

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШИШКІН МАКСИМ АНДРІЙОВИЧ

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

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.03.02 – патологічна анатомія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М. А. Шишкін

Науковий консультант – Туманський Валерій Олексійович, заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор

Запоріжжя – 2021

АНОТАЦІЯ

Шишкін М. А. Молекулярно-генетичні і імуногістохімічні параметри прогресування поліпів та раку товстої кишки. – Кваліфікаційна наукова праця 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.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2021.

В дисертаційній роботі з метою удосконалення патоморфологічного прогнозування аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки та агресивного перебігу колоректального раку досліджено: імуногістохімічні параметри проліферації та апоптозу (за експресією Ki-67, p53, каспази-3), неоангіогенезу (за експресією VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34), експресії маркерів стовбурових клітин (CD44, ALDH1, EpCAM) в біопсійному матеріалі товстокишкових поліпів і в операційному матеріалі колоректальної аденокарциноми; імуногістохімічні параметри епітеліально-мезенхімального переходу (за експресією E-кадгерину, β-катеніну, СК-20, віментину, α-SMA) і муцинового фенотипу (за експресією MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, Cdx-2) в операційному матеріалі колоректальної аденокарциноми; молекулярно-генетичні параметри транскрипційної активності генів *Ki-67*, *TP53*, *KRAS*, *CDH1*, *CTNNB1* в операційному матеріалі колоректальної аденокарциноми. Проведений порівняльний аналіз даних, отриманих для кожного окремого гістологічного різновиду товстокишкового поліпа із різним ступенем виразності диспластичних змін, для поліпів з дисплазією високого ступеня та високодиференційованої колоректальної аденокарциноми, для кожної окремої стадії розвитку колоректальної аденокарциноми, а також для неметастатичної та метастатичної карциноми.

За результатами проведених імуногістохімічних досліджень встановлено, що звичайні аденоми дистальної товстої кишки характеризуються середнім рівнем клітинної проліферації (за експресією Ki-67) та експресії p53, а також низьким рівнем апоптозу (за експресією каспази-3). Цим аденомам властивий низький рівень експресії VEGF-A, відсутність експресії VEGFR-1, середній рівень експресії VEGFR-2, а також медіана кількості CD34+ мікросудин, що варіює від 42,50 до 58,00 в стандартизованому полі зору мікроскопа. В цих аденомах має місце середній рівень експресії EpCAM, медіана кількості CD44+ клітин стромы варіює від 55,73 % до 60,02 %, медіана кількості CD44+ епітеліоцитів коливається від 19,14 % до 41,68 %, медіана кількості ALDH1+ клітин стромы варіює від 20,61 % до 37,18 %, а медіана кількості ALDH1+ епітеліоцитів – від 17,22 % до 30,63 %.

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. 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. 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 імуногістохімічні параметри неоангіогенезу в усіх цих аденомах суттєво не змінюються.

При прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня в тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах визначається достовірно зростання експресії ALDH1 клітинам стромы (на 45 % і 40 %, відповідно), а також зростання експресії ALDH1 епітеліоцитами (на 33 % і 39 %, відповідно). Також 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).

Визначено, що зубчасті новоутворення дистальної товстої кишки 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 стандартизованому полі зору мікроскопа. В зубчастих утвореннях має місце середній рівень експресії ЕрСМ; медіана кількості CD44+ клітин стромы варіює від 36,65 % до 65,56 %, медіана кількості CD44+ епітеліоцитів коливається від 5,25 % до 48,93 %, медіана кількості ALDH1+ клітин стромы варіює в діапазоні від 20,80 % до 32,25 %, а медіана кількості ALDH1+ епітеліоцитів варіює від 10,69 % до 22,65 %.

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 (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). Між показниками клітинної проліферації, апоптозу і експресії p53 в досліджених нами зубчастих новоутвореннях має місце прямий кореляційний зв'язок.

При прогресуванні дисплазії епітелію від низького до високого ступеня імуногістохімічні параметри неоангіогенезу статистично значущо не змінюються в традиційних зубчастих аденомах і в зубчастих утвореннях на широкій основі. Але гіперпластичні поліпи відрізняються від інших досліджених зубчастих новоутворень достовірним збільшенням на 32 % кількості CD34+ мікросудин в стандартизованому полі зору мікроскопа. Встановлено також, що при прогресуванні дисплазії епітелію до високого ступеня в традиційних зубчастих аденомах достовірно зростає на 32 %

експресія ALDH1 клітинам стромы та на 26 % зростає експресія ALDH1 епітеліоцитами.

Встановлено, що колоректальна аденокарцинома 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 імуногістохімічного дослідження експресії *Ki-67*, 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 імуногістохімічного дослідження експресії *p53*. Окрім того, визначено, що в колоректальній аденокарциномі при прогресуванні від I до IV стадії знижується медіана рівня експресії каспази-3 на 53,01 %, що прямо корелює із медіаною середнього рівня експресії *Ki-67* ($r = 0,71, p < 0,05$). Транскрипційна активність гену *KRAS* при прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії зростає майже в 7 разів, за наявності «стрибка» підвищення медіани експресії мРНК цього гену на II стадії прогресування. Нами встановлена наявність статистично значущих кореляцій між підвищеними показниками транскрипційної активності *KRAS* і низьким рівнем імуногістохімічної експресії каспази-3 ($r = -0,44, p < 0,05$), а також підвищеними показниками транскрипційної активності *KRAS* і *TP53* ($r = 0,43, p < 0,05$).

Колоректальна аденокарцинома 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 і прямо корелюють між собою ($r = 0,85, p < 0,05$). При цьому встановлено достовірний «стрибок» рівнів експресії *VEGF-A* і *VEGFR-2* при прогресуванні карциноми від I до II стадії. Експресія *VEGFR-1* визначається лише в карциномах II-IV стадій, за відсутності достовірного зростання на окремих стадіях прогресування. Також встановлено відсутність достовірного зростання показників експресії *CD34* при прогресуванні карциноми від I до IV стадії.

Встановлено, що при прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до II стадії 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 карциноми від III до IV стадії на 32,26 % збільшується кількість ALDH1+ ракових клітин, а також на 14,40 % – рівень експресії EPCAM раковими клітинами. Також було встановлено наявність зворотного середньої сили зв'язку між медіанами експресії CD44 і рівню клітинної проліферації ($r = -0,62, p < 0,05$).

При порівнянні імуногістохімічних параметрів новоутворень дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію високого ступеня і високодиференційованої колоректальної аденокарциноми виявлено низку статистично значущих відмінностей. Звичайні аденоми з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої карциноми статистично значущо меншими медіанами експресії p53 (на 37,09 % для тубулярних і на 45,35 % для тубуло-ворсинчастих аденом), меншими медіанами експресії VEGF-A (на 53,18% для тубулярних, на 35,01 % для тубуло-ворсинчастих, на 51,90 % для ворсинчастих аденом) 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). Зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи з дисплазією епітелію високого ступеня відрізняються від високодиференційованої карциноми 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).

При прогресуванні карциноми від I до IV стадії базово низька транскрипційна активність гену *CDH1* в карциномі зменшується в 11 разів і паралельно на цих стадіях прогресування карциноми також достовірно знижується на 71,83 % експресія E-кадгерину. При цьому підвищена транскрипційна активність гену *CTNNB1*, притаманна карциномі, достовірно не змінюється при її прогресуванні від I до IV стадії і корелює з високим рівнем експресії β-катеніну, який залишається достовірно високим на цих стадіях прогресування карциноми. 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 E-кадгерину.

Нами встановлено, що зниження експресії E-кадгерину при прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії відбувається паралельно із зниженням на 59,94 % експресії маркера епітеліального фенотипу – СК-20. Якщо експресія E-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. Згідно отриманих нами даних, зростання показників експресії маркерів мезенхімального фенотипу в карциномі починається вже із її переходу 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. Має місце тенденція до скупчення віментин⁺ і α-SMA⁺ клітин виявляються поблизу груп дрібних ракових залоз. За даними проведеного нами кореляційного аналізу є прямий сильний зв'язок між рівнями експресії E-кадгерину і 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 рівнями експресії СК-20 і віментину ($r = -0,65$, $p < 0,05$), а також α-SMA ($r = -0,69$, $p < 0,05$).

Встановлено, що прогресування колоректальної аденокарциноми 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, рівень експресії Cdx-2 достовірно зростає на 25,06 % на III стадії; на II стадії достовірно знижується рівень експресії MUC2 на 45,13 %, а також знижується рівень експресії MUC4 на 45,13 %.

В порівняльному аналізі встановлено, що метастатична колоректальна аденокарцинома 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: ЕрСAM+ ракових клітин (на 18,97 %), CD44+ клітин строми (на 45,74 %) і ALDH1+ клітин строми (на 51,61 %).

Наукова новизна. Вперше в порівняльному аналізі визначені імуногістохімічні параметри проліферації та апоптозу, експресії маркерів неангіогенезу 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 ЕрСAM

епітеліоцитами та кількість ALDH1-позитивних епітеліоцитів і клітин строми (на тлі незмінної експресії маркерів неангіогенезу). 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, неангіогенезу 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, MUC5AC, 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 неангіогенезу, та вищим рівнем маркерів епітеліально-мезенхімальної трансформації, а також більшим відсотком клітин, що мають властивості стовбурових.

Практичне значення. Для практичного використання в патологоанатомічній діагностиці встановлені відмінності імуногістохімічних параметрів клітинної проліферації та апоптозу, неангіогенезу 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. 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, відсотку клітин із властивостями стовбурових, 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. Отримано патент України на корисну модель № 128509 «Спосіб прогнозування схильності до прогресування зубчастих поліпів дистальних відділів товстої кишки».

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

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» – Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2021.

Zaporizhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhia, 2021.

In the thesis, in order to improve pathomorphological prognosis of adenomas and serrated lesions as well as the prognosis of colorectal cancer aggressiveness the following parameters were investigated: immunohistochemical parameters of proliferation and apoptosis (based on Ki-67, p53, caspase-3 expression), neoangiogenesis (based on VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34 expression), stem cell markers expression (CD44, ALDH1, EpCAM) in colonic polyps biopsies and colorectal adenocarcinoma surgical material; immunohistochemical parameters of epithelial-mesenchymal transition (based on E-cadherin, β -catenin, CK-20, vimentin, α -SMA expression) and mucin phenotype (based on MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, Cdx-2 expression) in colorectal adenocarcinoma surgical material; molecular-genetic parameters of *Ki-67*, *TP53*, *KRAS*, *CDH1*, *CTNNB1* transcriptional activity in colorectal adenocarcinoma surgical material. Comparative analyzes of the data obtained for each histological type of colonic polyps with different degrees of dysplasia, for high-grade colonic polyps and well-differentiated colorectal adenocarcinoma, for each stage of colorectal adenocarcinoma progression, as well as for non-metastatic and metastatic carcinoma were carried out.

Based on conducted immunohistochemical studies it was established that conventional adenomas of the distal colon are characterized by the medium cell proliferation level (based on Ki-67 expression) and p53 expression level, as well as by the low apoptosis level (based on caspase-3 expression). These adenomas are

characterized by the low VEGF-A expression level, absence of VEGFR-1 expression, medium VEGFR-2 expression level, as well as by the median of CD34+ microvessels quantity that varies from 42,50 up to 58,00 in a standardized field of view. In these adenomas the medium EpCAM expression level takes place, as well as the median of CD44+ stromal cells that varies from 55,73 % up to 60,02 %, the median of CD44+ epitheliocytes that varies from 19,14 % up to 41,68 %, the median of ALDH1+ stromal cells that varies from 20,61 % up to 37,18 %, and the median of ALDH1+ epitheliocytes that varies from 17,22 % up to 30,63 %.

It was established that during the adenomas progression from low-grade to high-grade dysplasia cell proliferation levels increase by 30 % in tubular adenomas and by 37 % – in tubulovillous adenomas. During the villous adenomas progression, cell proliferation level does not increase significantly, however, even in low-grade villous adenomas cell proliferation level is close to the high index. It was established that during the adenomas progression from low-grade to high-grade dysplasia in tubular, tubulovillous, and villous adenomas p53 expression indexes increase by 49 %, 34 %, 41 %, accordingly; apoptosis levels increase by 51 %, 50 %, 65 %, accordingly; immunohistochemical parameters of neoangiogenesis do not change in these polyps though.

During the tubulovillous and villous adenomas progression from low-grade to high-grade dysplasia, ALDH1 expression by stromal cells significantly increases (by 45 % and 40 %, accordingly), as well as ALDH1 expression by epitheliocytes (by 33 % and 39 %, accordingly). Moreover, it was established that during the tubular, tubulovillous and villous adenomas progression from low-grade to high-grade dysplasia, EpCAM expression significantly increases (by 13,68 %, 20,49 %, 21,71 %, accordingly).

It was established that serrated lesions of the distal colon are characterized by the medium cell proliferation level and p53 expression level, low apoptosis level, as well as by the low VEGF-A expression level, absence of VEGFR-1 expression, medium VEGFR-2 expression level, and by the median of CD34+ microvessels quantity that varies from 30,00 up to 51,00 in a standardized field of

view. In serrated lesions the medium EpCAM expression level takes place, as well as the median of CD44+ stromal cells that varies from 36,65 % up to 65,56 %, the median of CD44+ epitheliocytes that varies from 5,25 % up to 48,93 %, the median of ALDH1+ stromal cells that varies from 20,80 % up to 32,25 %, and the median of ALDH1+ epitheliocytes that varies from 10,69 % up to 22,65 %.

During the progression from low-grade to high-grade dysplasia, cell proliferation level increases significantly (by 42 % in traditional serrated adenomas and by 24 % in hyperplastic polyps) as well as apoptosis level (by 55 % in traditional serrated adenomas and by 38 % in hyperplastic polyps), and p53 expression increases (by 38 % in traditional serrated adenomas and by 90 % in hyperplastic polyps). Direct correlations between cell proliferation level, apoptosis level, and p53 expression level take place in serrated lesions of the distal colon.

During the progression from low-grade to high-grade dysplasia, immunohistochemical parameters of neoangiogenesis in traditional serrated adenomas and sessile serrated lesions do not change significantly. However, hyperplastic polyps differ by 32 % increasing of CD34+ microvessels quantity in a standardized field of view. Moreover, it was established that during the progression from low-grade to high-grade dysplasia, ALDH1 expression by stromal cells increases by 32 % and ALDH1 expression by epitheliocytes increases by 26 % in traditional serrated adenomas.

It was established that colorectal adenocarcinoma is characterized by increased *Ki-67* mRNA expression level, which decreases 6 times during the carcinoma progression from the Ist up to the IVth stage and correlates with the results of the parallel immunohistochemical study of *Ki-67* expression. The carcinoma is characterized by increased *TP53* mRNA expression level, which increases 4 times during the progression from the Ist up to the IVth stage and correlates with the results of the parallel immunohistochemical study of p53 expression. Moreover, it was established that the median of caspase-3 expression decreases by 53,01 % during the carcinoma progression from the Ist up to the IVth stage and correlates with the median of *Ki-67* expression ($r = 0,71$, $p < 0,05$).

The transcriptional activity of *KRAS* increases 7 times during the carcinoma progression from the Ist up to the IVth stage, and there is a “jump” of the median of the mRNA expression on the IInd stage. Statistically significant correlations between *KRAS* transcriptional activity index and caspase-3 expression level ($r = -0,44$, $p < 0,05$), as well as between *KRAS* and *TP* transcriptional activity indexes ($r = 0,43$, $p < 0,05$) were revealed.

Colorectal adenocarcinoma is characterized by the medium VEGF-A and VEGFR-2 expression levels which increase during the carcinoma progression from the Ist up to the IVth stage by 55,37 % and 47,21 %, accordingly, and directly correlate with each other ($r = 0,85$, $p < 0,05$). Wherein, there is a “jump” of VEGF-A and VEGFR-2 expression levels on the IInd stage. VEGFR-1 expression is detected only in carcinomas of the II-IV stages, there are no significant changes of the expression level during the progression. The absence of a statistically significant increase of CD34 expression indexes was revealed as well.

It was established that during the colorectal adenocarcinoma progression from the Ist up to the IInd stage quantity of CD44+ stromal cells increases by 27,65 %, and quantity of ALDH1+ stromal cells increases by 19,68 %. During the carcinoma progression from the IInd up to the IIIrd stage quantity of ALDH1+ stromal cells increases by 42,69 %, and EPCAM expression level by cancer cells increases by 9,07 %. During the carcinoma progression from the IIIrd up to the IVth stage quantity of ALDH1+ cancer cells increases by 32,26 %, and EPCAM expression level by cancer cells increases by 14,40 %. Moreover, reverse medium-strength correlation between the median of CD44 expression and cell proliferation level was revealed ($r = -0,62$, $p < 0,05$).

Comparative analysis of immunohistochemical parameters of high-grade distal colonic polyps and well-differentiated colorectal adenocarcinoma revealed few statistically significant differences. High-grade conventional adenomas differ from well-differentiated colorectal adenocarcinoma by significantly lower p53 expression medians (by 37,09 % for tubular and by 45,35 % for tubulovillous adenomas), lower VEGF-A (by 53,18 % for tubular, by 35,01 % for tubulovillous,

and by 51,09 % for villous adenomas) and VEGFR-2 (by 31,20 %, 36,82 %, 28,85 %, accordingly) expression medians, as well as by lower quantity of CD44+ and ALDH1+ stromal cells (by 19,42 %, 18,88 %, 15,27 % and by 50,43 %, 29,97 %, 31,01 %, accordingly). High-grade serrated adenomas and hyperplastic polyps differ from well-differentiated carcinoma by significantly lower Ki-67 (by 13,44% and 37,20 %, accordingly) and p53 (by 42,46 % and 61,07 %, accordingly) expression medians, lower VEGF-A (by 49,08 % and 57,20 %, accordingly) and VEGFR-2 (by 25,17 % and 37,97 %, accordingly) expression medians, as well as by lower quantity of CD44+ and ALDH1+ stromal cells (by 7,89 %, 46,36 % and by 39,22 %, 58,28 %, accordingly).

During the colorectal adenocarcinoma progression from the Ist up to the IVth stage, baseline low *CDH1* transcriptional activity decreases 11 times, E-cadherin expression level decreases by 71,83 % in parallel. Herein, increased *CTNNB1* transcriptional activity, which is typical for carcinoma, does not change significantly during the progression and correlates with the high β -catenin expression level that keeps increased on all the stages of the carcinoma progression. Direct medium-strength correlation ($r = 0,41$, $p < 0,05$) between increased *KRAS* transcriptional activity and the high β -catenin expression level, reverse medium-strength correlation ($r = -0,47$, $p < 0,05$) between increased *KRAS* transcriptional activity and the low E-cadherin expression level were revealed.

It was established that decreasing E-cadherin expression in the studied progression appears in parallel with a 59,94 % decreasing of CK-20 expression, which is another epithelial phenotype marker. It was noticed that E-cadherin expression presents only in cancer cell clusters, whereas CK-20 expression present in cancer cell clusters and in isolated cells located in the cancer stroma. According to the data obtained, increasing mesenchymal markers indexes starts with the carcinoma transition from the Ist to the IInd stage and progresses on following stages. During the carcinoma progression from the Ist up to the IVth stage, vimentin expression level increases by 35,26 % and α -SMA expression level increases by 54,71 %. Tendency to accumulation of vimentin+ and α -SMA+ cells close to the

cancer cell clusters takes place. Direct strong correlation between E-cadherin and CK-20 expression indexes ($r = 0,74$, $p < 0,05$), direct medium-strength correlation between vimentin and α -SMA expression indexes ($r = 0,53$, $p < 0,05$), reverse medium-strength correlation between CK-20 and vimentin expression indexes ($r = -0,65$, $p < 0,05$), as well as CK-20 and α -SMA expression indexes ($r = -0,69$, $p < 0,05$) were revealed.

It was established that the colorectal adenocarcinoma progression is associated with increasing MUC1 and Cdx-2 expression levels, as well as with the decreasing MUC2 and MUC4 expression levels. Wherein, MUC1 expression level increases by 35,69 % on the IInd stage, Cdx-2 expression level increases by 25,06 % on the IIIrd stage; on the IInd stage MUC2 expression level decreases by 45,13 % and MUC4 expression level decreases by 45,13 %.

Comparative analysis revealed that metastatic colorectal adenocarcinoma differs from non-metastatic one by significantly lower cell proliferation level (by 36,49 % of Ki-67 expression and 42,38 % of mRNA *Ki-67* expression), higher p53 expression level (by 45,18 % of p53 and 23,34 % of mRNA *TP53*), higher *KRAS* transcriptional activity (by 55,27 %), higher VEGF-A (by 32,04 %) and VEGFR-2 (by 35,30 %) expression levels, lower epithelial markers expression levels (by 63,30 % of E-cadherin expression and by 40,97 % of CK-20 expression) and higher mesenchymal markers expression levels (by 23,26 % of vimentin expression and by 38,64 % of α -SMA expression). Moreover, metastatic carcinoma differs from non-metastatic one by significantly higher MUC1 (by 16,05 %) and Cdx-2 (by 36,64 %) expression levels, lower MUC2 (by 28,14 %) and MUC4 (by 14,07 %) expression levels, as well as by statistically significant higher percentage of cells which have stem cells properties: EpCAM+ cancer cells (by 18,97 %), CD44+ stromal cells, and ALDH1+ stromal cells (by 51,61 %).

Scientific novelty. For the first time, immunohistochemical parameters of proliferation and apoptosis, neoangiogenesis, and stem cells markers expression were analyzed in each of the histological types of conventional adenomas and serrated lesions of the distal colon (according to the recent WHO classification,

2019). Idea of the significant role of stem cells in tubulovillous and villous adenomas progression have been further developed: increasing EpCAM expression by epitheliocytes as well as quantity of ALDH1+ epitheliocytes and stromal cells (on the background of non-changed immunohistochemical parameters of neoangiogenesis) during the dysplasia progression from low-grade to high-grade was established. It found that immunohistochemical parameters of proliferation and apoptosis significantly increase while parameters of neoangiogenesis do not change in hyperplastic polyps, traditional serrated adenomas, and sessile serrated adenomas progression from low-grade to high-grade. For the first time, the most significant differences of *Ki-67*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS* genes transcriptional activity and proliferative-apoptotic properties, parameters of neoangiogenesis, expression of epithelial-mesenchymal transition markers, and stem cell markers on I, II, III, IV stages of colorectal adenocarcinoma progression were explored in parallel molecular-genetic (PCR method) and immunohistochemical studies. The data on mucin phenotype of colorectal adenocarcinoma (based on MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, Cdx-2 expression levels) on I, II, III, IV stages were updated. New data were obtained on the colorectal cancer progression issue: it was proved that epithelial-mesenchymal transformation starts on the IInd stage of the cancer progression and rises up to the IVth stage of the cancer progression. New data were obtained on the issue of the differences between non-metastatic and metastatic colorectal adenocarcinoma, according to which metastatic carcinoma differs by the lower mRNA *Ki-67* expression level and lower cell proliferation level, higher mRNA *TP53* and *KRAS* expression levels, higher p53 and neoangiogenesis markers expression levels, as well as the higher epithelial-mesenchymal transition markers expression levels, and higher percentage of cells characterized by stemness.

Practical meaning. The differences between immunohistochemical parameters of cell proliferation and apoptosis, neoangiogenesis, and stemness, which are detectable during the tubular, tubulovillous, villous adenomas progression as well as hyperplastic polyps, traditional serrated adenomas, and

sessile serrated lesions progression were established for practical use in pathologist's practice. According to the obtained results, it was proved that high-grade colorectal conventional adenomas, serrated adenomas, and hyperplastic polyps differ from well-differentiated G1 colorectal adenocarcinoma of I-II stages by significantly lower Ki-67, p53, VEGF-A, VEGFR-2 expression indexes as well as by significantly lower number of cells which have stem cells properties. The combination of parameters of *Ki-67*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS* mRNA expression levels and immunohistochemical parameters of proliferation and apoptosis, epithelial-mesenchymal transition, neoangiogenesis, percentage of cells characterized by stemness, was established, and can be used in pathology departments, scientific-research institutions, oncology departments for clarifying colorectal cancer prognosis and choosing the best treatment strategy. The results of the research with a positive diagnostic effect are introduced into the practical work of Municipal Institution «Odessa Regional Pathological Anatomy Bureau» of Odessa regional council, Municipal Institution «Chernihiv Regional Pathological Anatomy Bureau» of Chernihiv regional council, Municipal Institution «Dnipro Regional Pathological Anatomy Bureau» of Dnipro regional council, Municipal Institution «Zaporizhzhia Regional Forensic Medicine Bureau» of Zaporizhzhia regional council. New theoretical principals of the research are used in the educational process at the departments of pathological anatomy of Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of Ukraine, Sumy State University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, as well as at the department of pathological anatomy with sectional course of Ukrainian Medical Dental Academy (Poltava), at the department of pathological anatomy and forensic medicine of Danylo Halytsky Lviv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, at the department of pathological anatomy and forensic medicine of Zaporizhzhia State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine. Ukraine's patent № 128509 «The method of

prognosis of tendency to progression of serrated polyps of the distal colon” was obtained.

Key words: *colorectal polyps, colorectal cancer, proliferation, apoptosis, K-RAS, angiogenesis, stem cells, CD44, ALDH1, EpCAM, CDH1, E-cadherin, CTNNB1, β -catenin, epithelial-mesenchymal transition.*

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ 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. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, статистична обробка даних)*.
2. Шишкін М. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 в опухолевых и стромальных клетках колоректальной аденокарциномы. М. А. Шишкін. *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. Туманський В. О., Шишкін М. А. Характеристика транскрипційної активності гена KRAS та експресії маркерів апоптозу в клітинах колоректальної аденокарциноми. *Перспективи розвитку сучасної патології: матеріали X Конгресу Патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 р.)*. Івано-Франківськ, 2018. С.194-195. *(Дисертанту належить підбір матеріалу, аналіз результатів імуногістохімічного і молекулярно-генетичного досліджень, статистична обробка даних)*.
5. 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). *(Дисертанту належить проведення гістологічного та*

імуногістохімічного досліджень, описання морфологічної частини корисної моделі).

6. Шишкин 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

7. Шишкін М. А., Туманський В. О. Особливості транскрипційної активності генів CDH1, CTNNB1 та експресії кодованих ними молекул E-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 *(Дисертанту належить проведення гістологічного та імуногістохімічного досліджень, аналіз результатів імуногістохімічного і молекулярно-генетичного досліджень, статистична обробка даних).*

8. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Морфологія*. 2019. Т. 13, №1. С. 67–75. URL: http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2019-13-01/2019.4.12.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.1.67-75. *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

9. Шишкин 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.

10. 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. *(Дисертанту належить проведення імуногістохімічного дослідження, аналіз*

результатів імуногістохімічного і молекулярно-генетичного досліджень, статистична обробка даних).

11. 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. URL: <http://morphology.dma.dp.ua/article/viewFile/185337/184936>. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.3.149-155.

12. 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 Учасстю (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.)*. Дніпро, 2019. С.150.

13. Шишкин М. А. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы. *Патология*. 2019. Т.16, №2 (46). С. 148–154. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177075

14. 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. URL: http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2019-13-04/2019.4.9.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.4.43-49. (*Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних*).

15. Шишкин М. А., Христенко Т. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии CD44 в колоректальной аденокарциноме. *Морфологія*. 2020. Т. 14, № 2. С. 44–50. URL: http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2020-14-02/2020.2.9.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2020.2.44-50. (*Дисертанту належить дизайн роботи,*

проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

16. 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. *(Дисертанту належать концепція і дизайн дослідження, збір даних, аналіз та інтерпретація даних).*

17. 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. *(Дисертанту належать концепція і дизайн дослідження, аналіз та інтерпретація даних, написання статті).*

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

19. 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, October 14-16, 2020)*. London, 2020. P. 616–620.

20. 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. *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

21. 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.

(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

22. Shyshkin M. A. Comparative analysis of CD44 expression in polyps and adenocarcinoma of the distal colon. *Вісник Українська медична стоматологічна академія*. 2020. Т. 20, № 3(71). С. 173–178.

23. 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: [http: 10.12775/JEHS.2020.10.11.021](http://10.12775/JEHS.2020.10.11.021).

(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

24. Шишкін М. А., Христенко Т. О. Порівняльна характеристика експресії ERСAM в поліпах і аденокарциномі дистальної товстої кишки. *Вісник Вінницького Національного Медичного Університету*. 2020. Т. 24, №2. С. 208–214. *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

25. 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](https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.124-131). *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

26. 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](https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.4.221242). *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

27. 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 Учасстю (м. Дніпро, 4-6 листопада 2020р.). Дніпро, 2020. С.126–127. (Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

28. 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.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	30
Вступ	32
Розділ 1 Колоректальна аденокарцинома: поліпи-прекурсори, клініко-морфологічні та молекулярно-імуногістохімічні характеристики неопластичного процесу (огляд літератури)	41
1.1 Епідеміологія колоректального раку	41
1.2 Сучасні уявлення про поліпи-прекурсори колоректального раку	43
1.2.1 Клініко-морфологічна характеристика звичайних колоректальних аденом	44
1.2.2 Клініко-морфологічна характеристика зубчастих новоутворень товстої кишки	49
1.3 Клініко-морфологічні характеристики колоректальної аденокарциноми	55
1.4 Молекулярно-імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми	63
1.4.1 Сучасні уявлення щодо процесів проліферації та апоптозу в колоректальній аденокарциномі	64
1.4.2 Сучасні уявлення про неоангіогенез в колоректальній аденокарциномі	66
1.4.3 Концепція ракових стовбурових клітин та її значимість в прогресуванні колоректальної аденокарциноми	73
1.4.4 Концепція епітеліально-мезенхімального переходу та її значимість в прогресуванні колоректальної аденокарциноми	80
1.4.5 Особливості взаємодії ракових клітин і мікросередовища та їх значення в прогресуванні колоректальної аденокарциноми	88
1.4.6 Концепція муцинового фенотипу та її значимість в прогресуванні колоректальної аденокарциноми	93
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	100

2.1	Матеріали дослідження	100
2.2	Методи дослідження	101
Розділ 3 Гістологічні і імуногістохімічні характеристики аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки		109
3.1	Гістологічні особливості аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки	109
3.2	Імуногістохімічна характеристика проліферативно-апоптотичних властивостей аденом і зубчастих утворень дистальної товстої кишки	114
3.3	Імуногістохімічні показники неоангіогенезу в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки	129
3.4	Експресія маркерів стовбурових клітин в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки	136
Розділ 4 Молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми		153
4.1	Проліферативно-апоптотичні властивості колоректальної аденокарциноми	154
4.2	Імуногістохімічні показники неоангіогенезу в колоректальній аденокарциномі	163
4.3	Характеристика експресії маркерів стовбурових клітин в колоректальній аденокарциномі	169
4.4	Порівняльний аналіз високодиференційованої аденокарциноми і high-grade поліпів дистальної товстої кишки	175
Розділ 5 Показники епітеліально-мезенхімальної трансформації і муцинового фенотипу при прогресуванні колоректальної аденокарциноми, а також комплексний аналіз параметрів метастатичної аденокарциноми		190
5.1	Молекулярно-генетична та імуногістохімічна характеристика показників експресії E-кадгерину і β -катеніну в колоректальній аденокарциномі	190

5.2 Особливості експресії маркерів епітеліального і мезенхімального фенотипів в колоректальній аденокарциномі	197
5.3 Імуногістохімічна характеристика муцинового фенотипу ракових клітин колоректальної аденокарциноми	203
5.4 Порівняльний аналіз імуногістохімічних і молекулярно-генетичних параметрів неметастатичної та метастатичної колоректальної аденокарциноми	210
Розділ 6 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	222
Висновки	260
Практичні рекомендації	265
Список використаних джерел	267
Додаток А Акти впровадження	295
Додаток Б Список опублікованих автором праць на тему дисертації	305
Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації	311

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

ALDH1	– альдегіддегідрогеназа 1
α - SMA	– альфа-гладеньком'язовий актин
Віментин	– проміжний філамент клітин мезенхімального походження
CD44	– поверхневий глікопротеїн, рецептор гіалуронової кислоти
CD34	– поверхневий глікопротеїн, кластер диференціювання ранніх етапів гемопоезу та кровотворних судин
СК-20	– проміжний філамент епітеліальних клітин
ДТК	– дистальна товста кишка
ІГХ	– імуногістохімічне (дослідження)
ЕМП	– епітеліально-мезенхімальний перехід
ЕрСAM	– молекула адгезії епітеліальних клітин
КРА	– колоректальна аденокарцинома
МФМ	– морфометричне (дослідження)
Me	– медіана
ІМПЗ	– имунопозитивні (клітини)
Каспаза-3	– фермент апоптотичної деградації, маркер апоптозу
Ki-67	– білок-регулятор клітинного циклу, маркер проліферації клітин
МГ	– молекулярно-генетичні (дослідження)
мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота
МФМ	– морфометричне (дослідження)
MUC1	– пан-епітеліальний мембранний мукопротеїн
MUC2	– кишковий мукопротеїн
MUC4	– трансмембранний мукопротеїн апікальної частини клітин
MUC5AC	– шлунковий мукопротеїн
НСО	– незмінена слизова оболонка
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
РСК	– ракові стовбурові клітини

СК	– стовбурові клітини
СПЗМ	– стандартизоване поле зору мікроскопа
УООЩ	– умовна одиниця оптичної щільності
CDH1	– ген, що кодує глікопротеїн E-кадгерин
CTNNB1	– ген, що кодує білок β -катенін
Cdx-2	– кишковий фактор транскрипції
KRAS	– протоонкоген, що кодує білок RAS
r	– коефіцієнт кореляції Пірсона
TP53	– ген, що кодує білок p53
β -катенін	– протеїн, молекула міжклітинної адгезії
E-кадгерин	– мембранний глікопротеїн, молекула міжклітинної адгезії
p53	– білок-регулятор клітинного циклу, маркер однойменного онкопротеїну
VEGF-A	– судинно-ендотеліальний фактор росту A
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

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Колоректальний рак є однією з найбільш поширених злоякісних пухлин в усьому світі. Програми скринінгу колоректального раку, що були розроблені та впроваджені в деяких країнах світу є достатньо ефективними та дозволяють виявляти пухлину на ранніх стадіях її розвитку, що значно впливає на прогноз: п'ятирічна виживаність хворих з діагностованою першою стадією хвороби сягає 90 %, в той час як за наявності метастатичного ураження цей показник коливається в діапазоні 10-20 %. В Україні близько 40 % випадків колоректального раку діагностуються в занедбаному стані, що є головною причиною високих показників смертності.

Незважаючи на певні успіхи, пов'язані із впровадженням скринінгових програм, поширенням та вдосконаленням техніки ендоскопічного дослідження товстої кишки, низка питань стосовно прогресії колоректальної карциноми лишається остаточно не вирішеною. По-перше, відомо, що розвитку колоректальної карциноми зазвичай передують доброякісний епітеліальний поліп. При цьому, треба зазначити, що певна кількість товстокишкових поліпів не мають злоякісного потенціалу і ніколи не трансформуються в рак, можливий навіть феномен спонтанної регресії поліпа. При цьому є також і поліпи, що мають злоякісний потенціал та їх злоякісна трансформація є лише питанням часу. На сьогодні відомо два основні шляхи малігнізації таких поліпів – це послідовність «аденома – карцинома» і зубчастий шлях, що активуються у випадках трансформації класичних колоректальних аденом і зубчастих поліпів, відповідно. Проте, поділ товстокишкових поліпів на класичні аденоми і зубчасті новоутворення було введено в клінічну практику відносно нещодавно і до теперішнього часу немає системного аналізу параметрів прогресування кожного окремого різновида аденом і зубчастих новоутворень товстої кишки. Окрім того, питання оцінки потенціалу злоякісності виявленого доброякісного поліпа все

ще лишається відкритим, так само, як і питання диференційної діагностики дисплазії високого ступеня і карциноми «in situ» в біопсійному матеріалі.

По-друге, дослідження біопсійного матеріалу, що був вилучений під час колоноскопії, не дає можливості визначити стадію хвороби у випадку злякисного процесу, та вирішити питання щодо наявності регіонарних та / або віддалених метастазів, що вкрай важливо для вибору максимально ефективної тактики лікування. Ці питання вирішуються за допомогою додаткових методів обстеження хворого, а також при безпосередньому хірургічному втручанні з подальшим патогістологічним дослідженням операційного матеріалу, що займає час і вимагає додаткових витрат ресурсів. Проте, потенційна можливість оцінити стадію хвороби та з певною вірогідністю формулювати судження щодо наявності метастазів базуючись на дослідженні біопсійного матеріалу первинної пухлини є перспективною в сенсі вдосконалення тактики і ефективності лікування кожного окремого хворого. Окрім того, поглиблене вивчення молекулярно-генетичних аномалій, що є маркерними для кожної із стадій прогресії колоректального раку, також дозволить вдосконалити наявні на сьогодні схеми діагностики та лікування.

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 і завдання дослідження. Мета – 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.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні **задачі**:

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 (Е-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 (ДТК) з диспластичними змінами різного ступеня тяжкості; зміни молекулярно-імуногістохімічних показників проліферації, апоптозу і мезенхімально-епітеліального переходу та параметрів муцинового імунофенотипу, неоангіогенезу і стовбурових клітин на різних стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми.

Методи дослідження: гістологічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, морфометричні (МФМ) дослідження біопсійного матеріалу аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки і операційного матеріалу колоректальної аденокарциноми для визначення дисплазії та стовбурових клітин, проліферативно-апоптотичних, муцин-фенотипічних та інвазивних властивостей клітин вивчених новоутворень, мезенхімально-епітеліального переходу, а також неоангіогенезу; статистичний аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в порівняльному аналізі визначені імуногістохімічні параметри проліферації та апоптозу, експресії маркерів неангіогенезу 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 EpCAM епітеліоцитами та кількість ALDH1-позитивних епітеліоцитів і клітин строми (на тлі незмінної експресії маркерів неангіогенезу). 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, неангіогенезу 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 на спосіб прогнозування схильності до прогресування зубчастих поліпів дистальної товстої кишки.

Практичне значення отриманих 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, кафедри 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 здобувача. Дисертаційна робота є самостійно виконаним дослідженням автора, науковим консультантом визначена тема, мета і завдання роботи. Дисертант особисто виконав патентно-інформаційний пошук, систематизацію і аналіз літератури, а також патогістологічні, імуногістохімічні (ІГХ) і морфометричні (МФМ) дослідження матеріалу всіх хворих; провів статистичний аналіз отриманих даних, систематизував та інтерпретував отримані результати; написав всі розділи дисертації; сформулював висновки та практичні рекомендації. Молекулярно-генетичні (МГ) дослідження патоморфологічного матеріалу виконані дисертантом в ПЛР-лабораторії Запорізького державного медичного університету. 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.

Структура та обсяг 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).

РОЗДІЛ 1
КОЛОРЕКТАЛЬНА АДЕНОКАРЦИНОМА:
ПОЛПИ-ПРЕКУРСОРИ, КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ ТА
МОЛЕКУЛЯРНО-ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НЕОПЛАСТИЧНОГО ПРОЦЕСУ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Епідеміологія колоректального раку

Колоректальний рак (КРР) є найбільш поширеною карциномою шлунково-кишкового тракту [1].

За даними світової статистики КРР, із показником 1 849 518 нових випадків зареєстрованих в 2018 році, займає 2 місце серед найбільш поширених злоякісних новоутворень жінок і 3 місце – чоловіків [2].

Показники захворюваності на КРР значно варіюють в країнах світу, при цьому спостерігається чітка тенденція до реєстрації найвищих показників захворюваності в країнах з високим рівнем доходу [3]. За даними American Cancer Society в США в 2021 році буде зареєстровано 79 520 нових випадків захворювання на КРР в чоловіків і 69 980 нових випадків захворювання в жінок, 28 520 чоловіків і 24 460 жінок помруть від цієї хвороби. Аналіз показників захворюваності в США за останні десятиліття виявив різке збільшення цих показників на початку 2000-х, що пов'язують із впровадженням скринінгових програм і покращенням якості діагностики хвороби. В період з 2013 по 2017 роки було зареєстровано річне зменшення показників захворюваності на 1 %, що є позитивною тенденцією. Проте, паралельно було зафіксовано річне зростання показників захворюваності на 2 % серед населення молодше 50 років, а також 1 % зростання цих показників серед населення 50 – 64 років, що свідчить про «помолодшання» карциноми і є негативною тенденцією [4].

