

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(2)-02

УДК: 616.345-006.5+616.345-006.66]-091.8:576.52

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ ЕРСАМ У ПОЛІПАХ І АДЕНОКАРЦИНОМІ ДИСТАЛЬНОЇ ТОВСТОЇ КИШКИ

Шишкін М. А., Христенко Т. О.

Запорізький державний медичний університет (пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035)

Відповідальний за листування:
e-mail: Khristenko.ta@gmail.com

Статтю отримано 16 квітня 2020 р.; прийнято до друку 20 травня 2020 р.

Анотація. *ЕрСАМ відомий як універсальний маркер стовбурових клітин, при цьому питання його значущості в колоректальному канцерогенезі залишається відкритим. Метою роботи було порівняти рівні імуногістохімічної експресії ЕрСАМ в поліпах і аденокарциномі дистальної товстої кишки. Проведено патогістологічне та імуногістохімічне дослідження біоптатів поліпів і незміненої слизової 40 пацієнтів, операційного матеріалу 30 пацієнтів, прооперованих з приводу колоректального раку. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакета "STATISTICA® for Windows 13.0" (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ8041382130ARCN10-J). Обчислювали медіану (Me), нижній і верхній квартилі (Q_1 ; Q_3), порівняння між двома групами спостережень проводили за допомогою критерія Манна-Уїтні. Встановлено, що для поліпів характерним є мембранний патерн експресії ЕрСАМ епітеліоцитами, з медіаною, що дорівнює 65,22 (33,65; 78,94) УООЩ. Порівняльний аналіз рівнів експресії ЕрСАМ в поліпах і гістологічно незмінній слизовій оболонці, а також у двох досліджених підгрупах поліпів встановив відсутність достовірної різниці. Для колоректальної аденокарциноми характерним є мембрано-цитоплазматичний патерн експресії ЕрСАМ раковими клітинами, з медіаною, що дорівнює 90,86 (80,24; 99,02) УООЩ. Порівняльний аналіз рівнів експресії ЕрСАМ у досліджених підгрупах карциноми, що відповідають стадіям хвороби за pTNM, встановив тенденцію до зростання рівня експресії ЕрСАМ раковими клітинами карциноми при її прогресії, з достовірним збільшенням показника медіани експресії маркера від II до IV стадії хвороби. Також встановлено, що медіана експресії ЕрСАМ раковими клітинами на 28% перевищує медіану експресії маркера епітеліоцитами поліпів, що є статистично значущим: 90,86 (80,24; 99,02) УООЩ vs. 65,22 (33,65; 78,94) УООЩ, $p < 0,05$. На підставі отриманих даних різниця в патернах експресії ЕрСАМ в поліпах і колоректальній аденокарциномі обумовлена структурними змінами, що зазнає молекула в ході кишкового канцерогенезу, а достовірний ріст рівня експресії ЕрСАМ на просунутих стадіях колоректальної карциноми відображає надбання раковими клітинами властивостей стовбурових.*

Ключові слова: новоутворення кишечника, поліпи, колоректальний рак, ЕрСАМ.

Вступ

ЕрСАМ (Epithelial Cell Adhesion Molecule) - трансмембранний глікопротеїн, що забезпечує Ca^{2+} -незалежну міжклітинну адгезію епітеліоцитів і передачу сигналів між клітинами. Молекула ЕрСАМ складається з 3 доменів: екстрацелюлярного (ЕрЕХ), трансмембранного та термінального цитоплазматичного (інтрацелюлярного, ЕрІСД). ЕрЕХ забезпечує безпосередньо гомотипічну адгезію, у той час як ЕрІСД зв'язується з актиновим цитоскелетом [3, 5, 13].

У нормі експресія ЕрСАМ виявляється на базолатеральних поверхнях мембран епітеліоцитів, що примітно, на вільних від молекул Е-кадгеріну кластерах мембран [3]. Високими рівнями експресії даної молекули характеризуються епітеліоцити тонкої і товстої кишки, жовчного міхура, ендометрія. При цьому загальною тенденцією є пряма кореляція експресії ЕрСАМ з рівнем проліферації епітеліоцитів і зворотна кореляція ЕрСАМ зі ступенем їх диференціювання [13]. Так, було показано, що в напрямку від крипт до кишкових ворсинок експресія ЕрСАМ знижується, відповідно високий рівень експресії даної молекули характеризує стовбурові клітини слизової кишки, розташовані в криптах, а відносно більш низький рівень експресії ЕрСАМ характеризує зрілі епітеліоцити ворсинок [16]. У літературі часто зустрічається визначення ЕрСАМ, яке вказує на те, що експресія

відповідного маркера характеризує всі види епітелію, за винятком плоского [3, 5, 13].

