.09.18, Бюл. № 18 (2018). (*Дисертант виконав гістологічне та ІГХ дослідження, описав морфологічну частину корисної моделі*).

АНОТАЦІЯ

Шишкін М.А. Молекулярно-генетичні і імуногістохімічні параметри прогресування поліпів та раку товстої кишки. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2021.

Визначено, що провідну роль в прогресуванні аденом ДТК відіграє дисплазія з підвищенням рівня проліферації та апоптозу епітелію, а також експресії ЕрСМ та кількості ALDH1+ клітин. Провідну роль в прогресуванні зубчастих утворень ДТК відіграє дисплазія з підвищенням рівня проліферації та апоптозу епітелію, в гіперпластичних поліпах – і збільшення кількості мікросудин. High-grade поліпи ДТК відрізняються від G1 КРА достовірно нижчими показниками експресії p53, VEGF-A, CD44, ALDH1, зубчасті утворення – і нижчим рівнем експресії Ki-67.

При прогресуванні КРА від I до IV стадії зростає експресія мРНК *KRAS*, *TP53* і експресія p53, знижується експресія мРНК *Ki-67* і експресія Ki-67. Також знижуються експресія мРНК *CDH1* і експресія Е-кадгерину, лишаються підвищеними експресія мРНК *CTNNB1* і експресія β-катеніну. Одночасно знижується експресія СК-20, зростає експресія віментину і α-SMA. Метастатична КРА відрізняється від неметастатичної достовірно вищими показниками експресії мРНК *KRAS*, мРНК *TP53* і p53, VEGF-A, VEGFR-2, віментину, α-SMA, MUC1, ЕрСМ, CD44, ALDH1 клітинами строми; достовірно нижчими показниками експресії мРНК гену *Ki-67* і Ki-67, Е-кадгерину, СК-20, MUC2, MUC4.

Ключові слова: колоректальні поліпи, колоректальний рак, проліферація, апоптоз, *K-RAS*, ангиогенез, стовбурові клітини, CD44, ALDH1, ЕрСМ, *CDH1*, Е-кадгерин, *CTNNB1*, β-катенін, епітеліально-мезенхімальний перехід.

АННОТАЦІЯ

Шишкін М.А. Молекулярно-генетические и иммуногистохимические параметры прогрессирования полипов и рака толстой кишки. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.02 – патологическая анатомия. – Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2021.

Установлено, что ведущую роль в прогрессировании аденом ДТК играет дисплазия с повышением уровня пролиферации и апоптоза эпителия, а также экспрессии EpCAM и количества ALDH1+ клеток. Ведущую роль в прогрессировании зубчатых образований ДТК играет дисплазия с повышением уровня пролиферации и апоптоза эпителия, в гиперпластических полипах – и рост числа микрососудов. High-grade полипы ДТК отличаются от G1 КРА достоверно более низкими показателями экспрессии p53, VEGF-A, CD44, ALDH1, зубчатые образования – и более низким уровнем экспрессии Ki-67.

При прогрессировании КРА от I до IV стадии возрастает экспрессия мРНК *KRAS*, *TP53* и экспрессия p53, снижается экспрессия мРНК *Ki-67* и экспрессия Ki-67. Также снижаются экспрессия мРНК *CDH1* и экспрессия E-кадгерина, остаются повышенными экспрессия мРНК *CTNNB1* и экспрессия β -катенина. Одновременно снижается экспрессия СК-20, возрастает экспрессия виментина и α -SMA. Метастатическая КРА отличается от неметастатической достоверно более высокими показателями экспрессии мРНК *KRAS*, мРНК *TP53* и p53, VEGF-A, VEGFR-2, виментина, α -SMA, MUC1, EpCAM, CD44, ALDH1 клетками стромы; достоверно более низкими показателями экспрессии мРНК *Ki-67* и Ki-67, E-кадгерина, СК-20, MUC2, MUC4.

Ключевые слова: колоректальные полипы, колоректальный рак, пролиферация, апоптоз, *K-RAS*, ангиогенез, стволовые клетки, CD44, ALDH1, EpCAM, *CDH1*, E-кадгерин, *CTNNB1*, β -катенин, эпителиально-мезенхимальный переход.

ANNOTATION

Shyshkin M.A. Molecular-genetic and immunohistochemical parameters of colonic polyps and colonic cancer progression. – Qualifying scientific work as a manuscript copyright.

Thesis for a doctoral degree in specialty 14.03.02 «Pathological anatomy» (22 – The Ministry of Health). – Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2021.

In the thesis, it was established that epithelial dysplasia with increased proliferation and apoptosis levels, as well as increased EpCAM expression and increased number of ALDH1+ epitheliocytes and stromal cells play a key role in the progression of conventional adenomas of the distal colon. Epithelial dysplasia with increased proliferation and apoptosis levels plays a key role in the progression of serrated lesions of the distal colon, augmented by the increased number of microvessels in hyperplastic polyps exclusively. It was shown that high-grade conventional adenomas of the distal colon differ from G1 colorectal adenocarcinoma by significantly lower p53, VEGF-A, CD44 expression indexes, as well as significantly lower ALDH1 expression by stromal cells; serrated lesions differ by significantly lower Ki-67, p53, VEGF-A, VEGFR-2 expression indexes, as well as significantly lower CD44 and ALDH1 expression by stromal cells.