За даними Національного канцер-реєстру України випадки раку товстої кишки складають 50,4 % всіх випадків раку шлунково-кишкового тракту. За 2019 рік було зареєстровано 9195 хворих на КРР. При цьому близько 40 % випадків захворювання було діагностовано в занедбаному стані. Рак товстої кишки займає 5 місце в структурі онкологічної захворюваності і смертності чоловічого населення України, 4 місце в структурі онкологічної захворюваності жіночого населення України і 2 місце в структурі онкологічної смертності жінок України, що вказує на тенденцію до вкрай агресивного перебігу хвороби в жінок. Стандартизований показник захворюваності складає 30,2 на 100 000 чоловічого населення і 19,3 на 100 000 жіночого населення [5].

За даними сучасної літератури близько 70 % всіх випадків КРР є спорадичними. Ці карциноми розвиваються на тлі тривалого впливу несприятливих факторів, таких, як надмірна вага, гіподинамія, довготривале паління, вживання значної кількості червоного та / або обробленого м'яса, зловживання алкоголем, недостатня кількість рослинних волокон в раціоні. При цьому тривалий вплив несприятливих зовнішніх факторів стимулює надмірну клітинну проліферацію та запуск послідовності «поліп – карцинома», що є загальноприйнятою стадійною схемою розвитку спорадичного КРР. В інших випадках КРР розвивається в наслідок спадкових генетичних аномалій, таких, як синдром Лінча, сімейний аденоматозний поліпоз та інші [2 - 3, 6].

За даними American Cancer Society 5-ти річна виживаність хворих на КРР складає 65 %. Треба зазначити, що 38 % випадків цього захворювання в США діагностуються на першій клінічній стадії хвороби, що характеризується 90 % 5-ти річною виживаністю [4]. В Україні показник 5-ти річної виживаності хворих на КРР становить 42 %, що обумовлено перш за все високим відсотком занедбаних випадків захворювання, що вже було наведено вище [5].

1.2 Сучасні уявлення про поліпи-прекурсори колоректального раку

В контексті наведених вище даних стає зрозумілим, що надзвичайної уваги заслуговують доброякісні новоутворення слизової оболонки товстої кишки, що передують розвитку злоякісного процесу, тобто, поліпи.

Термін «поліп» використовується для позначення будь-якого об'ємного утворення, що витинає у просвіт полого органу. Проте, зазвичай поліпами називають доброякісні новоутворення, що формуються внаслідок надмірної проліферації тих чи інших елементів слизової оболонки. Так, поширеним прикладом є аденома – утворення, що формується в результаті підвищеної проліферативної активності залозистих епітеліоцитів з утворенням численних скупчених залоз [7].

На сьогодні, згідно класифікації ВООЗ пухлин органів травлення 2019 року (5-го перегляду) поліпи товстої кишки принципово поділяють на дві групи:

- звичайні колоректальні аденоми (conventional colorectal adenoma);
- зубчасті новоутворення (serrated lesions) [1].

Цей поділ заснований на принципових гістологічних відмінностях епітеліальних доброякісних новоутворень товстої кишки [1], що детальніше будуть розглянуті дещо пізніше. Проте, треба зазначити, що кожна з цих груп поліпів є доволі гетерогенною і включає окремі гістологічні підгрупи, що мають специфічні клініко-морфологічні характеристики [6]. Також цей поділ складає основу двох основних шляхів розвитку КРР – це так звана послідовність «аденома – карцинома» (що включає етапи трансформації будь-якої звичайної колоректальної аденоми в аденокарциному) і зубчастих шлях малігнізації (що включає етапи трансформації будь-якого зубчастого новоутворення в колоректальну карциному). Останній було описано відносно нещодавно, проте, його значимість в розвитку спорадичного КРР не викликає сумнівів [3].

1.2.1 Клініко-морфологічна характеристика звичайних колоректальних аденом

Звичайна (класична) колоректальна аденома – це доброякісне новоутворення із диспластичного залозистого епітелію, що є найбільш поширеним варіантом товстокишкового поліпа. Згідно літературних даних мінімум 25 % чоловіків і 15 % жінок, що проходять колоноскопію, діагностуються із однією чи більшою кількістю аденом [8]. Також відомо, що близько 40 % людей віком понад 60 років мають щонайменше 1 аденому товстої кишки [9]. Звичайні колоректальні аденоми частіше виявляють в дистальних (лівих) відділах товстої кишки, порівняно із проксимальними (правими) відділами [8].

Відомо, що факторами ризику формування товстокишкових аденом є дієтологічні фактори, які підвищують ризик розвитку і КРР в тому числі. Це значна кількість червоного м'яса в раціоні, значна кількість жирів, тютюнопаління і тривалий прийом значних доз алкоголю. З іншого боку, збалансований раціон і достатня кількість рослинних волокон в раціоні знижують ризик формування як аденом, так і КРР. І хоча не всі аденоми трансформуються в карциному, близько 80 % з них назавжди лишаються доброякісними, точний діагноз є вкрай важливим з урахуванням варіабельності прогностичних показників для кожного з гістологічних субтипів аденом [6], про що буде сказано дещо пізніше.

Гістологічно розрізняють наступні субтипи звичайних колоректальних аденом:

- тубулярні аденоми;
- ворсинчасті (вільозні) аденоми;
- тубуло-ворсинчасті (тубуло-вільозні) аденоми [1].

Окрім того, в кожному з цих субтипів розрізняють аденоми з легкою дисплазією (low-grade adenoma) і аденоми з тяжкою дисплазією (high-grade adenoma) [1].

Гістологічні субтипи розрізняють, базуючись на виразності ворсинчастого компоненту. Так, тубулярні аденоми характеризуються наявністю збільшеної кількості залоз слизової товстої кишки, що формують поліпоподібний витин, ці залози можуть бути дещо подовженими та / або деформованими, проте, переважно зберігають округлу та / або овальну форму. Незначна кількість (до 25 %) подовжених кишкових крипт в тубулярних аденомах можуть формувати ворсинчасті структури. Тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються наявністю від 25 % до 75 % ворсинчастих структур, в той час як ворсинчасті – більш ніж 75 % ворсинчастих структур [1].

Типовими гістологічними змінами епітелію, що виявляють в аденомах з легкою дисплазією є виразне подовження і гіперхромність клітинних ядер, псевдостратифікація, втрата базальної орієнтації ядер. Помітно також зниження кількості диференційованих келихоподібних і абсорбуючих клітин. Тяжка дисплазія відрізняється посиленням наведених вище ознак, наявністю патологічних мітозів, значним скупченням диспластичних залоз із формуванням структур типу «спинка до спинки», можливо також формування крибріформних структур, типова наявність некротичного детриту в просвітах залоз [1]. На сьогодні добре відомо, що саме high-grade ворсинчасті і тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються найвищим потенціалом малігнізації – за різними даними відсоток випадків їх злоякісної трансформації варіює від 60 до 88 % [9].

Окрім того, кожний із гістологічних різновидів звичайних колоректальних аденом має низку клініко-морфологічних особливостей. Так, тубулярна аденома є найбільш поширеним варіантом звичайних колоректальних аденом. Виявляють тубулярні аденоми, як правило, під час ендоскопічного дослідження, що проводиться з будь-якої іншої причини, адже такі утворення зазвичай є безсимптомними. Такі утворення є поліпоподібними, мають вигляд поліпа на ніжці, зрідка можуть розташовуватись на широкій основі та виглядати як ділянка елевації

слизової, що не є типовим. Колір тубулярної аденоми зазвичай є більш насичено-червоний, порівняно із навколишньою незміненою слизовою оболонкою товстої кишки. Із збільшенням розміру тубулярної аденоми (більше 1 см в діаметрі) збільшується й вірогідність появи симптомів. Зазвичай вони пов'язані із виразкуванням поверхні аденоми і, як наслідок, хронічною крововтратою. Можливий розвиток залізодефіцитної анемії [8].

Серед гістологічних особливостей тубулярних аденом:

- переважання тубулярних структур в будові поліпа;
- наявність дисплазії епітелію, а також зони переходу від нормального до диспластично зміненого епітелію;
- звертають на себе увагу видовжені гіперхромні ядра, що розташовуються на різному рівні в епітеліоцитах, створюючи таким чином ефект псевдостратифікації;
- зниження продукції муцину (потовщення муцинового шару) варіює;
- можлива наявність метаплазії, іноді виявляються поодинокі клітини Панета, можлива також плоскоклітинна метаплазія, в найрідших випадках – кісткова;
- можливе явище псевдоінвазії, проте, дислоковані залози лишаються оточеними власною пластинкою слизової, навколо можливе накопичення гемосидерину [8].

Підвищення ризику малігнізації тубулярної аденоми асоціюється із збільшенням розміру поліпа більше 1 см в діаметрі, появою виразок на поверхні поліпа, симптоматичним перебігом новоутворення, а також прогресуванням поліпа із гістологічними змінами, що включають посилення виразності дисплазії та збільшення відсотку ворсинчастого компонента в поліпі. Відомо, що ризик злоякісної трансформації тубулярної аденоми становить 9,7 % і зростає в 1,77 разів із прогресуванням тубулярної аденоми до тяжкої дисплазії [2, 6].

Тубуло-ворсинчасті аденоми зустрічаються рідше тубулярних аденом, а ворсинчасті аденоми є найрідшим гістологічним варіантом звичайних колоректальних аденом. Тубуло-ворсинчасті і ворсинчасті аденоми мають переважно спільні клініко-морфологічні риси, та диференціюються виключно за відсотком ворсинчастого компоненту, про що вже було сказано раніше. Виявляють такі поліпи під час ендоскопічного дослідження, що проводиться з будь-якої причини, включаючи симптоматичний перебіг поліпа. Такі утворення є поліпоподібними, мають вигляд витину слизової на ніжці, зазвичай є доволі великими – середній їх діаметр за даними літератури варіює від 1 до 2,5 см. Колір тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом зазвичай є насичено-червоний, типові крововиливи, ерозії та навіть виразкування поверхні [8].

Серед гістологічних особливостей тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом:

- ворсинчасті (стрижнеподібні) витини, що мають фіброваскулярну основу та вкриті диспластичним епітелієм, формують до 75 % тубуло-ворсинчастої аденоми, і більше 75 % ворсинчастої аденоми;
- за наявності легкої дисплазії помітні подовжені гіперхромні ядра, що формують ефект псевдостратифікації, архітектоніка крипт збережена, можливі поодинокі ектопічні крипти;
- за наявності тяжкої дисплазії збільшується ядерно-цитоплазматичне співвідношення, стає виразною втрата базальної орієнтації ядер, виразний клітинний поліморфізм, та поява атипових мітозів;
- залози можуть скупчуватись та формувати крибриформні структури;
- можлива також наявність метаплазії, іноді виявляються поодинокі клітини Панета, можлива і плоскоклітинна метаплазія.

Підвищення ризику малігнізації тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом асоціюється із збільшенням їх розміру більше 1,5 см в діаметрі, симптоматичним перебігом новоутворення, а також прогресуванням поліпа із

гістологічними змінами, що включають посилення виразності дисплазії та збільшення відсотку ворсинчастого компонента в поліпі. Відомо, що ризик злоякісної трансформації тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом становить 16,2 % і зростає в 2,45 разів із прогресуванням таких аденом до тяжкої дисплазії [2, 6].

Згідно сучасних уявлень формування класичної колоректальної аденоми опосередковується низкою молекулярно-генетичних аномалій. Першою такою аномалією зазвичай стає активація Wnt / β -катенінового сигнального шляху в наслідок порушення функції білка APC і, як наслідок, надмірного накопичення β -катеніну. Одним із ефектів активації цього шляху є різке підвищення проліферативної активності недиференційованих клітин-попередників, включаючи стовбурові клітини, як наслідок – порушення клітинної ієрархії, оскільки швидкість проліферації в цих випадках значно перевищує швидкість диференціювання клітин. Гістологічно це має вигляд дисплазії [10]. Мутація гену *APC*, що кодує однойменний білок, вперше була виявлена у випадках сімейного аденоматозного поліпозу, коли кількість товстокишкових аденом сягає 100 і більше [11]. Пізніше було показано, що мутація цього гену наявна і в спорадичних випадках – її виявляють в 34 % випадків звичайних поодиноких аденом, ця цифра сягає 55 % у випадках, коли виявляють множинні звичайні аденоми [12].

Ріст класичної колоректальної аденоми асоціюється із накопиченням нових молекулярно-генетичних аномалій. Активуючі мутації *KRAS* призводять до ще більшої дисрегуляції процесів проліферації та диференціювання через активацію MAPK сигнального каскаду. Мутації *PTEN* (частіше за все – делеції) призводять до активації PI3K сигнального каскаду, ефектами останнього є пригнічення апоптозу та збільшення виживаності клітин. Додаткові альтерації *TP53* також підвищують виживаність клітин, навіть в умовах пошкодження клітинної ДНК, що не підлягає репарації [10].

Збільшення класичної колоректальної аденоми в розмірах асоціюється також із активацією неоангіогенезу, при цьому в стромальному компоненті поліпа спостерігається посилення інфільтрації імуніцитами, збільшення кількості фібробластів і міофібробластів. Таким чином новоутворення безпосередньо забезпечує живлення популяції активно проліферуючих клітин за рахунок неоангіогенезу, а також перманентну підтримку підвищеного рівня проліферативної активності за рахунок паракринних взаємодій епітеліоцитів і клітин стромы. Активація неоангіогенезу забезпечує достатній рівень трофіки активно проліферуючих новоутворених клітин [13].

1.2.2 Клініко-морфологічна характеристика зубчастих новоутворень товстої кишки

Зубчасті новоутворення – це доброякісні новоутворення, що відрізняються типовою зубчастістю (serrated appearance) епітелію, яку також іноді називають пилкоподібністю (sawtooth appearance) або навіть зірчастістю (stellate appearance) [1]. За різними даними зубчасті новоутворення складають від 10 % до 40 % від усіх поліпоподібних новоутворень, що виявляють під час колоноскопії. Доволі часто зубчасті новоутворення є множинними – в кожного другого пацієнта виявляють від 2 до 5 зубчастих новоутворень в дистальному та / або проксимальному відділі товстої кишки [8]. Також доволі поширеним є виявлення як зубчастих поліпів, так і звичайних аденом в одного пацієнта. Обґрунтуванням цього явища є деякі спільні молекулярно-генетичні аномалії, що реалізуються в ході формування і розвитку товстокишкових поліпів [14 - 15]. Проте, не треба забувати, що ці дві групи поліпів принципово розділено базуючись на різних молекулярних механізмах прогресії, про що детальніше буду сказано дещо пізніше.

Гістологічно розрізняють наступні субтипи зубчастих новоутворень товстої кишки:

- традиційна зубчаста аденома;

- гіперпластичний поліп;
- зубчасте утворення на широкій основі [1].

Традиційні зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи можуть мати диспластичні зміни епітелію легкого (low-grade) або тяжкого (high-grade) ступеня [1]. Зубчасті новоутворення на широкій основі характеризуються відсутністю диспластичних змін [1], проте, за даними літератури в 8 % – 24 % випадків в зубчастих утвореннях на широкій основі виявляють вогнища легкої (low-grade) дисплазії епітелію, зазвичай в поверхневих відділах [16 - 18].

Традиційні зубчасті аденоми характеризуються так званою щілинною зубчастістю (slit-like serration): значно подовжені залози формують структури, подібні до ворсинчастих, проте вкриті епітелієм із зубчастою архітектонікою [1]. Треба зазначити, що зубчастість в цих аденомах формується за рахунок патологічного розгалуження крипт з формуванням так званих ектопічних крипт, що розташовані перпендикулярно по відношенню до передуючої крипти [19]. Більша частина епітеліоцитів в складі традиційних зубчастих аденом є високими циліндричними клітинами з насичено-еозинофільною цитоплазмою та подовженими ядрами. Зазвичай зустрічаються лише поодинокі келихоподібні клітини [1]. Проте, в літературі також описано гістологічний варіант збагаченої келихоподібними клітинами (mucin / goblet cell rich type) традиційної зубчастої аденоми, що виявляється лише в 2 % – 4 % випадків цих аденом [16].

Таким чином, основними гістологічними особливостями (відмінними рисами) традиційних зубчастих аденом є наступні:

- наявність ектопічних крипт, що розташовані перпендикулярно по відношенню до передуючої крипти;
- насичено-еозинофільна цитоплазма диспластичних епітеліоцитів;
- комбінація ворсинчастості та зубчастості в гістоархітектониці [1, 16, 19].

Клініко-морфологічні особливості традиційних зубчастих аденом полягають в наступному. Цей різновид товстокишкового поліпа є найрідшим, порівняно з іншими зубчастими новоутвореннями, а також класичними аденомами товстої кишки. При цьому більш ніж 90 % традиційних зубчастих аденом виявляють саме в дистальних (лівих) відділах товстої кишки, включаючи пряму кишку. Середній діаметр таких аденом коливається від 0,9 до 1,5 см (тобто, вони є доволі великими). Зазвичай це поліпоподібні новоутворення, що витинають у просвіт кишківника (рідше це «сидячі» утворення). При ендоскопічному дослідженні відзначають гіперемовану і мікрогранулярну поверхню таких поліпів. Можуть також виявлятися ерозії, язви, крововиливи на поверхні [16].

Гіперпластичні поліпи товстої кишки характеризуються виразно подовженими і рівномірно розподіленими кишковими криптами, що мають типову зубчастість епітелію лише в поверхневих відділах [1]. В цих поліпах зубчастість епітелію формується за рахунок випинання цитоплазми клітин у напрямку просвіту крипт. Тобто, цей характер зубчастості (цитоплазматичний) принципово відрізняється від зубчастості в традиційних зубчастих аденомах, яка була охарактеризована вище [19].

Розрізняють 2 гістологічні варіанти гіперпластичних поліпів товстої кишки – це мікроезичулярні (microvesicular type) та збагачені келихоподібними клітинами (goblet cell rich type) поліпи [1]. Мікроезичулярні гіперпластичні поліпи відрізняються мікроезичулярними епітеліоцитами, що мають насичену цитоплазму та містять численні апікально розташовані вакуолі. Збагачені келихоподібними клітинами епітеліоцити відрізняються збільшеною кількістю келихоподібних клітин, що значно переважають над циліндричними епітеліоцитами. Раніше також виділяли бідний на муцин тип (mucine poor type) гіперпластичних поліпів, проте, було доведено, що це випадки пошкоджених мікроезичулярних поліпів [16].

Таким чином, основними гістологічними особливостями (відмінними рисами) гіперпластичних поліпів товстої кишки є наступні:

- три патерни, що визначають різновид гіперпластичного поліпа;
- цитоплазматичний характер зубчастості, що наявна переважно в поверхневих відділах поліпа;
- виразне подовження кишкових крипт, що асоціюється із поширенням зони проліферації, проте, без їхньої деформації [1, 16, 19].

Клініко-морфологічні особливості гіперпластичних поліпів товстої кишки полягають в наступному. Гіперпластичні поліпи є найбільш поширеним варіантом зубчастих новоутворень товстої кишки (складають до 70 % поліпів цієї групи). 70 – 80 % гіперпластичних поліпів локалізуються саме в дистальних (лівих) відділах товстої кишки. Середній діаметр таких аденом коливається від 0,3 до 0,8 см (тобто, вони є відносно невеликими). Зазвичай це поліпоподібні новоутворення, що витинають у просвіт кишківника (рідше це «сидячі» або пласкі новоутворення). При ендоскопічному дослідженні відзначають гладеньку поверхню таких поліпів, що зазвичай бліда в порівнянні з навколишньої слизовою, лише в окремих випадках вона може бути дещо гіперемована. Поява ерозій, язв, крововиливів на поверхні гіперпластичного поліпа товстої кишки є ознакою його прогресування [16].

Зубчасте утворення на широкій основі характеризуються типовою деформацією крипт: напрямом росту такого утворення є горизонтальним, вздовж м'язової пластинки слизової, крипти розширені в базальних відділах [1], зубчастість епітелію є цитоплазматичною і поширюється по всій довжині аж до базальних відділів крипт [19]. На сьогодні, згідно діючої класифікації ВООЗ 5-го перегляду, наявність хоча б однієї деформованої крипти з типовою дилатацією в базальному відділі та зубчастістю епітелію по всій довжині, є чинним критерієм для постановки діагнозу зубчастого утворення [1]. Стосовно клітинного складу цих утворень, вони містять

мікроевезикулярні епітеліоцити та келихоподібні клітини в співвідношенні 1:1 – 1:2 [16].

Таким чином, основними гістологічними особливостями (відмінними рисами) гіперпластичних поліпів товстої кишки є наступні:

- базальна дилатація і розгалуженість кишкових крипт;
- цитоплазматична зубчастість епітелію, що поширюється по всій довжині кишкових крипт;
- горизонтальний напрям росту новоутворення [1, 16, 19].

Питання щодо походження і прогресії зубчастих утворень на широкій основі жваво дискутуються в сучасній науковій спільноті. Є теорії щодо патогенетичного зв'язку між зубчастими новоутвореннями на широкій основі та гіперпластичними поліпами товстої кишки, що базуються на їх спільних рисах, таких як цитоплазматичний характер зубчастості і наявність мікроевезикулярних епітеліоцитів [16 - 20]. Окрім того, є теорія щодо розвитку зубчастих утворень на широкій основі *de novo* [20 - 21].

Треба зазначити, що теорія щодо патогенетичного зв'язку між зубчастими новоутвореннями на широкій основі та гіперпластичними поліпами не узгоджується із сучасними даними щодо розподілу зубчастих новоутворень у відділах кишківника. Загалом, зубчасті поліпи є більш типовими для дистальних відділів товстої кишки. При цьому до 90 % всіх традиційних зубчастих аденом знаходять в дистальних відділах товстої кишки, до 80 % всіх зубчастих поліпів – також в дистальних відділах, але до 80 % всіх зубчастих утворень на широкій основі знаходять в проксимальних відділах товстої кишки [16].

Клініко-морфологічні особливості зубчастих утворень на широкій основі товстої кишки полягають в наступному. На відміну від інших зубчастих новоутворень (зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів), зубчасті утворення на широкій основі частіше виявляють в проксимальних (правих) відділах товстої кишки. 70 – 85 % зубчастих утворень на широкій основі виявляють саме в проксимальній товстій кишці. Середній діаметр

таких новоутворень коливається від 0,5 до 0,7 см (тобто, вони є відносно невеликими). Зазвичай це пласкі або це «сидячі» новоутворення, що виглядають як вогнище елевації слизової оболонки, що не має чітких меж. Поверхня зубчастих утворень на широкій основі зазвичай гладенька і бліда в порівнянні з навколишньої слизовою, лише в окремих випадках вона може бути гіперемована. Поява ерозій, язв, крововиливів, будь-яких вторинних змін на поверхні зубчастого утворення на широкій основі товстої кишки є ознакою його прогресування [16].

Згідно сучасних уявлень формування зубчастих новоутворень товстої кишки опосередковується низкою молекулярно-генетичних механізмів. В більшості випадків пусковим механізмом стає мутація генів, які залучені до регуляції протеїнкіназ, що активуються мітогенами (це можуть бути мутації *KRAS* або *BRAF*). Активуючі мутації *BRAF* призводять до поширеного метилювання CpG острівців. Поява цієї аномалії є проявом так званого CIMP-фенотипу (CpG island methylator phenotype). Внаслідок прояву цього фенотипу відбувається сайленсинг багатьох генів, включаючи деякі тумор-супресорні гени. В ході прогресії традиційних зубчастих аденом в 25 % – 48 % випадків відбувається гіперметилювання *CDKN2A* (ген, що кодує білок p16). В прогресії гіперпластичних поліпів і зубчастих утворень на широкій основі частіше відбувається гіперметилювання *MLH1* (приблизно в 75 % випадків), що призводить до розвитку мікросателітної нестабільності (MSI) [16].

Прогресія зубчастих новоутворень також асоціюється з активацією Wnt/ β -катенінового сигнального шляху. Раніше вже зазначалось, що активація цього шляху відбувається на ранніх етапах розвитку звичайних аденом. У випадку ж зубчастих утворень, активація цього шляху є більш пізньою подією, що зазвичай асоціюється із збільшенням виразності диспластичних змін. Окрім того, у випадку прогресії зубчастих новоутворень активація Wnt / β -катенінового відбувається, як правило, в наслідок мутацій,

пошкоджуючих RNF43–ZNRF3 комплекс (а не APC протеїн, як у випадку звичайних аденом) [12, 16].

Згідно сучасних даних щонайменше 20 % спорадичних колоректальних карцином розвивається внаслідок злоякісної трансформації зубчастих новоутворень [21].

1.3 Клініко-морфологічні характеристики колоректальної аденокарциноми

Колоректальна аденокарцинома (КРА) є найбільш поширеним (90 %) гістологічним типом злоякісного новоутворення товстої кишки [1].

Карциноми товстої кишки принципово поділяють на правобічні (або карциноми проксимальної товстої кишки – сліпої, висхідної, а також проксимальних 2/3 поперечної ободової) та лівобічні (або дистальні – дистальної 1/3 поперечної ободової кишки і дистальніше). Більша частина карцином товстої кишки є лівобічними, при цьому за останні роки по всьому світу реєструється покращення показників виживаності хворих на рак дистальних відділів товстої кишки. Це пов'язують із впровадженням скринінгових програм і поширенням колоноскопії, що дозволяє виявляти передракові зміни та карциноми на ранніх стадіях розвитку [22].

Поділ товстокишкових карцином на право- і лівобічні має практичне значення та є обґрунтованим сучасними даними щодо кишкового канцерогенезу. Більшість скринінгових методів, в тому числі аналіз калу на приховану кров, є більш чутливими до лівобічних, тобто, дистальних колоректальних карцином. Окрім того, лівобічні карциноми зазвичай є поліпоподібними утвореннями, в той час як правобічні карциноми частіше є плоскими утвореннями, що є більш складними для виявлення та діагностики [23 – 24]. Перелік клінічно значущих відмінностей між карциномами проксимальної та дистальної товстої кишки наведено в таблиці нижче (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 – Відмінності між правобічними та лівобічними карциномами товстої кишки

Карциноми проксимальної товстої кишки	Карциноми дистальної товстої кишки	Посилання на джерело інформації
частіше розвиваються в похилому віці	частіше розвиваються на межі середнього і похилого віку	[22 - 24]
частіше розвиваються в жінок	частіше розвиваються в чоловіків	[22 - 24]
типові симптоми токсико-анемічної форми хвороби – гарячка та гіпохромна анемія	типові симптоми обтураційної форми хвороби – прогресуюча кишкова непрохідність	[22 - 24]
макроскопічно мають вигляд плоского новоутворення	макроскопічно мають вигляд поліпоподібного новоутворення	[22 - 24]
частіше низько- і недиференційовані карциноми	частіше помірно- і низькодиференційовані карциноми	[22 - 24]
поширений муцинозний патерн	поширений тубулярний та / або ворсинчастий патерн	[22 - 24]
виразна імуноклітинна інфільтрація, переважно за рахунок Т-лімфоцитів	слабка імуноклітинна інфільтрація	[25 - 26]
найчастіше перші віддалені метастази виявляють на парієтальній очеревині	найчастіше перші віддалені метастази виявляють в печінці та легенях	[27]
поширені мутації в системі репарації помилково спарених нуклеотидів (DNA mismatch repair)	поширені <i>KRAS</i> , <i>APC</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>p53</i> мутації, що призводять до мікросателітної нестабільності (CIN)	[22, 28]
пухлини низько чутливі або не чутливі до стандартних схем хіміотерапії, проте, реагують на імунотерапію	пухлини реагують на стандартні схеми хіміотерапії, а також таргетної терапії, спрямованої на рецептори до факторів росту	[25 - 26]

Гістологічно більшість колоректальних аденокарцином є звичайними або неспецифікованими (так звана карцинома «NOS» – carcinoma of no special type). Це злоякісні пухлини, що гістологічно характеризуються виразною клітинною і тканинною атипією, інвазивним ростом, а також одним із

патернів тканинної архітекtonіки, що є характерними для звичайних аденом – тубулярним, ворсинчастим або тубуло-ворсинчастим [1].

Існують також інші гістологічні варіанти колоректальних карцином (окрім неспецифікованої NOS). Виділяють наступні особливі субтипи: зубчаста аденокарцинома, аденомоподібна аденокарцинома, мікропапілярна аденокарцинома, муциозна аденокарцинома, дискогезивна аденокарцинома, перстнеподібно-клітинна аденокарцинома, медулярна аденокарцинома, залозисто-плоскоклітинна аденокарцинома, недиференційована аденокарцинома та аденокарцинома з саркоматозним компонентом. Кожен з цих особливих субтипів названий відповідно до патерну тканинної архітекtonіки, що визначається в пухлині [1].

Так, зубчасті колоректальні карциноми мають патерн архітекtonіки подібний до зубчастих поліпів – звертає на себе увагу зубчастість просвітів залозоподібних утворень. Аденомоподібна колоректальна аденокарцинома раніше називалась також «ворсинчаста аденокарцинома» та «інвазивна папілярна аденокарцинома», адже, вона має патерн архітекtonіки подібний до high-grade ворсинчастих аденом та може викликати певні труднощі в аспекті диференційної діагностики. Мікропапілярна колоректальна аденокарцинома відрізняється наявністю кластерів ракових клітин із стромальними структурами, що імітують просвіти судин, створюючи таким чином ефект мікропапілярної архітекtonіки. Муциозна колоректальна аденокарцинома характеризується вогнищами позаклітинного накопичення муцинів (слизу), що формують так звані «басейни». Перстнеподібно-клітинна колоректальна аденокарцинома характеризується наявністю клітин, що накопичують муцини всередині і, як наслідок, трансформуються в клітини, що містять велику муцинову краплю всередині та ядро, дислоковане на периферію. Медулярна колоректальна аденокарцинома відрізняється значним переважанням паренхіматозного компоненту над стромальним, ракові клітини мають везикулярні ядра, помітні ядерця і насичено-еозинофільну цитоплазму. Залозисто-плоскоклітинна колоректальна

аденокарцинома відрізняється наявністю кластерів ракових клітин, архітектоніка яких відповідає плоскоклітинній карциномі [1].

КРА характеризується тенденцією до формування залозоподібних структур атипovими клітинами, що є базисом для визначення ступеню диференціювання (G) пухлини. Основними рисами КРА різного ступеня диференціювання є наступні:

- в добре-диференційованих (G₁) карциномах (також називаємо їх високодиференційовані карциноми) більш ніж 95 % тканинної маси пухлини представлено залозоподібними утвореннями;
- в помірно-диференційованих (G₂) карциномах від 50 % до 95 % тканинної маси пухлини представлено залозоподібними утвореннями;
- в низько-диференційованих (G₃) карциномах менш ніж 50 % тканинної маси пухлини представлено залозоподібними утвореннями [29].

Згідно літературних даних 70 % всіх колоректальних аденокарцином діагностуються як помірно-диференційовані. Добре- та низько-диференційовані складають 10 % і 20 % всіх випадків, відповідно [16, 26, 29].

Ключовою гістологічною ознакою є інвазія атипovих клітин через м'язову пластинку слизової у підслизову основу. Проте, визначення цієї ознаки може бути ускладнено в поверхнево забраних або неправильно орієнтованих біоптатах. Якщо м'язова пластинка слизової чітко візуалізується в біоптаті, вкрай важливим є оцінка її цілісності або ж інвазія раковими клітинами. Інвазивна карцинома зазвичай проростає м'язову пластинку до підслизового шару, де її клітини визначаються в безпосередній близькості до судин [29].

Ще однією важливою гістологічною рисою інвазивної КРА є десмопластична реакція стромы, що помітна у вигляді виразного фіброзу стромального компоненту [29]. Десмоплазія є добре помітним візуальним критерієм, проте має двобічне значення в прогресуванні пухлини. Адже, з одного боку, добре розвинена фіброзна строма є своєрідною перешкодою на шляху ракових клітин, вимагає від них значної літичної активності [30].

З іншого ж боку, є теорії про те, що колагенові волокна в ракових пухлинах формують так звані «треки», тобто, шляхи, що визначають напрямок інвазивного росту ракових клітин [31]. Окрім того, добре відомо, що надмірна строма є бар'єром на шляху імунітетів, що могли б задіяти шкоди раковим клітинам шляхом механізмів протипухлинного імунітету. І, що не менш важливо, новоутворена десмопластична строма є субстратом для неонгіагенезу – невід'ємного компоненту канцерогенезу, детальніше про який буде сказано дещо пізніше [30 – 31].

Звертає на себе увагу, що діагноз інвазивної (T_1) КРА ставиться у випадку, коли має місце інвазія підслизового шару або глибше. Оскільки для інших відділів шлунково-кишкового тракту (стравохід, шлунок, тонка кишка) цей критерій є іншим – інвазивними вважаються карциноми у випадках, коли ракові клітини інвазують власну пластинку слизової оболонки [29]. Це пояснюється особливостями лімфатичної системи товстої кишки, з огляду на які ризик метастазування виникає лише за умови інвазії підслизового шару [32].

КРА, що локалізуються виключно в межах власної пластинки слизової називають неінвазивними (T_{is}) та прирівнюють до тяжкої дисплазії (HGD). Що важливо з огляду на можливість проведення достатньо ефективного лікування шляхом ендоскопічного втручання [29].

Використані раніше в тексті позначення T_1 і T_{is} – параметри системи TNM [33]. Основні параметри цієї системи для колоректального раку наведені нижче.

1. T – tumor – параметр, що характеризує глибину інвазії первинної пухлини:

1.1. T_{is} – ракові клітини локалізовані в межах власної пластинки слизової товстої кишки;

1.2. T_1 – ракові клітини проникають через м'язову пластинку слизової і поширюються у підслизовій основі;

1.3. T_2 – ракові клітини проникають у м'язовий шар стінки товстої кишки;

1.4. T_3 – ракові клітини знаходять у субсерозному шарі стінки товстої кишки;

1.5. T_{4a} – пухлина проросла всі шари стінки товстої кишки, ракові клітини знаходять в структурах вісцеральної очеревини;

1.6. T_{4b} – пухлина проросла всі шари стінки та прилеглі до враженої товстої кишки анатомічні структури.

2. N – node – параметр, що характеризує залучення регіонарних лімфатичних вузлів у злоякісний процес:

2.1. N_0 – пухлина не поширюється в регіонарні лімфатичні вузли;

2.2. N_{1a} – ракові клітини знайдені в 1 регіонарному лімфатичному вузлі;

2.3. N_{1b} – ракові клітини знайдені в 2-3 регіонарних лімфатичних вузлах;

2.4. N_{1c} – знайдені вузлові структури, що сформовані раковими клітинами, розташовані близько товстої кишки, але ці структури не є лімфатичними вузлами;

2.5. N_{2a} – ракові клітини знайдені в 4-6 регіонарних лімфатичних вузлах;

2.6. N_{2b} – ракові клітини знайдені в більш ніж 7 регіонарних лімфатичних вузлах.

3. M – metastasis – параметр, що характеризує наявність віддалених метастазів:

3.1. M_0 – немає віддалених метастазів;

3.2. M_{1a} – пухлина поширилась на 1 будь-який інший орган, окрім товстої кишки;

3.3. M_{1b} – пухлина поширилась на більш ніж 1 будь-який інший орган, окрім товстої кишки;

3.4. M_{1c} – пухлина поширилась на парієтальну очеревину [33].

Базуючись на системі TNM, AJCC (American Joint Committee on Cancer) було розроблено системи стадіювання раку. Систему стадіювання колоректального раку, що використовується в теперішній час (2017-го року 8-го перегляду), наведено нижче.

1. Стадія 0 – $T_{is} + N_0 + M_0$: ракові клітини локалізовані в межах власної пластинки слизової, немає інвазії, немає регіонарних і віддалених метастазів.

2. Стадія I – $T_{1-2} + N_0 + M_0$: ракові клітини поширюються в межах підслизової основи або м'язового шару стінки товстої кишки, немає регіонарних і віддалених метастазів.

3. Стадія II A – $T_3 + N_0 + M_0$: ракові клітини поширюються до субсерозного шару стінки товстої кишки, немає регіонарних і віддалених метастазів.

4. Стадія II B – $T_{4a} + N_0 + M_0$: ракові клітини поширюються до вісцеральної очеревини, немає регіонарних і віддалених метастазів.

5. Стадія II C – $T_{4b} + N_0 + M_0$: ракові клітини поширюються до прилеглих до враженої товстої кишки анатомічних структур, немає регіонарних і віддалених метастазів.

6. Стадія III A – $T_{1-2} + N_{1a-c} + M_0$ або $T_1 + N_{2a} + M_0$: ракові клітини поширюються в межах підслизової основи або м'язового шару стінки товстої кишки, наявні регіонарні метастази в 1-3 лімфатичних вузлах або у вузлових структурах, що розташовані близько товстої кишки, але не є лімфатичними вузлами, немає віддалених метастазів; або ракові клітини поширюються в межах підслизового шару стінки товстої кишки, наявні регіонарні метастази в 4-6 лімфатичних вузлах, немає віддалених метастазів.

7. Стадія III B – $T_{3-4a} + N_{1a-c} + M_0$ або $T_{2-3} + N_{2a} + M_0$ або $T_{1-2} + N_{2b} + M_0$: ракові клітини поширюються до субсерозного шару або до вісцеральної очеревини, наявні регіонарні метастази в 1-3 лімфатичних вузлах або у вузлових структурах, що розташовані близько товстої кишки, але не є лімфатичними вузлами, немає віддалених метастазів; або ракові клітини

поширюються до м'язового або субсерозного шару, наявні регіонарні метастази в 4-6 лімфатичних вузлах, немає віддалених метастазів; або ракові клітини поширюються в межах підслизової основи або м'язового шару стінки товстої кишки, наявні регіонарні метастази в більш ніж 7 лімфатичних вузлах, немає віддалених метастазів.

8. Стадія III C – $T_{4a} + N_{2a} + M_0$ або $T_{3-4a} + N_{2b} + M_0$ або $T_{4b} + N_{1-2} + M_0$: ракові клітини поширюються в структурах вісцеральної очеревини, наявні регіонарні метастази в 4-6 лімфатичних вузлах, немає віддалених метастазів; або ракові клітини поширюються до субсерозного шару або до вісцеральної очеревини, наявні регіонарні метастази в більш ніж 7 лімфатичних вузлах, немає віддалених метастазів; або ракові клітини поширюються через всі шари стінки та на прилеглі до враженої товстої кишки анатомічні структури, наявна будь-яка кількість регіонарних метастазів, немає віддалених метастазів.

9. Стадія IV A – будь-яка T + будь-яка N + M_{1a} : будь-яка глибина інвазії, будь-яка кількість метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах, пухлина поширилась на 1 будь-який інший орган, окрім товстої кишки.

10. Стадія IV B – будь-яка T + будь-яка N + M_{1b-c} : будь-яка глибина інвазії, будь-яка кількість метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах, пухлина поширилась на більш ніж 1 будь-який інший орган, окрім товстої кишки або на парієтальну очеревину [33].

Є ще одна система стадіювання KPP, що є менш поширеною, порівняно із TNM- та AJCC-системами стадіювання раку, проте також використовується в клінічній практиці. Це система стадіювання колоректального раку Dukes (Dukes' staging system). Згідно цієї класифікації виділяють наступні стадії KPP:

- Dukes A – пухлина локалізована в межах слизової оболонки, може сягати м'язового шару стінки товстої кишки;
- Dukes B – пухлина проросла всю товщу м'язового шару стінки товстої кишки;

- Dukes C – пухлина поширилась на щонайменше 1 регіонарний лімфатичний вузол;
- Dukes D – пухлина поширилась на будь-яку іншу частину тіла (печінка, легені, кістки, та інше) [32].

Прогресія КРА від неінвазивної до метастатичної стадії базується на низці молекулярно-генетичних змін, що роблять можливим не тільки неконтрольований поділ клітин, але й зміну їх фенотипічних і функціональних властивостей і, як наслідок, інвазію та метастазування [29].

Процес виходу ракових клітин з місця первинної локації (первинної пухлини) та утворення нових колоній у віддалених тканинах описується як каскад «вторгнення-метастазування». Цей каскад складається з п'яти основних етапів: 1) локальна інвазія ракових клітин у навколишній матрикс; 2) інтравазація ракових клітин у систему кровообігу; 3) системне транспортування ракових клітин; 4) екстравазація ракових клітин в паренхіму віддалених локацій; 5) колонізація віддалених локацій та формування вторинної пухлини. Незважаючи на те, молекулярні механізми реалізації кожного з цих етапів ще до кінця не вивчені, а також, вірогідно, відрізняються для кожного окремого різновиду злоякісних пухлин, деякі з цих механізмів вже певною мірою досліджені [27, 29]. Далі буде розглянуто основні з цих механізмів.