При цьому відомо, що експресія ЕрСАМ характеризує клітини-попередники епітеліоцитів шкіри, але не виявляється в зрілих кератиноцитах [16]. У печінці ЕрСАМ виявляється виключно перипортально, що є типовою локалізацією стовбурових клітин у даному органі [7]. За даними літератури ЕрСАМ є також універсальним маркером стовбурових клітин (СК), оскільки експресується ембріональними СК і СК дорослих [3, 13].

Відомо, що для більшості карцином характерна гіперекспресія ЕрСАМ, тобто значущо більша експресія маркера клітинами раку в порівнянні зі зразком нормальної тканини [3, 13]. При цьому прогностична значущість оцінки рівня експресії ЕрСАМ різна, що залежить від виду карциноми. Було доведено, що гіперекспресія ЕрСАМ в раку щитовидної залози, світлоклітинного раку нирки, плоскоклітинному раку голови і шиї асоціюється з поліпшенням показників виживання хворих [2, 8, 14]. У той час як гіперекспресія ЕрСАМ в протоковій карциномі підшлункової залози і раку шлунка асоціюється з погіршенням показників виживаності [6, 9]. Крім того, щодо ряду карцином, зокрема, колоректального раку (КРР), літературні дані носять суперечливий характер: є повідомлення про кореляцію гіперекспресії маркера

як з поліпшенням, так і з погіршенням прогностичних показників [10].

Гіперекспресію ЕрСМ в раку пов'язують зі специфічністю адгезивної функції, а також особливостями сигнальних функцій цієї молекули. ЕрСМ забезпечує адгезію за рахунок формування зв'язків з такою ж молекулою на сусідній клітині, тобто відбувається зв'язування двох позаклітинних доменів молекул ЕрСМ. Такі контакти слабкіші контактів, які забезпечують інші молекули міжклітинної адгезії, наприклад, кадгеринів. Крім того, відомо, що ЕрСМ може сприяти відокремленню кадгеринів-опосередкованих контактів, шляхом конкурентного зв'язування ЕрСД з молекулами α -актину [16]. Щодо сигнальних функцій, ЕрСМ втягується в Wnt/ β -катеніновий каскад за рахунок можливості його зв'язування з FHL2-протеїном (безпосереднім учасником каскаду). Більш того, відомо, що FHL2-протеїн є основною мішенню для зв'язування ЕрСМ в ембріональних СК. Також у літературі описані механізми залучення ЕрСМ в РІЗК-Акт-каскад і nPKC-залежний сигнальний шлях [3].

Суперечливість літературних даних щодо прогностичної значущості експресії ЕрСМ в КРР [10] привертає увагу до цього питання. Механізми реалізації гіперекспресії цієї молекули і роль у кишковому канцерогенезі до кінця залишаються не вивченими [5, 10]. Добре відома роль мутацій кодуєчого гена ЕРСМ у розвитку синдрому Лінча (спадкового неполіпозного раку товстої кишки) - герміногенні делеції цього гена призводять до подавлення експресії MSH2, що до теперішнього часу визнано одним з ключових механізмів розвитку захворювання [12]. При цьому в літературі знайдені лише поодинокі повідомлення про особливості експресії ЕрСМ у поліпах товстої кишки [4, 15], питання про роль ЕрСМ в прогресії послідовності "аденома-карцинома" і зубчастого шляху кишкового канцерогенезу залишаються відкритими.

Мета даного дослідження - порівняти рівні імуногістохімічної експресії ЕрСМ у поліпах і аденокарциномі дистальної товстої кишки.

Матеріали та методи

Проведено патоморфологічне й імуногістохімічне (ІГХ) дослідження матеріалу біопсії 40 пацієнтів (відібрані біоптати поліпів і гістологічно незміненої слизової дистальної товстої кишки), а також операційного матеріалу колоректальної аденокарциноми (КРА) 30 пацієнтів.

Біопсійний і операційний матеріал фіксували в 10% забуференому формаліні, заливали в парафін. Особливості гістологічної будови досліджених зразків вивчали в зрізах, забарвлених гематоксиліном і еозином, а також за допомогою ШИК-реакції.

При проведенні патогістологічного дослідження оцінювали особливості мікроскопічної будови зразків, на підставі чого сформовано 2 групи порівняння: 1 група -

поліпи дистальної товстої кишки (біопсії 30 пацієнтів), 2 група - аденокарцинома дистальної товстої кишки (операційний матеріал 30 пацієнтів). На підставі діючої класифікації ВООЗ перша група була поділена на 2 підгрупи: підгрупа 1.1 - гіперпластичні (зубчасті) поліпи (15 пацієнтів), підгрупа 1.2 - аденоматозні поліпи (15 пацієнтів). На підставі діючої класифікації pTNM друга група була розділена на 4 підгрупи, відповідно до стадій захворювання: I стадія (6 пацієнтів), II стадія (9 пацієнтів), III стадія (9 пацієнтів), IV стадія (6 пацієнтів). Групу контролю сформували 10 біоптатів гістологічно незміненої слизової оболонки дистальних відділів товстої кишки.