During the colorectal adenocarcinoma progression from the Ist up to the IVth stage, transcriptional activities of *KRAS* and *TP53* genes increase, whereas transcriptional activity of *Ki-67* gene decreases, immunohistochemical p53 and Ki-67 expression indexes change accordingly. During the progression, transcriptional activity of *CDH1* and E-cadherin expression level decrease, while transcriptional activity of *CTNNB1* and β -catenin expression level keep elevated. At the same time, indicators of epithelial-mesenchymal transformation appear: CK-20 expression level decreases, vimentin and α -SMA expression levels increase. During the colorectal adenocarcinoma progression from the Ist up to the IInd stage, MUC1, VEGF-A, VEGFR-2, CD44 expression levels increase, as well as ALDH1 expression by stromal cells, whereas MUC2 and MUC4 expression levels decrease. The colorectal adenocarcinoma progression from the IInd up to the IIIrd stage differs by the elevation of Cdx-2 and EPCAM expression levels, while the progression from the IIIrd up to the IVth stage differs by the elevation of EPCAM expression level and ALDH1 expression level by both cancer cells and stromal cells. Metastatic colorectal adenocarcinoma differs from non-metastatic one by significantly higher mRNA *KRAS*, mRNA *TP53* and p53, VEGF-A and VEGFR-2, vimentin, α -SMA, MUC1, EpCAM, CD44 expression levels, as well as higher ALDH1 expression by stromal cells; and by significantly lower mRNA *Ki-67* and Ki-67, E-cadherin and CK-20, MUC2 and MUC4 expression levels.

Key words: colorectal polyps, colorectal cancer, proliferation, apoptosis, *K-RAS*, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34, angiogenesis, stem cells, CD44, ALDH1, EpCAM, *CDH1*, E-cadherin, *CTNNB1*, β -catenin, CK-20, α -SMA, vimentin, epithelial-mesenchymal transition, mucins, Cdx-2.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

β -катенін	– протеїн, молекула міжклітинної адгезії
Віментин	– проміжний філамент клітин мезенхімального походження
Е-кадгерин	– мембранний глікопротеїн, молекула міжклітинної адгезії
ЕМП	– епітеліально-мезенхімальний перехід
ДТК	– дистальна товста кишка
ІГХ	– імуногістохімічне (дослідження)
ІМПЗ	– имунопозитивні (клітини)
Каспаза-3	– фермент апоптотичної деградації, маркер апоптозу
КРА	– колоректальна аденокарцинома
МГ	– молекулярно-генетичні (дослідження)
Me	– медіана
МФМ	– морфометричне (дослідження)
НСО	– незмінена слизова оболонка
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
СПЗМ	– стандартизоване поле зору мікроскопа
УООЩ	– умовна одиниця оптичної щільності
ALDH1	– альдегіддегідрогеназа 1
α -SMA	– альфа-гладеньком'язовий актин
CK20	– проміжний філамент епітеліальних клітин
CD44	– поверхневий глікопротеїн, рецептор гіалуронової кислоти
CD34	– поверхневий глікопротеїн, кластер диференціювання ранніх етапів гемопоезу та кровотворних судин
<i>CDH1</i>	– ген, що кодує глікопротеїн Е-кадгерин
<i>CTNNB1</i>	– ген, що кодує білок β -катенін
Cdx-2	– кишковий фактор транскрипції
ЕрСAM	– молекула адгезії епітеліальних клітин
Ki-67	– білок-регулятор клітинного циклу, маркер проліферації клітин
MUC1	– пан-епітеліальний мембранний мукопротеїн
MUC2	– кишковий мукопротеїн
MUC4	– трансмембранний мукопротеїн апікальної частини клітин
MUC5AC	– шлунковий мукопротеїн
<i>KRAS</i>	– протоонкоген, що кодує білок RAS
p53	– білок-регулятор клітинного циклу, маркер однойменного онкопротеїну
r	– коефіцієнт кореляції Пірсона
<i>TP53</i>	– ген, що кодує білок p53
VEGF-A	– фактор росту ендотелію судин А
VEGFR-1	– рецептор 1 судинно-ендотеліального фактору росту
VEGFR-2	– рецептор 2 судинно-ендотеліального фактору росту
Wnt/ β -катеніновий каскад	– внутрішньоклітинний сигнальний каскад, центральним компонентом якого є β -катенін

Підписано до друку 29.03.2021 р. Гарнітура Times New Roman.
Папір друкарський. Формат 60×90/16. Умовн. друк. арк. 1,33.
Обл.-вид. арк. 0,9. Друк — ризограф.
Наклад — 100 прим. Зам. № 9132.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26