1.4 Молекулярно-імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми

Згідно сучасних уявлень, молекулярну основу прогресування злоякісних пухлин складають збій диференціювання нових поколінь клітин, дисбаланс їх проліферації та апоптозу, а також низка механізмів, що забезпечують трофіку новоутвореної маси тканини (неоангіогенез) і умови для поширення ракових клітин (перш за все, шляхом зміни їх фенотипічних властивостей). Окрему

молекулярну ланку прогресування злоякісних пухлин складає концепція ракових стовбурових клітин. Всі ці питання в аспекті стадійного прогресування колоректальної аденокарциноми будуть висвітлені в наступних підрозділах.

1.4.1 Сучасні уявлення щодо процесів проліферації та апоптозу в колоректальній аденокарциномі

Проліферація і апоптоз є базовими механізмами підтримки балансу в клітинних популяціях, що забезпечують елімінацію старих або пошкоджених клітин їх заміщенням їх новими. Дисрегуляція проліферації та апоптозу в бік збільшення проліферативної та пригнічення апоптотичної активності клітин призводить до гіперплазії, дисплазії, туморогенезу [34]. Зазвичай збільшення проліферативної та пригнічення апоптотичної активності клітин відбуваються паралельно. Серед найбільш поширених молекулярних подій, що призводять до цього збою з подальшим запуском кишкового канцерогенезу, є:

- гіпоксія, що підсилює активність HIFs і, як наслідок, проліферацію малодиференційованих або недиференційованих клітин, включаючи клітини-попередники та стовбурові клітини;
- активація одного або декількох із сигнальних шляхів, що залучені до регуляції клітинного циклу внаслідок мутацій та / або епігенетичних аномалій (Wnt, Notch, IGF, PI3K/Akt, NF-κB, Hh та ін.);
- активація прото-онкогенів в асоціації з інактивацією тумор-супресорних генів [35].

Напротязі останніх десятиліть було проведено багато досліджень, присвячених вивченню проліферації та апоптозу в злоякісних пухлинах шляхом використання імуногістохімічних маркерів – антитіл до маркерних молекул проліферації та апоптозу [36-48]. Так, для оцінки клітинної

проліферації зазвичай використовують антитіла до Ki-67. Цей білок є ядерним протеїном, що присутній лише в клітинах, які знаходяться у фазах G1, S, G2 або M клітинного циклу. Тобто, в клітинах, що проліферують. В ядрах клітин, що знаходяться в фазі G0 клітинного циклу цей протеїн відсутній [49]. Для оцінки рівня апоптозу клітин доволі поширеним є використання антитіл до каспази-3 – однієї з ефекторних каспаз, присутність активованої форми якої в клітинах свідчить про запуск апоптотичного каскаду. З метою комплексної оцінки апоптозу обґрунтованим є і використання антитіл до p53 – так званого «сторожа геному». Нормальна форма цього білка не виявляється імуногістохімічним методом з причини надшвидкого періоду напіврозпаду. Білки, що виявляються імуногістохімічним методом, є мутантними та індикаторними відносно порушення роботи каспаз-залежного апоптотичного каскаду [34].

З використанням цих маркерів було доведено, що в певних карциномах, а саме – в інвазивній карциномі молочної залози [36 - 37], ендометрію [38], легені [39], рівень клітинної проліферації є статистично значущо вищим порівняно до показників неінвазивних карцином. Окрім того, для значної кількості пухлин, включаючи перелічені вище, було доведено зниження рівня апоптозу при прогресії [34, 38]. Проте, є і винятки – було описано окремі варіанти раку молочної залози [40], а також плоскоклітинного раку ротової порожнини [41], що характеризуються підвищеним рівнем апоптозу.

Сучасні літературні дані щодо рівнів проліферації та апоптозу клітин в КРР є вкрай варіабельними. За даними більшості дослідників, ракові клітини КРР характеризуються середнім та / або високими рівнем клітинної проліферації [42 - 44], а також низьким рівнем апоптозу [34, 42]. Дані щодо імуногістохімічної експресії «стража геному» p53 в КРР варіюють у широкому діапазоні – дослідники приводять показники від низького до середнього рівнів експресії відповідного маркеру [45 - 48].

Найбільш дискутабельним є питання щодо прогностичної цінності перелічених вище маркерів. Адже, стосовно Ki-67 дані суперечливі – є роботи, згідно яких високі показники експресії цього маркеру є прогностично несприятливими [42 - 43], і є роботи, згідно яких КРР з високими показниками експресії Ki-67 відрізняються кращим прогнозом [50 - 51]. Окрім того, в низькі досліджень було зроблено висновок, згідно якого Ki-67 не можна розцінювати в якості прогностичного маркеру для КРР [44, 49].

Звертає на себе увагу той факт, що маркери проліферації та апоптозу було неодноразово досліджено в КРР I-IV стадій [42-51]. При цьому, дослідження, в яких проводились порівняння рівнів проліферації та апоптозу в КРР і поліпах-прекурсорах є нечисленними. Окрім того, ці роботи проводились 10 і більше років тому, коли уявлення щодо товстокишкових поліпів суттєво відрізнялись від теперішніх. В цих дослідженнях порівнювали КРР лише з одним гістологічним варіантом товстокишкових поліпів – зі звичайними аденомами [52 - 55]. Роботи, в якій проводилось би порівняння рівнів проліферації та апоптозу в КРР і в кожному з виділених на сьогодні гістологічних видів товстокишкових поліпів, не знайдено, що вказує на актуальність досліджень в цьому напрямку.

1.4.2 Сучасні уявлення про неангіогенез в колоректальній аденокарциномі

Ще одним важливим механізмом, що забезпечує пухлинну прогресію є неангіогенез. Адже, процес новоутворення судин забезпечує трофіку новоутвореної тканини. В низці досліджень було показано, що неангіогенез активується ще на етапі передракових змін слизової товстої кишки, до яких відносять і поліпи [56 - 58].

Було показано, що активація неангіогенезу передує формуванню аденоми, відбувається переважно в зоні базальних відділів кишкових крипт та асоціюється із стійкою вазодилатацією. Окрім того, було показано

переважання активності проангіогенних факторів порівняно за антиангіогенними факторами в аденомах [57]. В дослідженні Namid A.A. et al. (2018) було показано гіперекспресію VEGF-A і VEGFR-2 в аденомах, та відносно нормальний рівень експресії цих маркерів в зубчастих гіперпластичних поліпах [56]. Знову ж таки, звертає на себе увагу відсутність у сучасній літературі систематизованих повних даних щодо експресії маркерів неоангіогенезу в кожному гістологічному типі товстокишкових поліпів згідно діючої класифікації, а також порівняння усіх цих показників з аналогічними показниками КРР.

Безумовно, процес неоангіогенезу задіяний не лише на ранніх етапах кишкового канцерогенезу. Реалізація етапів інвазивного росту та метастазування невід'ємно пов'язана із функціонуванням каскадів, що активуються опосередковано рецепторами до судинних факторів росту. Більший об'єм пухлинної тканини потребує добре розвиненої судинної системи. І власне судини слугують шляхами розповсюдження ракових клітин, тобто, метастазування [59].

Вивчення експресії маркерів, залучених до неоангіогенезу, представляє значний інтерес. По-перше, рівень активності неоангіогенезу зазвичай прямо корелює із погіршенням прогностичних показників, що було доведено для значної кількості злоякісних пухлин [60 - 62]. По-друге, ці маркери є потенційними мішенями для таргетної антиангіогенної терапії та вивчення їх експресії в окремих пухлинах дозволяє оптимізувати лікувальну тактику [61, 63]. І ще одним не менш важливим фактором є те, що поглиблене вивчення молекул, залучених до неоангіогенезу в канцерогенезі, дозволяє прояснювати досі не вирішені питання молекулярних основ злоякісного росту, що безумовно перспективно з точки зору можливостей оптимізації діагностики та лікування КРР.

Серед найбільш поширених маркерів неоангіогенезу – молекули сімейства VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF) та їх рецептори VEGFR (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3). VEGF-A – судинно-

ендотеліальний фактор росту типу А – є ключовим проангіогенним фактором в онкогенезі, основним рецептором до якого служить VEGFR-2 (рецептор судинно-ендотеліального росту другого типу) [64]. Експресія VEGFR-2 клітинами КРР досліджена в значній кількості робіт, проте дані щодо рівня експресії цього маркера варіюють від низького до високого. Показник частоти VEGFR-2-позитивних пухлин також варіює – від 55 % до 100 % [59, 65 - 67]. При цьому значимість VEGFR-2 в кишковому канцерогенезі не викликає сумнівів, оскільки доведено залежність між експресією цього маркера і виживаністю ракових клітин, а також їх чутливістю до хіміотерапії [66 - 67]. В роботі Liu Z. et al. (2017) було показано залежність між експресією VEGFR-2 і диференціюванням клітин КРР в напрямку ендотеліоцитів [59].

Роль VEGFR-1 дискутується. Вважається, що VEGFR-1 за нормальних умов слугує в якості «приманки» для молекул VEGF-A, що заважає їх зв'язуванню з рецепторами VEGFR-2 та утримуючи таким чином фізіологічний рівень утворення нових судин [64]. Але протиріччя в том, що в багатьох дослідженнях, присвячених вивченню VEGFR-1 в пухлинах, було показано підвищення рівня експресії відповідного маркера по відношенню до показників норми. Тобто, підвищення рівня експресії VEGFR-1 в пухлинах асоціюється з активацією неоангіогенезу. Механізм цього феномену лишається невивченим [65].

Окрім того, звертає на себе увагу, що молекули сімейства VEGFR залучаються не лише до регуляції новоутворення судин, а й до ряду інших процесів. Доведено, що ці рецептори здатні до регулювання активності (запуску аутофосфорілювання) інших тирозинкіназних рецепторів, серед яких – EGFR, RTKs, cMET. Відповідно, VEGFR залучені до регуляції сигнальних каскадів, що запускаються із вказаних рецепторів. Ці каскади безпосередньо впливають на клітинну проліферацію і виживаність, реалізацію фенотипу, інвазивних властивостей і здатності до міграції клітин [66, 68].

З метою вивчення неоангіогензу в КРР також використовують маркери, що дозволяють селективно забарвлювати ендотеліоцити – це CD31, CD34, CD105 та інші. З їх використанням з'являється можливість проводити підрахунок кількості мікросудин в полі зору мікроскопа [67, 69 - 70]. CD34 – це молекула міжклітинної адгезії, експресія якої характеризує як зрілі ендотеліоцити, так і їх клітини-попередники. Таким чином, використання цього маркера дозволяє проводити підрахунок не тільки зрілих, але й новоутворених мікросудин в полі зору мікроскопа. Було виявлено кореляції між показниками експресії CD34 в КРА і виживаністю хворих, а також деякими клініко-морфологічними характеристиками карциноми, такими як розмір пухлини, глибина її інвазії, наявність регіонарних та віддалених метастазів [69 - 70].

Ангіогенез вважається однією із ключових ланок росту пухлини та запровадження шляху транспортування метастазуючих ракових клітин. Ангіогенез необхідний не тільки для підтримки росту пухлини, але й для того, щоб ракові клітини проникли в судинну систему шляхом утворення нових судин, які з'єднуються з вже існуючою системою кровообігу [57]. Це ремоделювання судин вимагає активації ендотеліальних клітин проангіогенними факторами. Представники сімейства молекул VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, PlGF) вважаються найважливішими індукторами неоангіогенезу. Гіпоксія стимулює секрецію VEGF клітинами, що зазнають нестачу кисню, шляхом посередництва HIF1 α . Іншими тригерами експресії VEGF є EGF, TGF- α та - β , PDGF, ILGF-1, FGF [60 - 61]. Незважаючи на те, що досі залишаються відкритими питання про те, як кожний із представників сімейства VEGF бере участь в неоангіогенезі, було показано, що VEGF-A зв'язується з VEGFR2 на ендотеліальних клітинах, сприяючи міграції ендотеліоцитів, підвищенню їх виживаності та проліферації, індукуючи MAPK- та PI3K-каскади. VEGF-C діє через VEGFR-3, сприяючи лімфангіогенезу, що безумовно відіграє роль в розвитку регіонарних метастазів [69].

З'являється все більше доказів того, що неоангіогенез – це не ізольований саморегульований процес, а наслідок взаємодії «пухлина-мікросередовище», що не обмежується генерацією нових судин, а також робить можливим і навіть прискорює метастазування. В літературі знайдено інформацію щодо важливості ендотеліальних клітин пухлини, які належать до групи пухлинних стромальних клітин і є результатом взаємодії пухлинних клітин і мікросередовища. Функція ендотеліальних клітин пухлини не обмежується утворенням нових кровоносних судин для забезпечення пухлини поживними речовинами та забезпечення шляху розповсюдження, але насправді стимулює пухлину до метастазування. Коли ракові клітини потрапляють в систему кровообігу, вони фізично торкаються ендотеліальних клітин пухлини і взаємодіють з ними за допомогою юкстакринової та паракриної сигналізації. Ендотеліальні клітини пухлини секретують біглікан, невеликий багатий повторний протеоглікан, який стимулює пухлинні клітини до метастазування шляхом активації сигналізації NF κ B та ERK. Крім того, ТЕЦ здатні знижувати рівень супресивних факторів пухлини, таких як Slit2, тим самим сприяючи прогресуванню пухлини [65].

Інтерлейкін-33 є ще одним прикладом складності та двонаправлених взаємодій між пухлинними клітинами, мікросередовищем та неоангіогенезом. Цей цитокін, що секретується переважно раковими клітинами в карциномах, індукує неоангіогенез через рекрутування мієлоїдних клітин, які секретують VEGF. Це також опосередковано сприяє метастазуванню в печінку в КРР, мобілізуючи макрофаги та мієлоїдні клітини для реконструкції стромы до про-ендотеліальних клітин пухлини, замість того, щоб змінювати інвазивні або міграційні властивості та метастатичні можливості ракових клітин. Виявлено, що різні лейкоцити, асоційовані з пухлинами, включаючи макрофаги, нейтрофіли, супресори та дендритні клітини, отримані мієлоїдами, тучні клітини, вроджені лімфоїдні клітини, клітини $\gamma\delta$ T та природні клітини-кілери, не тільки призводять до локальної імуносупресії, але також сприяють ангіогенезу

шляхом секреції VEGF, хемокінів, цитокінів, протеаз, структурних білків та мікровезикул [69].

Іншими факторами, які також сприяють неоангіогенезу при різних видах раку, включаючи КРР, є ADAM9 та FGF18. При метастазуванні колоректального раку ADAM9 сприяє підвищенню експресії VEGF-A, ANGPT2 та PLAT, а також активує EGFR. FGF18 активує ERK/MAPK-каскад через зв'язування з рецептором FGFR3 на ендотеліальних клітинах, сприяючи тим самим неоангіогенезу. FGF18 також може активувати NF- κ B, що призводить до регуляції та секреції прозапальних цитокінів з подальшим набором пухлинних макрофагів, які секретують VEGF-A та клітини екстрацелюлярного матриксу, які секретують MMP9, що сприяє ангіогенезу та утворенню відповідного мікросередовища пухлини [65 - 66].

Іншим фактором, що сприяє неоангіогенезу через ERK-каскад, є ген зв'язування кальцію та інтегрину-1 *KRAS*, дисрегуляція якого має місце при різних видах злоякісних пухлин, включаючи КРР, та часто корелює з онкогенними мутаціями. При фосфорилуванні, опосередкованому PKD2, інтегрин-1 сприяє неоангіогенезу, опосередковуючи індуковане PKD2 продукування та секрецію пухлинними клітинами VEGFR-2. Продемонстровано, що гомеодомен-взаємодіюча протеїнкіназа-2 (HIPK2) функціонує як супресор прогресування пухлинного росту при різних типах раку, а її надмірна експресія призводить до зниження регуляторної активності VEGF. Інгібування HIPK2 гіпоксією призводить до індукції ЕМП та неоангіогенезу через передачу сигналів канонічного Wnt-каскаду та збільшення активності промотору VEGF [65 - 66].

В літературі також було знайдено інформацію, що в гіпоксичних умовах клітини КРР вивільняють екзосоми в мікросередовище пухлини, що сприяє неоангіогенезу. Ці екзосоми, збагачені WNT4, призводять до індукції сигналізації β -катеніну в ендотеліальних клітинах і стимулюють останні до проліферації та міграції. Беручи до уваги механізми метастазування при КРР, здається, що неоангіогенез відрізняється за умов метастазування в печінку та

очеревину. Метастази в печінку вважаються результатом гематогенного поширення. Однак для того, щоб пухлинні клітини транспортувались до печінки, вони спочатку повинні знайти доступ до кровоносної системи. Вони також залежать від новоутворення нових дрібних судин, що виникають навколо первинної пухлини, що збільшує ймовірність потрапляння пухлинних клітин у кров. Як тільки вони потрапляють у печінку, знову потрібен неоангіогенез, щоб метастази могли збільшуватись в розмірах та збільшуватись кількісно [58 - 60].

Сама пухлина може активно підтримувати цей процес, роблячи паренхіму печінки більш дозвільною для самонаведення та зростання метастазів шляхом експресії VEGFR-1, що виділяється гемопоетичними клітинами-попередниками, що заселяють преметастатичну нішу. У пацієнтів з колоректальним раком, синхронними метастазами в печінку та первинною пухлиною спостерігається значно вища експресія VEGFR-1 і VEGF-A в паренхімі печінки, прилеглої до метастазів, порівняно із експресією цих маркерів в паренхімі печінки, прилеглої до метастазів у пацієнтів з метастатичними метастазами в печінці після резекції первинної пухлини. Це спостереження акцентує здатність до промоції неоангіогенезу первинної пухлини [58 - 60].

На відміну від метастатичного ураження печінки при КРР, карциноматоз очеревини вважається не результатом гематогенної дисемінації, а наслідком лімфогенної дисемінації та / або виходу ракових клітин у порожнину очеревини з подальшим прикріпленням до поверхні очеревини. Отже, неоангіогенез вірогідно не відіграє ключової ролі на початкових етапах метастатичного каскаду в цьому випадку. Однак, як тільки клітини КРР опинились в черевній порожнині зазначеним шляхом, їх виживаність та темпи поширення залежать від неоангіогенезу, що є необхідним перш за все для підтримки відповідного рівня трофіки, а, відповідно, і проліферації ракових клітин, а також розширення можливостей гематогенної дисемінації [58 - 60].

1.4.3 Концепція ракових стовбурових клітин та її значимість в прогресуванні колоректальної аденокарциноми

Особливий інтерес також викликає теорія щодо ракових стовбурових клітин (РСК) в контексті кишкового канцерогенезу. РСК – це субпопуляції клітин карциноми, що є локалізованими в стромальному компоненті пухлини (це мезенхімальні стовбурові клітини) або ж серед ракових клітин (це є власне ракові стовбурові клітини). Відомо, що РСК мають властивості до самовідновлення, симетричного і асиметричного поділу, часткового диференціювання, а також до існування, самовідновлення і диференціювання за межами первинної пухлини. Серед досліджених властивостей РСК в карциномах – здатність до промоції пухлинного росту, рецидивів і метастазування, а також формування хіміорезистентності [71 - 73].

За фізіологічних умов стовбурові клітини слизової товстої кишки локалізовані виключно в базальних відділах кишкових крипт. Клітини, що формуються в результаті поділу стовбурової клітини, рухаються вздовж вертикальної осі кишкової крипти в напрямку верхівки та продовжують ділитися, поки не сягають середньої третини крипти. В цій зоні недиференційовані нащадки стовбурової клітини починають диференціюватись в напрямку кишкових ентероцитів, келихоподібних або ентероендокринних клітин [74].

Відносно стовбурових клітин в контексті канцерогенезу вважається, що ракові клітини є нащадками нормальних стовбурових клітин [74]. З точки зору цієї концепції, злоякісна трансформація вперше трапляється в пулі стовбурових клітин, що локалізовані в базальних відділах кишкових крипт. Нащадки ж цих клітин, пересуваються в напрямку, аналогічному тому, що є фізіологічним (вздовж вертикальної осі кишкової крипти), передаючи при цьому набуті властивості злоякісності – це вже ракові стовбурові клітини. Це так звана модель «знизу догори» (bottom-up model) поширення РСК

напочатку кишкового канцерогенезу. Є також і модель «зверху вниз» (top-down model) поширення РСК напочатку кишкового канцерогенезу, що базується на загальнопоширеному спостереженні щодо локалізації перших диспластичних змін в поверхневих відділах кишкових крипт [75].

Дослідження РСК стало можливим із відкриттям маркерних молекул, що є властивими цій популяції клітин. З метою дослідження РСК в КРР найчастіше використовують CD44, CD133, ALDH1, EpCAM [74].

CD44 – це мембранний глікопротеїн (рецептор), що за фізіологічних умов експресується ембріональними стовбуровими клітинами, а також значною кількістю стовбурових клітин дорослих і клітин-попередників [76 - 77]. В тому числі маркер експресується нормальними стовбуровими клітинами і клітинами-попередниками епітеліоцитів слизової товстої кишки [74]. Молекули CD44 мають широкий спектр функціональних властивостей. Основним лігандом CD44 є гіалуронова кислота – один із домінуючих компонентів позаклітинного матриксу. Зв'язування CD44 із гіалуроновою кислотою призводить до структурної перебудови інтрацелюлярного домену CD44, що сприяє відокремленню цього домену від цитоскелету клітини та зв'язування з адаптерними протеїнами. Таким чином, функціонують сигнальні каскади, пов'язані з CD44. Серед останніх – MAPK-, Wnt-, PI3K/Akt-каскади. Ці каскади безпосередньо регулюють проліферацію і диференціювання клітин, апоптоз і епітеліально-мезенхімальний перехід, про який буде сказано дещо пізніше [78].

Окрім гіалуронової кислоти, CD44 також може зв'язувати остеопонін і деякі молекули-месенджери, включаючи фактори росту. Всі ці молекули присутні в значній кількості в позаклітинному матриксі карцином [79]. Зокрема, гіалуронова кислота і остеопонін присутні в значній кількості в ниші лейкемічних стовбурових клітин, а також в ниші стовбурових клітин солідних пухлин, де ці молекули забезпечують підтримку популяції РСК [74]. Доведено також взаємозв'язок між експресією CD44 і активністю MMP-9, що забезпечує інвазивні властивості ракових клітин [78].

В експериментальних роботах було показано, що CD44+ клітини є тумор-ініціюючими клітинами в ксенотрансплататах. Згідно даних, отриманих в цих роботах, CD44+ клітини мають властивості стовбурових, тобто, кожна окрема CD44+ клітина здатна до самовідновлення, а також диференціювання з формуванням пухлини в ксенотрансплататі, аналогічної первинній пухлині [80]. Окрім того, в низці клінічних досліджень було показано, що експресія CD44 корелює зі стадією пухлинного процесу, наявністю регіонарних і віддалених метастазів, прогнозом та виживаністю хворих на карциноми різних видів. Високий рівень експресії CD44 визнано маркерним для субпопуляцій клітин із високим туморогенним потенціалом [81 - 84].

При цьому в літературі було знайдено деякі протиріччя відносно функціонування і ролі CD44 в КРР. За даними Wu Q. et al. (2015) зниження експресії CD44 в КРР асоціюється із пригніченням пухлинного росту та поширення ракових клітин [85]. За даними Li X.D. et al. (2013) зниження експресії CD44 в КРР асоціюється із промоцією поширення ракових клітин. Однак, треба зазначити, що в останній роботі було досліджено варіантні ізоформи CD44 (CD44v), що є результатом альтернативного сплайсінгу [86]. Було також знайдено інформацію, згідно якої, високодиференційовані КРР характеризуються вищими рівнями експресії CD44 порівняно із низкодиференційованими пухлинами. При цьому високий рівень експресії CD44 асоціюється із погіршенням прогнозу в групі високодиференційованих КРР [87]. Таким чином, лишається ще багато невирішених питань щодо функціонування молекул CD44 в кишковому канцерогенезі, їх значенні та можливостей практичної імплікації.

ALDH1 (альдегіддегідрогеназа 1) – «метаболічний» маркер стовбурових клітин. Це NAD(P)⁺-залежний фермент, що має здатність до окислення широкого спектру ендо- і екзогенних альдегідів, забезпечуючи таким чином захист клітин в умовах оксидативного стресу. Детоксифікуюча здатність ALDH1 вважається основним механізмом високої виживаності та

«довголіття» стовбурових клітин. Окрім того, ALDH1 відіграє важливу роль в біосинтезі деяких регуляторних молекул, таких як ретиноева кислота, γ -аміномаляна кислота, бетаїн [88]. ALDH1 забезпечує трансформацію ретиноальдегіда в ретиноеву кислоту, що є сигнальною молекулою, яка необхідна для активації клітинної проліферації та диференціювання [89].

Було доведено ефективність використання маркера ALDH1 з метою виділення пулу РСК в карциномі молочної залози, протоковій карциномі підшлункової залози, а також в колоректальній карциномі [90 - 93]. Доведено роль ALDH1 в якості промотора епітеліально-мезенхімального переходу ракових клітин: атипіві епітеліоцити втрачають ознаки диференціювання і набувають ознак не тільки мезенхімальних, але й стовбурових клітин, що корелює із показниками прогресії раку [91]. ALDH1 може бути основним механізмом формування резистентності до алкілюючих хіміотерапевтичних препаратів, адже, молекула здатна до незворотного окислення алкільних груп [89].

Проте, в сучасних літературних даних щодо значення ALDH1 в кишковому канцерогенезі все ще лишаються невисвітлені питання та протиріччя. В низькі досліджень було показано, що ALDH1 є незалежним прогностичним параметром: високий рівень експресії цього маркера прямо корелює із погіршення прогностичних показників, а також біль просунутими (advanced) клініко-морфологічними параметрами КРР [91]. В інших роботах було показано відсутність кореляцій між рівнем експресії ALDH1 і клінічною стадією КРР [94]. Окрім того, дослідження, присвячені вивченню експресії як ALDH1, так і CD44, в поліпах-прекурсорах КРР є поодинокими та не дають комплексної картини значимості цього маркера в клінічній практиці [91].

ЕрСАР (Epithelial Cell Adhesion Molecule) – трансмембранний глікопротеїн, що забезпечує Ca^{2+} -незалежну міжклітинну адгезію епітеліоцитів, а також міжклітинний обмін сигналами. Молекула ЕрСАР складається з трьох доменів: екстрацеллюлярного (ЕрЕХ), трансмембранного та термінального цитоплазматичного (інтрацеллюлярного, ЕрІСД). ЕрЕХ

безпосередньо забезпечує гомологічну адгезію, в той час як EpcAM безпосередньо зв'язується з актиновим цитоскелетом клітини [95 - 97].

В нормі експресія EpcAM має місце на базолатеральних поверхнях мембран епітеліоцитів, які, що важливо, вільні від молекул E-кадгерину [95]. Високий рівень експресії EpcAM є властивим епітеліоцитам тонкої та товстої кишки, жовчного міхура, а також ендометрію. При цьому загальною тенденцією є прямий зв'язок між експресією EpcAM з рівнем проліферативної активності епітеліоців при паралельному зворотному зв'язку із рівнем їх диференціювання [97]. Так, було показано, що в напрямку від кишкових крипт до кишкових ворсинок експресія EpcAM знижується. Відповідно, вищий рівень експресії цього маркера характеризує стовбурові клітини та клітини-попередники, що локалізовані в нижніх відділах кишкових крипт, а нижчий рівень експресії цього маркера характеризує зрілі епітеліоцити кишкових ворсинок [98].

В літературі доволі поширеним є визначення EpcAM, згідно якого експресія цього маркера характеризує всі види епітелію, за винятком плоского [95 - 97]. При цьому добре відомо, що експресія EpcAM виявляється в клітинах-попередниках епітеліоцитів шкіри, але не виявляється в зрілих клітинах [98]. В печінці експресія EpcAM виявляється виключно перипортально, що є типовою локацією стовбурових клітин цього органу [99]. За даними літератури EpcAM також експресується ембріональними стовбуровими клітинами та стовбуровими клітинами дорослих [95, 97].

Відомо, що для більшості карцином властива гіперекспресія EpcAM, тобто значущо більша експресія цього маркера порівняно показників норми [95, 97]. При цьому прогностична значимість гіперекспресії EpcAM варіює в залежності від різновиду карциноми. Так, було показано, що гіперекспресія EpcAM клітинами раку щитоподібної залози, світлоклітинного раку нирки, плоскоклітинного раку голови та ший асоціюється із порівняно кращими прогностичними показниками [100 - 102]. Навпроти, гіперекспресія EpcAM клітинами протокової карциноми підшлункової залози і раку шлунка

асоціюється із порівняно гіршими прогностичними показниками [103 - 104]. Літературні дані стосовно прогностичної цінності експресії ЕрСАМ клітинами КРР є протирічними: є дані як стосовно асоціації між гіперекспресією ЕрСАМ і погіршенням прогностичних показників (таких даних переважна більшість), так і дані стосовно асоціації між гіперекспресією ЕрСАМ і покращенням прогностичних показників [105].

Гіперекспресію ЕрСАМ в карциномах пов'язують із специфікою адгезивної функції цих молекул, а також із функціонуванням сигнальних каскадів, функціонально поєднаних із ними. ЕрСАМ забезпечує адгезію шляхом формування зв'язків із такою ж самою молекулою на сусідній клітині, тобто, відбувається зв'язування двох позаклітинних доменів двох молекул ЕрСАМ (формування гомологічних зв'язків). Такі зв'язки є слабкішими в порівнянні зі зв'язками, що формуються, наприклад, молекулами сімейства кадгеринів (включаючи E-кадгерин). Окрім того, відомо, що ЕрСАМ може сприяти роз'єднанню контактів, утворених кадгеринами, шляхом конкурентного зв'язування ЕрІСД з а-актином [98]. Відносно сигнальних функцій, відомо, що ЕрСАМ залучається до функціонування Wnt/ β -катенінового каскаду за рахунок можливості зв'язуватись із FHL2-протеїном, що є безпосередньою ланкою каскаду. Більше того, FHL2 є основною мішенню зв'язування для ЕрСАМ в ембріональних стовбурових клітинах. В літературі також описані механізми залучення ЕрСАМ до функціонування РІЗК- і nPKC- каскадів [95].

Протиріччя в питаннях прогностичної цінності ЕрСАМ для діагностики окремих стадій та прогнозування перебігу колоректального раку привертають увагу [105]. Механізми функціонування і роль цієї молекули в розвитку спорадичного КРР все ще лишаються до кінця не вивченими [96, 105]. При цьому все досліджено роль мутацій кодуєчого гену *ErСАМ* в розвитку синдрому Лінча – герміногенні мутації гену призводять до пригнічення експресії MSH2, що є пусковим механізмом розвитку неоплазії при даному захворюванні [106]. В літературі було знайдено лише поодинокі

повідомлення щодо особливостей експресії EpCAM в товстокишкових поліпах [107 - 108], питання значимості цього маркеру в послідовності «аденома-карцинома» і «зубчастому» шляху малігнізації все ще лишаються відкритими.

В низці попередніх робіт інших дослідників було показано, що метастазування КРР корелює із ПГХ-експресією маркерів стовбурових клітин в карциномі. Так, було встановлено, що наявність метастазів у печінці асоціюється із підвищеними рівнями експресії CD133, CD44 і β -катеніну, в той час як метастатичне ураження очеревини не асоціюється із статистично значущим підвищенням показників експресії цих маркерів. Це може свідчити про те, що поширення пухлини на очеревину не потребує функціональної активності клітин із властивостями стовбурових, та може розцінюватись як прояв локальної агресії карциноми [71 - 73]. В мультिवаріантному аналізі було показано, що відсутність експресії CD133 в зразках КРР пацієнтів із карциноматозом очеревини є незалежним прогностичним фактором зниження показника виживаності, а також підвищеної вірогідності післяопераційного рецидиву. При цьому чіткого розуміння взаємозв'язків між експресією ПГХ-маркерів стовбурових клітин і карциноматозом очеревини КРА все ще немає [74 - 75]. А от дані щодо взаємозв'язків між експресією ПГХ-маркерів стовбурових клітин і метастатичним ураженням печінки при КРА є більш чіткими. Експресія гену *Oct4* корелює з низькою виживаністю пацієнтів з КРР без метастазів в печінці, а клітини з високим рівнем експресії гену *Oct4* активно формують метастази в печінку *in vivo*. Маркери стовбурових клітин Notch1 та ALDH1 корелюють з метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли, запущеною стадією та рецидивом пухлини, а також представляють собою незалежний прогностичний фактор при колоректальній аденокарциномі. Таким чином, ракові стовбурові клітини мають здатність до міграції та інвазії, і маркери стовбурових клітин виявились незалежними прогностичними факторами. Однак, треба зазначити, що розподіл ракових клітин в різні метастатичні ділянки в рамках

органотропізму та підтримання біологічних особливостей також опосередковується впливом окремих компонентів мікросередовища [90, 92].

1.4.4 Концепція епітеліально-мезенхімального переходу та її значення в прогресуванні колоректальної аденокарциноми

Ще однією ланкою кишкового канцерогенезу, що звертає на себе увагу при вивченні молекулярних основ цього процесу, є епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП). ЕМП – це процес, в ході якого епітеліальні клітини набувають властивостей мезенхімальних клітин [109 - 111]. Цей процес є визнаною основою інвазії та метастазування ракових клітин. В результаті ЕМП тісно зв'язані один із одним епітеліоцити роз'єднуються, втрачають полярність, набувають властивостей мезенхімального фенотипу, а також здатність до продукції та деградації окремих компонентів позаклітинного матриксу [109].

ЕМП був описаний в значній кількості карцином, включаючи колоректальну аденокарциному, однак точні механізми реалізації цього процесу в карциномах все ще вивчаються. З метою дослідження епітеліально-мезенхімального переходу в серійних зрізах пухлин використовують маркери епітеліального (Е-кадгерин, цитокератин, десмоплакін) і мезенхімального (віментин, α -SMA, десмін) фенотипів, а також функціонально пов'язані маркери [110 - 111].

Важливо також зазначити, що епітеліально-мезенхімальний перехід є ключовою програмою, яка дозволяє стаціонарним епітеліальним клітинам втратити адгезивні властивості та набутти мезенхімальних властивостей, що необхідні для інвазії та метастазування. До останніх відносять посилену рухливість, інвазивність, підвищену стійкість до апоптозу, а також деградацію та вироблення компонентів позаклітинного матриксу. Регуляція ЕМП відбувається на різних молекулярних рівнях. Далі послідовно буде

викладено основні шляхи регуляції ЕМП в карциномах, зокрема, в колоректальній аденокарциномі [109].

Е-кадгерин – трансмембранний глікопротеїн, що кодується геном *CDH1* і відіграє ключову роль в забезпеченні Ca^{2+} -залежної міжклітинної адгезії. Молекули Е-кадгерину, локалізовані переважно на базолатеральних поверхнях епітеліоцитів, складаються із екстрацелюлярного, трансмембранного та інтрацитоплазматичного доменів. Екстрацелюлярний домен безпосередньо забезпечує формування міжклітинних зв'язків, а також зв'язування молекул Ca^{2+} , що є необхідним для просторової організації молекул Е-кадгерину. Трансмембранний домен забезпечує передачу сигналів ззовні, а інтрацитоплазматичний може зв'язуватись із низкою молекул, серед яких – β -катенін. Це обумовлює опосередковане залучення Е-кадгерину до функціонування Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду. Останній, в свою чергу, є одним із сигнальних каскадів, що здатні до запуску ЕМП [112]. Окрім того, відомо, що порушення експресії *CDH1* і, відповідно, його білкового продукту є однією з невід'ємних ланок канцерогенезу, формує основу для відокремлення окремих атипівих епітеліоцитів (що, власне, є одним з ефектів ЕМП) [113]. В низці експериментальних робіт було показано, що зниження експресії *CDH1* асоціюється із активацією міграції ракових клітин колоректальної аденокарциноми [114].

Е-кадгерин, трансмембранний білок, що експресується епітеліальними клітинами, відіграє важливу роль у підтримці полярності клітин епітелію та стабілізації контактів клітин-клітин, дозволяючи клітинам підтримувати свій епітеліальний фенотип. Зниження рівня експресії Е-кадгерину асоціюється з метастазуванням у лімфатичні вузли, запущеною стадією, поганою диференціацією та інвазією судин в більшості карцином. Зниження рівня Е-кадгерину зазвичай супроводжується підвищенням регуляції N-кадгерину, молекули адгезії, виявленої в неепітеліальних тканинах. N-кадгерин сприяє прогресуванню пухлини, посилюючи сигналізацію рецептора фактора росту фібробластів (FGFR) та активність ядерного β -катеніну [112, 115].

Фактори транскрипції, що регулюють експресію Е-кадгерину в КРР, можна розділити на дві групи: прямі та непрямі репресори. Прямі репресори Е-кадгерину зв'язуються безпосередньо з промотором Е-кадгерину і включають SNAIL (SNAIL-1, -2), ZEB (ZEB-1, -2), E12 / E47, AP4. Непрямі репресори TWIST (TWIST-1, -2), FOXC-2, TCF-4, SOX-2, OCT4, Nanog, PROX1, SIX1, PRRX1, HMGA1 та Fra-1 мають кілька конкретних цілей і регулюють транскрипцію Е-кадгерину на кількох рівнях, включаючи активацію прямих репресорів. Що стосується клінічного значення в КРР, то репресори AP4, SOX2 та OCT4 достовірно пов'язані з метастазуванням карциноми в печінку. Окрім того, надмірна експресія репресора TWIST1, у якої 85% хворих на КРР демонструють помірну та сильну експресію, асоціюється з інвазією регіонарних лімфатичних вузлів, чоловічою статтю та погіршенням прогнозу. Посилення регуляції SNAI2 суттєво корелює з посиленою експресією віментину, і як експресія SNAI2, так і експресія віментину пов'язана з метастазуванням у лімфатичні вузли та поганим прогнозом [112 - 113].

β -катенін кодується геном *CTNNB1* і виконує дві основні функції в епітеліальній клітині – це підтримання міжклітинної адгезії та регуляція транскрипції Wnt-таргетних генів. Входячи до складу кадгерин-катенінового комплексу, β -катенін забезпечує зв'язок між Е-кадгерином і α -катеніном, що безпосередньо контактує з актиновим цитоскелетом клітини. Відомо, що аномалії структури та / або функції кадгерин-катенінового комплексу є основою порушення адгезивних властивостей епітеліоцитів [115 - 116].

Функціонуючи як фактор транскрипції (за умови ON-state Wnt/ β -катенінового сигнального шляху), β -катенін накопичується в клітинних ядрах і активує транскрипцію Wnt-таргетних генів, що відповідають за регуляцію проліферації, апоптозу, виживаності епітеліоцитів, а також реалізації їхніх адгезивних властивостей і рухливості [115 - 116]. Аномалії експресії *CTNNB1* та пов'язані з ними порушення функціонування сигнальних каскадів за умов канцерогенезу стали темою для багатьох

досліджень. Однак відомості фахової літератури щодо особливостей експресії гена *CTNNB1* та кодованого ним β -катеніну в КРА суттєво варіюють, а питання щодо точних механізмів взаємодії залучених сигнальних молекул залишаються невирішеними [116 - 118].

Цитокератини (СК) – сімейство протеїнів, що формують проміжні філаменти цитоскелету епітеліоцитів. В залежності від молекулярної маси виділяють 54 види молекул цього сімейства. Кожна молекула складається із центрального α -спірального домену, а також головного і хвостового доменів. Посттранслційні модифікації останніх регулюють функціонування цитокератинів, які, окрім формування каркасу клітини, приймають участь в диференціюванні епітеліоцитів і реалізації їх фенотипічних властивостей. Кожен із представників цього сімейства має властивості тканинної специфіки, тобто, зустрічається лише в окремих гістологічних типах тканин [119]. СК-20 – це кератин зрілих ентероцитів і келихоподібних клітин, що традиційно використовується в онкоморфології з метою диференційної діагностики та встановлення гістогенезу карцином [120]. СК-20 – це кератин зрілих ентероцитів і келихоподібних клітин, що традиційно використовується в онкоморфології з метою диференційної діагностики та встановлення гістогенезу карцином [120].