ІГХ дослідження проводили за стандартною методикою, що передбачена виробником антитіл. Використовували моноклональні антитіла до ЕрСМ (ЕрСМ Clone Ab-9, Thermo Scientific, USA). Результати ІГХ-дослідження оцінювали в мікроскопі Axioplan-2 (Carl Zeiss, Germany) при збільшенні $\times 200$. У кожному випадку оцінювали 5 полів зору. Рівень експресії ІГХ-маркера оцінювали методом фотоцифрової морфометрії, результати виражали в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ): 0-20 УООЩ - негативна реакція, 21-50 УООЩ - низький рівень експресії, 51-100 УООЩ - помірний рівень експресії, понад 100 УООЩ - високий рівень експресії.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою пакета "STATISTICA® for Windows 13.0" (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J). Обчислювали медіану (Me), нижній і верхній квартилі (Q1; Q3), порівняння між двома групами спостережень проводили за допомогою критерія Манна-Уїтні. Результати вважали статистично значущими на рівні 95% ($p < 0,05$).

Результати. Обговорення

Встановлено, що для поліпів дистальної товстої кишки характерний мембранний патерн експресії ЕрСМ епітеліоцитами, з медіаною рівною 65,22 (33,65; 78,94) УООЩ, що відповідає середньому рівню ІГХ-експресії маркера (рис. 1).

Порівняльний аналіз рівнів експресії ЕрСМ у поліпах і гістологічно незмінній слизовій оболонці дистальної товстої кишки виявив відсутність достовірної різниці: медіана експресії маркера для поліпів становила 65,22 (33,65; 78,94) УООЩ vs. медіана експресії маркера для незміненої слизової оболонки становила 48,36 (35,18; 60,21) УООЩ, $p > 0,05$. Експресія ЕрСМ у гістологічно незмінній слизовій так само, як і в поліпах, характеризувалася мембранним патерном. Порівняльний аналіз рівнів експресії ЕрСМ у двох вивчених підгрупах поліпів дистальної товстої кишки також виявив відсутність достовірної різниці: медіана експресії маркера для гіперпластичних поліпів становила 65,22 (31,47; 80,02) УООЩ vs. медіана експресії маркера для аденом становила 64,54 (33,65; 71,14) УООЩ, $p > 0,05$.

Для колоректальної аденокарциноми характерний мембранно-цитоплазматичний патерн експресії ЕрСМ

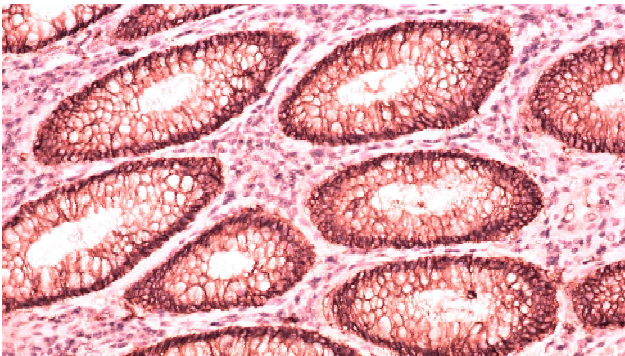


Рис. 1. Середній рівень мембранної експресії EpCAM у поліпі дистальної товстої кишки. Мо *a-Hu EpCAM (Clone Ab-9, ThermoScientific, USA)*. 36. x 400.

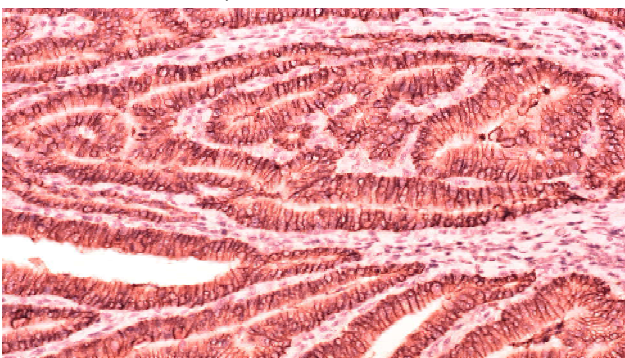


Рис. 2. Середній рівень мембранно-цитоплазматичної експресії EpCAM в колоректальній аденокарциномі. Мо *a-Hu EpCAM (Clone Ab-9, ThermoScientific, USA)*. 36. x 400.

раковими клітинами, з медіаною, рівній 90,86 (80,24; 99,02) УООЩ, що відповідає середньому рівню експресії маркера (рис. 2).