Віментин – білок проміжних філаментів клітин мезодермального походження. Молекула-мономер віментину має будову, подібну до білків проміжних філаментів: наявні центральний α -спіральний домен, головний і хвостовий домени. Особливість полягає в тому, що мономери віментину закручуються один навколо одного, формуючі спіральні димери. Формування димерів є ключовим механізмом утримання цілісності мезенхімальних клітин. Динамічна структура віментину є основою здатності мезенхімальних клітин до зміни форми, а взаємодія віментину з іншими елементами клітинного цитоскелету є основою рухливості цих клітин. Однойменний маркер широко використовується в онкоморфології з метою діагностики сарком. При цьому в сучасній науковій літературі все частіше зустрічаються

повідомлення щодо підвищення показників експресії віментину в деяких карциномах. Поясненням цього феномену є епітеліально-мезенхімальний перехід ракових клітин, що призводить до експресії ними маркерів мезенхімального фенотипу [121 - 122].

Віментин – це білок проміжних філаментів, що експресується в мезенхімальних клітинах, а також в окремих ракових клітинах (що зазнають ЕМП). Віментин співіснує та взаємодіє з кератином-KRT14 шляхом утворення внутрішньоклітинного гібриду Vim / KRT14 і може знаходитися в клітинах інвазивного фронту карциноми. Існує гіпотеза, що це гібридне поєднання порушує жорсткість кератинових волокон, сприяючи тим самим клітинній міграції. Експресія віментину регулюється геном *Vim*, що регулює міграцію ракових клітин та інвазивність. Показано, що нокдаун гену *Vim* порушує ріст і міграцію колонії кератиноцитів, пригнічує ЕМТ.

α -SMA є однією з ізоформ актину, що є основним компонентом клітинних мікрофіламентів. Молекула α -SMA – це глобулярний білок, що здатний до полімеризації з утворенням актинових спіралей мікрофіламентів. В нормі α -SMA експресується в міофібробластах, гладком'язових клітинах, де, окрім каркасної функції, виконує і функцію скоротливості. Остання є відмінною рисою міофібробластів (при їх порівнянні із звичайними фібробластами). Експресію α -SMA виявляють в ранах, що загоюються, вогнищах фіброзу, а також в стромальному компоненті карцином [123].

Ко-експресію α -SMA і віментину зазвичай використовують з метою виділення пулу тумор-асоційованих фібробластів, що дозволяє вивчати питання, пов'язані із взаємодією ракових клітин і їх мікрооточення, включаючи питання ініціації та прогресії ЕМП [111, 122 - 123]. В дослідженнях останніх років було запропоновано інші комбінації маркерів для виділення пулу тумор-асоційованих фібробластів в карциномах колоректальної локалізації. Так, в роботі Meyer S.N. et al. (2019) було обґрунтовано використання ко-експресії СК-20 і віментину з метою виділення пулу тумор-асоційованих фібробластів в колоректальній

карциномі, оскільки добре розвинена десмопластична строма також є результатом ЕМП, відповідно, її клітини експресують маркери як епітеліального так і мезенхімального фенотипів [124].

Загалом, в значній кількості робіт було показано зниження рівня експресії маркерів епітеліального фенотипу і збільшення рівня експресії маркерів мезенхімального фенотипу в карциномах товстої кишки [111, 114, 120, 124 - 130]. При цьому дослідники аналізували переважно ці показники в КРР загалом [111, 114, 120, 124 - 125], або в КРР різного ступеню диференціювання [126 - 128], або в КРР лише окремих клінічних стадій [129 - 130]. Звертає на себе увагу відсутність системного аналізу цих показників на кожній окремій стадії розвитку колоректальної аденокарциноми відповідно діючої системи стадіювання.

Процес ЕМП може бути активований безліччю позаклітинних сигналів в мікросередовищі пухлини з подальшою активацією всіх основних сигнальних шляхів реалізації властивостей ракових клітин. Беручи до уваги сучасні літературні дані, всі ці сигнальні шляхи мають певне значення в програмі ЕМТ і по-різному сприяють прогресу КРР. Далі буде детальніше описано ці шляхи [110].

Абераційна активація канонічного Wnt-сигнального каскаду призводить до пригнічення активності комплексу деструкції, основною функцією якого є деградація молекул β -катеніну. Згодом вільний цитозольний β -катенін транслокується в ядро, де він зв'язується з фактором транскрипції TCF4, індукуючи транскрипцію таргетних генів Wnt-сигнального каскаду, включаючи активацію репресорів E-кадгерину ZEB1 та SNAIL-1, а також MT1-MMP9 і LAMC2, які пов'язані з інвазивністю колоректальної карциноми. Інактивуючі мутації супресорних генів пухлини, таких як APC та AXIN2, призводять до регуляції канонічного Wnt-сигнального каскаду, сприяючи тим самим епітеліально-мезенхімальній трансформації. Таким чином, аберантна активація канонічного WNT-каскаду та β -катеніно-залежна сигналізація сприяють прогресуванню

пухлини та є важливою ланкою епітеліально-мезенхімального переходу в КРР [117 - 118].

Інактивація TGF- β /Smad-сигнального шляху призводить до прогресування КРР, відповідні мутації виявляються у 40–50% карцином. За відсутності цих мутацій, Smad-2 і -3 активуються TGF- β і переносяться в ядро за допомогою Smad-4, що регулює транскрипцію. За наявності мутацій втрата Smad-4, яка зазвичай пригнічує активацію STAT3, призводить до аберрантної активації STAT3, що пов'язано з підвищеною регуляцією експресії ZEB1, зниженням експресії E-кадгерину та підвищенням експресії N-кадгерину і віментину. Що стосується клінічної значущості цього механізму епітеліально-мезенхімального переходу в прогресуванні КРР, втрата Smad4 виявляється у 30% метастатичних колоректальних карцином і є вірогідним предиктором метастазування в печінку [109 - 111].

Клаудин-3, що є мембранним протеїном і компонентом щільних з'єднань, допомагає клітинам залишатися в своєму епітеліальному фенотипі і функціонує як супресор ЕМП. Однак, подібно до Smad4, втрата експресії клаудину-3 призводить до індукції епітеліально-мезенхімального переходу через аберрантну активацію STAT3. Його втрата також призводить до регуляції канонічного Wnt-сигнального каскаду і є індикатором гіршої виживаності пацієнтів. Більше того, у половини пацієнтів із КРР спостерігаються мутації, які призводять до інактивації TGF- β /Smad-каскаду, що в результаті призводить до індукції епітеліально-мезенхімального переходу [122].

В літературі також було знайдено інформацію про те, що регуляторний ген 1 N-Мус (NDRG1) інгібує ЕМП, міграцію та інвазію шляхом пригнічення активності згаданих вище шляхів, а також сигнального шляху ErbB та інгібування аутофагічних шляхів пробудження в різних ракових клітинах. У хворих на КРР виявлено, що експресія NDRG1 є незалежним прогностичним фактором виживання та рецидиву пухлини: пацієнти із КРР,

які є негативними до NDRG1, стикаються з гіршим прогнозом щодо загальної виживаності [122].

Іншими двома основними сигнальними шляхами, що регулюють ЕМТ, є RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK-каскад і PI3K/AKT-каскад, обидва активуються переважно факторами росту, такими як EGF та FGF. Активація RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK-каскаду призводить до збільшення експресії SNAIL-1 і -2. PI3K/AKT-каскад може індукувати експресію SNAIL-1 через NF-κB або через AKT, пригнічуючи активність комплексу деструкції в Wnt-каскаді, що в кінцевому підсумку призводить до підвищення експресії SNAIL-1 та ZEB1. Як описано вище, активація SNAIL1 та ZEB1 призводить до пригнічення експресії E-кадгерину та індукції ЕМП в колоректальній карциномі. Також задіяний у цих сигнальних мережах, ген 18 фактору росту фібробластів (FGF18) виявляє підвищену експресію в КРР і відіграє роль кінцевої ланки канонічного Wnt-каскаду, що активує епітеліально-мезенхімальний перехід [110, 114].

За даними літератури іншим важливим фактором реалізації ЕМП в колоректальній карциномі є ADAM9 – металопротеїназа, що закріплена на клітинних мембранах, і за багатьма джерелами сприяє інвазії ракових клітин КРР. За наявності метастазів КРР в печінку ADAM9 виділяється зірчастими клітинами печінки та зв'язується з клітинами колоректального раку, сприяючи їх інвазії шляхом взаємодії з компонентами екстрацеллюлярного матриксу. Дослідження на клітинах колоректального раку показали, що ADAM9, ініційований IL-6, який активує сигнальний шлях JNK, індукує експресію ЕМП-асоційованого фактора транскрипції SNAIL через експресію NOX1 у клітинній мембрані та продукцію АФК. ADAM9 сприяє метастазуванню ракових клітин за рахунок посиленої експресії CDCP1, проміграційного трансмембранного білка, який бере участь у взаємодії клітин та надмірно експресується у випадках метастатичної колоректальної карциноми [122].

1.4.5 Особливості взаємодій ракових клітин і мікросередовища та їх значення в прогресуванні колоректальної аденокарциноми

Взаємодія між раковими клітинами та їх мікросередовищем вважається важливим компонентом не тільки на ранніх стадіях колоректального канцерогенезу, але також при прогресуванні пухлини та розвитку метастазів. Пухлинне мікросередовище складається із запальних та імунних клітин, що включають переважно нейтрофіли, макрофаги, канцер-асоційовані фібробласти, а також умови середовища, такі як гіпоксія, наявність та концентрація ростових факторів, сигнальних молекул, а також компонентів екстрацелюлярного матриксу. Інвазія пухлинних клітин вимагає деградації базальної мембрани з подальшою міграцією ракових клітин через строму в прилеглі тканини, а також вимагає активації неоангіогенезу [25, 27].

Процес ремоделювання стромы опосередковується перш за все трансформуючим фактором росту бета (TGF- β) і тромбоцитарним фактором росту (PDGF), що секретуються канцер-асоційованими фібробластами. Окрім того, канцер-асоційовані фібробласти продукують матриксні металопротеїнази (MMP), інгібітори MMP, компоненти екстрацелюлярного матриксу, цитокіни, фактори росту та фактори, що стимулюють ЕМП, сприяючи не тільки проліферації та інвазії раку, але й метастазуванню [25].

Через складну систему взаємодій розчинних факторів макрофаги рекрутуються в мікросередовище пухлини, де вони виконують різні функції, що переважно залежать від стадії прогресування пухлини. На ранніх стадіях більшість канцер-асоційованих макрофагів є канцер-асоційованими макрофагами підтипу 1, що мають прозапальні властивості та працюють на елімінацію злоякісних клітин; на пізніх стадіях макрофаги можуть перейти на підтип 2, що виконують імуносупресивні функції, створюючи мікросередовище, яке сприяє прогресуванню карциноми. Шляхом секреції компонентів, що руйнують екстрацелюлярний матрикс (наприклад,

MMP-1, -7, -9, -12), канцер-асоційовані макрофаги підтримують ракові клітини, які виконують інвазію в строму. Окрім того, навіть прозапальні макрофаги 1 підтипу можуть сприяти ЕМП та активувати шлях β -катенін/TCF4, вивільняючи прозапальні фактори, підтримуючи тим самим метастатичний каскад [31 - 32].

Окрім своєї ролі у вербуванні імунних клітин, цитокіни можуть також діяти в напрямку індукції ЕМП в ракових клітинах. Інтерлейкін-1 β сприяє ЕМП через активацію ZEB1, інтерлейкін-11 через сигналізацію GP130/STAT3, а інтерлейкін-6 через активацію STAT3 та експресію SNAI1. Зниження нормальної функції p53, аж до повного її зникення, також опосередковано інтерлейкіном-6 призводить до зниження експресії E-кадгерину та збільшення експресії SLUG, сприяючи подальшому ЕМП. Індукована TGF- β -експресія SNAI1 може активувати IL8 з подальшою активацією CXCR1 та індукцією ЕМП через сигналізацію PI3K/АКТ. TNF- α може індукувати ЕМП безпосередньо за допомогою АКТ/GSK-3 β -опосередкованої стабілізації SNAI1 та опосередковано за рахунок збільшення експресії інтерлейкіна-8 та CXCR1. Втрата Smad-4 не лише сприяє ЕМП через описані вище сигнальні шляхи, але також збільшуючи експресію CCL15, веде до рекрутування клітин мієлоїдного ряду в КРР. Потім ці клітини допомагають раковим клітинам КРР виконувати інвазію в строму, виробляючи MMP-9 в значній кількості [95 - 96].

На додаток до описаних вище взаємодії ракових клітин та мікросередовища, важливу роль в формуванні віддалених метастазів відіграють також певні специфічні клітини мікросередовища. Серед них – макрофаги очеревини, мезотеліальні клітини очеревини та фібробласти очеревини. Перитонеальна інвазія визначається як інвазія пухлини за межі еластичної пластинки очеревини, яка створює мікросередовище інвазивної пухлини, сприяючи прогресуванню та метастазуванню карциноми. Макрофаги очеревини утворюють перший бар'єр на шляху інвазії за рахунок секреції фактора некрозу пухлини. Однак, вони також можуть

переключитися на фенотип 2-го підтипу макрофагів, про який вже згадувалось вище, та який сприяє прогресуванню карциноми, зокрема, шляхом активної секреції інтерлейкіну-6 і інтерлейкіну-10. Хоча точна функція мезотеліальних клітин очеревини на початкових стадіях перитонеального карциноматозу до кінця не з'ясована, вважається, що ці клітини відіграють важливу роль у підтримці внутрішньочеревного гомеостазу. Після активації макрофагів очеревини вони виділяють різноманітні опосередковуючі молекули в мікросередовище пухлини, такі як цитокіни, хемокіни, фактори росту, компоненти екстрацеллюлярного матриксу і молекули адгезії. Проте, все ще ведуться дискусії щодо мезотеліальних клітин очеревини, які можуть як виконувати захисну функцію, так і підтримувати колонізацію очеревини раковими клітинами [31 - 32, 35].

Після колонізації очеревини раковими клітинами фібробласти очеревини сприяють прогресуванню пухлини, діючи подібно до канцер-асоційованих фібробластів. Недавні дослідження показують, що канцер-асоційовані фібробласти можуть походити від мезенхімальних стовбурових клітин; проте механізми цієї трансформації досі незрозумілі. Зосередження уваги на субпопуляціях фібробластів показало, що субперитонеальні фібробласти відіграють активну роль у процесі інвазії КРР. Вони демонструють високу експресію генів компонентів екстрацеллюлярного матриксу та регуляцію генів, пов'язаних із білками скороченням клітин, включаючи α -SMA. Скорочувальна здатність строми клітин та фіброз з експресією α -SMA сприяють міграції клітин, інвазії та прискорюють метастазування [95 - 96].

Клітини CD90 (+) / CD45 (-) є невеликою субпопуляцією клітин, подібних до мезотеліальних, знайдених у перитонеальній рідині, які також виражають характеристики мезенхімальних стовбурових клітин. Після стимуляції TGF- β мезотеліальні клітини експресують колаген 1-го типу, α -SMA, віментин і діють подібно до міофібробластів. Таким чином, вони

відіграють допоміжну роль у розвитку метастазів у очеревину, створюючи сприятливе мікросередовище пухлини. Останнім часом значна увага приділяється також перитонеальним адипоцитам, які, як було встановлено, сприяють проліферації та інвазії ракових клітин шляхом ліпідної інтерналізації клітинами раку шлунка, забезпечуючи тим самим поживні речовини для злоякісного відділу. Підвищена інвазивність опосередковується активністю PI3K/Akt-каскаду. Подібних досліджені в напрямку активності перитонеальних адипоцитів при КРР ще не проводилось [109].

При гематогенному поширенні тромбоцити та нейтрофіли допомагають клітинам пухлини, які потрапили в систему кровообігу (так звані циркулюючі пухлинні клітини), уникати елімінації, захищаючи їх від імунних атак природних клітин-кіллерів. TGF- β та PDGF, що виділяються з тромбоцитів, пригнічують активність природних клітин-кіллерів. Утворюючи захисні плащі в поєднанні з фібриногеном, тромбоцити також фізично захищають ракові клітини від природних клітин-кіллерів. Завдяки TGF- β -індукованій активації NF- κ B у ракових клітинах програма ЕМП посилюється та просувається таким чином, що циркулюючі пухлинні клітини не втрачають своїх інвазивних характеристик, необхідних для екстравазації та метастатичної колонізації, повертаючись до епітеліального стану [95 - 96]. Екстравазація додатково підтримується секрецією АТФ із тромбоцитів, що збільшує проникність судин і полегшує вхід у тканину. Показано, що нейтрофіли підтримують метастатичне поширення, утворюючи нейтрофільні позаклітинні пастки, які затримують пухлинні клітини в крові, таким чином допомагаючи їм прилипати до ендотеліальних клітин, уникаючи природних нападів клітин-кіллерів та екстравазату. Через погану адаптацію до нового мікросередовища більшість пухлинних клітин або елімінуються після екстравазації, або переходять у стан спокою на невизначений термін. Ці клітини можуть активуватися для зростання шляхом промєстатичних змін у мікросередовищі, таких як гіпоксія, фіброз, запалення та вироблення компонентів екстрацеллюлярного матриксу канцер-асоційованими

фібробластами, що підкреслює взаємозалежність ракових клітин та їх мікросередовища. Щоб уникнути аноікісів при перитонеальному карциноматозі, пептидази, пов'язані з калікреїном (наприклад, KLK7), активуються, і пухлинні клітини утворюють скупчення і продовжують розмножуватися на противагу гематогенному розповсюдженню, де клітини пухлини хімічно та механічно захищені тромбоцитами. Окрім того, дослідження на клітинних лініях KPP показали, що підвищення регуляції Src-тирозинкінази, яка відіграє важливу роль у спайках клітинного матриксу та клітинних клітин, призводить до підвищеної стійкості до аноікісів [109].

Нещодавно основна увага була приділена виявленню відповідних молекул адгезії при перитонеальному розповсюдженні, і було показано, що молекули адгезії відрізняються між гематогенною та перитонеальною дисемінацією, що свідчить про відмінності в процесах приєднання. При гематогенному розповсюдженні, при KPP, головним чином у печінці, необхідна адаптованість ендотелію в печінкових синусоїдах, що передбачає зв'язування CD44 з гіалуроновою кислотою та антигенами групи крові sLea і sLex, а також з селектинами, що зв'язуються з компонентами екстрацеллюлярного матриксу [32]. Важливими молекулами адгезії при перитонеальному карциноматозі є інтегрини (наприклад, $\alpha 2\beta 1$) та інтегранові ліганди, протеоглікани (наприклад, CD44), члени надсімейства імуноглобулінів (наприклад, ICAM1, VCAM1, L1CAM), муцини (наприклад, MUC16) та епітеліальна молекула адгезії EpcAM [95]. Триває суперечка щодо важливості кожної з цих молекул адгезії для формування сприятливої метастатичної ділянки. Літературні дані свідчать, що антигени групи крові відіграють роль лише у гематогенному розповсюдженні, тоді як L1CAM та протеоглікани сприяють дисемінації виключно по очеревині. Хоча точні відмінності залишаються незрозумілими, є згода щодо важливості молекул адгезії у метастатичному розповсюдженні, особливо оскільки вільно «плаваючі» ракові клітини в порожнині очеревини не обов'язково призводять до перитонеального карциноматозу. Для інвазії в очеревину потрібні

протеолітичні ферменти, такі як матричні металопротеази (наприклад, MMP-2, -7, -9), які секретуються раковими клітинами або оточуючими стромальними клітинами. Після інвазії ракові клітини не тільки повинні виживати в новому середовищі, але також і підтримувати проліферацію за допомогою ростових факторів, а також факторів, що сприяють неоангіогенезу. В літературі знайдено інформацію, що мРНК IGF-1 надмірно експресується при перитонеальному розповсюдженні КРР, порівняно із карциномами, що метастазували в печінку [109 - 110].

1.4.6 Концепція муцинового фенотипу та її значення в прогресуванні колоректальної аденокарциноми

Фенотип пухлин шлунково-кишкового тракту також оцінюють із використанням маркерних муцинів (MUCs). MUCs – це високомолекулярні глікопротеїни, що синтезуються багатьма епітеліоцитами. В шлунково-кишковому тракті MUCs формують слизований бар'єр, що захищає епітелій від зовнішніх агресивних факторів (алкоголь, куріння, гостра їжа та ін.), впливу ферментів, мікроорганізмів та інших чинників, здатних пошкоджувати епітелій [131]. Серед відомих на сьогодні 21 MUCs виділяють мембрано-асоційовані (MUC1, MUC4, MUC17) муцини, які окрім захисної функції забезпечують передачу сигналів до епітеліоцитів, а також секреторні (MUC2, MUC5AC, MUC6) муцини. Останні формують основу полімерного гелю, що вкриває слизові оболонки [132].

Відомо, що кишковий канцерогенез асоціюється із зміною муцинового профілю слизової оболонки в зоні ураження. Можлива як втрата експресії MUCs, які за нормальних умов експресуються епітеліоцитами слизової товстої кишки, так і поява експресії MUCs, що за нормальних умов не типові для ентероцитів [133]. Окрім того, є інформація щодо значення MUCs в кишковому канцерогенезі. Добре відомо, що структурні зміни, які зазнають молекули MUC1 в ході пухлинної прогресії, призводять до перманентної

активації MAPK-, PI3K- і Wnt-сигнальних каскадів [134]. В праці R. H. Fernandez, K. S. Linden (2017) було обґрунтовано взаємозв'язок між експресією MUC1 і ЕМП ракових клітин [135]. Проте інформації щодо чітких механізмів цього зв'язку в КРР в сучасній літературі не було знайдено. В низці робіт було описано зниження експресії MUC2 в КРР, а також асоціація цього явища із просунутими стадіями хвороби і погіршенням прогностичних показників. При цьому чіткі механізми цього явища теж лишаються не вивченими [136 - 137]. MUC4 був запропонований K. Shiv Ram et al. (2014) в якості маркеру, що дозволяє виділяти групу високого ризику малігнізації серед пацієнтів із поліпами товстої кишки [132]. Експресія MUC5AC є нормальною для слизової оболонки шлунка, в умовах норми не виявляється в слизовій оболонці кишківника. За даними літератури окремі випадки КРР характеризуються експресією цього муцину, що є ярким прикладом зміни муцинового фенотипу в ході кишкового канцерогенезу [138].

MUC1, який також називають пан-епітеліальним мембранним муцином, – це трансмембранний глікопротеїн, що має сильно гликозилований екстрацелюлярний домен, також відомий як епісіалін (episialin). За нормальних умов MUC1 експресується апікальною зоною залозистих епітеліоцитів стравоходу, шлунка, дванадцятипалої кишки, підшлункової залози, матки, молочних залоз, простати та легенів. Основна функція цього муцину за умов норми – захист підлеглого епітеліального шару. Окрім того, MUC1 відіграє значущу роль в передачі сигналів ззовні до середини епітеліоцитів [131 - 132]. Відомо, що структурні та функціональні особливості молекул MUC1 за умов норми та за умов злякисного процесу суттєво відрізняються. Так, експресія MUC1 виявляється в багатьох карциномах, включаючи КРР, та відзначається на будь-якій поверхні (або на усіх поверхнях) ракових клітин, що втратили базальну орієнтацію ядер. Окрім того, в більшості карцином визначаються середні та / або високі показники експресії MUC1 раковими клітинами. Функціональна роль MUC1 в злякисній прогресії вивчалась в багатьох дослідженнях [131 - 138]. Як вже

зазначалось раніше, структурні зміни, які зазнають молекули MUC1 в ході пухлинної прогресії, призводять до перманентної активації MAPK-, PI3K- і Wnt-сигнальних каскадів [134]; в іншій праці було обґрунтовано взаємозв'язок між експресією MUC1 і ЕМП ракових клітин [135]. Проте, чіткі уявлення щодо значимості MUC1 в реалізації інвазивних та метастатичних властивостей ракових клітин КРА все ще відсутні.

MUC2, який також називають кишковим муцином, – це секреторний муцин, що є основою слизового шару, який вкриває поверхню слизової оболонки товстої кишки. Цей слизовий шар є двошаровим: внутрішній шар безпосередньо вкриває епітеліоцити і в нормі не містить бактерій, в той час як зовнішній шар не контактує із епітелієм безпосередньо і зазвичай є колонізованим бактеріями (нормальна мікрофлора кішківника) [136 - 137]. Відомо, що зниження експресії MUC2 перш за все призводить до потоншення внутрішнього слизового шару, що може призводити до безпосереднього контакту бактерій із епітелієм. Це призводить до запалення, зазвичай хронічного, і, яка наслідок, можливий розвиток дисплазії низького ступеня, дисплазії високого ступеня і карциноми (прогресія зазвичай займає роки та відбувається за умови не усунення причинного фактору) [131 - 132, 137]. Таким чином, за нормальних умов MUC2 виконує протизапальну функцію, попереджаючи хронічне запалення слизової оболонки товстої кишки та розвиток неоплазій. І, навпаки, відсутність нормального рівня експресії MUC2 призводить до промоції неоплазій, а за окремими даними – також і інтерлейкін-6-індукованого ЕМП. Базуючись на цьому, MUC2 було запропоновано в якості біомаркери для діагностики, підбору імунотерапії, та прогнозування КРР [136 - 137].

MUC4 – трансмембранний муцин, який в класичному розумінні вважається трахеобронхіальним муцином келихоподібних клітин. Проте, експресія MUC4 властива також і слизовій оболонці шлунка, тонкої і товстої кишки, слизовій оболонці матки, а також виявляється в передміхуровій залозі. В кишківнику цей муцин зазвичай присутній на поверхні

келихоподібних клітин, а також циліндричних епітеліоцитів [131]. MUC4 складається із 2 субодиниць: перша - муциноподібна, MUC4 α , яка має глікозильовані тандемні повтори, та друга – MUC4 β , що складається з трьох доменів, подібних до епідермального фактору росту (EGF), і короткого цитоплазматичного хвоста. Відомо, що експресія MUC4 частково регулюється шляхами, пов'язаними з інтерфероном- γ , ретиноевою кислотою та трансформуючим фактором росту- β , що відображає функціональну активність молекули [132].

Відомо, що MUC4 залучається до реалізації ультраструктурних змін, що відбуваються при злоякісній трансформації епітеліоцитів. Зокрема, повідомлялось, що муциновий шар, який містить MUC4 захищає диспластичні та / або ракові клітини від цитотоксичної дії імуніцитів, блокуючи протипухлинну імунну відповідь. А домен MUC4, що структурно подібний до EGF (що вже зазначалось вище) може виконувати роль модулятора HER2/ErbB2-тирозинкіназних рецепторів, що потенціює туморогенез. Окрім того, повідомлялось, що гіперексперсія MUC4 є причиною апоптозо-резистентності злоякісних пухлин. Всі ці повідомлення, що були знайдені в літературі, вказують на значущу роль MUC4 в прогресії карцином, проте, чіткі механізми функціонування цих молекул за умов кишкового канцерогенезу все ще лишаються до кінця не вивченими [131 - 132].

MUC5AC, який також називають шлунковим муцином, – це секреторний гель-формуєчий муцин, який в нормі експресується в слизовій оболонці шлунка, а також в слизовій цервікального каналу, в яєчниках, підшлунковій залозі та легенях. В нормі експресія MUC5AC не виявляється в слизовій оболонці кишківника, включаючи товсту кишку [138]. Частота виявлення MUC5AC+ пухлин серед випадків КРР значно варіює – від 0 до 95 % (за даними літератури), а наявність MUC5AC+ КРР пов'язують переважно із високим рівнем мікросателітної нестабільності таких карцином [131 - 133, 136, 138]. Оскільки високий рівень мікросателітної нестабільності

традиційно вважається прогностично сприятливим відносно прогресування КРР, MUC5AC+ випадки також вважають прогностично більш сприятливими, у порівнянні із MUC5AC- випадками [138]. Іншим поясненням появи експресії MUC5AC в КРА, що було знайдено в літературі, є перманентна активація MAPK-сигнального каскаду, за рахунок цього активується декілька факторів транскрипції [139]. Серед останніх – E2F/DP – фактор, що регулює транскрипцію кількох генів, включаючи *MUC5AC* [139].

Дані літератури відносно безпосередніх кореляцій між експресією MUC5AC в КРА і окремими клініко-морфологічними параметрами пухлини, такими, яка глибина інвазії, наявність метастазів, та інше, значно варіюють [131 - 133, 136, 138]. Зустрічаються повідомлення як щодо наявності таких зв'язків, так і щодо відсутності таких зв'язків. Це стало приводом для включення MUC5AC в панель вивчення муцинового фенотипу КРА в цьому дослідженні.

Cdx-2 – кишковий фактор транскрипції, відомий також як каудальний гомеобокс 2-го типу, основна функція якого полягає в підтримці кишкового фенотипу. Cdx-2 в нормі експресується ентероцитами. Це ще один маркер фенотипу, який зазвичай включають у панель дослідження муцинового профілю новоутворень шлунково-кишкового тракту [139]. Добре відомо, що Cdx-2 має тумор-супресивні властивості: ця молекула здатна до зв'язування із β -катеніном в клітинному ядрі, що призводить до деструкції β -катенін-TCF-комплексів, що, в свою чергу, призводить до інактивації Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду. Окрім того, відомо, що Cdx-2 здатний до стабілізації p27Kip1, блокуючи убіквітинування цього протеїну, що в результаті призводить до пригнічення активності CyclinE і «зупиняє» ракові клітини в G0 фазі клітинного циклу [140].

При цьому відомо, протягом останнього десятиліття було накопичено значну кількість даних щодо асоціації експресії Cdx-2 з розвитком КРР, прогресуванням карциноми, її просунутими стадіями, судинною інвазією та метастазуванням. В більшості досліджень з цього питання було показано, що

KPP характеризується високими показниками експресії Cdx-2 [139-142]. Це йде всупереч із наведеними вище загальними уявленнями щодо функціонування Cdx-2. Проте, чіткий механізм функціонування Cdx-2 в кишковому канцерогенезі ще не було описано [140].

В низьці робіт також було показано, що відсутність експресії Cdx-2 в KPP є прогностично несприятливою, виявляється лише в 5 % цих карцином. Зниження експресії Cdx-2, що було описано в цих роботах, пов'язували із певними молекулярно-генетичними альтераціями, серед яких – високий рівень мікросателітної нестабільності, мутації гену *BRAF*, CIMP-фенотип пухлин. Окрім того, було встановлено, що втрата експресії Cdx-2 є більш властивою карциномам проксимальної товстої кишки порівняно із карциномами дистальної товстої кишки [141].

Резюме. За результатами аналізу сучасних літературних даних щодо поліпів-прекурсорів колоректального раку та молекулярно-генетичних основ прогресування карцином за умов кишкового канцерогенезу, виділено наступні моменти. Перш за все, на сьогодні ще відсутній системний аналіз основних імуногістохімічних параметрів прогресування кожного окремого гістологічного типу аденом і зубчастих новоутворень товстої кишки. Численні повідомлення щодо гетерогенності кожної з цих двох груп новоутворень вказують на необхідність проведення такого аналізу. По-друге, основні молекулярно-генетичні аномалії, що відображуються на імуногістохімічних параметрах, та складають основу формування і прогресування карцином, включаючи колоректальну аденокарциному, лишаються все ще до кінця не вивченими. Так, дані щодо проліферації та апоптозу клітин, дисбаланс яких є безумовною основою пухлинної прогресії, значно варіюють в різних варіантах передракових змін товстої кишки, а також в окремих варіантах карцином товстої кишки, що відрізняються за клініко-морфологічними параметрами. Дані щодо рівнів експресії головних імуногістохімічних показників неоангіогенезу VEGF-A і VEGFR-2 також

значно варіюють. Чіткість в розумінні цього питання є вкрай важливою, адже обидві молекули є мішенями антиангіогенної таргетної терапії в практичній онкології. Механізм функціонування VEGFR-1 за умов кишкового канцерогенезу лишається не вивченим, проте, також може бути перспективним з огляду на можливості його імплікації в клінічній практиці. Концепція ракових стовбурових клітин лише набирає розвитку, проте, безумовно є перспективною. Адже, згідно цієї концепції ракові стовбурові клітини є причиною як формування, так і прогресування карцином, включаючи колоректальну аденокарциному. А ідентифікація якісних та / або кількісних показників експресії маркерів стовбурових клітин в колоректальній аденокарциномі потенційно дає можливість оцінки її агресивності. Концепція епітеліально-мезенхімальної трансформації також активно досліджується в напрямку виділення чітких критеріїв стадійного прогресування колоректальної аденокарциноми, які ще й досі лишаються не встановленими. Концепція муцинового фенотипу також все ще містить до кінця не вирішені питання. Такі як чіткі уявлення щодо значимості MUC1 в реалізації інвазивних та метастатичних властивостей ракових клітин, можливість використання MUC2 в якості біомаркеру діагностики та прогнозування колоректальної аденокарциноми, чіткі механізми функціонування MUC4 і MUC5AC в прогресуванні колоректальної аденокарциноми, а також механізм функціонування онкосупресору Cdx-2 в прогресуванні колоректальної аденокарциноми все ще до кінця не вивчені.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали дослідження

Досліджено операційний матеріал КРА 120 хворих, біопсії аденом і зубчастих новоутворень ДТК 110 хворих, біопсії незміненої слизової оболонки (НСО) дистальної товстої кишки 20 пацієнтів, а також секційний матеріал НСО дистальної товстої кишки 10 померлих.

Весь матеріал для мікроскопічних, ІГХ і МФМ досліджень розподілено на 3 групи: I група – КРА 120 хворих віком 38-86 років; II група – аденоми і зубчасті новоутворення ДТК 110 хворих віком 35-72 років; III група умовного контролю – НСО 30 пацієнтів віком 22-35 років.

З метою вивчення ІГХ і МФМ особливостей КРА, перша група спостережень була розподілена на 4 підгрупи відповідно стадіям: 1 підгрупа – I стадія хвороби ($T_{1-2} N_0 M_0$), 24 випадки; 2 підгрупа – II стадія ($T_{3-4} N_0 M_0$), 32 випадки; 3 підгрупа – III стадія ($T_{1-4} N_{1-3} M_0$), 36 випадків; 4 підгрупа – IV стадія ($T_{1-4} N_{1-3} M_1$), 28 випадків. В цій групі вивчені також ІГХ і МГ 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.

З метою вивчення ІГХ і МФМ особливостей аденом і зубчастих новоутворень ДТК, друга група спостережень була розподілена на 2 підгрупи: 1 підгрупа – аденоми, 50 випадків; 2 підгрупа – зубчасті новоутворення, 60 випадків. Окрім того, в кожній з цих підгруп вивчалися особливості окремих різновидів поліпів: в 1 підгрупі було досліджено тубулярні (28 випадків), ворсинчасті (8 випадків) та тубуло-ворсинчасті аденоми (14 випадків); в 2 підгрупі – гіперпластичні поліпи (34 випадків), традиційні зубчасті аденоми (16 випадків) та зубчасті новоутворення на широкій основі (10 випадків). Додатково, в кожній із цих підгруп було

досліджено новоутворення із різним ступенем тяжкості дисплазії: в 1 підгрупі було досліджено low-grade і high-grade аденоми, в 2 підгрупі було досліджено low-grade і high-grade гіперпластичні поліпи і традиційні зубчасті аденоми, а також зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії та low-grade зубчасті утворення на широкій основі.

Дифференційно-діагностичні параметри новоутворень ДТК з high-grade дисплазією і високодиференційованої КРА вивчені в підгрупі high-grade аденом, high-grade зубчастих поліпів ДТК (48 випадків) і в підгрупі високодиференційованої G1 неметастатичної КРА (28 випадків).

Молекулярно-генетичні дослідження виконані методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на матеріалі 50 пацієнтів: 40 хворих на КРА (розподілені на підгрупи за стадіями хвороби, як було наведено вище, по 10 випадків в кожній досліджуваній методом ПЛР підгрупі) і 10 зразків секційного матеріалу НСО дистальної товстої кишки.

2.2 Методи дослідження

Для мікроскопічних, імуногістохімічних і морфометричних досліджень використано архівний матеріал: шматочки КРА, ПДТК, НСО, що були зафіксовані в 10 % забуференому формаліні та залиті в парафін. З парафінових блоків на прецезійному ротаційному мікротомі НМ 3600 («MICROM Laborgerate GmbH» – Німеччина) виготовляли серійні стандартні зрізи завтовшки 4 μm, які розміщали на звичайні предметні скельця для оглядового патогістологічного дослідження та на адгезивні предметні скельця «SUPER FROST PLUS» («DAKO», Данія) для проведення імуногістохімічних досліджень.

Гістологічні, імуногістохімічні та морфометричні методики дослідження. При мікроскопічному дослідженні зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозином, визначали: глибину інвазії пухлини та ступінь її гістологічного диференціювання, наявність метастазів у регіонарних

лімфатичних вузлах та віддалених метастазів; гістологічну будову поліпів, наявність дисплазії епітелію та її ступінь. З метою виявлення та оцінки функції слизоутворення епітеліоцитами було використано забарвлення ШИК-реакцією.

ІГХ дослідження виконували в парафінових зрізах з використанням моноклональних та поліклональних антитіл. Етапи депарафінізації, регідратації та високотемпературного демаскування антигенів проводили в РТ-модулі з використанням НІЕР буферу (рН=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 («ДАКО», США). Зрізи дозбарвлювали гематоксилином Майєра та заключали в канадський бальзам.

Оцінку результатів ІГХ-реакції проводили в мікроскопі Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Німеччина), при збільшенні x200, в кожному випадку аналізували 5 полів зору. Отримані результати документували у вигляді цифрових зображень за допомогою фотокамери Jenoptic («Carl Zeiss», Німеччина).

Проліферативну активність епітеліоцитів і стромальних клітин аденом і зубчастих новоутворень ДТК, а також ракових і стромальних клітин КРА визначали з використанням антитіл *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6* («ДАКО», Данія); наявність апоптозу зазначених клітин визначали з використанням антитіл *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP* («ThermoScientific», США) і *Mo a-Hu p53 Protein, Clone SP5* («ДАКО», Данія).

Для оцінки результатів ІГХ реакції з Ki-67 і p53 підраховували відсоток імунозбарвлених клітин: підрахунок проводився в програмі Adobe Photoshop CC інструментом «counter». Рівень експресії розцінювали як низький за наявності менш ніж 25% імунозбарвлених клітин в

стандартизованому полі зору, як середній – за наявності 25-75% імунозабарвлених клітин, та як високий – за наявності більш ніж 75% імунозабарвлених клітин в полі зору. Результати ІГХ дослідження *Ki-67* і *p53* були співставленні з результатами молекулярно-генетичного дослідження відносної нормалізованої експресії мРНК кодуючих генів *Ki-67*, *TP53*, а також відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS*.

Рівень експресії каспази-3 оцінювали методом фотоцифрової МФМ із використанням програми Image J, де визначали інтенсивність експресії маркеру і кількісно градуювали її в умовних одиницях оптичної щільності (УООЩ): негативна реакція – 0-20 УООЩ; низький рівень експресії – 21-50 УООЩ; помірний рівень експресії – 51-100 УООЩ; високий рівень експресії – більше 100 УООЩ.

З метою вивчення параметрів неоангіогенезу в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК, а також в КРА проведено ІГХ дослідження з використанням антитіл *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). Рівні експресії VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 визначали методом фотоцифрової МФМ в УООЩ та кількісно градуювали на 4 рівня (негативна реакція, низький, помірний або високий рівень експресії) за методикою, що була описана вище.

При дослідженні зрізів, забарвлених з використанням антитіл до CD34, проводили підрахунок кількості CD34-позитивних мікросудин в 5 стандартизованих полях зору мікроскопа (СПЗМ) за методом Босарі.

Значення стовбурових клітин в прогресії аденом і зубчастих новоутворень ДТК, а також КРА було досліджено з використанням антитіл *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). Результати ІГХ-реакцій з використанням маркерів CD44 і ALDH1A1 оцінювали з використанням фотоцифрової МФМ: в

кожному випадку оцінювали 5 стандартизованих полів зору мікроскопу при збільшенні $\times 200$ шляхом підрахунку кількості пікселів імунопозитивного цифрового зображення відповідного маркеру, а також загальної кількості пікселів. Кількість імунопозитивних пікселів фіксували в %, що відображав % площі імунозabarвлених клітин. Результати ІГХ-реакцій з використанням маркеру EpCAM оцінювали методом МФМ в УООЩ та кількісно градували на 4 рівня (негативна реакція, низький, помірний або високий рівень експресії) за методикою, що була описана вище.

Особливості функціонування молекул E-кадгерину і β -катеніну в КРА було досліджено з використанням антитіл *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone 43 EP 700 Y* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) та *Mo a Hu Beta-Catenin* («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). Рівні експресії досліджуваних маркерів визначали методом фотоцифрової МФМ в УООЩ та кількісно градували на 4 рівня (негативна реакція, низький, помірний або високий рівень експресії) за методикою, що була описана вище. Результати ІГХ дослідження E-кадгерина та β -катеніна були співставленні з результатами молекулярно-генетичного дослідження відносної нормалізованої експресії мРНК генів *CDH1* та *CTNNB1*.

Епітеліально-мезенхімальний перехід в КРА було досліджено з використанням антитіл *Mo a-Hu E-Cadherin, Clone 43 EP 700 Y* («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). Рівні експресії E-кадгерину, СК-20, віментину, α -SMA визначали методом фотоцифрової МФМ в УООЩ та кількісно градували на 4 рівня (негативна реакція, низький, помірний або високий рівень експресії) за методикою, що була описана вище.

Вивчення іммунофенотипу КРА та його значення в прогресії карциноми потребувало використання антитіл *Po Rb A-Hu MUC-1 (Epitope Specific Rabbit Antibody)* («Thermo Fisher Scientific Inc.», 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). Рівні експресії зазначених маркерів визначали методом фотоцифрової МФМ в УООЩ та кількісно градували на 4 рівня (негативна реакція, низький, помірний або високий рівень експресії) за методикою, яка була описана вище.

Методи молекулярно-генетичних досліджень. Молекулярно-генетичні дослідження проводили на матеріалі, фіксованому в 10 % забуференому формаліні та залитому в парафінові блоки. Для отримання тотальної РНК проводили попередню депарафінізацію тканини в ксилолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %). Підготовлені зразки гомогенізували за допомогою ступки і товкачика, поміщали в пробірки "Ахуген" (США) і проводили додаткову депарафінізацію і повторну регідратацію, згідно протоколу дослідження.

Виділення тотальної РНК з тканини проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («Ізоген Lab., LTD», Росія), який містить *Trizol reagent* (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідінтіоціанат та фенол с рН=4.0) та *Extra Gene E* (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли згідно з протоколом до набору. Виділену РНК негайно використовували для роботи або зберігали при температурі – 70 °С. Перед використанням центрифугували пробірки з РНК протягом 1 хвилини при 14000 об/хв.

Для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 («Синтол», Росія). Реакційна суміш загальним обсягом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої Н₂О, очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотну транскрипцію проводили при 45 °С впродовж 45 хвилин з наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хв. при 92 °С. Для визначення рівня експресії

досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів для проведення ПЛР-РЧ в присутності SYBR Green R-402 («Синтол», Росія).

Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімеразау SynTaq з антитілами, що подавляли активність ферменту, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, dNTP- дезоксинуклеозидтрифосфати, 1 45 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального обсягу 25 мкл додаванням деіонізованої H₂O. Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референтного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмою «Thermo Scientific» у США (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Специфічні пари праймерів, що були використані для аналізу досліджуваних і референтного генів

Ген	Праймер	Tm,0C	Product length (bp)	Exon junction
Catenin beta 1 (CTNNB1)	F = CCTGTTCCCCTGAGGGTATT R = CCATTGTCCACGCTGGATTT	58.4 58.82	66	220/ 221
E-cadherin, (CDH1)	F = CAGTACAACGACCCAACCCA R = ACCCACCTCTAAGGCCATCT	59.89 59.96	63	2060/ 2061
<i>K-RAS</i>	F = AAGACAGAGAGTGGAGGATGC R = TGTCGGATCTCCCTCACCAA	59.17 60.25	51	642/ 643
<i>Ki-67</i>	F = GTGGTTCGACAAGTGGCCTT R = ACAACTCTTCCACTGGGACG	60.82 59.61	51	106/107
<i>TP53</i>	F = CTGGATTGGCAGCCAGACT R = CTCCTCCATGGCAGTGACC	59.70	46	174/175
Actin, beta (Actb)	F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	61.30 61.15	59	78/79

Після початкової денатурації протягом 10 хвилин при 95 °С ампліфікація складалася з 45-50 циклів та проводилася за таких умов: денатурація – 95 °С, 15 секунд, віджиг – 59-61 °С, 30-60 секунд, елонгація – 72 °С, 30 секунд. В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген Actin, beta (Actb). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta Ct$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ («Bio-Rad», США). В експеримент були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторах.

Статистична обробка результатів дослідження. Статистичну обробку отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері в програмі «STATISTICA® for Windows 13.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J). Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли з використанням критерію Шапіро-Уїлка. Обчислювали медіану, нижній та верхній квантилі, дані представляли у вигляді $Me (Q_1; Q_3)$.

Порівняння отриманих даних у 2 групах проводили за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні для незалежних вибірок та непараметричного T-критерію Вілкоксона для залежних вибірок. Для порівняння даних в 3 і більше групах спостереження використовувався непараметричний однофакторний дисперсійний аналіз Краскела-Уоліса. Значимість різниці між частотою позитивної ІГХ-реакції в групах дослідження, а також між частотою підвищення відносної нормалізованої експресії мРНК в групах дослідження перевіряли за допомогою критерію χ^2 .

Також проводили кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r) для оцінки зв'язків між досліджуваними ознаками. Значення коефіцієнта від 0,1 до 0,29 свідчить про слабкий зв'язок ознак,

значення коефіцієнта від 0,3 до 0,69 підтверджує середній ступінь зв'язку ознак, значення коефіцієнта від 0,7 і вище свідчить про наявність сильного зв'язку між досліджуваними ознаками.

Для всіх видів аналізу відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ГІСТОЛОГІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АДЕНОМ І ЗУБЧАСТИХ НОВОУТВОРЕНЬ ДИСТАЛЬНОЇ ТОВСТОЇ КИШКИ

Серед так званих поліпів дистальної товстої кишки досліджені звичайні колоректальні аденоми (тубулярні, ворсинчасті та тубуло-ворсинчасті аденоми), а також зубчасті новоутворення (гіперпластичні поліпи, традиційні зубчасті аденоми та зубчасті утворення на широкій основі), які були виділені в 2019 році в класифікації ВООЗ пухлин органів травлення (5-го перегляду).

3.1 Гістологічні особливості аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки

При мікроскопічному дослідженні аденом дистальної товстої кишки встановлено, що вони сформовані численними кишковими криптами різних форм та розмірів, що оточені пухкою сполучною тканиною. Тубулярні аденоми характеризуються типовою архітектонікою: переважанням в новоутворенні крипт округлої чи овальної форми, вистелених диспластичним епітелієм, а також сполучнотканинних ворсин на поверхні аденоми, вкритих диспластичним епітелієм, які складають менше 20% площі зрізу новоутворення (рис. 3.1). Ворсинчасті аденоми відрізняються переважанням стрижневих структур сполучної тканини, вкритих диспластичним епітелієм, які складають більш ніж 75 % від загальної площі зрізу (рис. 3.2), а також наявністю нечисленних овально-тубулярних крипт в базальній частині новоутворення. Тубуло-ворсинчасті аденоми мають змішаний патерн архітектоніки: присутні як тубулярні структури, так і ворсинчасті структури, при цьому останні складають 20-25 % від загальної площі зрізу новоутворення. Виразність диспластичних змін в класичних аденомах варіює від низького до високого ступеня.

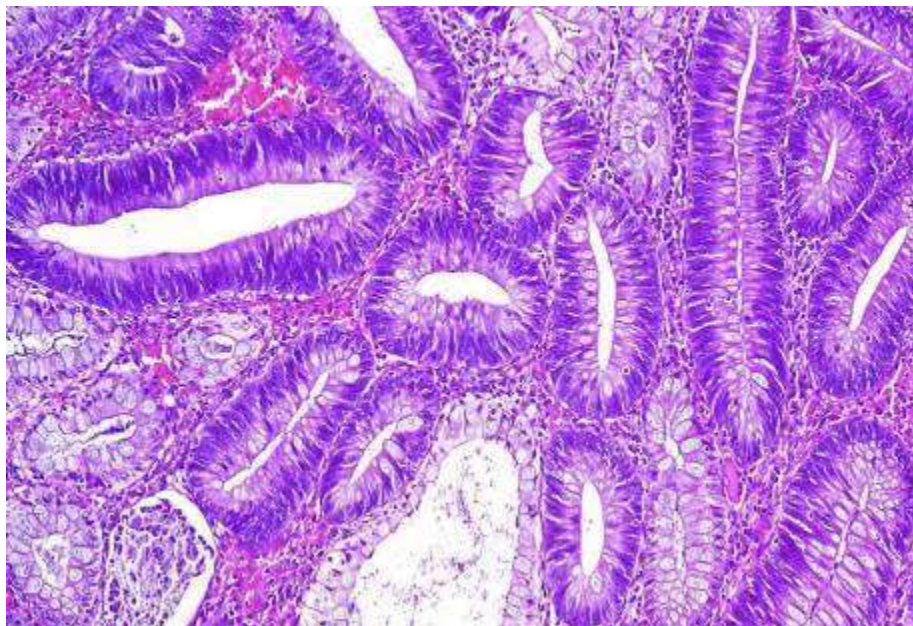


Рисунок 3.1 – Тубулярна аденома: переважання крипт округлої чи овальної форми, вистелених диспластичним епітелієм. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.

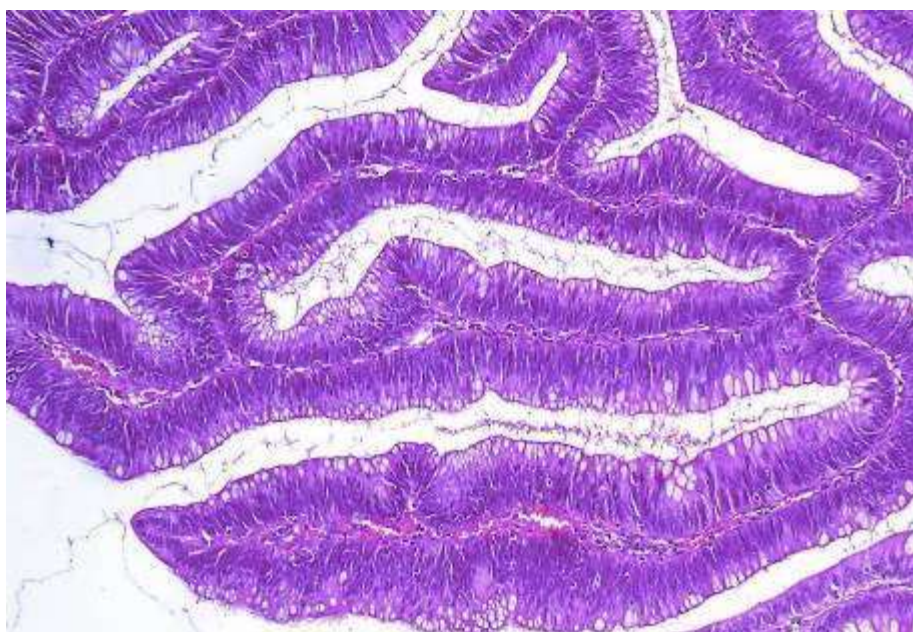


Рисунок 3.2 – Ворсинчаста аденома: переважання видовжених крипт та стрижневих структур сполучної тканини, вкритих диспластичним епітелієм. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.

50 % досліджених аденом мали дисплазію епітелію низького ступеня (далі – low-grade дисплазія), що характеризується частковою втратою

базальної орієнтації подовжених ядер, які не сягають апікальної поверхні клітин; гіперхромністю ядерного хроматину; наявністю помітних ядерців і нечисленних мітозів, а також збереженням муцинового шару на поверхні клітин (рис. 3.3). Інші 50% аденом мали дисплазію епітелію високого ступеня (далі – high-grade дисплазія), що відрізняється наявністю в епітелії значно подовжених, гіперхромних ядер з виразною втратою їх базальної орієнтації; численних мітозів; архітектонікою залоз «спинка до спинки» та формуванням ними крибриформних структур (рис. 3.4).

При мікроскопічному дослідженні зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки встановлено, що вони сформовані криптами, які мають виразний в різній мірі «зубчастий» вид епітеліального шару. Відмінною рисою гіперпластичних поліпів є наявність значно подовжених кишкових крипти, які мають «зубчастий» вид епітелію виключно в апікальній частині крипти (рис. 3.5). Зубчасті аденоми відрізняються наявністю епітелію «зубчастої» структури по всій довжині крипти. При цьому традиційні зубчасті аденоми характеризуються помірно-виразною ворсинчастою архітектонікою, що поєднується із «зубчастістю» епітелію (рис. 3.6). Особливістю зубчастих новоутворень на широкій основі є наявність множинних архітектурно спотворених зубчастих крипти з виразною базальною дилатацією крипти, з їх латеральним горизонтальним ростом вздовж м'язової пластинки слизової оболонки.

13 % досліджених зубчастих новоутворень, представлені виключно зубчастими утвореннями на широкій основі, характеризувались відсутністю диспластичних змін епітелію. 50 % досліджених зубчастих новоутворень (представлені традиційними зубчастими аденомами, гіперпластичними поліпами, а також зубчастими утвореннями на широкій основі) характеризувались наявністю low-grade дисплазії епітелію, особливості якої все було наведено вище. 37 % досліджених зубчастих новоутворень (представлені традиційними зубчастими аденомами і гіперпластичними

поліпами) характеризувались наявністю high-grade дисплазії епітелію, особливості якої також було наведено вище.

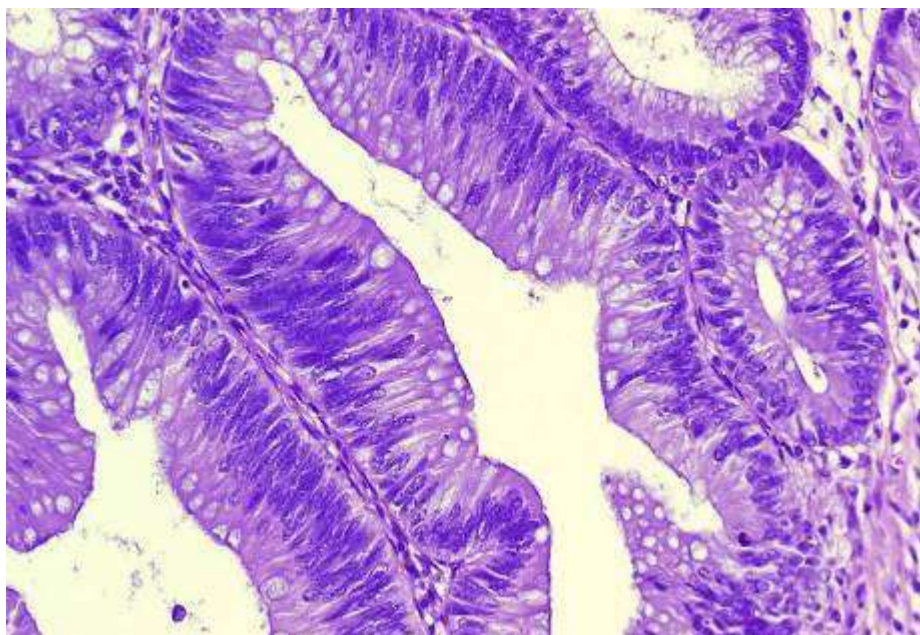


Рисунок 3.3 – Low-grade дисплазія в тубулярній аденомі: помітне подовження ядер та часткова втрата базальної орієнтації окремими ядрами, помітні ядерця. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 200$.

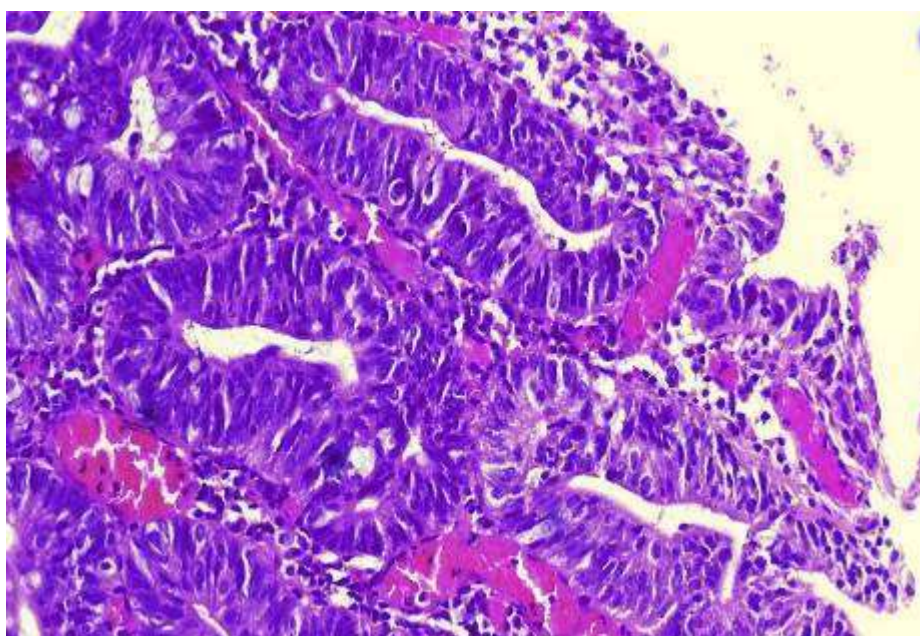


Рисунок 3.4 – High-grade дисплазія в тубулярній аденомі: помітні значно подовжені, гіперхромні ядра з повною втратою їх базальної орієнтації. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. $\times 200$.

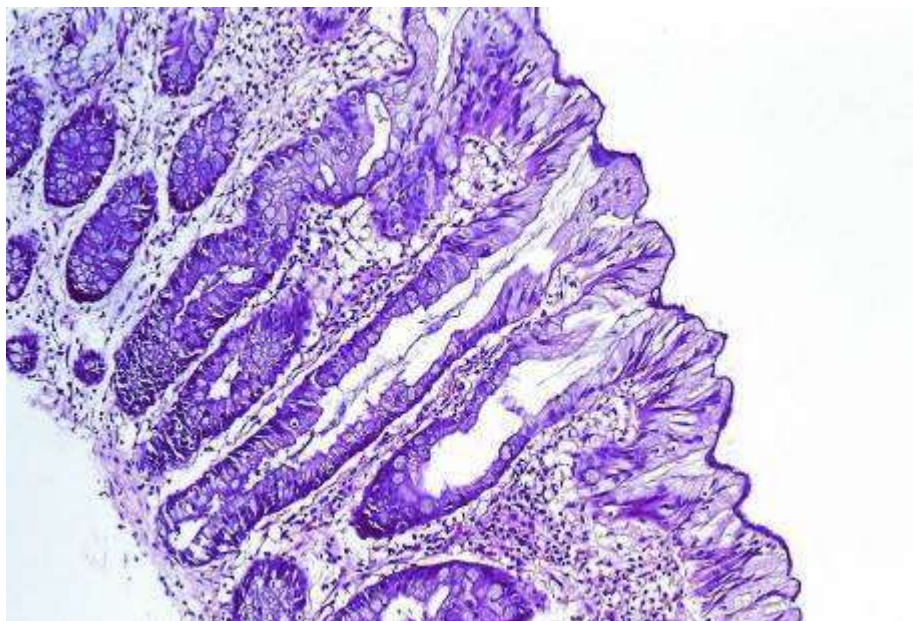


Рисунок 3.5 – Гіперпластичний поліп: подовжені кишкові крипти та характерна «зубчастість» в поверхневих відділах. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.

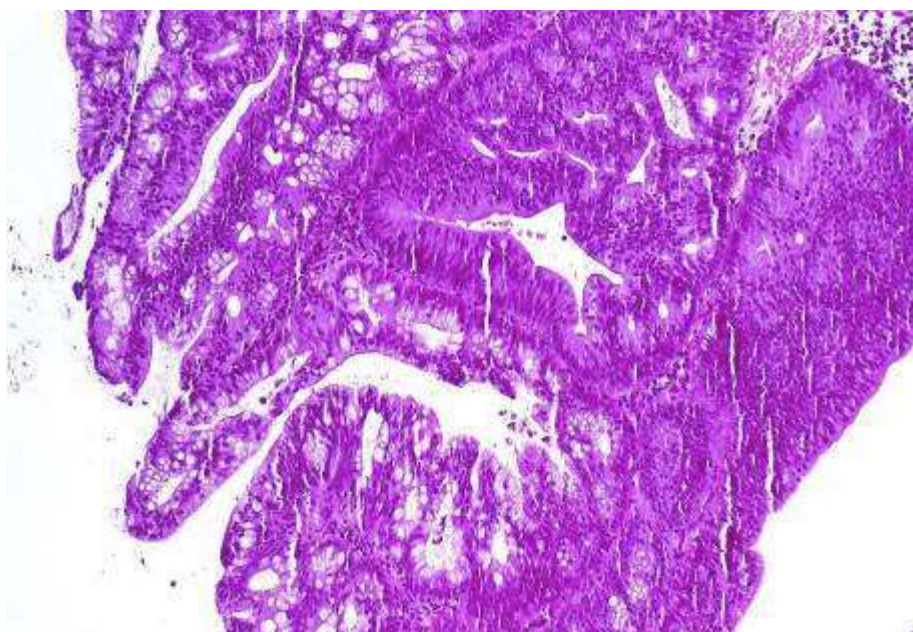


Рисунок 3.6 – Традиційна зубчаста аденома: наявність стрижневих структур сполучної тканини (ворсинчаста архітектоніка), вкритих диспластичним епітелієм, в поєднанні із «зубчастістю» епітелію. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 100$.

Таким чином було вивчено основні мікроскопічні характеристики аденом і зубчастих новоутворень ДТК.

3.2 Імуногістохімічна характеристика проліферативно-апоптотичних властивостей аденом і зубчастих утворень дистальної товстої кишки

Проліферативні властивості аденом і зубчастих новоутворень ДТК досліджені за рівнем ІГХ експресії Ki-67 в ядрах епітеліоцитів та клітин строми цих новоутворень. Встановлено, що ПДТК характеризуються середнім рівнем проліферативної активності епітеліальних і стромальних клітин: медіана ядерної експресії Ki-67 в аденомах становила 65,39 (48,65 ; 76,23) %, медіана ядерної експресії Ki-67 в зубчастих поліпах становила 38,33 (25,27 ; 45,39) %.

Рівень клітинної проліферації також був оцінений окремо для кожного гістологічного субтипу аденом і зубчастих утворень ДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Встановлено, що low-grade тубулярні аденоми характеризуються медіаною експресії Ki-67, що дорівнює 49,19 (43,08 ; 65,39) %, в той час як high-grade тубулярні аденоми характеризуються медіаною експресії маркера, що дорівнює 73,85 (72,15 ; 85,36) %. Low-grade тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії Ki-67, що дорівнює 48,48 (42,16 ; 52,13) %, а high-grade тубуло-ворсинчасті аденоми – медіаною експресії маркера, що дорівнює 76,23 (52,28 ; 76,23) %. Low-grade ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії Ki-67, що дорівнює 65,15 (62,44 ; 70,22) %, high-grade ворсинчасті аденоми – медіаною експресії маркера, що дорівнює 78,96 (75,81 ; 82,37) %. Low-grade традиційні зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи характеризуються медіанами експресії Ki-67, що дорівнюють 40,22 (36,14 ; 45,39) % і 38,52 (30,98 ; 41,15) %, відповідно, аналогічні high-grade поліпи – 68,96 (59,52 ; 70,25) % і 50,03 (45,25 ; 55,15) %. Також було проаналізовано показники експресії Ki-67 в зубчастих утвореннях на широкій основі, про що буде сказано дещо пізніше.

Отримані дані, з урахуванням результатів порівняльного аналізу, систематизовано в таблицях 3.1 і 3.2.

Таблиця 3.1 – Показники експресії Ki-67 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення p
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	49,19 (43,08 ; 65,39) %	73,85 (72,15 ; 85,36) %	p < 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми	48,48 (42,16 ; 52,13) %	76,23 (52,28 ; 76,23) %	p < 0,05
ворсинчасті аденоми	65,15 (62,44 ; 70,22) %	78,96 (75,81 ; 82,37) %	p > 0,05
традиційні зубчасті аденоми	40,22 (36,14 ; 45,39) %	68,96 (59,52 ; 70,25) %	p < 0,05
гіперпластичні поліпи	38,52 (30,98; 41,15) %	50,03 (45,25 ; 55,15) %	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Таблиця 3.2 – Показники експресії Ki-67 в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення p
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії Ki-67	22,20 (22,19 ; 25,27) %	39,14 (38,15;40,25) %	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Встановлено, що high-grade тубулярні аденоми відрізняє статистично значущо на 33,40 % вищий рівень проліферації, в порівнянні з low-grade тубулярними аденомами (p < 0,05; рис. 3.7, рис. 3.8, рис. 3.9). High-grade тубуло-ворсинчасті аденоми також відрізняє статистично значущо на 36,41 % вищий рівень проліферації, в порівнянні з low-grade тубуло-ворсинчастими аденомами (p < 0,05; рис. 3.7). Показник проліферації в ворсинчастих

аденомах статистично значущо не відрізняється за умов low-grade і high-grade дисплазії ($p > 0,05$; рис. 3.7).

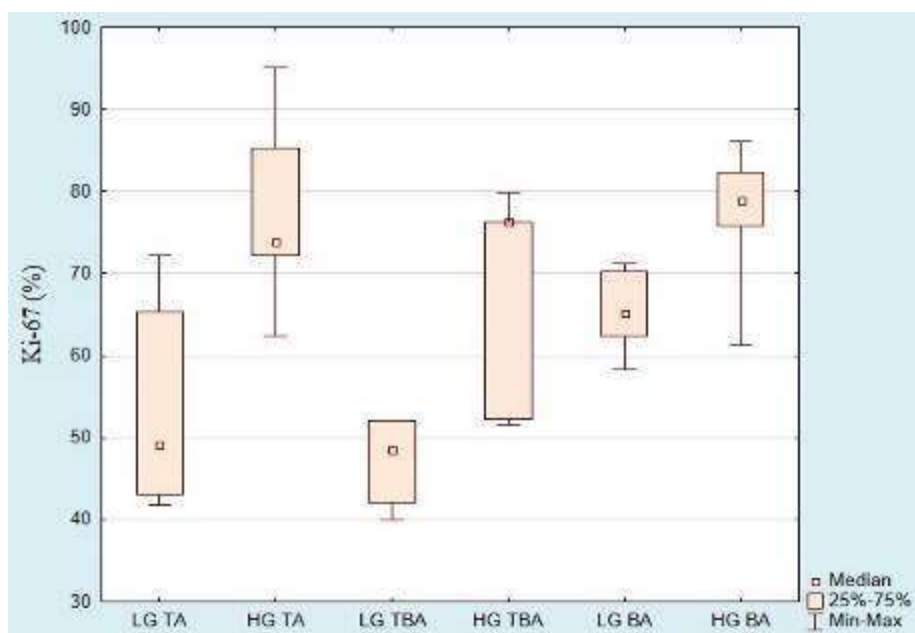


Рисунок 3.7 – Порівняльний аналіз показників експресії Ki-67 в low-grade і high-grade тубулярних аденомах (LG TA і HG TA), тубуло-ворсинчастих (LG TBA і HG TBA) і ворсинчастих аденомах (LG BA і HG BA).

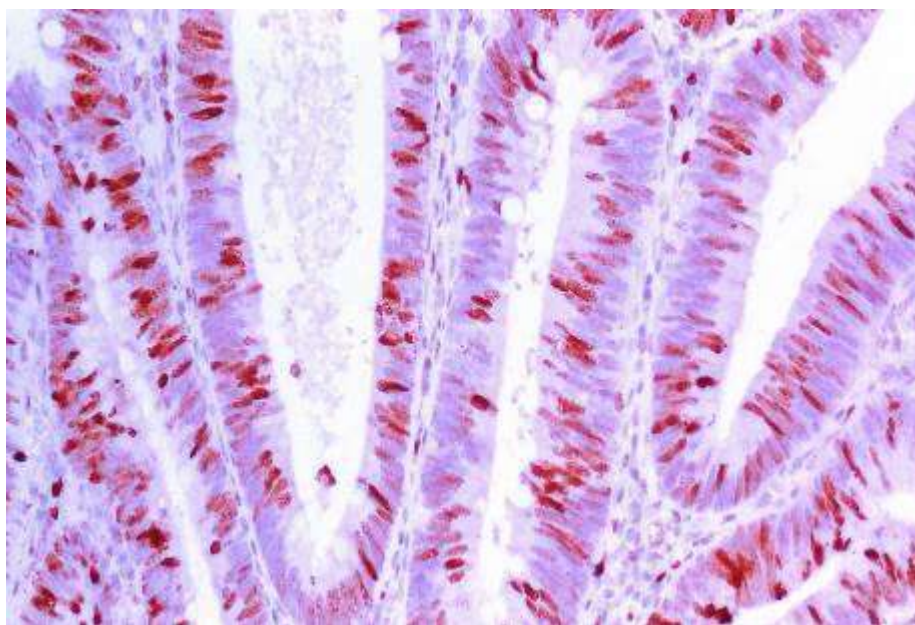


Рисунок 3.8 – Середній рівень ядерної експресії Ki-67 в тубулярній аденомі з low-grade дисплазією епітелію. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6*. 36. × 200.

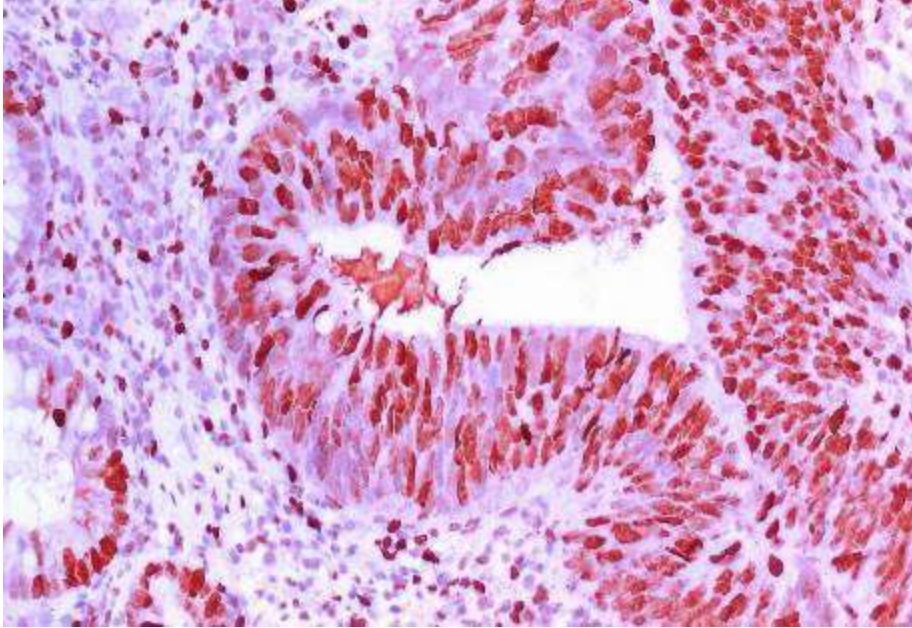


Рисунок 3.9 – Високий рівень ядерної експресії Ki-67 в локусі high-grade дисплазії тубулярної аденоми. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6*. 36. × 200.

Порівняльний аналіз даних, отриманих для традиційних зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів, вказує на те, що high-grade традиційні зубчасті аденоми відрізняє статистично значущо на 41,68 % вищий рівень клітинної проліферації, в порівнянні з low-grade традиційними зубчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.10). High-grade гіперпластичні поліпи відрізняє статистично значущо на 23,01 % вищий рівень клітинної проліферації, в порівнянні з low-grade гіперпластичними поліпами ($p < 0,05$; рис. 3.10).

Також було проаналізовано показники клітинної проліферації в зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії і в low-grade зубчастих утвореннях на широкій основі (див. табл. 3.2). Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії характеризуються медіаною експресії Ki-67, що дорівнює 22,20 (22,19 ; 25,27) %, в той час як low-grade зубчасті утворення на широкій основі – 39,14 (38,15;40,25) %. Таким чином, low-grade зубчасті утворення на широкій основі відрізняє статистично значущо на 43,29 %

вищий рівень проліферації, в порівнянні з зубчастими утвореннями на широкій основі без дисплазії ($p < 0,05$; рис. 3.10).

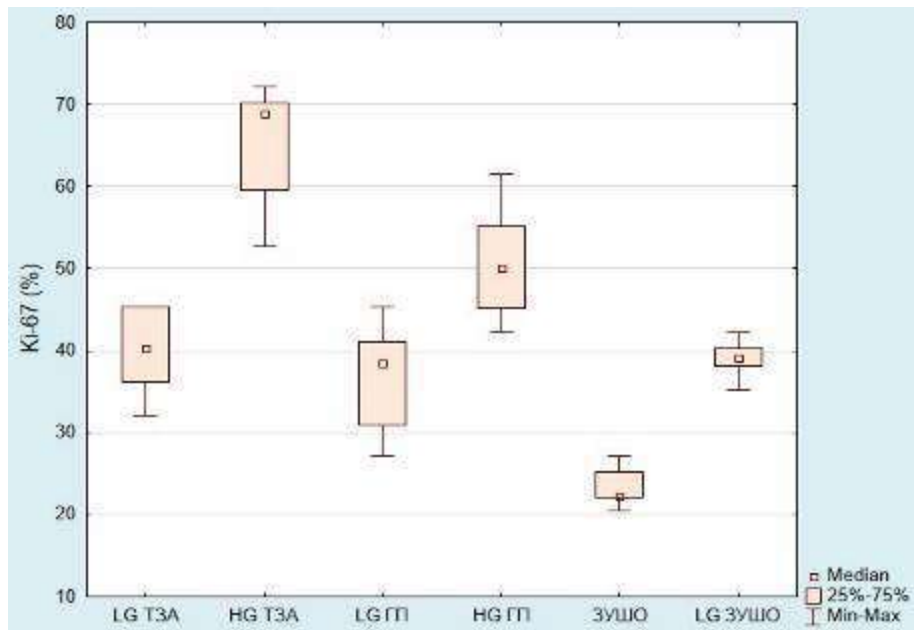


Рисунок 3.10 – Порівняльний аналіз показників експресії Ki-67 в low-grade і high-grade традиційних зубчастих аденомах (LG T3A і HG T3A), гіперпластичних поліпах (LG ГП і HG ГП), а також зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії (ЗУШО) і з low-grade дисплазією (LG ЗУШО).

Окрім того, помітними є певні тенденції розподілу Ki-67-імунопозитивних (ІМПЗ) клітин в досліджуваних поліпах. Так, всі досліджені субтипи аденом, включаючи зубчасті аденоми, характеризуються рівномірним розподілом Ki-67-ІМПЗ клітин по всій довжині кишкових крипт. Зубчасті новоутворення на широкій основі, навпроти, характеризуються наявністю Ki-67-ІМПЗ клітин переважно в нижній та середній третині кишкових крипт. Ця тенденція зберігається і в зубчастих утвореннях на широкій основі з вогнищевою low-grade дисплазією, що спостерігається поверхневих відділах. Гіперпластичні поліпи також характеризуються розподілом Ki-67-ІМПЗ клітин переважно в нижній та середній третині кишкових крипт (рис. 3.11), проте в 36 % випадків гіперпластичних поліпів з low-grade дисплазією і в 100 % випадків

гіперпластичних поліпів з high-grade дисплазією має місце рівномірний розподіл Ki-67-ІМПЗ клітин по всій довжині кишкових крипт (рис. 3.12).

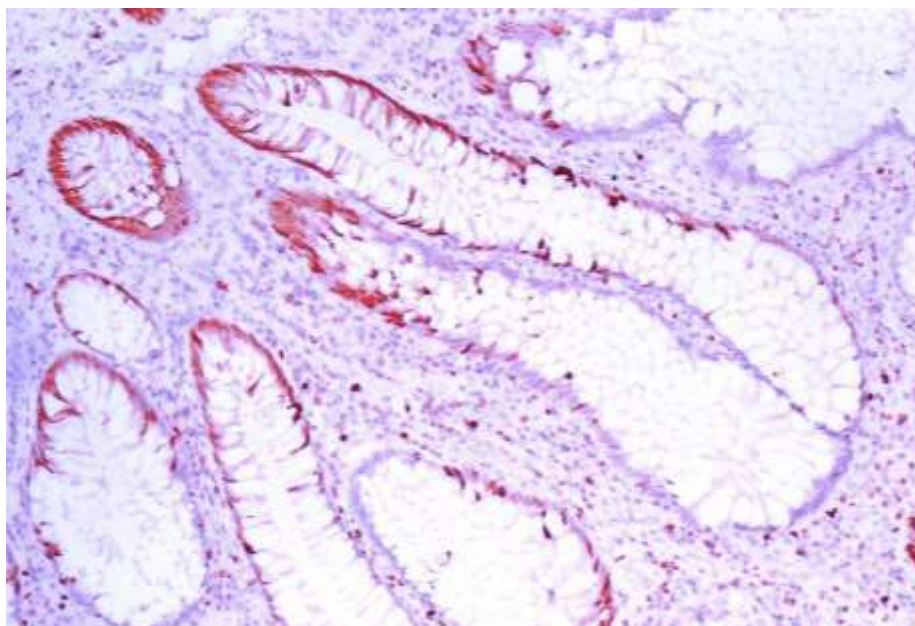


Рисунок 3.11 – Локація Ki-67-імунопозитивних клітин в нижній на середній третині кишкових крипт в гіперпластичному поліпі. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6. 36. × 100.*

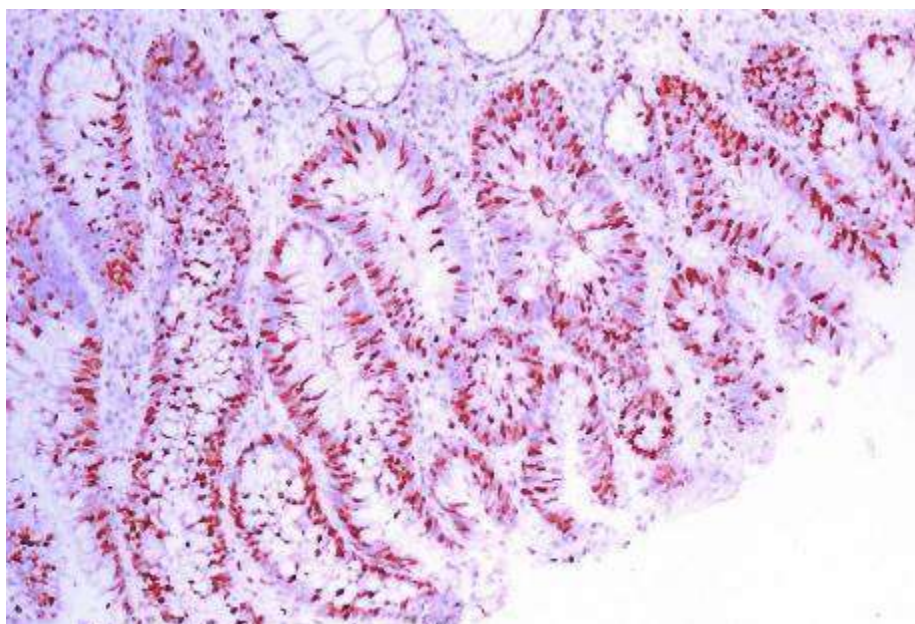


Рисунок 3.12 – Дифузний розподіл Ki-67-імунопозитивних клітин (по всій довжині кишкових крипт) в гіперпластичному поліпі з вогнищами low-grade дисплазії в поверхневих відділах. *Mo a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6. 36. × 100.*

Апоптотичні властивості аденом і зубчастих новоутворень ДТК досліджені шляхом оцінки ІГХ-реакцій з антитілами до p53 і каспази-3. В аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК ядерна експресія p53 визначається переважно в епітеліоцитах, а також в поодиноких клітинах строми; цитоплазматична експресія каспази-3 також виявляється переважно в цитоплазмі епітеліоцитів та в одиничних клітинах строми, тобто апоптотична активність в цих новоутвореннях стосується насамперед епітеліальних клітин.

Встановлено, що аденоми і зубчасті новоутворення ДТК характеризуються низьким та середнім рівнем накопичення онкопротеїну p53: медіана ядерної експресії p53 в епітелії аденом становила 31,64 (25,15 ; 48,91) %, медіана ядерної експресії p53 в епітелії зубчастих новоутворень дорівнювала 19,18 (1,85 ; 30,42) %.