Порівняльний аналіз рівнів експресії EpCAM у вивчених підгрупах КРА, відповідно до стадій захворювання по рTNM, виявив ряд достовірних відмінностей: медіана експресії маркера раковими клітинами I стадії КРА становила 76,18 (72,69; 80,24) УООЩ vs. медіана експресії маркера раковими клітинами II стадії КРА становила 83,96 (78,17; 90,55) УООЩ, $p > 0,05$; медіана експресії маркера раковими клітинами II стадії КРА становила 83,96 (78,17; 90,55) УООЩ vs. медіана експресії маркера раковими клітинами III стадії КРА становила 92,33 (91,18; 105,34) УООЩ, $p < 0,05$; медіана експресії маркера раковими клітинами III стадії КРА становила 92,33 (91,18; 105,34) УООЩ vs. медіана експресії маркера раковими клітинами IV стадії КРА становила 107,85 (96,78; 120,34) УООЩ, $p < 0,05$. Таким чином, виявлена тенденція до зростання рівня експресії EpCAM раковими клітинами КРА при її прогресії, з достовірним зростанням рівня експресії маркера від II до IV стадії хвороби.

Також був проведений порівняльний аналіз даних, отриманих для поліпів дистальної товстої кишки і колоректальної аденокарциноми. Виявлено, що медіана експресії EpCAM раковими клітинами КРА на 28% більша медіани експресії маркера епітеліоцитами

поліпів дистальної товстої кишки, що є статистично значущим: 90,86 (80,24; 99,02) УООЩ vs. 65,22 (33,65; 78,94) УООЩ, $p < 0,05$ (рис. 3). Крім того, привертає увагу відмінність у патернах експресії EpCAM у карциномі та поліпах, про які вже було сказано раніше.

За даними літератури, при вивченні зразків нормальних тканин, позитивна ІГХ-реакція з використанням анти-EpCAM-антитіл характеризується мембранним патерном експресії, що пов'язано зі структурними особливостями молекули: екстрацелюлярний і трансмембранний домен EpCAM мають значущо більшу молекулярну масу в порівнянні з термінальним інтрацелюлярним доменом EpICD, який також називають "коротким". Виявлення EpICD у нормальних тканинах вимагає використання домен-специфічних антитіл. При використанні останніх проявляється цитоплазматична, а в окремих випадках і перинуклеарна і/або ядерна експресія маркера, що пов'язано з процесами протеолітичного розщеплення EpICD, яке відбувається при залученні його в сигнальних каскадах [11].

Згідно з отриманими даними, зразки гістологічно незміненої слизової та поліпів дистальної товстої кишки характеризуються мембранним патерном експресії EpCAM, у той час як вивчені зразки колоректальної аденокарциноми характеризуються мембранно-цитоплазматичним патерном експресії маркера. У літературі зустрічалися повідомлення про мембранно-цитоплазматичну, а також ядерну експресії EpCAM в КРА, яка проявлялася при використанні анти-EpCAM-антитіл (не домен-специфічних антитіл) [3, 16].

Грунтуючись на даних літератури, найбільш імовірно причиною прояву цитоплазматичного компонента в патерні експресії EpCAM в карциномах служить протеоліз EpICD з подальшою олігомеризацією. У нормі EpICD може піддаватися, або ж не піддаватися протеолізу. Непідвладний протеолізу інтрацелюлярний домен EpCAM знаходиться у зв'язаному з цитоскелетом стані.

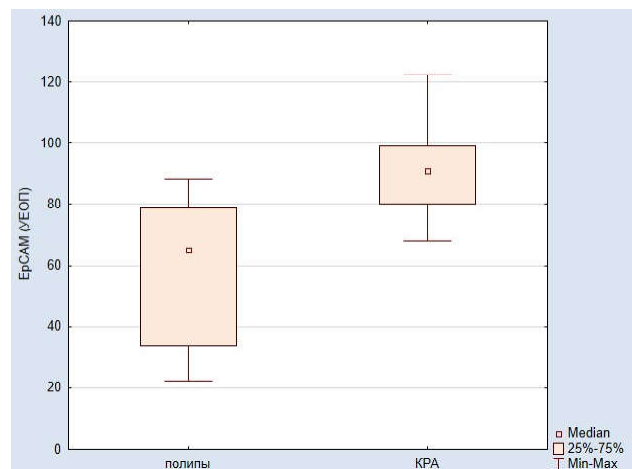


Рис. 3. Показники імуногістохімічної експресії EpCAM у поліпах дистальної товстої кишки (поліпи) і колоректальній аденокарциномі (КРА).

При впливі на ЕрСМ дезінтегринів і металопротеази ADAM-17 відбувається протеоліз, що призводить до роз'єднання ЕрСД і цитоскелету, а також розпаду домену на більш дрібні фрагменти. Останні, в свою чергу, можуть зв'язуватися з молекулами-учасниками сигнальних каскадів, опосередковуючи таким чином їх активацію [13]. Так, наприклад, фрагменти ЕрСД можуть зв'язуватися з FHL2-протеїном, що призводить до активації Wnt/ β -катенінового каскаду. Фрагменти ЕрСД також можуть взаємодіяти з RAS-протеїном, запускаючи фосфорилування АКТ з наступною активацією PI3K-Акт-сигнального шляху [3]. У карциномах, з невідомої причини, відбувається олігомеризація фрагментів ЕрСД, що тягне за собою надмірну активацію супідрядних сигнальних каскадів [13]. Крім того, очевидно, що олігомеризація фрагментів ЕрСД призводить до збільшення молекулярної маси домену, що робить можливим його візуалізацію (проявляється цитоплазматичним компонентом патерну експресії).