Рівень накопичення онкопротеїну p53 також був оцінений окремо для кожного гістологічного варіанту ПДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Отримані дані, з урахуванням результату порівняльного аналізу, наведені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Показники експресії p53 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення p
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	22,70 (15,26 ; 30,42) %	44,47 (30,45 ; 52,34) %	p < 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми	25,75 (15,25 ; 30,14) %	38,63 (30,22 ; 52,54) %	p < 0,05
ворсинчасті аденоми	31,45 (25,15 ; 35,94) %	53,20 (49,13 ; 60,38) %	p < 0,05
традиційні зубчасті аденоми	25,36 (18,21 ; 25,38) %	40,67 (31,16 ; 45,36) %	p < 0,05
гіперпластичні поліпи	2,86 (1,25 ; 5,49) %	27,52 (20,15 ; 30,41) %	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Показано, що low-grade тубулярні аденоми характеризуються медіаною експресії p53, що дорівнює 22,70 (15,26 ; 30,42) %, а high-grade тубулярні аденоми – 44,47 (30,45 ; 52,34) %. Low-grade тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії p53, що дорівнює 25,75 (15,25 ; 30,14) %, а high-grade тубуло-ворсинчасті аденоми – 38,63 (30,22 ; 52,54) %. Low-grade ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії p53, що дорівнює 31,45 (25,15 ; 35,94) %, а high-grade ворсинчасті аденоми – 53,20 (49,13 ; 60,38) %.

Таким чином, встановлено, що high-grade тубулярні аденоми відрізняє на 48,96 % вищий рівень експресії p53, в порівнянні з low-grade тубулярними аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.13, рис. 3.14, рис. 3.15). High-grade тубуло-ворсинчасті аденоми відрізняє на 33,35 % вищий рівень експресії p53, в порівнянні з low-grade тубуло-ворсинчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.13). High-grade ворсинчасті аденоми відрізняє на 40,89 % вищий рівень експресії p53, в порівнянні з low-grade ворсинчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.13).

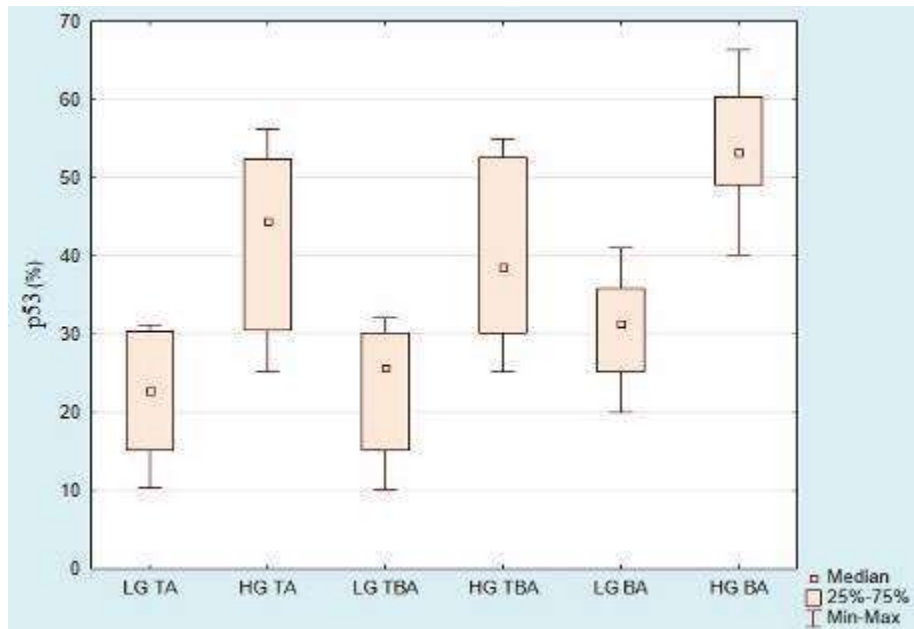


Рисунок 3.13 – Порівняльний аналіз показників експресії p53 в low-grade і high-grade тубулярних аденомах (LG TA і HG TA), тубуло-ворсинчастих (LG TBA і HG TBA) і ворсинчастих аденомах (LG BA і HG BA).

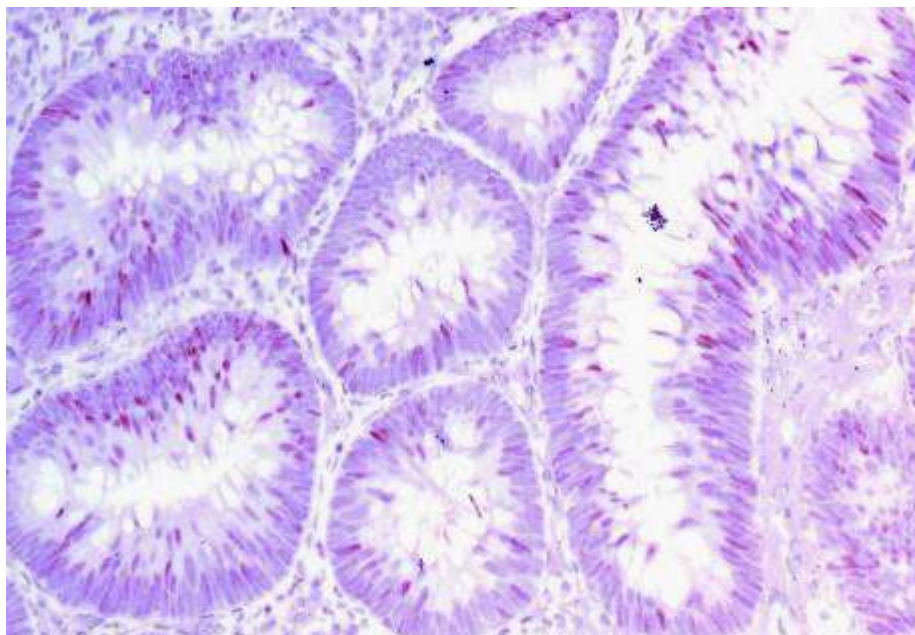


Рисунок 3.14 – Низький рівень ядерної експресії p53 в тубулярній аденомі з low-grade дисплазією епітелію. *Mo a-Hu p53 Protein, Clone SP5*. 36. ×200.

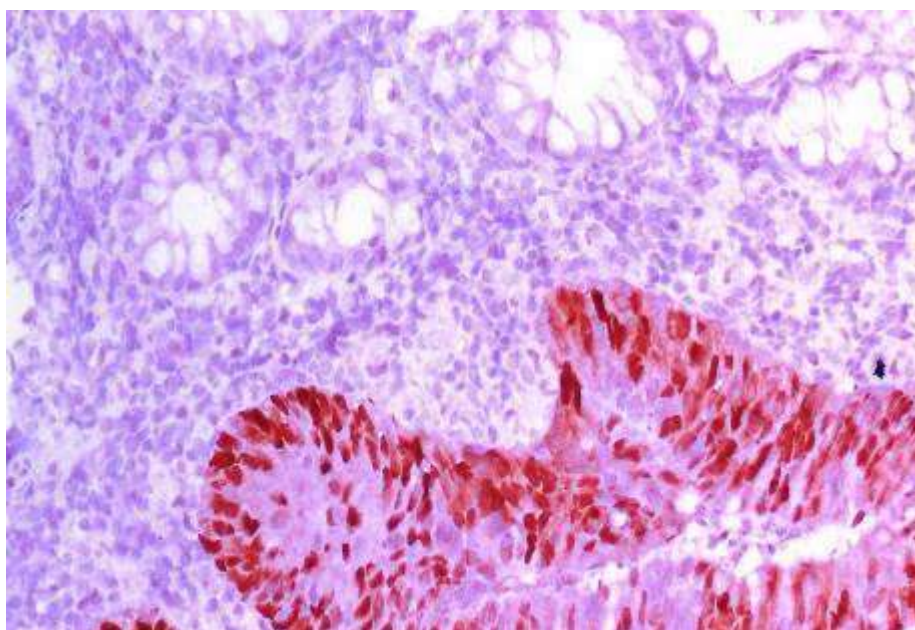


Рисунок 3.15 – Високий рівень експресії p53 в локусі high-grade дисплазії епітелію тубулярної аденоми. *Mo a-Hu p53 Protein, Clone SP5*. 36. ×200.

Відносно зубчастих поліпів отримано наступні дані. Low-grade традиційні зубчасті аденоми характеризуються медіаною експресії p53, що

дорівнює 25,36 (18,21 ; 25,38) %, а high-grade традиційні зубчасті аденоми характеризуються медіаною експресії p53, що дорівнює 40,67 (31,16 ; 45,36) %. Low-grade гіперпластичні поліпи характеризуються медіаною експресії p53, що дорівнює 2,86 (1,25 ; 5,49) %, а high-grade гіперпластичні поліпи характеризуються медіаною експресії p53, що дорівнює 27,52 (20,15 ; 30,41) % (див. табл. 3.3).

Таким чином, встановлено, що high-grade традиційні зубчасті аденоми відрізняє на 37,65 % вищий рівень експресії p53, в порівнянні з low-grade традиційними зубчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.16). High-grade гіперпластичні поліпи відрізняє на 89,61 % вищий рівень експресії p53, в порівнянні з low-grade гіперпластичними поліпами ($p < 0,05$; рис. 3.16).

Зубчасті новоутворення на широкій основі характеризувались вкрай низькими показниками ядерної експресії онкопротеїну p53, що коливались в діапазоні 0-1 %, тож були розцінені як p53-імунонегативні випадки.

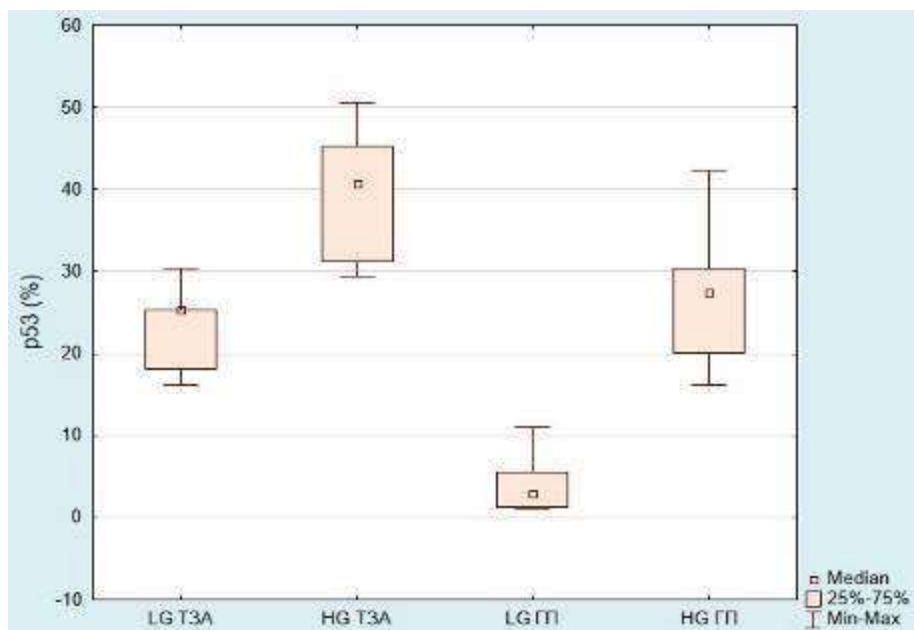


Рисунок 3.16 – Порівняльний аналіз показників експресії p53 low-grade і high-grade традиційних зубчастих аденомах (LG T3A і HG T3A), гіперпластичних поліпах (LG ПП і HG ПП).

Встановлено, що аденоми і зубчасті утворення ДТК характеризуються низьким рівнем апоптозу, що був оцінений за рівнем ІГХ експресії каспази-3:

медіана експресії каспази-3 в аденомах становила 36,84 (20,38 ; 42,34) УООЩ, в зубчастих новоутвореннях – 25,14 (16,48 ; 36,54) УООЩ. Рівень апоптозу також був оцінений окремо для кожного гістологічного варіанту досліджених утворень з урахуванням ступеня дисплазії (табл. 3.4, табл. 3.5).

Таблиця 3.4 – Показники експресії каспази-3 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення p
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	20,38 (18,08 ; 26,52) УООЩ	41,25 (35,69 ; 55,03) УООЩ	p < 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми	20,74 (15,20 ; 32,15) УООЩ	41,03 (37,01 ; 48,89) УООЩ	p < 0,05
ворсинчасті аденоми	22,36 (21,17 ; 41,25) УООЩ	63,26 (50,24 ; 71,29) УООЩ	p < 0,05
традиційні зубчасті аденоми	20,85 (18,52 ; 26,52) УООЩ	46,32 (32,15 ; 55,26) УООЩ	p < 0,05
гіперпластичні поліпи	21,74 (11,97 ; 28,15) УООЩ	34,89 (25,14 ; 40,25) УООЩ	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Таблиця 3.5 – Показники експресії каспази-3 в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення p
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії каспази-3	12,24 (11,48 ; 16,48) УООЩ	38,82 (30,64 ; 39,85) УООЩ	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Показано, що low-grade класичні аденоми характеризуються медіанами експресії каспази-3, що дорівнюють 20,38 (18,08 ; 26,52), 20,74 (15,20 ; 32,15),

22,36 (21,17 ; 41,25) УООЩ, а high-grade класичні аденоми характеризуються медіанами експресії каспази-3, що дорівнюють 41,25 (35,69 ; 55,03), 41,03 (37,01 ; 48,89), 63,26 (50,24 ; 71,29) (для тубулярних, тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих аденом, відповідно). Low-grade зубчасті поліпи характеризуються медіанами експресії каспази-3, що дорівнюють 20,85 (18,52 ; 26,52), 21,74 (11,97 ; 28,15) УООЩ, а high-grade зубчасті поліпи характеризуються медіанами експресії каспази-3, що дорівнюють 46,32 (32,15 ; 55,26), 34,89 (25,14 ; 40,25) УООЩ (для зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів, відповідно). Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії характеризуються медіаною експресії каспази-3, що дорівнює 12,24 (11,48 ; 28,15) УООЩ, а аналогічні low-grade утворення – 38,82 (30,64 ; 39,85) УООЩ.

Таким чином, high-grade тубулярні аденоми відрізняє статистично значущо на 50,60 % вищий рівень експресії каспази-3, в порівнянні з low-grade тубулярними аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.17, рис. 3.18, рис. 3.19).

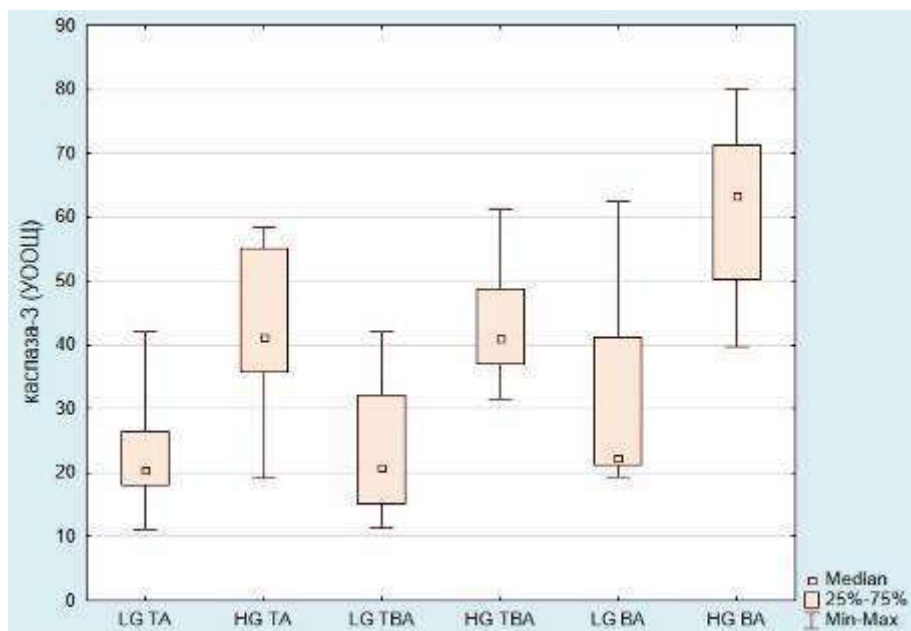


Рисунок 3.17 – Порівняльний аналіз показників експресії каспази-3 в low-grade і high-grade тубулярних аденомах (LG TA і HG TA), тубуло-ворсинчастих (LG TBA і HG TBA) і ворсинчастих аденомах (LG BA і HG BA).

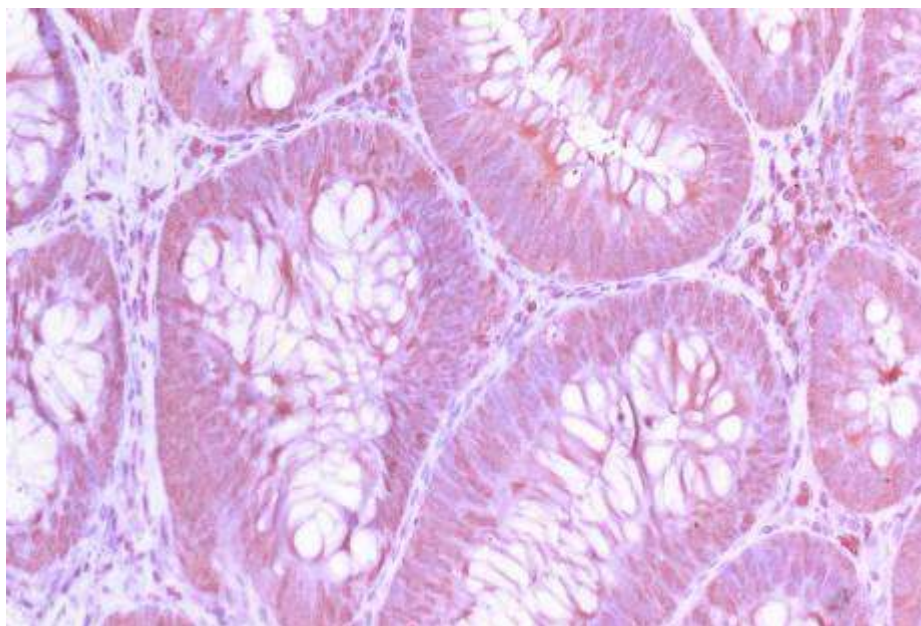


Рисунок 3.18 – Низький рівень ядерно-цитоплазматичної експресії каспази-3 в тубулярній аденомі з low-grade дисплазією епітелію. *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP*. Зб. $\times 200$.

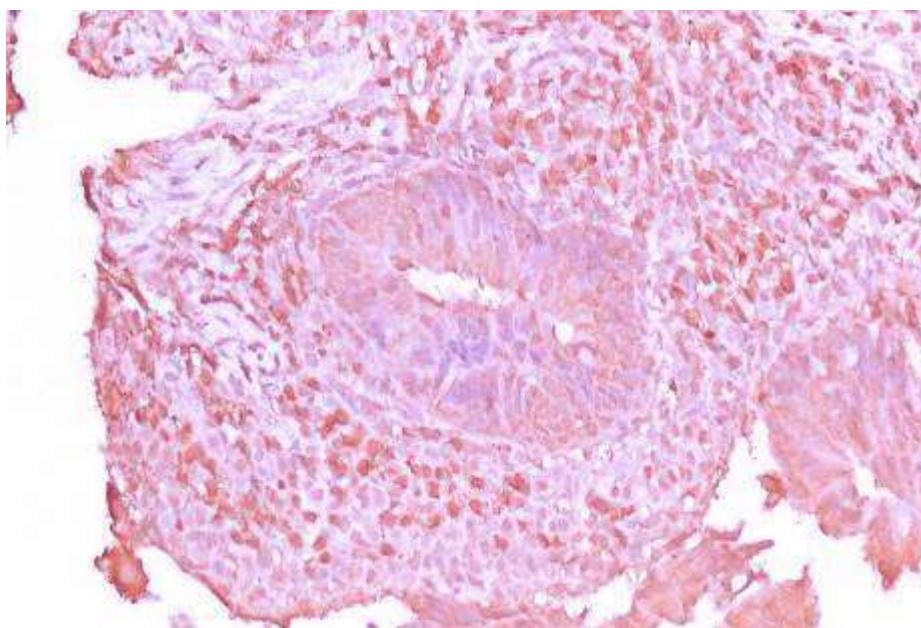


Рисунок 3.19 – Середній рівень ядерно-цитоплазматичної експресії каспази-3 в тубулярній аденомі з high-grade дисплазією епітелію. *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP*. Зб. $\times 200$.

High-grade тубуло-ворсинчасті аденоми відрізняє статистично значущо на 49,46 % вищий рівень експресії каспази-3, в порівнянні з low-grade тубуло-ворсинчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.17). High-grade ворсинчасті

аденоми відрізняє статистично значущо на 64,66 % вищий рівень експресії каспази-3, в порівнянні з low-grade ворсинчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.17).

Результати порівняльного аналізу даних, отриманих для зубчатих новоутворень ДТК, вказують на те, що high-grade традиційні зубчасті аденоми відрізняє на 54,99 % вищий рівень експресії каспази-3 в порівнянні з low-grade зубчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.20). High-grade гіперпластичні поліпи відрізняє на 37,69 % вищий рівень експресії каспази-3 в порівнянні з low-grade поліпами ($p < 0,05$; рис. 3.20). Low-grade зубчасті утворення на широкій основі відрізняє на 68,47 % вищий рівень апоптозу, в порівнянні з аналогічними утвореннями без дисплазії ($p < 0,05$; рис. 3.20).

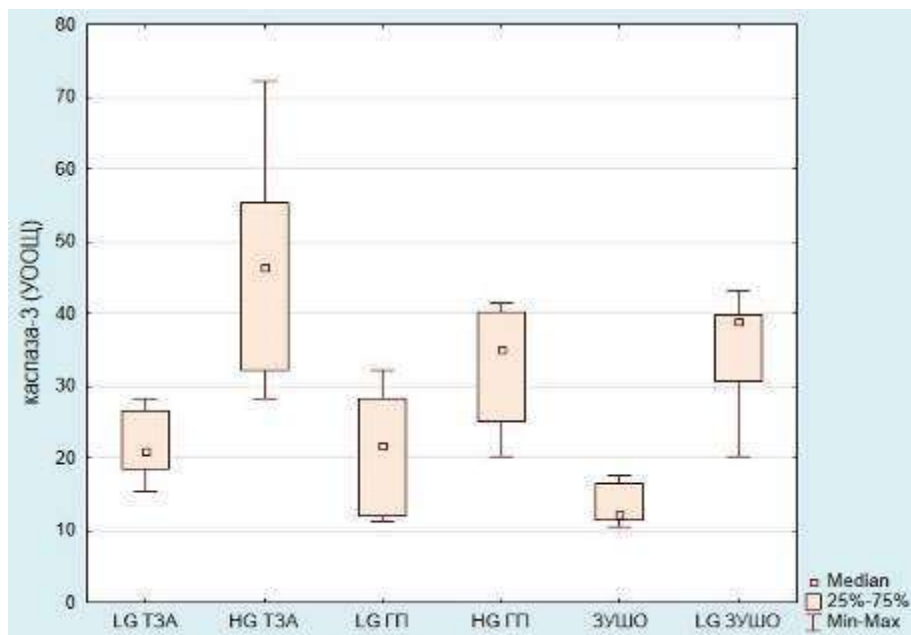


Рисунок 3.20 – Порівняльний аналіз показників експресії каспази-3 в low-grade і high-grade традиційних зубчастих аденомах (LG T3A і HG T3A), гіперпластичних поліпах (LG ГП і HG ГП), а також зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії (ЗУШО) і з low-grade дисплазією (LG ЗУШО).

За допомогою кореляційного аналізу виявлено низку асоціацій, наведених в таблиці 3.6. Встановлено наявність прямої середньої сили кореляції між середнім рівнем проліферації та низьким рівнем апоптозу

клітин звичайних аденом ($r = 0,61$, $p < 0,05$), а також прямої слабкої кореляції між середнім рівнем проліферації та низьким рівнем апоптозу клітин зубчастих новоутворень ($r = 0,42$, $p < 0,05$). Встановлено наявність прямого слабкого зв'язку між середнім рівнем проліферації та середнім рівнем накопичення p53 клітинами звичайних аденом ($r = 0,49$, $p < 0,05$), та між середнім рівнем проліферації та низьким рівнем накопичення p53 клітинами зубчастих новоутворень ($r = 0,39$, $p < 0,05$). Окрім того, встановлено наявність прямого сильного зв'язку між середнім рівнем накопичення онкопротеїну p53 клітинами аденом і низьким рівнем їх апоптозу ($r = 0,71$, $p < 0,05$), та між низьким рівнем накопичення онкопротеїну p53 клітинами зубчастих утворень і низьким рівнем їх апоптозу ($r = 0,79$, $p < 0,05$).

Таблиця 3.6 – Кореляційні зв'язки між рівнями експресії Ki-67, p53, каспази-3 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки

	Ki-67 аденоми	Ki-67 зубчасті поліпи	p53 аденоми	p53 зубчасті поліпи	каспаза-3 аденоми	каспаза-3 зубчасті поліпи
Ki-67 аденоми	1,00	0,05	0,49*	0,10	0,61*	-0,12
Ki-67 зубчасті поліпи	0,05	1,00	-0,18	0,39*	-0,15	0,42*
p53 аденоми	0,49*	-0,18	1,00	0,02	0,71*	0,08
p53 зубчасті поліпи	0,10	0,39*	0,02	1,00	0,12	0,79*
каспаза-3 аденоми	0,61*	-0,15	0,71*	0,12	1,00	0,25
каспаза-3 зубчасті поліпи	-0,12	0,42*	0,08	0,79*	0,25	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Таким чином було вивчено основні ІГХ характеристики проліферативно-апоптотичних властивостей клітин аденом і зубчастих новоутворень ДТК.

3.3 Імуногістохімічні показники неангіогенезу в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки

Неангіогенез в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК досліджений з використанням ІГХ маркерів VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 і CD44. Встановлено, що ПДТК характеризуються низкими та середніми рівнями експресії VEGF-A і VEGFR-2 епітеліоцитами та поодинокими клітинами строми, а експресія VEGFR-1 не є характерною для ПДТК (в 100% досліджуваних випадків імунозabarвлення відсутнє).

Аденоми і зубчасті утворення ДТК характеризуються низьким рівнем експресії VEGF-A: медіана рівня експресії маркеру для аденом становила 30,19 (21,34 ; 38,46) УООЩ (рис. 3.21), для зубчастих новоутворень – 25,31 (20,06 ; 31,13) УООЩ. Рівень експресії VEGF-A також був оцінений окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих утворень ДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Отримані дані, з урахуванням результатів порівняльного аналізу, наведено в таблицях 3.7 і 3.8.

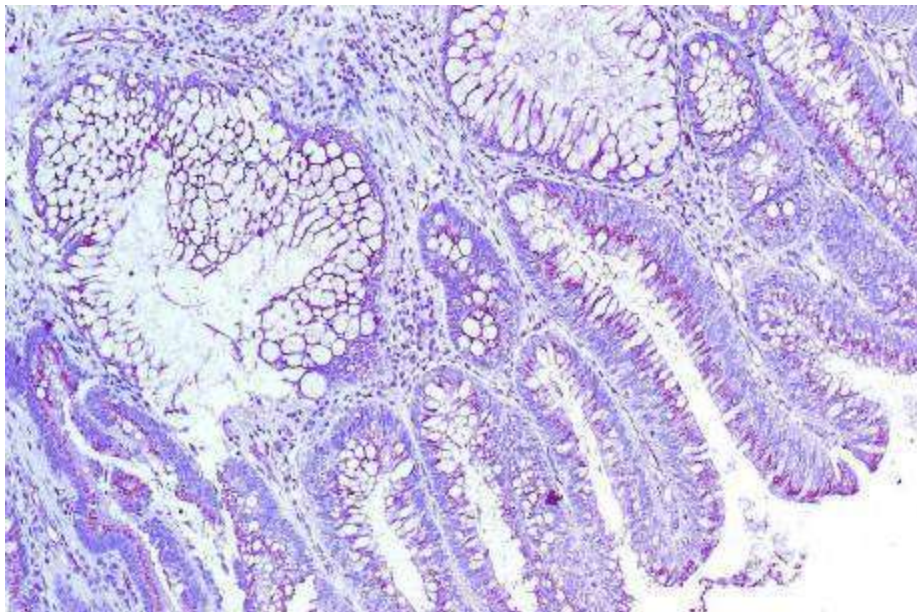


Рисунок 3.21 – Низький рівень мембранно-цитоплазматичної експресії VEGF-A в low-grade класичній аденомі. *Mo a-Hu VEGF Ab-3, Clone JH121.*

36. × 100.

Low-grade класичні аденоми характеризуються медіанами експресії VEGF-A, що дорівнюють 30,44 (22,92 ; 36,77), 36,81 (25,35 ; 48,15), 28,14 (20,61 ; 37,68) УООЩ, а high-grade класичні аденоми – 28,20 (23,33 ; 37,85), 39,14 (26,81 ; 48,30), 28,97 (21,34 ; 30,22) УООЩ (для тубулярних, тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих аденом). Low-grade зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи характеризуються медіанами експресії VEGF-A, що дорівнюють 28,44 (20,02 ; 32,15), 22,97 (20,28 ; 25,45) УООЩ, high-grade зубчасті поліпи – 30,67 (27,70 ; 36,79), 25,78 (19,90 ; 30,68) УООЩ.

Таблиця 3.7 – Показники експресії VEGF-A в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення р
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	30,44 (22,92 ; 36,77) УООЩ	28,20 (23,33 ; 37,85) УООЩ	p > 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми	36,81 (25,35 ; 48,15) УООЩ	39,14 (26,81 ; 48,30) УООЩ	p > 0,05
ворсинчасті аденоми	28,14 (20,61 ; 37,68) УООЩ	28,97 (21,34 ; 30,22) УООЩ	p > 0,05
традиційні зубчасті аденоми	28,44 (20,02 ; 32,15) УООЩ	30,67 (27,70 ; 36,79) УООЩ	p > 0,05
гіперпластичні поліпи	22,97 (20,28 ; 25,45) УООЩ	25,78 (19,90 ; 30,68) УООЩ	p > 0,05

Таблиця 3.8 – Показники експресії VEGF-A в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення р
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії VEGF-A	20,22 (20,06 ; 21,48) УООЩ	25,80 (16,21 ; 31,36) УООЩ	p > 0,05

Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії характеризуються медіаною експресії VEGF-A, що дорівнює 20,22 (20,06 ; 21,48) УООЩ, а аналогічні low-grade утворення – 25,80 (16,21 ; 31,36) УООЩ.

Аденоми і зубчасті утворення ДТК характеризуються середнім рівнем експресії VEGFR-2: медіана рівня експресії маркера для аденом становила 51,36 (40,22 ; 62,13) УООЩ (рис. 3.22), для зубчастих утворень – 50,25 (40,21 ; 61,07) УООЩ.

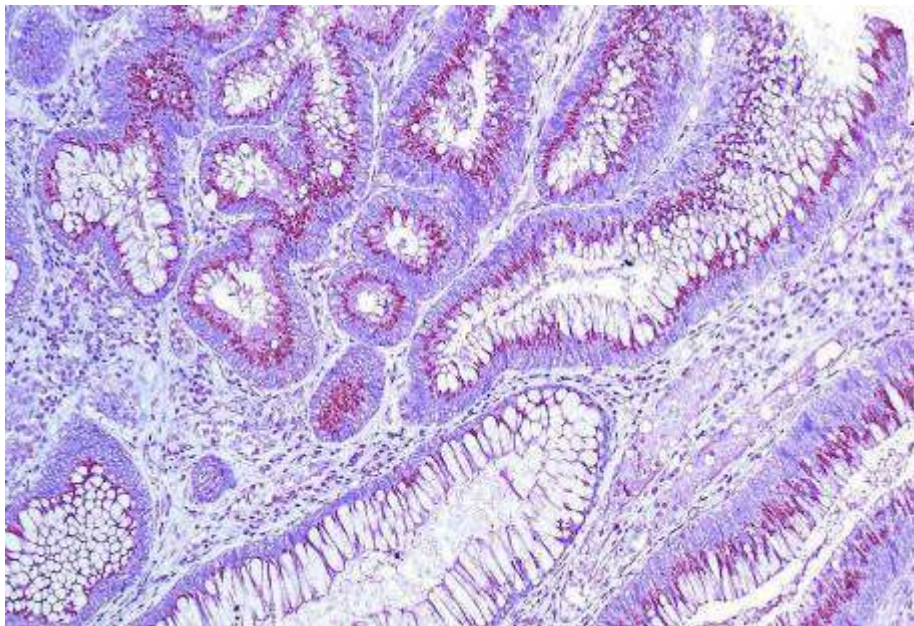


Рис. 3.22 – Низький рівень мембранно-цитоплазматичної експресії VEGFR-2 в low-grade класичній аденомі.. *Rb a Hu VEGFR2 Ab-1*. 3б. × 100.

Рівень експресії VEGFR-2 також був оцінений окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих утворень ДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Показано, що low-grade тубулярні аденоми характеризуються медіаною експресії VEGFR-2, що дорівнює 51,72 (46,14 ; 66,53) УООЩ, а high-grade тубулярні аденоми – 56,22 (50,69 ; 60,22) УООЩ. Low-grade тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії VEGFR-2, що дорівнює 50,41 (38,64 ; 61,46) УООЩ, а high-grade тубуло-ворсинчасті – 51,63 (40,22 ; 70,22). Low-grade ворсинчасті характеризуються

медіаною експресії VEGFR-2, що дорівнює 51,36 (35,89 ; 52,17) УООЩ, а high-grade ворсинчасті аденоми – 58,14 (40,02 ; 71,36) УООЩ.

Low-grade традиційні зубчасті аденоми характеризуються медіаною експресії VEGFR-2, що дорівнює 55,21 (46,15 ; 60,25) УООЩ, а high-grade традиційні зубчасті аденоми – 61,15 (40,21 ; 62,56) УООЩ. Low-grade гіперпластичні поліпи характеризуються медіаною експресії VEGFR-2, що дорівнює 42,15 (41,52 ; 52,13) УООЩ, а high-grade гіперпластичні поліпи – 50,69 (41,38 ; 60,32) УООЩ. Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії характеризуються медіаною експресії VEGFR-2, що дорівнює 48,44 (30,19 ; 50,25) УООЩ, а low-grade зубчасті утворення на широкій основі – 50,26 (42,13 ; 61,39) УООЩ. Отримані дані наведені в таблицях 3.9 і 3.10.

Таблиця 3.9 – Показники експресії VEGFR-2 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення р
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	51,72 (46,14 ; 66,53) УООЩ	56,22 (50,69 ; 60,22) УООЩ	p > 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми	50,41 (38,64 ; 61,46) УООЩ	51,63 (40,22 ; 70,22) УООЩ	p > 0,05
ворсинчасті аденоми	51,36 (35,89 ; 52,17) УООЩ	58,14 (40,02 ; 71,36) УООЩ	p > 0,05
традиційні зубчасті аденоми	55,21 (46,15 ; 60,25) УООЩ	61,15 (40,21 ; 62,56) УООЩ	p > 0,05
гіперпластичні поліпи	42,15 (41,52 ; 52,13) УООЩ	50,69 (41,38 ; 60,32) УООЩ	p > 0,05

Таблиця 3.10 – Показники експресії VEGFR-2 в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення р
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії VEGFR-2	48,44 (30,19 ; 50,25) УООЩ	50,26 (42,13 ; 61,39) УООЩ	p > 0,05

Встановлено, що звичайні low-grade аденоми статистично значущо не відрізняються від звичайних high-grade аденом за показниками експресії VEGFR-2 ($p > 0,05$). Low-grade традиційні зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи також статистично значущо не відрізняються від high-grade зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів, відповідно, за показниками експресії VEGFR-2 ($p > 0,05$). Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії статистично значущо не відрізняються від low-grade зубчастих утворень на широкій основі за показниками експресії VEGFR-2 ($p > 0,05$). Таким чином, результати проведеного порівняльного аналізу вказують на відсутність статистично значущої різниці між показниками експресії VEGFR-2 в аналогічних low-grade і high-grade утвореннях ДТК.

В ІГХ дослідженнях, за експресією CD34 визначена кількість мікросудин: медіана кількості мікросудин в СПЗМ в аденомах склала 50,00 (40,00 ; 60,00), в зубчастих поліпах – 42,00 (30,00 ; 52,00) (рис. 3.23).

Медіани кількості мікросудин в СПЗМ також були оцінені окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих утворень ДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Показано, що low-grade класичні аденоми характеризуються медіанами експресії CD34, що дорівнюють 42,50 (32,50 ; 57,00), 51,00 (40,00 ; 56,00), 49,00 (42,00 ; 54,00), а high-grade класичні аденоми – 51,00 (49,00 ; 55,00), 58,00 (41,00 ; 66,00), 50,50 (42,00 ; 61,00) (для тубулярних, тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих аденом, відповідно). Low-grade зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи характеризуються медіанами експресії CD34, що дорівнюють 42,00 (42,00 ; 51,00), 35,00 (30,00 ; 39,00), а high-grade зубчасті аденоми і гіперпластичні поліпи – 44,50 (32,00 ; 52,00), 51,00 (48,00 ; 55,00), відповідно. Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії характеризуються медіаною експресії CD34, що дорівнює 30,00 (22,00 ; 43,00), а low-grade зубчасті утворення на широкій основі – 36,00 (25,00 ; 57,50). Дані наведені в таблицях 3.10 і 3.11.

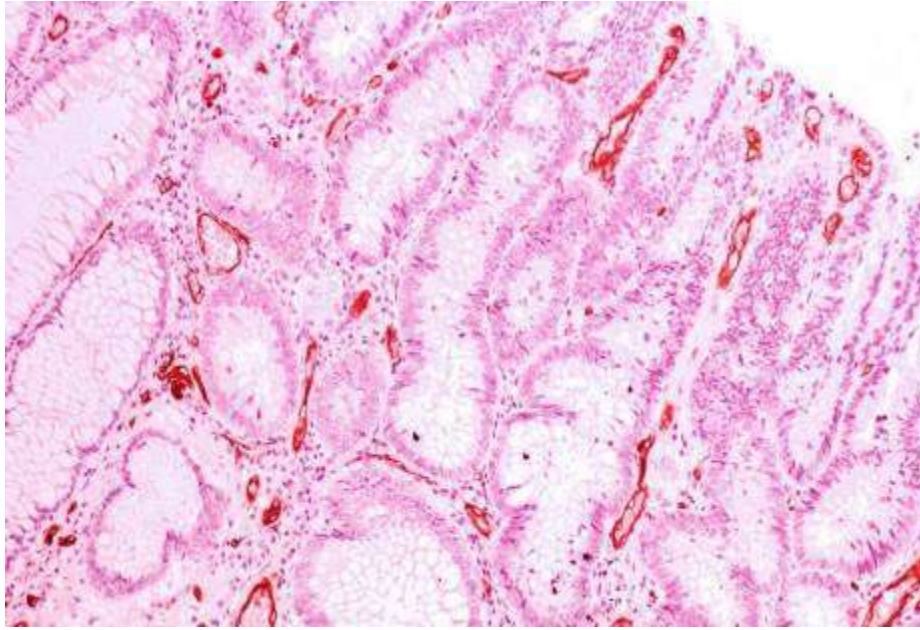


Рис. 3.23 – Експресія CD34, що дозволяє підраховувати кількість мікросудин, в гіперпластичному поліпі. *Mo a-Hu CD34, Clone QVEnd/10*. 36. × 100.

Таблиця 3.10 – Показники експресії CD34 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення р
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	42,50 (32,50 ; 57,00)	51,00 (49,00 ; 55,00)	p > 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми	51,00 (40,00 ; 56,00)	58,00 (41,00 ; 66,00)	p > 0,05
ворсинчасті аденоми	49,00 (42,00 ; 54,00)	50,50 (42,00 ; 61,00)	p > 0,05
традиційні зубчасті аденоми	42,00 (42,00 ; 51,00)	44,50 (32,00 ; 52,00)	p > 0,05
гіперпластичні поліпи	35,00 (30,00 ; 39,00)	51,00 (48,00 ; 55,00)	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Таким чином, low-grade аденоми, так само як і low-grade традиційні зубчасті аденоми, статистично значущо не відрізняються від аналогічних high-grade аденоми за показниками експресії CD34 (p > 0,05). Проте, low-grade гіперпластичні поліпи достовірно відрізняються від high-grade

гіперпластичних поліпів за показником експресії CD34 ($p < 0,05$). Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії статистично значущо не відрізняються від low-grade зубчастих утворень на широкій основі без дисплазії за показником експресії CD34 ($p > 0,05$).

За допомогою кореляційного аналізу виявлено низку асоціацій між рівнями експресії маркерів ангиогенезу та кількістю мікросудин в СПЗМ в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК (табл. 3.12).