У літературі також була описана ядерна експресія ЕрСМ у карциномах, що пояснюється можливістю зв'язування фрагментів ЕрСД з β -катеніном і LEF-1 з наступною транслокацією даного комплексу в ядро. Це ще один з можливих шляхів опосередкування активації Wnt/ β -катенінового каскаду молекулами ЕрСМ [3, 16]. Однак, у проведеному дослідженні не було виявлено ядерного патерну експресії ЕрСМ. Крім того, в проведених нами раніше роботі була описана мембранно-цитоплазматична експресія β -катеніну при відсутності іммунозабарвлених (антитілами до β -катеніну) ядер в КРА. Був зроблений висновок про те, що рівень експресії β -катеніну в цитоплазмі ракових клітин КРА не досягає критичного (того, що призводить до транслокації молекул β -катеніну в ядро), а провідну роль в прогресії КРА відіграє зниження експресії Е-кадгеріна, асоційоване з аномальною (підвищеною) активністю KRAS [1]. Раніше вже було сказано про те, що фрагменти ЕрСД можуть взаємодіяти з RAS-протеїном, активуючи таким чином PI3K-Акт-сигнальний шлях [3], що узгоджується з даними проведеного нами раніше дослідження [1], і побічно вказує на залучення ЕрСМ у прогресивні стадії колоректального канцерогенезу шляхом активації PI3K-Акт-каскаду.

Крім того, в раніше проведеному дослідженні [1] було показано зниження ІГХ-експресії Е-кадгеріна й експресії мРНК кодуючого гена *CDH1* у послідовних стадіях КРА. У даній роботі було показано зростання ІГХ-експресії ЕрСМ у послідовних стадіях КРА. За даними літератури незважаючи на те, що обидві молекули (Е-кадгерін і ЕрСМ) відносять до молекул міжклітинної адгезії, вони мають властивість функціонального антагонізму. Добре відомо, що карциноми характеризуються зниженою експресією Е-кадгеріна, що лежить в основі роз'єднання атипичних епітеліоцитів [17], але при цьому карциноми характеризуються і підвищеною експресією ЕрСМ [3, 13], про що вже було сказано раніше. У ряді

досліджень було показано, що підвищення експресії ЕрСМ в раку асоціюється зі зниженням експресії β -катеніна (механізм якого залишається не ясним) і паралельним підвищенням розчинності цитоплазматичного домену Е-кадгеріна. Крім того, гіперекспресія ЕрСМ призводить до перерозподілу молекул β -актину, залучених у формування кадгерінових контактів, на користь ЕрСД [11, 16].

Як уже згадувалося раніше, в літературі зустрічаються лише поодинокі повідомлення про особливості експресії ЕрСМ у поліпах дистальної товстої кишки [4, 15], які не дають комплексної картини значення маркера в контексті дослідження цих новоутворень. У даній роботі було встановлено, що гіперпластичні поліпи й аденоми дистальної товстої кишки характеризуються середніми рівнями експресії ЕрСМ (статистично значуща різниця між їх медіанами відсутня). При цьому має місце статистично значуща різниця між медіанами експресії ЕрСМ епітеліоцитами поліпів і раковими клітинами КРА, а також між медіанами рівня експресії маркера раковими клітинами на II, III, IV стадіях КРА (з тенденцією до зростання).

У даній роботі було встановлено, що гіперпластичні поліпи і аденоми дистальної товстої кишки характеризуються середніми рівнями експресії ЕрСМ (статистично значуща різниця між їх медіанами відсутня). При цьому має місце статистично значуща різниця між медіанами експресії ЕрСМ епітеліоцитами поліпів і раковими клітинами КРА, а також між медіанами рівня експресії маркера раковими клітинами на II, III, IV стадіях КРА (з тенденцією до зростання).

На підставі отриманих результатів можна вважати, що ЕрСМ зберігає свої нормальні структурні та функціональні властивості в поліпах-прекурсорах КРА. А зміни цих властивостей характерні для просунутих стадій КРА і, ймовірно, залучаються до їх прогресії. Вище вже були описані механізми зміни патерну експресії ЕрСМ у КРА, що відображає структурні зміни молекул. Значуще зростання їх експресії свідчить про велику функціональну активність, перебуваючи в тісній асоціації зі структурною перебудовою (протеоліз з подальшою олігомеризацією) і, крім того, відображаючи фенотипічні зміни ракових клітин. Відповідно до сучасних уявлень, втрата ознак фенотипічного диференціювання раковими клітинами, тією чи іншою мірою, асоціюється з придбанням ними властивостей стовбуровості (stemness), таких як здатність до постійного самооновлення популяції [3]. На отриманих даних, а також комплексного аналізу літератури, можна вважати, що значне підвищення рівня експресії ЕрСМ у послідовних стадіях прогресії КРА відображає фенотипічні зміни ракових клітин у бік набуття ними властивостей СК. ЕрСМ добре відомий як універсальний маркер СК [3, 13], про що вже було сказано раніше. А основою фенотипічних змін з придбанням властивостей стовбуровості служить активація Wnt-каскадів, LIF/STAT3- і c-Мус-сигнальних шляхів, факторів