Таблиця 3.11 – Показники експресії CD34 в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення р
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії CD34	30,00 (22,00 ; 43,00)	36,00 (25,00 ; 57,50)	$p > 0,05$

Таблиця 3.12 – Кореляційні зв'язки між рівнями експресії VEGF-A, VEGFR-2, CD34 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки

	VEGF-A аденоми	VEGF-A зубчасті поліпи	VEGFR-2 аденоми	VEGFR-2 зубчасті поліпи	CD34 аденоми	CD34 зубчасті поліпи
VEGF-A аденоми	1,00	0,11	0,72*	0,05	0,31*	0,21
VEGF-A зубчасті поліпи	0,11	1,00	-0,19	0,79*	-0,21	0,37*
VEGFR-2 аденоми	0,72*	-0,19	1,00	0,19	0,35*	0,18
VEGFR-2 зубчасті поліпи	0,05	0,79*	0,19	1,00	0,12	0,44*
CD34 аденоми	0,31*	-0,21	0,35*	0,12	1,00	0,35
CD34 зубчасті поліпи	0,21	0,37*	0,18	0,44*	0,35	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Встановлено наявність прямого сильного кореляційного зв'язку між низькими рівнями експресії VEGF-A і середніми рівнями експресії VEGFR-2 як в аденомах ($r = 0,72$, $p < 0,05$), так і в зубчастих новоутвореннях ($r = 0,79$, $p < 0,05$) дистальної товстої кишки. Окрім того, встановлено наявність прямих слабких кореляцій між низькими рівнями експресії VEGF-A і медіанами кількості мікросудин в аденомах ($r = 0,31$, $p < 0,05$) та в зубчастих новоутвореннях ($r = 0,37$, $p < 0,05$), а також прямих слабких кореляцій між середніми рівнями експресії VEGFR-2 і медіанами кількості мікросудин в аденомах ($r = 0,35$, $p < 0,05$) та в зубчастих новоутвореннях ($r = 0,44$, $p < 0,05$).

Таким чином було вивчено основні ПГХ параметри неоангіогенезу в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК.

3.4 Експресія маркерів стовбурових клітин в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки

Стовбурові клітини та стовбурові властивості (“stemness”) інших клітин аденом і зубчастих утворень ДТК вивчені за експресією CD44, ALDH1, EpCAM.

В аденомах і зубчастих утвореннях ДТК мембранна експресія CD44 виявляється в клітинах строми, а також в диспластично змінених епітеліоцитах. В аденомах медіана CD44+ клітин строми сягає 59,38 (49,21 ; 70,16) %, а медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 30,11 (22,10 ; 36,69) % (рис. 3.24); в зубчастих новоутвореннях медіана CD44+ клітин строми складає 45,86 (40,02 ; 52,46) %, а медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 29,23 (18,34 ; 41,18) % (рис. 3.25).

Експресія CD44 також була оцінена окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих утворень ДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Показано, що в low-grade тубулярних аденомах медіана CD44+ клітин строми

становить 59,15 (55,13 ; 71,18) %, а в high-grade тубулярних аденомах цей показник становить 57,35 (50,01 ; 64,71) %; в low-grade тубулярних аденомах медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 19,14 (11,25 ; 25,15) %, а в high-grade тубулярних аденомах – 23,75 (20,03 ; 28,91) %. В low-grade тубуло-ворсинчастих аденомах медіана CD44+ клітин строми становить 55,73 (48,13 ; 62,15) %, а в high-grade тубуло-ворсинчастих аденомах цей показник становить 57,74 (50,25 ; 62,54) %; в low-grade тубуло-ворсинчастих аденомах медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 29,85 (22,05 ; 31,15) %, а в high-grade тубуло-ворсинчастих аденомах – 34,19 (28,16 ; 38,96) %. В low-grade ворсинчастих аденомах медіана CD44+ клітин строми становить 58,76 (42,13 ; 70,31) %, а в high-grade ворсинчастих аденомах цей показник становить 60,02 (43,29 ; 74,36) %; в low-grade ворсинчастих аденомах медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 34,50 (30,01 ; 42,15) %, а в high-grade ворсинчастих аденомах – 41,68 (30,22 ; 45,23) % (табл. 3.13).

Відносно зубчастих новоутворень ДТК отримано наступні дані. В low-grade традиційних зубчастих аденомах медіана CD44+ клітин строми становить 52,23 (48,04 ; 68,13) %, а в high-grade традиційних зубчастих аденомах цей показник дорівнює 65,56 (48,22 ; 71,15) %; в low-grade традиційних зубчастих аденомах медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 47,05 (38,47 ; 56,87) %, а в high-grade традиційних зубчастих аденомах – 48,93 (42,47 ; 52,15) %. В low-grade гіперпластичних поліпах медіана CD44+ клітин строми становить 36,65 (32,46; 40,22) %, а в high-grade гіперпластичних поліпах цей показник дорівнює 38,18 (25,34 ; 42,13) %; в low-grade гіперпластичних поліпах медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 24,10 (18,46 ; 28,23) %, а в high-grade гіперпластичних поліпах – 32,35 (28,34 ; 37,65) %. В зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії медіана CD44+ клітин строми становить 39,23 (32,15 ; 45,51) %, а в low-grade зубчастих утвореннях на широкій основі цей показник дорівнює 39,86 (26,54 ; 42,13) %; в зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії медіана CD44+ епітеліоцитів складає 5,25 (3,24 ; 8,44) %, а в low-grade зубчастих утвореннях

на широкій основі цей показник становить 8,26 (4,03 ; 9,12) %. Отримані дані, з урахуванням результатів порівняльного аналізу, систематизовано і наведено в таблицях 3.13 і 3.14.

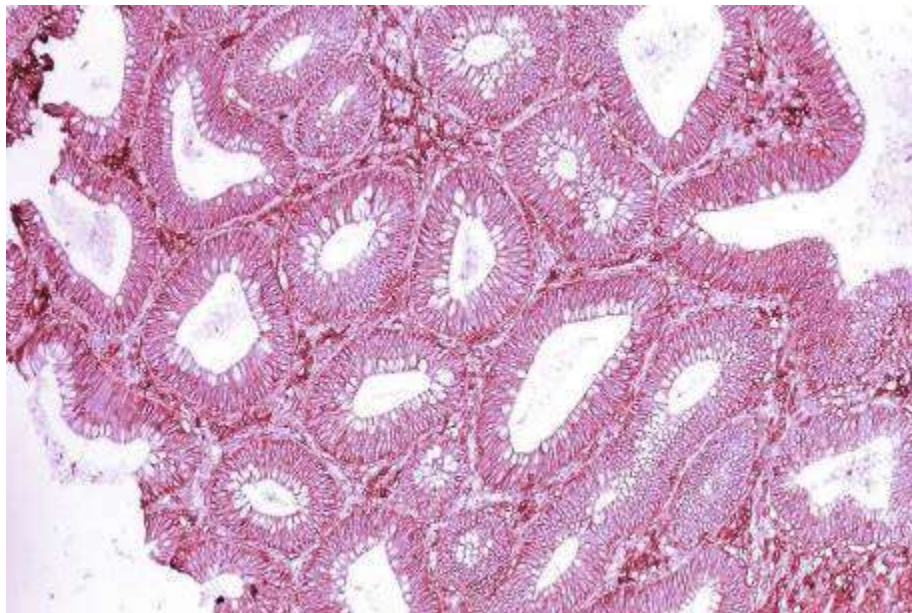


Рисунок 3.24 – Мембранна експресія CD44 в епітеліоцитах та клітинах строми low-grade тубулярної аденоми. *Mo a Hu CD44 Std./HСAM Ab-4 Clone 156-3C11*. 36. × 100.

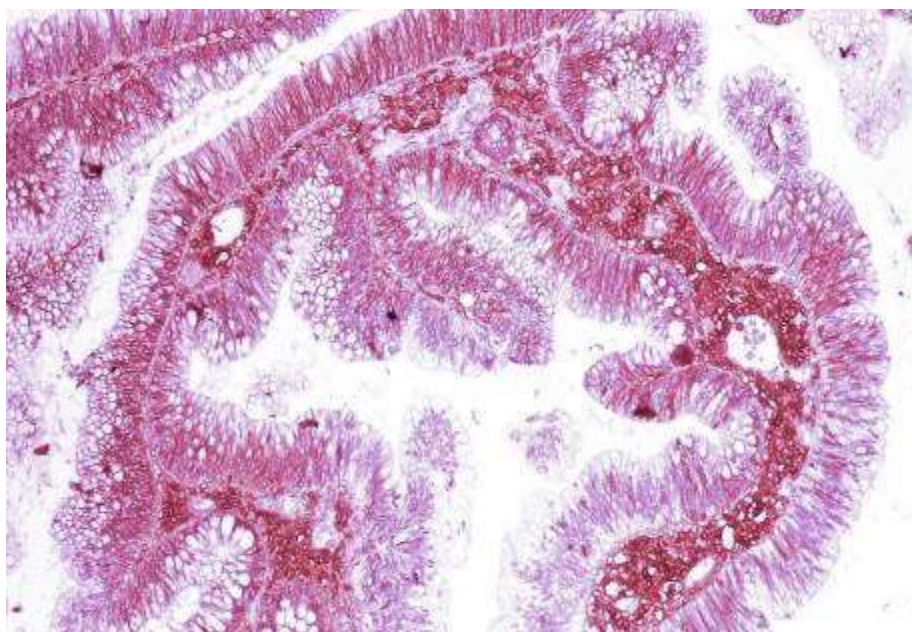


Рисунок 3.25 – Мембранна експресія CD44 в епітеліоцитах та клітинах строми low-grade традиційної зубчастої аденоми. *Mo a Hu CD44 Std./HСAM Ab-4 Clone 156-3C11*. 36. × 100.

Отримані дані свідчать про відсутність статистично значущої різниці між показниками експресії CD44 клітинами аденом ДТК з різним ступенем виразності диспластичних змін, а також в зубчастих новоутворень ДТК з різним ступенем виразності диспластичних змін.

Таблиця 3.13 – Показники експресії CD44 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення p
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми (клітини строми)	59,15 (55,13 ; 71,18) %	57,35 (50,01 ; 64,71) %	p > 0,05
тубулярні аденоми (епітеліоцити)	19,14 (11,25 ; 25,15) %	23,75 (20,03 ; 28,91) %	p > 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми (клітини строми)	55,73 (48,13 ; 62,15) %	57,74 (50,25 ; 62,54) %	p > 0,05
тубуло-ворсинчасті аденоми (епітеліоцити)	29,85 (22,05 ; 31,15) %	34,19 (28,16 ; 38,96) %	p > 0,05
ворсинчасті аденоми (клітини строми)	58,76 (42,13 ; 70,31) %	60,02 (43,29 ; 74,36) %	p > 0,05
ворсинчасті аденоми (епітеліоцити)	34,50 (30,01 ; 42,15) %	41,68 (30,22 ; 45,23) %	p > 0,05
традиційні зубчасті аденоми (клітини строми)	52,23 (48,04 ; 68,13) %	65,56 (48,22 ; 71,15) %	p > 0,05
традиційні зубчасті аденоми (епітеліоцити)	47,05 (38,47 ; 56,87) %	48,93 (42,47 ; 52,15) %	p > 0,05
гіперпластичні поліпи (клітини строми)	36,65 (32,46; 40,22) %	38,18 (25,34 ; 42,13) %	p > 0,05
гіперпластичні поліпи (епітеліоцити)	24,10 (18,46 ; 28,23) %	32,35 (28,34 ; 37,65) %	p > 0,05

Таблиця 3.14 – Показники експресії CD44 в поліпах дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення p
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
показник експресії CD44 клітинами строми	39,23 (32,15 ; 45,51) %	39,86 (26,54 ; 42,13) %	p > 0,05
показник експресії CD44 епітеліоцитами	5,25 (3,24 ; 8,44) %	8,26 (4,03 ; 9,12) %	p > 0,05

Окрім того, було встановлено, що зубчасті новоутворення на широкій основі характеризуються локалізацією CD44+ епітеліоцитів в нижній та середній третині кишкових крипт, тобто, в ділянках, що є нормальною локацією клітин-попередників епітеліоцитів слизової товстої кишки. Такий розподіл зберігається і в low-grade зубчастих новоутвореннях на широкій основі. Гіперпластичні поліпи також характеризуються локалізацією CD44+ епітеліоцитів переважно в нижній та середній третині кишкових крипт (рис. 3.26), проте в 42 % гіперпластичних поліпів з low-grade дисплазією і в 100 % гіперпластичних поліпів з high-grade дисплазією визначається рівномірний розподіл CD44+ епітеліоцитів по всій довжині кишкових крипт. Всі інші досліджені аденоми дистальної товстої кишки (тубулярні, тубуло-ворсинчасті, ворсинчасті, а також традиційні зубчасті аденоми) характеризуються виключно рівномірним розподілом CD44+ епітеліоцитів по всій довжині кишкових крипт.

Цитоплазматична експресія ALDH1 виявлялась в клітинах строми поліпів, а також в окремих диспластично змінених епітеліоцитах досліджених новоутворень ДТК. Встановлено, що в аденомах ДТК медіана експресії ALDH1+ клітин строми дорівнює 25,25 (20,04 ; 31,27) %, медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів – 21,16 (17,13 ; 28,18) %; в зубчастих новоутвореннях медіана експресії ALDH1+ клітин строми складає 24,52 (21,18 ; 29,36) %, медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів складає 15,81 (11,15 ; 20,04) % (рис. 3.27).

Показник експресії ALDH1+ клітин також був оцінений окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих новоутворень ДТК з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії. В low-grade тубулярних аденомах медіана експресії ALDH1+ клітин строми склала 23,59 %, в high-grade тубулярних аденомах медіана експресії ALDH1+ клітин строми склала 26,32 % ($p > 0,05$). В low-grade тубулярних аденомах медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів склала 17,36 %, в high-grade тубулярних аденомах цей показник становив 19,13 % ($p > 0,05$).

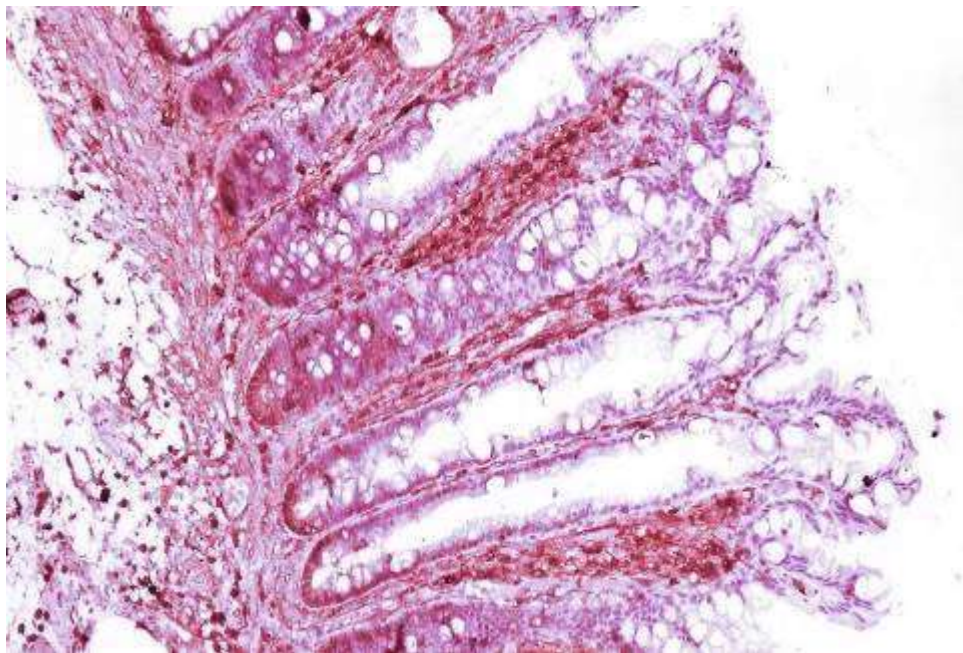


Рисунок 3.26 – Експресія CD44 в гіперпластичному поліпі з локацією імунозабарвлених епітеліоцитів в базальних відділах крипт. *Mo a Hu CD44 Std./HCAM Ab-4 Clone 156-3C11*. 36. × 100.

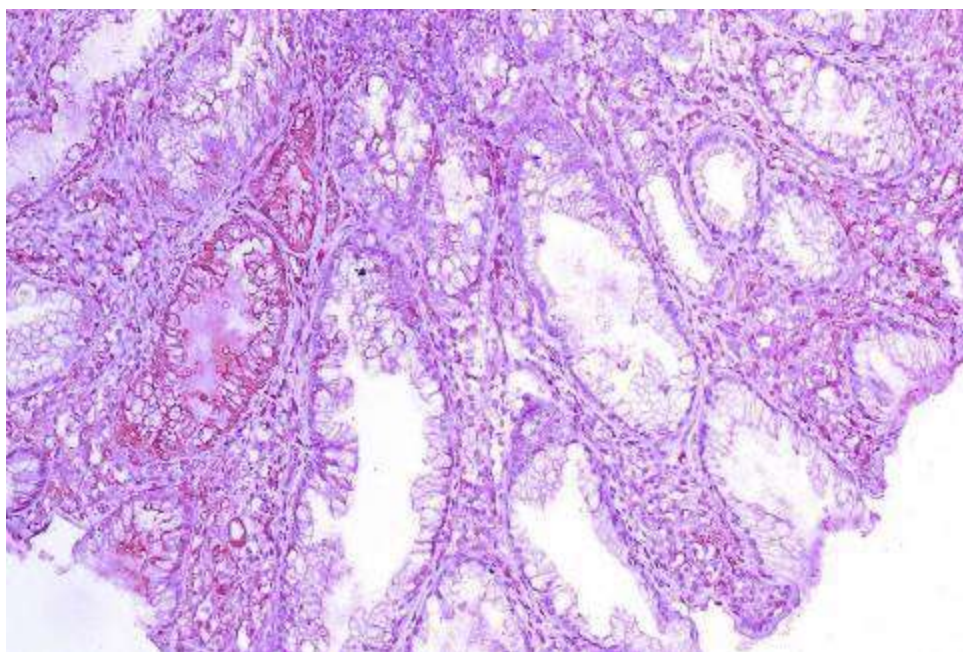


Рисунок 3.27 – Цитоплазматична експресія ALDH1 в клітинах строми, а також окремих епітеліоцитах в гіперпластичному поліпі. *Rb a Hu ALDH1A1*. 36. × 100.

В low-grade тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах медіани експресії ALDH1+ клітин строми склали 20,61 % і 22,19 %, відповідно, в аналогічних high-grade аденомах це показники склали 37,18 % і 36,63 %, відповідно ($p < 0,05$). В low-grade тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденомах медіани експресії ALDH1+ епітеліоцитів склали 20,79 % і 17,22 %, відповідно, в аналогічних high-grade аденомах ці показники склали 30,63 % і 28,18 % , відповідно ($p < 0,05$). В low-grade традиційних зубчастих аденомах медіана експресії ALDH1+ клітин строми склала 22,15 %, в аналогічних high-grade аденомах цей показник становив 32,25 % ($p < 0,05$). В low-grade традиційних зубчастих аденомах медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів склала 16,90 %, в аналогічних high-grade аденомах цей показник становив 22,65 % ($p < 0,05$). В low-grade гіперпластичних поліпах медіана експресії ALDH1+ клітин строми склала 26,75 %, в аналогічних high-grade поліпах цей показник становив 22,15 % ($p > 0,05$). В low-grade гіперпластичних поліпах медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів склала 13,74 %, в аналогічних high-grade поліпах цей показник становив 14,15 % ($p > 0,05$). В зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії медіана експресії ALDH1+ клітин строми склала 20,80 %, в аналогічних утвореннях з low-grade дисплазією цей показник становив 26,75 % ($p > 0,05$). В зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитами не виявлялась, в той час як в аналогічних утвореннях з low-grade дисплазією цей показник становив 10,69 %. Отримані дані, з урахуванням результатів порівняльного аналізу, наведені в таблицях 3.15 і 3.16.

Таким чином, було встановлено, що high-grade тубуло-ворсинчасті аденоми відрізняє статистично значущо на 44,57 % більший показник експресії ALDH1 клітинами строми, а також на 32,13 % більший показник експресії ALDH1 епітеліоцитами в порівнянні з аналогічними low-grade аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.28, рис. 3.29). А high-grade ворсинчасті аденоми відрізняє статистично значущо на 39,43 % більший показник експресії

ALDH1 клітинами строми, а також на 38,90 % більший показник експресії ALDH1 епітеліоцитами в порівнянні з аналогічними low-grade аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.28, рис. 3.29).

Таблиця 3.15 – Показники експресії ALDH1 в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих утворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення p
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми (клітини строми)	23,59 (19,28 ; 28,64) %	26,32 (21,22 ; 29,87) %	$p > 0,05$
тубулярні аденоми (епітеліоцити)	17,36 (11,23 ; 21,15) %	19,13 (15,63 ; 21,17) %	$p > 0,05$
тубуло-ворсинчасті аденоми (клітини строми)	20,61 (16,97 ; 25,36) %	37,18 (28,15 ; 39,65) %	$p < 0,05$
тубуло-ворсинчасті аденоми (епітеліоцити)	20,79 (18,34 ; 25,22) %	30,63 (29,17 ; 32,15) %	$p < 0,05$
ворсинчасті аденоми (клітини строми)	22,19 (12,46 ; 25,14) %	36,63 (28,05 ; 41,15) %	$p < 0,05$
ворсинчасті аденоми (епітеліоцити)	17,22 (15,22 ; 21,15) %	28,18 (25,17 ; 30,04) %	$p < 0,05$
традиційні зубчасті аденоми (клітини строми)	22,15 (19,94 ; 25,36) %	32,25 (28,03 ; 36,45) %	$p < 0,05$
традиційні зубчасті аденоми (епітеліоцити)	16,90 (11,14 ; 18,24) %	22,65 (21,15 ; 25,04) %	$p < 0,05$
гіперпластичні поліпи (клітини строми)	26,75 (21,56 ; 29,47) %	22,15 (21,17 ; 29,36) %	$p > 0,05$
гіперпластичні поліпи (епітеліоцити)	13,74 (11,15 ; 18,25) %	14,15 (12,22 ; 20,04) %	$p > 0,05$

Примітка. **$p < 0,05$** – статистично значуща різниця.

Таблиця 3.16 – Показники експресії ALDH1 в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення p
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії ALDH1+ клітин строми	20,80 (18,91 ; 23,69) %	26,75 (21,56 ; 29,47) %	$p > 0,05$
Показник експресії ALDH1+ епітеліоцитів	-	10,69 (9,41 ; 15,05) %	-

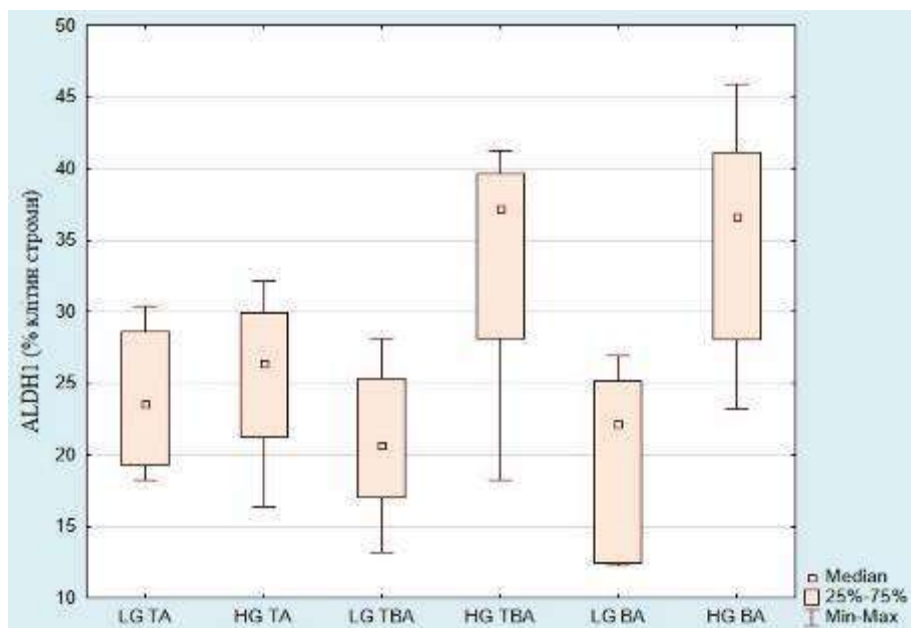


Рисунок 3.28 – Порівняльний аналіз кількості ALDH1+ клітин стромы в low-grade і high-grade тубулярних аденомах (LG TA і HG TA), тубуло-ворсинчастих (LG TBA і HG TBA) і ворсинчастих аденомах (LG BA і HG BA).

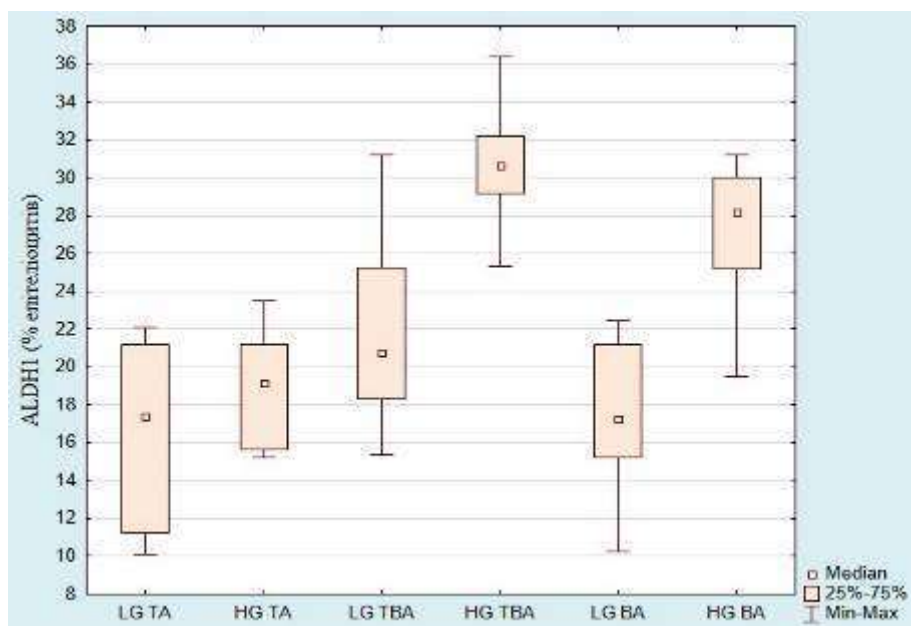


Рисунок 3.29 – Порівняльний аналіз кількості ALDH1+ епітеліоцитів в low-grade і high-grade тубулярних аденомах (LG TA і HG TA), тубуло-ворсинчастих (LG TBA і HG TBA) і ворсинчастих аденомах (LG BA і HG BA).

High-grade традиційні зубчасті аденоми відрізняються статистично значущо на 31,26 % і на 25,39 % більшими показниками експресії ALDH1 в

клітинах строми і в епітеліоцитах, відповідно, в порівнянні з low-grade традиційними зубчастими аденомами ($p < 0,05$; рис. 3.30, рис. 3.31).

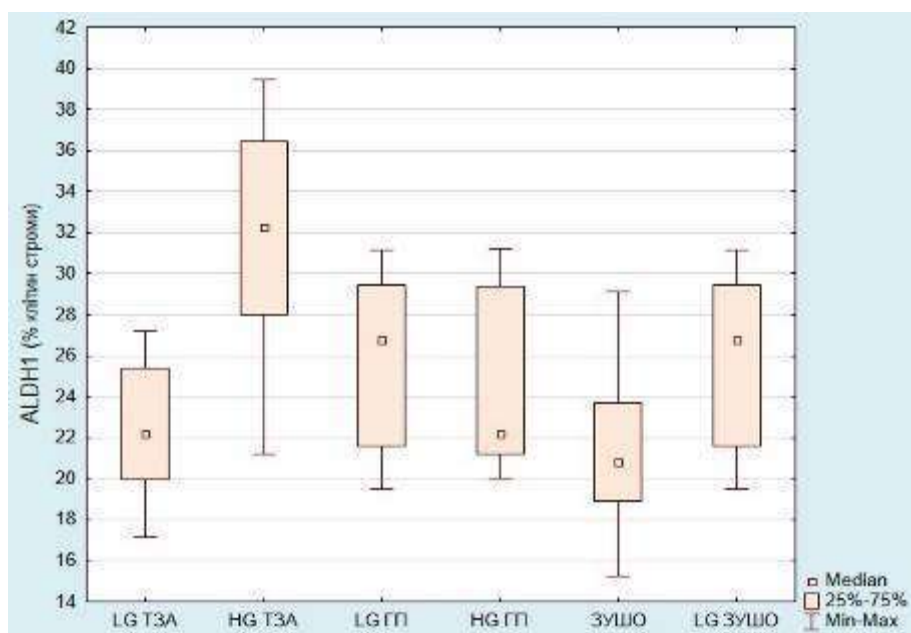


Рисунок 3.30 – Порівняльний аналіз кількості ALDH1+ клітин строми в low-grade і high-grade традиційних зубчастих аденомах (LG T3A і HG T3A), гіперпластичних поліпах (LG ГП і HG ГП), а також зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії (ЗУШО) і з low-grade дисплазією (LG ЗУШО).

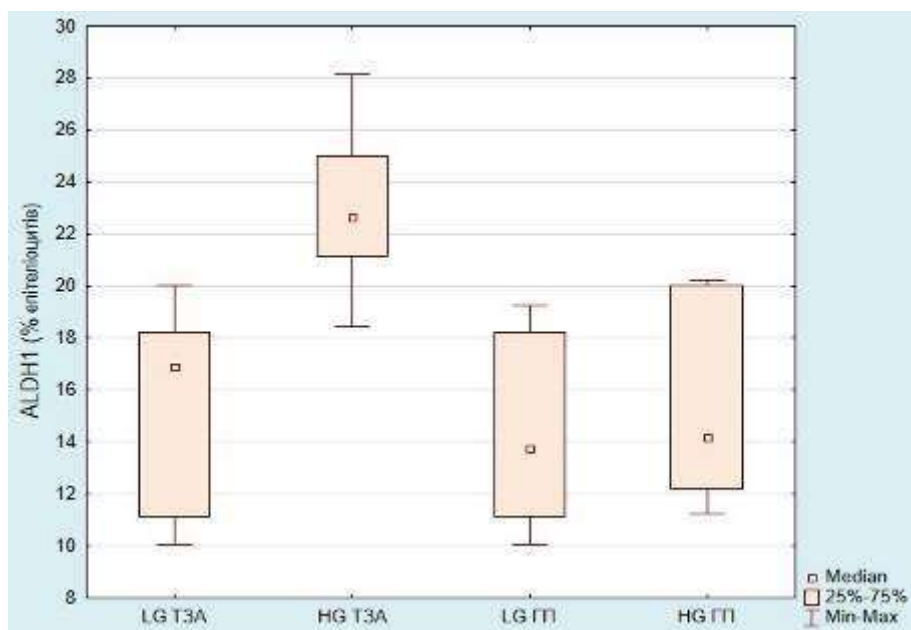


Рисунок 3.31 – Порівняльний аналіз кількості ALDH1+ епітеліоцитів в low-grade і high-grade традиційних зубчастих аденомах (LG T3A і HG T3A), гіперпластичних поліпах (LG ГП і HG ГП).

High-grade гіперпластичні поліпи статистично значущо не відрізняються від low-grade гіперпластичних поліпів за показниками експресії ALDH1 ($p > 0,05$; рис. 3.30, рис. 3.31). Low-grade зубчасті утворення на широкій основі статистично значущо не відрізняються від зубчастих утворень на широкій основі без дисплазії за показниками експресії ALDH1 в клітинах строми ($p > 0,05$; рис. 3.30), однак low-grade зубчасті утворення на широкій основі відрізняє наявність ALDH1+ епітеліоцитів, що не є характерним для зубчастих утворень на широкій основі без дисплазії (останні характеризуються негативною ІГХ-реакцією епітеліоцитів з відповідним маркером).

Експресія ЕрСМ в виявлялась в епітеліоцитах аденом і зубчастих утворень ДТК, мала мембранну або мембранно-цитоплазматичну локалізацію. Встановлено, що медіана експресії ЕрСМ в аденомах ДТК дорівнює 66,22 (58,44 ; 70,57) УООЩ (рис. 3.32), а в зубчастих новоутвореннях медіана експресії ЕрСМ 60,79 (49,15 ; 67,29) УООЩ (рис. 3.33).

Показники експресії ЕрСМ також були оцінені окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих утворень ДТК з урахуванням ступеня дисплазії. Low-grade тубулярні аденоми характеризуються медіаною експресії ЕрСМ, що дорівнює 58,40 (55,14 ; 60,22) УООЩ, high-grade тубулярні аденоми – 67,65 (62,47 ; 71,15) УООЩ ($p < 0,05$). Low-grade тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії ЕрСМ, що дорівнює 58,50 (50,58 ; 65,46) УООЩ, high-grade тубуло-ворсинчасті аденоми – 73,57 (68,15 ; 78,15) УООЩ ($p < 0,05$). Low-grade ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії ЕрСМ, що дорівнює 57,29 (50,15 ; 64,55) УООЩ, high-grade ворсинчасті аденоми – 73,17 (66,36 ; 80,34) УООЩ ($p < 0,05$). Low-grade традиційні зубчасті аденоми характеризуються медіаною експресії ЕрСМ, що дорівнює 57,10 (48,26 ; 58,55) УООЩ, high-grade традиційні зубчасті аденоми аденоми

характеризуються медіаною експресії ЕрСАМ, що дорівнює 68,48 (65,21 ; 74,15) УООЩ ($p < 0,05$).



Рисунок 3.32 – Середній рівень мембранно-цитоплазматичної експресії ЕрСАМ в тубулярній аденомі з low-grade дисплазією епітелію. *Rb a Hu ЕрСАМ. 3б. × 100.*

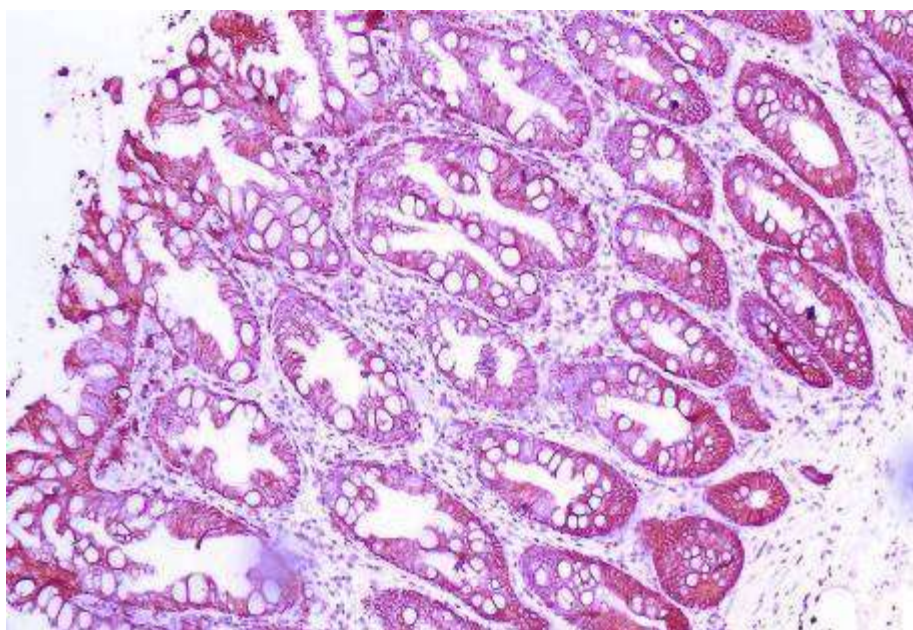


Рисунок 3.33 – Середній рівень мембранно-цитоплазматичної експресії ЕрСАМ в гіперпластичному поліпі з low-grade дисплазією епітелію. *Rb a Hu ЕрСАМ. 3б. × 100.*

Low-grade гіперпластичні поліпи характеризуються медіаною експресії ЕрСАМ, що дорівнює 57,10 (48,26 ; 58,55) УООЩ, high-grade гіперпластичні поліпи – 68,48 (65,21 ; 74,15) УООЩ ($p < 0,05$). Зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії характеризуються медіаною експресії ЕрСАМ, що дорівнює 30,84 УООЩ, а low-grade зубчасті утворення на широкій основі характеризуються медіаною експресії ЕрСАМ, що дорівнює 58,29 УООЩ ($p < 0,05$). Отримані дані, з урахуванням результатів порівняльного аналізу, наведено в таблицях 3.17 і 3.18.

Таблиця 3.17 – Показники експресії ЕрСАМ в аденомах і зубчастих утвореннях дистальної товстої кишки з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade) і з дисплазією епітелію високого ступеня (high-grade)

Субтипи аденом і зубчастих новоутворень	Медіана експресії з урахуванням ступеня тяжкості дисплазії епітелію		Значення p
	low-grade	high-grade	
тубулярні аденоми	58,40 (55,14 ; 60,22) УООЩ	67,65 (62,47 ; 71,15) УООЩ	$p < 0,05$
тубуло-ворсинчасті аденоми	58,50 (50,58 ; 65,46) УООЩ	73,57 (68,15 ; 78,15) УООЩ	$p < 0,05$
ворсинчасті аденоми	57,29 (50,15 ; 64,55) УООЩ	73,17 (66,36 ; 80,34) УООЩ	$p < 0,05$
традиційні зубчасті аденоми	57,10 (48,26 ; 58,55) УООЩ	68,48 (65,21 ; 74,15) УООЩ	$p < 0,05$
гіперпластичні поліпи	62,34 (59,24 ; 65,24) УООЩ	67,65 (64,32 ; 73,24) УООЩ	$p > 0,05$

Примітка. $p < 0,05$ – статистично значуща різниця.

Таблиця 3.18 – Показники експресії ЕрСАМ в зубчастих утвореннях на широкій основі дистальної товстої кишки без дисплазії та з дисплазією епітелію низького ступеня (low-grade)

Зубчасті утворення на широкій основі	Медіана експресії з урахуванням відсутності або наявності легкої дисплазії		Значення p
	без дисплазії	з low-grade дисплазією	
Показник експресії ЕрСАМ	30,84 (25,15 ; 36,58) УООЩ	58,29 (55,26 ; 69,24) УООЩ	$p < 0,05$

Примітка. $p < 0,05$ – статистично значуща різниця.

Таким чином, high-grade тубулярні, ворсинчасті та тубуло-ворсинчасті аденоми відрізняються статистично значущо більш високими на 13,68 %, 20,49 % і 21,71 % рівнями мембрано-цитоплазматичної експресії ЕрСАМ, відповідно, при їх порівнянні з аналогічними low-grade аденомами. High-grade традиційні зубчасті аденоми відрізняються статистично значущо на 17 % більшим рівнем експресії ЕрСАМ в порівнянні з аналогічними low-grade поліпами. Low-grade зубчасті новоутворення на широкій основі відрізняються статистично значущо на 48 % більшим рівнем експресії ЕрСАМ, в порівнянні з аналогічними новоутвореннями без дисплазії.

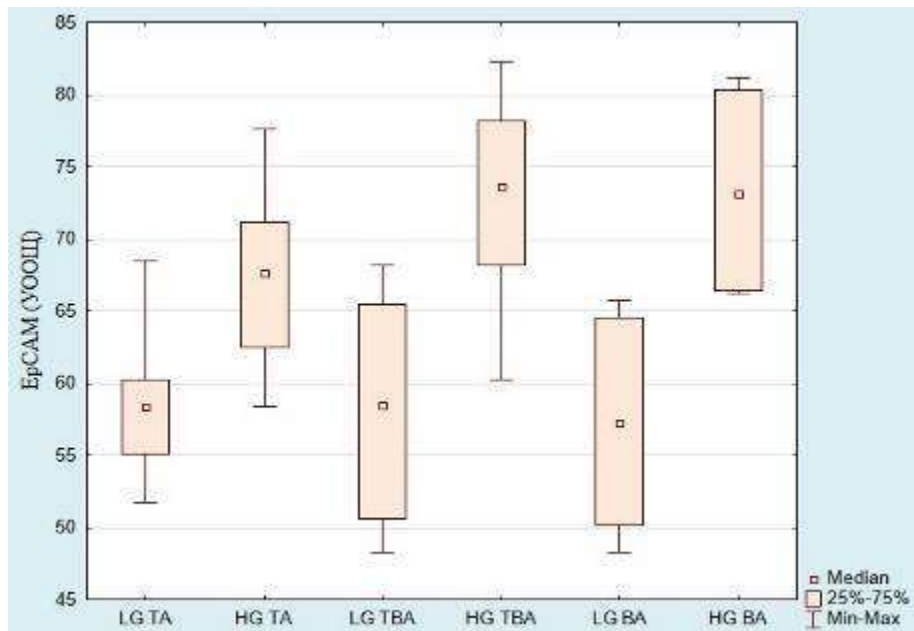


Рисунок 3.34 – Порівняльний аналіз показників експресії ЕрСАМ в low-grade і high-grade тубулярних аденомах (LG TA і HG TA), тубуло-ворсинчастих (LG TBA і HG TBA) і ворсинчастих аденомах (LG BA і HG BA).