транскрипції Nanog, Oct3/4, Klf4, Sox2 [3], частина з яких може бути опосередкована EpCAM, про що також вже було сказано раніше.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Поліпи дистальної товстої кишки характеризуються мембранним патерном і середнім рівнем експресії EpCAM, що значущо не відрізняється від такого в незмінній слизовій.

2. Колоректальна аденокарцинома характеризується

мембранно-цитоплазматичним патерном і середнім рівнем експресії EpCAM, що значущо перевищує такий у поліпах дистальної товстої кишки.

3. На II, III, IV стадіях колоректальної аденокарциноми спостерігається вірогідне зростання рівня експресії EpCAM, що відображає і частково опосередковує придбання раковими клітинами властивостей стовбурових клітин.

Планується проведення порівняльного аналізу рівнів експресії інших маркерів стовбурових клітин (CD44, ALDH1) у поліпах і карциномі дистальної товстої кишки.

Список посилань

1. Шишкін, М. А., & Туманський, В. О. (2018). Особливості транскрипційної активності генів CDH1, CTNNB1 та експресії кодovаних ними E-кадгерину, β-катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми. *Патологія*, 15 (43), 221-228. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2018.2.141432>
2. Abdrabh, R. M., & Rashad, H. M. (2019). Significance of epithelial cell adhesion molecule and epidermal growth factor receptor expression in papillary thyroid carcinoma: an immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Pathology*, 39 (1), 159-164. https://doi.org/10.4103/EGJP.EGJP_20_19
3. Boesch, M., Spizzo, G., & Seeber, A. (2018). Concise Review: Aggressive Colorectal Cancer: Role of Epithelial Cell Adhesion Molecule in Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Stem Cells Translational Medicine*, 7, 495-501. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0289>
4. Cappelleso, R., Lo Mele, M., Rosa-Rizzotto, E., Guido, E., De Lazzari, F., Pilati, P., ... & Rugge, M. (2019). Molecular Characterization of "Sessile Serrated" Adenoma to Carcinoma Transition in Six Early Colorectal Cancers. *Pathology, Research and Practice*, 215 (5), 957-962. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.02.001>
5. Chai, X. B., Song, R. F., & Xu, F. (2015). Expression changes in epithelial cell adhesion molecule during colorectal cancer tumorigenesis. *Genetics and Molecular Research*, 14 (3), 7624-7629. <https://doi.org/10.4238/2015.July.13.6>
6. Dai, M., Yuan, F., Fu, C., Shen, G., Hu, S., & Shen, G. (2017). Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS one*, 12 (4), e0175357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175357>
7. Dolle, L., Theise, N. D., Schmelzer, E., Boulter, L., Gires, O., & van Grunsvan, L. A. (2015). EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308 (4), 233-250. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00069.2014>
8. Eichelberg, C., Chun, F. K., Bedke, J., Heuer, R., Adam, M., Moch, H., ... & Minner, S. (2013). Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 132 (12), 2948-55. <https://doi.org/10.1002/ijc.27970>
9. Gzil, A., Zarebska, I., Bursiewicz, W., Antosik, P., Graznka, D., & Szyberg, L. (2019). Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *Molecular Biology Reports*, 46 (6), 6629-6645. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05058-1>
10. Han, S., Zong, S., Shi, Q., Li, H., Liu, S., Yang, W., ... & Hou, F. (2017). Is Ep-CAM Expression a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer? A Systematic Meta-Analysis. *EBioMedicine*, 20, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.025>
11. Huang, L., Yang, Y., Yang, F., Liu, S., Zhu, Z., Lei, Z., & Guo, J.

- (2018). Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 42, 1771-1785. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3764>
12. Huth, C., Kloor, M., Voigt, A. Y., Bozukova, G., Evers, C., Gaspar, H., ... & Blaker, M. (2012). The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Modern Pathology*, 25 (6), 911-916. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.30>
13. Keller, L., Werner, S., & Pantel, K. (2019). Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*, 3 (6), 165-180. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.188>
14. Murakami, N., Mori, T., Nakamura, S., Yoshimoto, S., Honma, Y., Ueno, T., ... & Itami, J. (2019). Prognostic value of the expression of epithelial cell adhesion molecules in head and neck squamous cell carcinoma treated by definitive radiotherapy. *Journal of Radiation Research*, 60 (6), 803-811. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz053>
15. Murakami, T., Akazawa, Y., Yatagai, N., Hiromoto, T., Sasahara, N., Saito, T., ... & Yao, T. (2018). Molecular characterization of sessile serrated adenoma/polyps with dysplasia/carcinoma based on immunohistochemistry, next-generation sequencing, and microsatellite instability testing: a case series study. *Diagnostic pathology*, 13 (1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0771-3>
16. Pavsic, M., Guncar, G., Djinic-Carugo, K., & Lenarcic, B. (2014). Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. *Nature Communications*, 28 (5), 4764. <https://doi.org/10.1038/ncomms5764>
17. Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., & Ngai, S. C. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121, 11-22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010

References

1. Shyshkin, M. A., Tumanskyi, V. O. (2018) Osoblyvosti transkryptsiiinoi aktyvnosti heniv CDH1, CTNNB1 ta ekspresii kodovanykh nymy molekul E-kadherynu, β-kateninu na I, II, III, IV stadiakh rozvytku kolorektalnoi adenokartsynomy [Features of CDH1, CTNNB1 genes transcriptional activity and expression levels of E-cadherin, β-catenin proteins coded by these genes on the I, II, III, IV stages of colorectal adenocarcinoma development]. *Patolohiia - Pathology*, 15 (43), 221-228. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2018.2.141432>
2. Abdrabh, R. M., & Rashad, H. M. (2019). Significance of epithelial cell adhesion molecule and epidermal growth factor receptor expression in papillary thyroid carcinoma: an immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Pathology*, 39 (1), 159-164. https://doi.org/10.4103/EGJP.EGJP_20_19
3. Boesch, M., Spizzo, G., & Seeber, A. (2018). Concise Review: Aggressive Colorectal Cancer: Role of Epithelial Cell Adhesion

- Molecule in Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Stem Cells Translational Medicine*, 7, 495-501. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0289>
4. Cappellesso, R., Lo Mele, M., Rosa-Rizzotto, E., Guido, E., De Lazzari, F., Pilati, P., ... & Rugge, M. (2019). Molecular Characterization of "Sessile Serrated" Adenoma to Carcinoma Transition in Six Early Colorectal Cancers. *Pathology, Research and Practice*, 215 (5), 957-962. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.02.001>
 5. Chai, X. B., Song, R. F., & Xu, F. (2015). Expression changes in epithelial cell adhesion molecule during colorectal cancer tumorigenesis. *Genetics and Molecular Research*, 14 (3), 7624-7629. <https://doi.org/10.4238/2015.July.13.6>
 6. Dai, M., Yuan, F., Fu, C., Shen, G., Hu, S., & Shen, G. (2017). Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS one*, 12 (4), e0175357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175357>
 7. Dolle, L., Theise, N. D., Schmelzer, E., Boulter, L., Gires, O., & van Grunsven, L. A. (2015). EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308 (4), 233-250. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00069.2014>
 8. Eichelberg, C., Chun, F. K., Bedke, J., Heuer, R., Adam, M., Moch, H., ... & Minner, S. (2013). Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma. *International Journal of Cancer*, 132 (12), 2948-55. <https://doi.org/10.1002/ijc.27970>
 9. Gzil, A., Zarebska, I., Bursiewicz, W., Antosik, P., Graznka, D., & Szyberg, L. (2019). Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications. *Molecular Biology Reports*, 46 (6), 6629-6645. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05058-1>
 10. Han, S., Zong, S., Shi, Q., Li, H., Liu, S., Yang, W., ... & Hou, F. (2017). Is Ep-CAM Expression a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer? A Systematic Meta-Analysis. *EBioMedicine*, 20, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.025>
 11. Huang, L., Yang, Y., Yang, F., Liu, S., Zhu, Z., Lei, Z., & Guo, J. (2018). Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 42, 1771-1785. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3764>
 12. Huth, C., Kloor, M., Voigt, A. Y., Bozukova, G., Evers, C., Gaspar, H., ... & Blaker, M. (2012). The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors. *Modern Pathology*, 25 (6), 911-916. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.30>
 13. Keller, L., Werner, S., & Pantel, K. (2019). Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*, 3 (6), 165-180. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.188>
 14. Murakami, N., Mori, T., Nakamura, S., Yoshimoto, S., Honma, Y., Ueno, T., ... & Itami, J. (2019). Prognostic value of the expression of epithelial cell adhesion molecules in head and neck squamous cell carcinoma treated by definitive radiotherapy. *Journal of Radiation Research*, 60 (6), 803-811. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz053>
 15. Murakami, T., Akazawa, Y., Yatagai, N., Hiromoto, T., Sasahara, N., Saito, T., ... & Yao, T. (2018). Molecular characterization of sessile serrated adenoma/polyps with dysplasia/carcinoma based on immunohistochemistry, next-generation sequencing, and microsatellite instability testing: a case series study. *Diagnostic pathology*, 13 (1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0771-3>
 16. Pavsic, M., Guncar, G., Djinic-Carugo, K., & Lenarcic, B. (2014). Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. *Nature Communications*, 5 (5), 4764. <https://doi.org/10.1038/ncomms5764>
 17. Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., & Ngai, S. C. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121, 11-22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ EPСAM В ПОЛИПАХ И АДЕНОКАРЦИНОМЕ ДИСТАЛЬНОЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Шишкин М. А., Христенко Т. А.

Аннотация. EpCAM известен как универсальный маркер стволовых клеток, при этом вопрос его значимости в колоректальном канцерогенезе остается открытым. Целью работы было сравнить уровни иммуногистохимической экспрессии EpCAM в полипах и аденокарциноме дистальной толстой кишки. Проведено патогистологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов полипов и неизменной слизистой 40 пациентов, операционного материала 30 пациентов, прооперированных по поводу колоректального рака. Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета "STATISTICA® for Windows 13.0" (StatSoft Inc., лицензия № JPZ8041382130ARCN10-J). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q₁; Q₃), сравнение между двумя группами наблюдений проводили при помощи критерия Манна-Уитни. Установлено, что для полипов характерен мембранный паттерн экспрессии EpCAM эпителиоцитами, с медианой равной 65,22 (33,65; 78,94) УЕОП. Сравнительный анализ уровней экспрессии EpCAM в полипах и гистологически неизменной слизистой оболочке, а также в двух изученных подгруппах полипов выявил отсутствие достоверной разницы. Для колоректальной аденокарциномы характерен мембранно-цитоплазматический паттерн экспрессии EpCAM раковыми клетками, с медианой равной 90,86 (80,24; 99,02) УЕОП. Сравнительный анализ уровней экспрессии EpCAM в изученных подгруппах карциномы, соответственно стадиям заболевания по pTNM, выявил тенденцию к возрастанию уровня экспрессии EpCAM раковыми клетками карциномы при ее прогрессии, с достоверным увеличением показателя медианы экспрессии маркера от II к IV стадиям болезни. Также выявлено, что медиана экспрессии EpCAM раковыми клетками на 28% больше медианы экспрессии маркера эпителиоцитами полипов, что статистически значимо: 90,86 (80,24; 99,02) УЕОП vs. 65,22 (33,65; 78,94) УЕОП, p<0,05. На основании полученных данных различие в паттернах экспрессии EpCAM в полипах и колоректальной карциноме обусловлено структурными изменениями, которые претерпевает молекула в ходе кишечного канцерогенеза, а достоверное возрастание уровня экспрессии EpCAM на продвинутых стадиях колоректальной карциномы отражает приобретение раковыми клетками свойств стволовых.

Ключевые слова: новообразования кишечника, полипы, колоректальный рак, EpCAM.

COMPARATIVE STUDY OF EPCAM EXPRESSION IN POLYPS AND ADENOCARCINOMA OF THE DISTAL COLON

Shyshkin M. A., Khrystenko T. O.

Annotation. EpCAM is known as a universal stem cell marker, however, the question of its value in colorectal cancerogenesis is still open. The aim of the research was to compare EpCAM immunohistochemical expression levels in polyps and adenocarcinoma of the

distal colon. Pathohistological and immunohistochemical studies of biopsies of polyps and non-changed mucosa of 40 patients, as well as surgical material of 30 patients that underwent surgical treatment of colorectal cancer were carried out. The data were statistically processed using the STATISTICA® for Windows 13.0 package (StatSoft Inc., license № JPZ804I382130ARCN10-J). The median (Me), the lower and upper quartiles (Q_1 ; Q_3) were calculated, the comparison between the two groups of observations was performed using the Mann-Whitney test. It was figured out that the polyps are characterized by membranous pattern of EpCAM expression by epitheliocytes with the median equal to 65.22 (33.65; 78.94) CUOD. Comparative analysis of EpCAM expression levels in the polyps and histologically non-changed mucosa, as well as in two studied subgroups of the polyps revealed no significant differences. Colorectal adenocarcinoma is characterized by membranous-cytoplasmic pattern of EpCAM expression by cancer cells with the median equal to 90.86 (80.24; 99.02) CUOD. Comparative analysis of EpCAM expression levels in studied subgroups of the carcinoma (subgroups that correspond to the pTNM stages) revealed the tendency to increasing of EpCAM expression by cancer cells with statistically significant growth of the expression level median during the progression of the tumor from II to IV stages. Furthermore, it was established that the median of EpCAM expression is 28 % higher than the median of the marker expression in the polyps that is statistically significant: 90.86 (80.24; 99.02) CUOD vs. 65.22 (33.65; 78.94) CUOD, $p < 0.05$. Based on the data obtained, the difference in the patterns of EpCAM expression in the polyps and colorectal carcinoma is due to structural changes that happens to the molecule during colorectal carcinogenesis, moreover, significant increasing of EpCAM expression level at advanced stages of colorectal carcinoma reflects the acquisition of stemness by cancer cells.

Keywords: intestinal neoplasms, polyps, colorectal cancer, EpCAM.