Окрім того, встановлено, що зубчасті утворення на широкій основі без дисплазії відрізняються мембранним патерном експресії ЕрСАМ епітеліоцитами. Серед досліджених low-grade гіперпластичних поліпів і low-grade зубчастих новоутворень на широкій основі є випадки і мембранної, і мембранно-цитоплазматичної експресії ЕрСАМ. Інші досліджені зубчасті

поліпи характеризуються виключно мембранно-цитоплазматичним патерном експресії ЕрСАМ. Всі тубулярні, ворсинчасті і тубуло-ворсинчасті аденоми характеризуються виключно мембранно-цитоплазматичним патерном експресії ЕрСАМ.

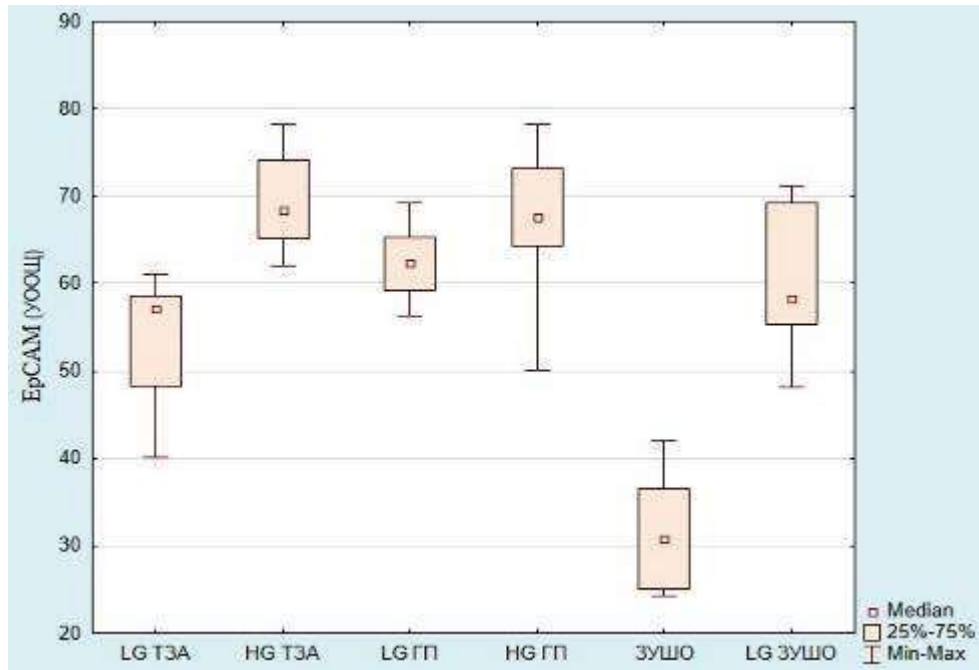


Рисунок 3.35 – Порівняльний аналіз показників експресії ЕрСАМ в low-grade і high-grade традиційних зубчастих аденомах (LG T3A і HG T3A), гіперпластичних поліпах (LG ГП і HG ГП), а також зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії (ЗУШО) і з low-grade дисплазією (LG ЗУШО).

Таким чином було вивчено основні ІГХ характеристики експресії маркерів стовбурових клітин CD44, ALDH1, ЕрСАМ клітинами аденом і зубчастих новоутворень ДТК.

Резюме. Досліджено ІГХ параметри проліферації, апоптозу, неоангіогенезу і експресії маркерів стовбурових клітин в звичайних аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК. Проведено порівняння цих параметрів в кожному гістологічному субтипі звичайних аденом і зубчастих новоутворень ДТК з різним ступенем виразності диспластичних змін.

Встановлено, що рівні клітинної проліферації зростають на 30 % при прогресуванні тубулярних і на 37 % при прогресуванні тубуло-ворсинчастих аденом від low-grade до high-grade дисплазії. Рівень клітинної проліферації достовірно не зростає при прогресуванні ворсинчастих аденом. Адже, для останніх вже за умов low-grade дисплазії рівень проліферації клітин є близьким до високого.

Рівень клітинної проліферації зростає на 44 % при прогресуванні зубчастих новоутворень на широкій основі від утворень без дисплазії до low-grade утворень. В прогресуванні зубчастих поліпів від low-grade до high-grade дисплазії рівень проліферації також достовірно зростає: на 42 % в традиційних зубчастих аденомах і на 24 % в гіперпластичних поліпах.

Також встановлено, що показники експресії p53 зростають на 49 %, 34 %, 41 % при прогресуванні тубулярних, тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом, відповідно, від low-grade до high-grade дисплазії. Показники експресії p53 зростають на 38 % і на 90 % при прогресуванні традиційних зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів, відповідно (low-grade – high-grade). Звертає на себе увагу, що для high-grade гіперпластичних поліпів цей показник збільшується більш ніж в 10 разів. Всім цим поліпам властивий прямий зв'язок між показниками клітинної проліферації і експресії p53. А для зубчастих утворень на широкій основі (як без дисплазії, так і з low-grade дисплазією) характерні вкрай низькі показники експресії p53.

Встановлено, що рівні апоптозу зростають на 51 %, 50 %, 65 % при прогресуванні тубулярних, тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом, відповідно, від low-grade до high-grade дисплазії. Рівень апоптозу зростає на 69 % при прогресуванні зубчастих новоутворень на широкій основі від утворень без дисплазії до low-grade утворень. В прогресуванні зубчастих поліпів рівень проліферації також достовірно зростає: на 55 % в традиційних зубчастих аденомах і на 38 % в гіперпластичних поліпах (low-grade – high-grade). Всім аденомам і зубчастим новоутворенням властивий прямий зв'язок між показниками клітинної проліферації та апоптозу.

ІГХ параметри неоангіогенезу статистично значущо не змінюються при прогресуванні зубчастих утворень на широкій основі від утворень без дисплазії до low-grade утворень, а також при прогресуванні звичайних аденом і традиційних зубчастих аденом від low-grade до high-grade дисплазії. Встановлено, що гіперпластичні поліпи відрізняються від інших досліджених поліпів достовірним на 32 % збільшенням кількості мікросудин в полі зору при прогресуванні від low-grade до high-grade дисплазії.

Встановлено, що експресія CD44+ клітин строми та епітеліоцитів статистично значущо не змінюється при прогресуванні звичайних аденом, традиційних зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів від low-grade до high-grade дисплазії, а також при прогресуванні зубчастих утворень на широкій основі без дисплазії до low-grade зубчастих утворень на широкій основі.

Встановлено, що експресія ALDH1+ клітин строми та епітеліоцитів статистично значущо не змінюється при прогресуванні тубулярних аденом, гіперпластичних поліпів від low-grade до high-grade дисплазії, а також зубчастих утворень на широкій основі без дисплазії до low-grade утворень. Однак, прогресування тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих і традиційних зубчастих аденом (low-grade – high-grade) асоціюється із достовірним на 45 %, 40 % і 32 % зростанням експресії ALDH1+ клітин строми, відповідно, а також із достовірним на 33 %, 39 % і 26 % зростанням експресії ALDH1+ епітеліоцитів, відповідно.

Встановлено також, що статистично значуще зростання експресії ЕрСАМ характерно лише для звичайних аденом: показники експресії зростають на 14 %, 21 %, 22 %, відповідно, при прогресуванні від low-grade до high-grade дисплазії. Прогресування досліджених зубчастих новоутворень не асоціюється із статистично значущим зростанням експресії ЕрСАМ.

Матеріали розділу відображені у 3-х статтях [143-145] та у 4-х тезах [146-149].

РОЗДІЛ 4

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОЇ АДЕНОКАРЦИНОМИ

При мікроскопічному дослідженні неспецифікованої КРА встановлено, що пухлина формується численними раковими клітинами, що утворюють більш-менш виразні залозоподібні структури, оточені виразною десмопластичною стромою. Типовим є наявність некротичного детриту в просвіті залозоподібних структур, а також виразна запально-клітинна інфільтрація стромального компонента пухлини.

Виразність та структура залозоподібних структур варіюють в залежності від ступеня диференціювання (grade – G) пухлини. Так, високодиференційована (G₁) КРА характеризується виразними залозоподібними структурами, просвіти яких можуть мати округлу, овальну або неправильну форму, є тенденція до кістозної дилатації цих структур із накопиченням некротичного детриту в просвіті. Ядра значно збільшені, подовжені, помітні ядерця (рис. 4.1).

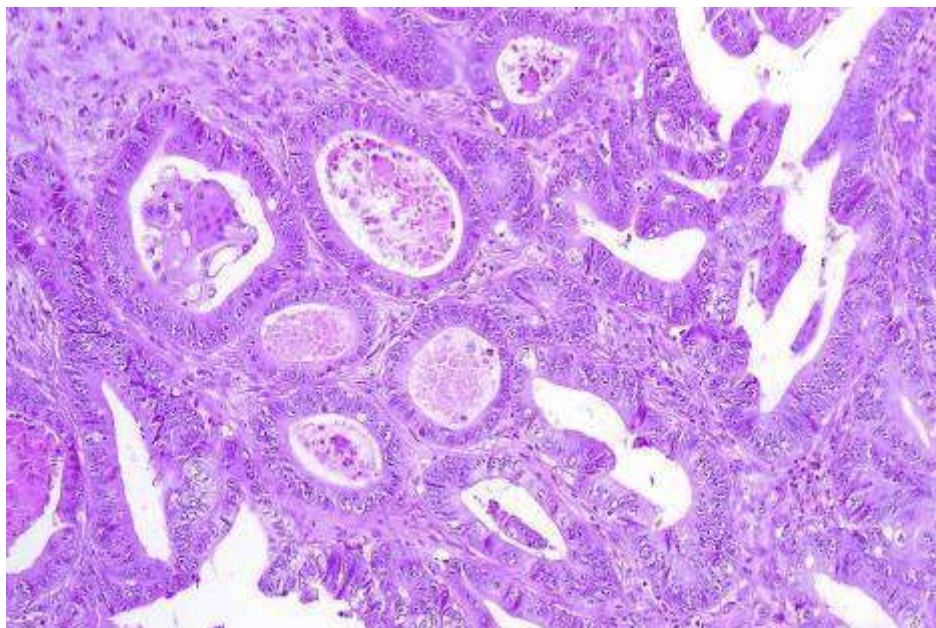


Рисунок 4.1 – Високодиференційована колоректальна аденокарцинома.
Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. × 100.

Помірнодиференційована (G_2) КРА відрізняється меншою виразністю залозоподібних структур, просвіти яких мають переважно неправильну форму, окрім того, зустрічаються солідні пласти ракових клітин. Низкодиференційовану (G_3) КРА відрізняє те, що вона переважно сформована солідними пластами ракових клітин, залозоподібні структури складають менш ніж 50% пухлини.

4.1 Проліферативно-апоптотичні властивості колоректальної аденокарциноми

Проліферативні властивості КРА були досліджені шляхом паралельного молекулярно-генетичного дослідження рівня транскрипційної активності мРНК кодуєчого гену *Ki-67* у порівнянні з ІГХ експресією *Ki-67* в одних і тих же зразках карциноми на I, II, III, IV стадіях її прогресування.

За результатами МГ дослідження встановлено, що КРА характеризується підвищеною транскрипційною активністю гену *Ki-67*: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену складає 1,80 (1,04 ; 2,99). Тобто, цей показник є підвищеним відносно показників зразків НСО, що були використані в якості контролю при проведенні ПЛР. При цьому переважна більшість досліджуваних зразків (80 %) характеризувалась підвищеними показниками експресії мРНК *Ki-67*, а 20 % досліджуваних зразків характеризувались показниками, що були зниженими відносно показників НСО. Згідно критерію χ^2 зразки з підвищеними показниками експресії мРНК *Ki-67* траплялись достовірно частіше ($p < 0,05$).

Аналіз показників експресії мРНК *Ki-67* за стадіями КРА виявив тенденцію до їх зниження: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* в зразках КРА I стадії складає 3,20 (2,31 ; 3,59), 100 % зразків характеризуються підвищеними показниками експресії мРНК гену; медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* в зразках КРА II стадії

складає 2,92 (1,80 ; 3,50), 100 % зразків характеризуються підвищеними показниками експресії мРНК гену; медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* в зразках КРА III стадії складає 1,27 (1,19 ; 2,08), 90 % зразків характеризуються підвищеними показниками експресії мРНК гену; медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* в зразках КРА IV стадії складає 0,52 (0,28 ; 1,04), лише 10 % цих зразків характеризуються підвищеними показниками експресії мРНК гену (рис. 4.2).

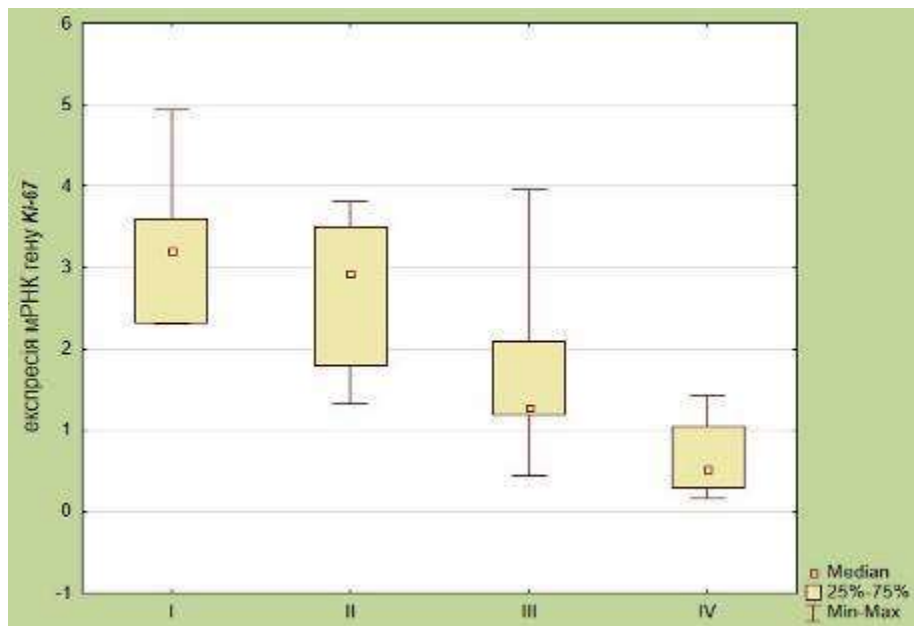


Рисунок 4.2 – Порівняльний аналіз показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Ці результати узгоджуються з результатами ІГХ дослідження експресії *Ki-67*, за якими встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем проліферативної активності клітин: медіана експресії *Ki-67* дорівнює 41,20 (36,62 ; 59,42) % (рис. 4.3). Рівень проліферації клітин КРА на різних стадіях виглядає наступним чином: медіана експресії *Ki-67* клітинами КРА I стадії дорівнює 73,95 (61,57 ; 81,38) %, II стадії – 43,54 (38,77 ; 53,16) %, III стадії складає 38,88 (27,39 ; 41,27) % та IV стадії – 27,37 (20,96 ; 39,24) %. Таким чином, має місце тенденція до зменшення проліферативної активності клітин

КРА при прогресії пухлини від I до IV стадії, із наявністю достовірної різниці між показниками, отриманими для I та II стадій ($p < 0,05$; рис. 4.4).

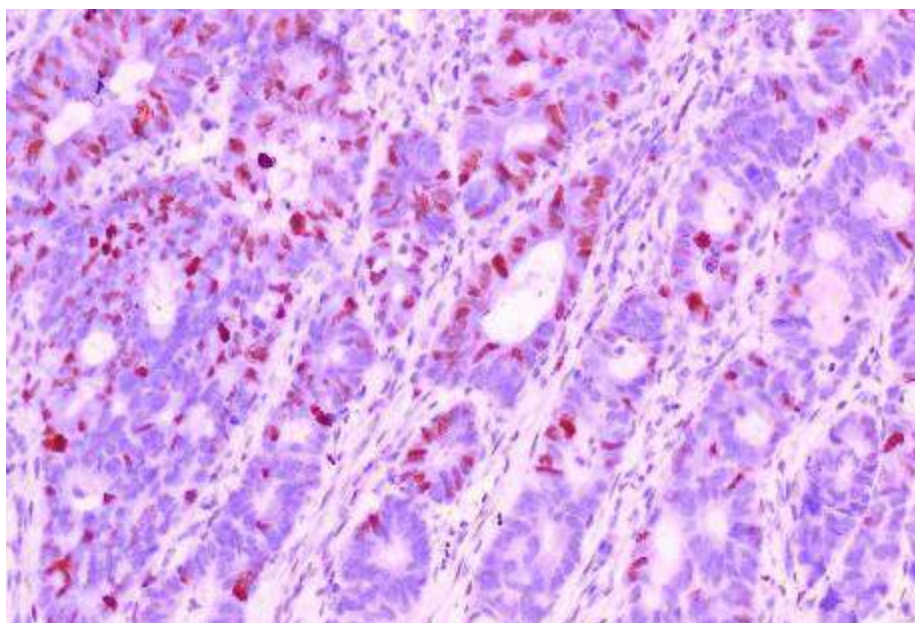


Рис. 4.3 – Середній рівень ядерної експресії Ki-67 в колоректальній аденокарциномі III pTNM стадії. Мо *a-Hu Ki-67 Antigen, Clone SP6*.

36. × 200.

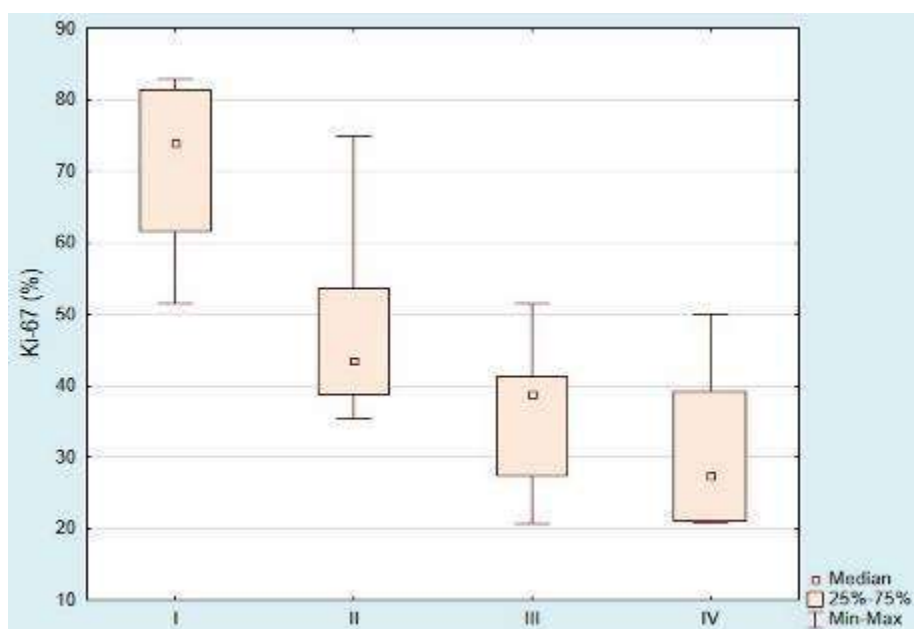


Рисунок 4.4 – Порівняльний аналіз показників клітинної проліферації (оціненою за імуногістохімічною експресією Ki-67) в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Апоптотичні властивості КРА були досліджені шляхом паралельного МГ і ПГХ дослідження рівня транскрипційної активності мРНК кодуючого гену *TP53* у порівнянні з ПГХ експресією p53 та каспази-3 в одних і тих же зразках карциноми на I, II, III, IV стадіях її прогресування.

За результатами МГ дослідження встановлено, що КРА характеризується підвищеною транскрипційною активністю гену *TP53*: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену складає 3,50 (2,30 ; 6,50). 100 % досліджуваних зразків характеризувались підвищеними показниками експресії мРНК *TP53*. Аналіз показників експресії мРНК *TP53* за стадіями прогресування КРА виявив чітку тенденцію до їх підвищення: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в КРА I стадії складає 2,15 (0,82 ; 2,30), медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в КРА II стадії складає 2,80 (1,32 ; 4,50), медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в КРА III стадії складає 3,80 (2,32 ; 6,50), медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в КРА IV стадії складає 7,80 (5,99 ; 8,92) (рис. 4.5).

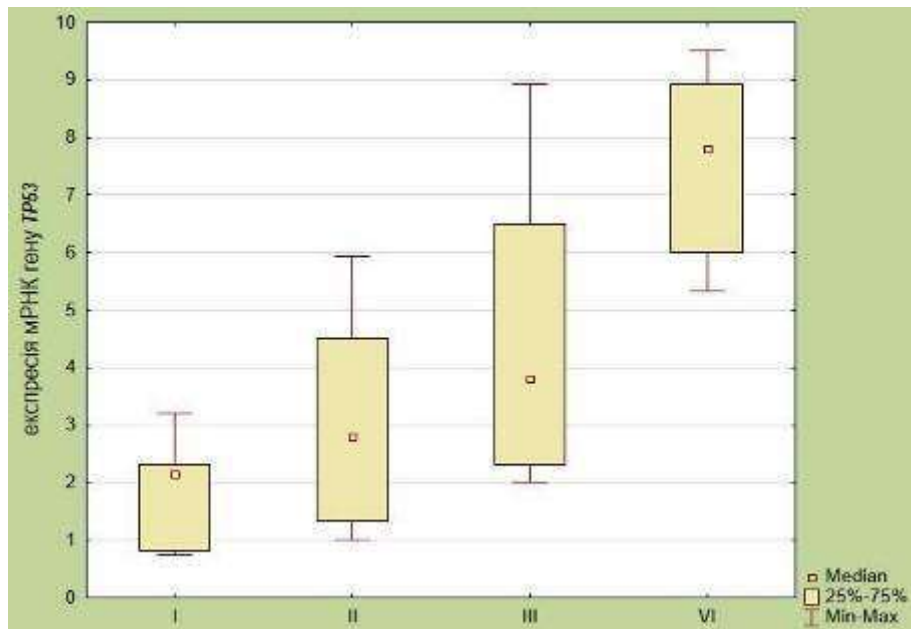


Рисунок 4.5 – Порівняльний аналіз показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Ці результати узгоджуються з результатами імуногістохімічного дослідження експресії онкопротеїну p53, за якими встановлено, що колоректальна аденокарцинома характеризується середнім рівнем накопичення онкопротеїну p53: медіана експресії маркера в карциномі дорівнює 52,59 (51,14 ; 28,49) % (рис. 4.6). Рівень накопичення p53 в пухлині в послідовності від I до IV стадії прогресування КРА зростає наступним чином: медіана експресії p53 клітинами КРА I стадії дорівнює 25,39 (13,56 ; 30,32) %, медіана експресії p53 клітинами КРА II стадії дорівнює 29,16 (22,10 ; 61,64) %, медіана експресії p53 клітинами КРА III стадії дорівнює 58,72 (49,66 ; 86,35) %, медіана експресії p53 клітинами КРА IV стадії дорівнює 80,31 (68,08 ; 91,48) %.

Таким чином, має місце тенденція до накопичення онкопротеїну p53 при прогресії КРА від I до IV стадії (рис. 4.7), що узгоджується із результатами паралельно проведеного МГ дослідження (рис. 4.5).

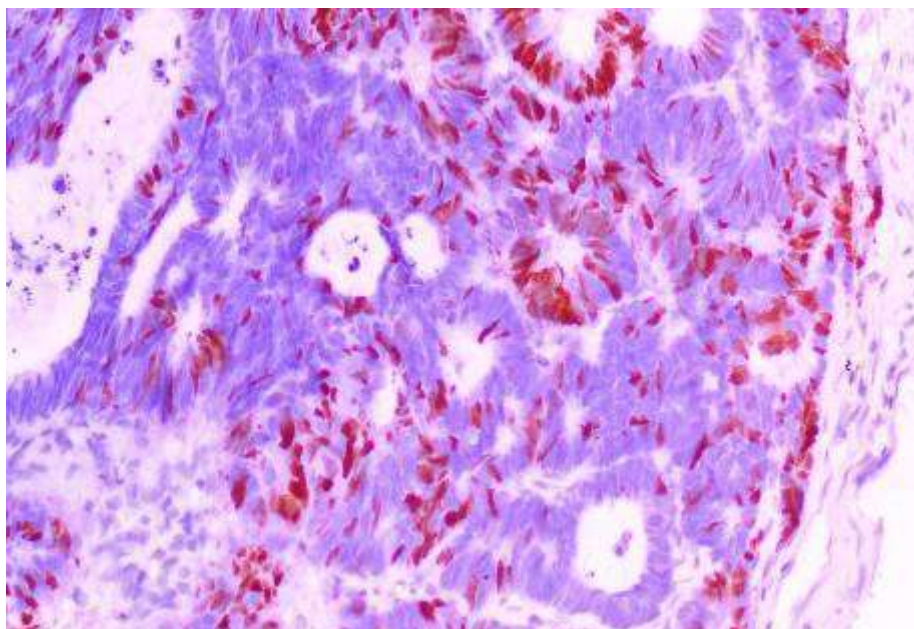


Рисунок 4.6 – Середній рівень ядерної експресії p53 в колоректальній аденокарциномі III pTNM стадії. *Mo a-Hu p53 Protein, Clone SP5.*

36. ×200.

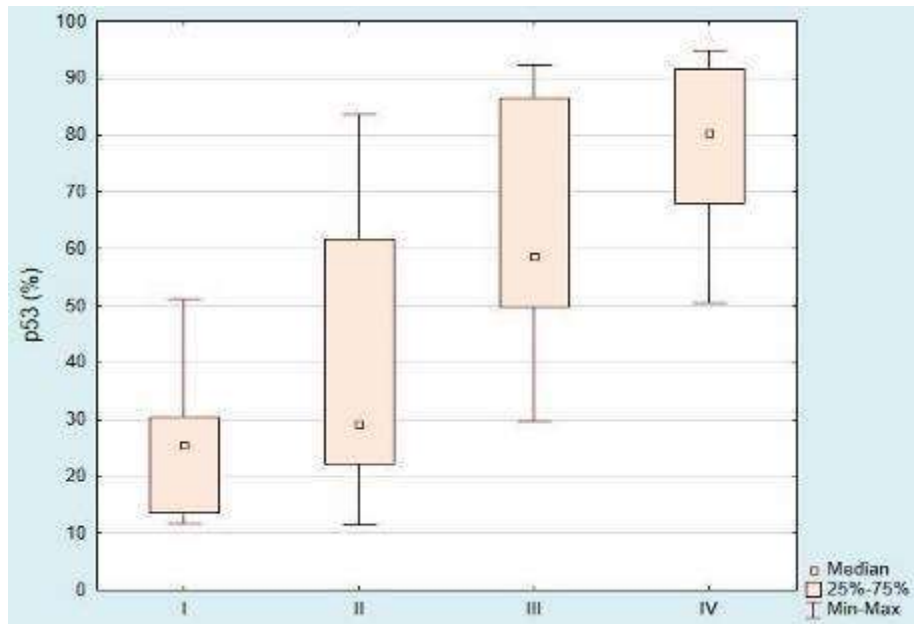


Рисунок 4.7 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії p53 клітинами колоректальної аденокарциноми I, II, III, IV стадій.

За результатами ІГХ дослідження також встановлено, що КРА характеризується низьким рівнем апоптозу: медіана експресії каспази-3 клітинами карциноми дорівнює 37,78 (26,27 ; 54,60) УООЩ (рис. 4.8). Рівень апоптозу за експресією каспази-3 також був оцінений окремо для кожної pTNM стадії КРА. Отримано наступні дані: медіана експресії каспази-3 клітинами КРА I стадії дорівнює 54,60 (52,53 ; 62,48) УООЩ, медіана експресії каспази-3 клітинами II стадії дорівнює 53,82 (39,38 ; 67,73) УООЩ, медіана експресії каспази-3 клітинами III стадії дорівнює 33,63 (26,84 ; 35,34) УООЩ, медіана експресії каспази-3 клітинами IV стадії дорівнює 25,66 (18,03 ; 26,27) УООЩ.

Таким чином, має місце тенденція до зниження рівня апоптозу при прогресії КРА від I до IV стадії. При цьому достовірна різниця наявна між показниками, отриманими для II та III стадій: 53,82 (39,38 ; 67,73) УООЩ II стадії vs. 33,63 (26,84 ; 35,34) III стадії ($p < 0,05$; рис. 4.9). Медіана експресії каспази-3 клітинами КРА III стадії є достовірно на 37,52 % нижчою в порівнянні із медіаною експресії каспази-3 клітинами КРА II стадії.

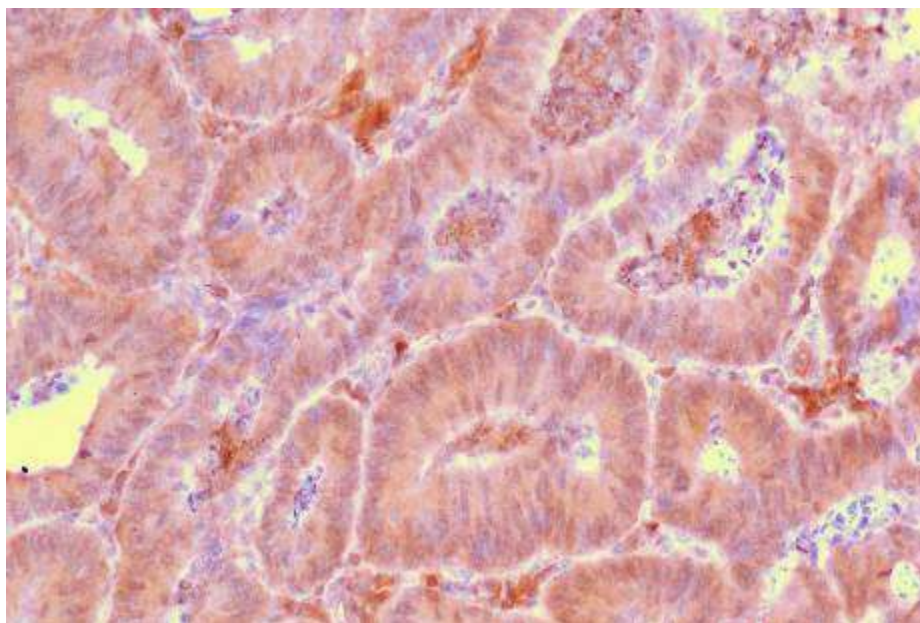


Рисунок 4.8 – Низький рівень ядерно-цитоплазматичної експресії каспази-3 в колоректальній аденокарциномі II pTNM стадії.. *Mo a-Hu Caspase 3 Ab-3, Clone 3CSP. 3б. × 200.*

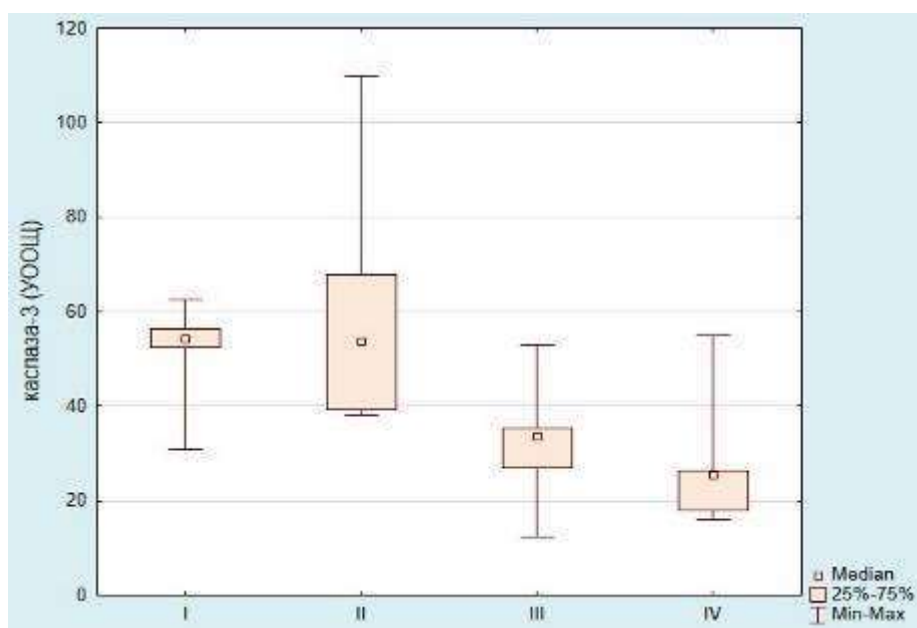


Рисунок 4.9 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії каспази-3 клітинами колоректальної аденокарциноми I, II, III, IV стадій.

В контексті вивчення проліферативно-апоптотичних властивостей КРА було також досліджено рівень транскрипційної активності гену *KRAS* на кожній з досліджуваних стадій прогресування пухлини. За результатами МГ

дослідження встановлено, що КРА характеризується підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS*: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену складає 1,66 (1,19 ; 2,91).

При цьому переважна більшість досліджуваних зразків (87,5 %) характеризувалась підвищеними показниками експресії мРНК *KRAS*, а 12,5 % досліджуваних зразків характеризувались показниками, що були зниженими відносно показників НСО. Згідно критерію χ^2 зразки з підвищеними показниками експресії мРНК *KRAS* траплялись достовірно частіше ($p < 0,05$).

Аналіз показників експресії мРНК *KRAS* за стадіями прогресування КРА виявив тенденцію до їх збільшення в послідовності від I до IV стадії: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в зразках КРА I стадії складає 0,42 (0,36 ; 0,43) і є зниженою в 80 % зразків; медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в зразках КРА II стадії складає 1,31 (1,09 ; 2,91), 70 % зразків характеризуються підвищеними показниками експресії мРНК гену; медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в зразках КРА III стадії складає 1,75 (1,31 ; 2,93), 100% зразків характеризуються підвищеними показниками експресії мРНК гену; медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в зразках КРА IV стадії складає 2,91 (1,85 ; 3,50) і є підвищеною в 100 % зразків (рис. 4.10).

За допомогою кореляційного аналізу виявлено низку асоціацій між рівнями експресії досліджуваних ІГХ і МГ маркерів в КРА (табл. 4.1). По-перше, треба зазначити, що за допомогою кореляційного аналізу підтверджено узгодження даних паралельних імуногістохімічних і молекулярно-генетичних досліджень: наявний зв'язок між середнім рівнем експресії Ki-67 і зниженою експресією мРНК *Ki-67* ($r = 0,52$, $p < 0,05$) в колоректальній аденокарциномі, а також між середнім рівнем експресії p53 і підвищеною експресією мРНК *TP53* ($r = 0,71$, $p < 0,05$) в досліджених зразках карциноми.

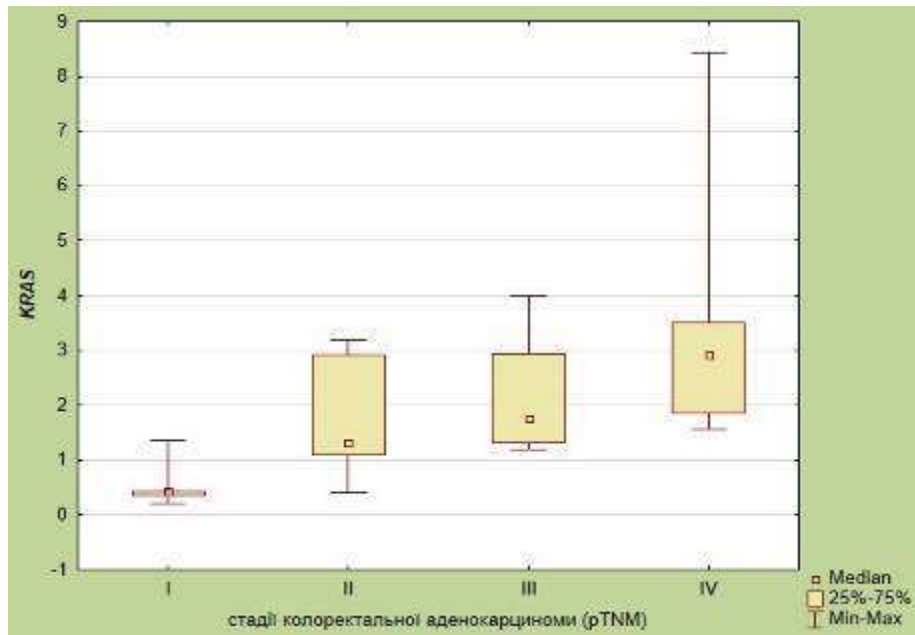


Рисунок 4.10 – Порівняльний аналіз показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Таблиця 4.1 – Кореляційні зв'язки між рівнями експресії Ki-67, p53, каспази-3, а також рівнями експресії мРНК *Ki-67*, *TP53*, *KRAS* в колоректальній аденокарциномі

	Ki-67	p53	каспаза-3	мРНК <i>Ki-67</i>	мРНК <i>TP53</i>	мРНК <i>KRAS</i>
Ki-67	1,00	0,34	0,70*	0,52*	-0,18	-0,26
p53	0,34	1,00	0,32	0,28	0,71*	0,38
каспаза-3	0,70*	0,32	1,00	-0,20	0,19	-0,44*
мРНК <i>Ki-67</i>	0,52*	0,28	-0,20	1,00	0,15	-0,19
мРНК <i>TP53</i>	-0,18	0,71*	0,19	0,15	1,00	0,43*
мРНК <i>KRAS</i>	-0,26	0,38	-0,44*	-0,19	0,43*	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Також встановлено кореляції між підвищеними показниками транскрипції *KRAS* і низьким рівнем ІГХ експресії каспази-3 ($r = -0,44$, $p < 0,05$), підвищеними показниками транскрипції *KRAS* і *TP53* ($r = 0,43$, $p < 0,05$), а також між середнім рівнем ІГХ експресії Ki-67 і низьким рівнем експресії каспази-3 ($r = 0,71$, $p < 0,05$) в КРА.

Таким чином було вивчено основні ІГХ і МГ характеристики проліферативно-апоптотичних властивостей клітин КРА на кожній із чотирьох послідовних стадій її прогресування.

4.2 Імуногістохімічні показники неоангіогенезу в колоректальній аденокарциномі

При визначенні ІГХ показників неоангіогенезу в КРА з використанням VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 і CD34 отримані наступні результати.

Встановлено, що мембрано-цитоплазматична експресія VEGF-A виявляється в ракових клітинах, клітинах стромі і ендотеліоцитах судин КРА в 100 % досліджених випадків. За результатами цифрової морфометрії КРА характеризується середнім рівнем експресії VEGF-A, медіана якої становить 70,31 (53,05 ; 84,62) УООЩ (рис. 4.11).

Рівень експресії VEGF-A на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА має наступні особливості: в I стадії медіана експресії VEGF-A дорівнює 37,80 (30,22 ; 56,89) УООЩ; в II стадії медіана експресії VEGF-A зростає і сягає 88,50 (63,00 ; 115,00) УООЩ; в III стадії медіана експресії VEGF-A складає 79,34 (63,14 ; 84,99) УООЩ; в IV стадії медіана експресії VEGF-A дорівнює 84,69 (80,66 ; 110,28) УООЩ.

Таким чином, встановлено статистично значуще зростання рівня експресії VEGF-A при прогресуванні КРА від I до II стадії: 37,80 (30,22 ; 56,89) УООЩ I стадії vs. 88,50 (63,00 ; 115,00) УООЩ II стадії ($p < 0,05$; рис. 4.12). Медіана експресії VEGF-A клітинами КРА II стадії є достовірно на 57,29 % вищою в порівнянні із медіаною експресії VEGF-A клітинами КРА I стадії.

Показники експресії VEGF-A клітинами КРА II-IV стадій коливаються у відносно вузькому діапазоні та статистично значущо не відрізняються: 88,50 (63,00 ; 115,00) УООЩ II стадії vs. 79,34 (63,14 ; 84,99) УООЩ III стадії ($p > 0,05$), 79,34 (63,14 ; 84,99) УООЩ III стадії vs. 84,69 (80,66 ; 110,28)

УООЩ IV стадії ($p > 0,05$). Звертає на себе увагу, що достовірне зростання рівня експресії VEGF-A відбувається саме при прогресуванні ранніх стадій КРА – від I до II стадії.

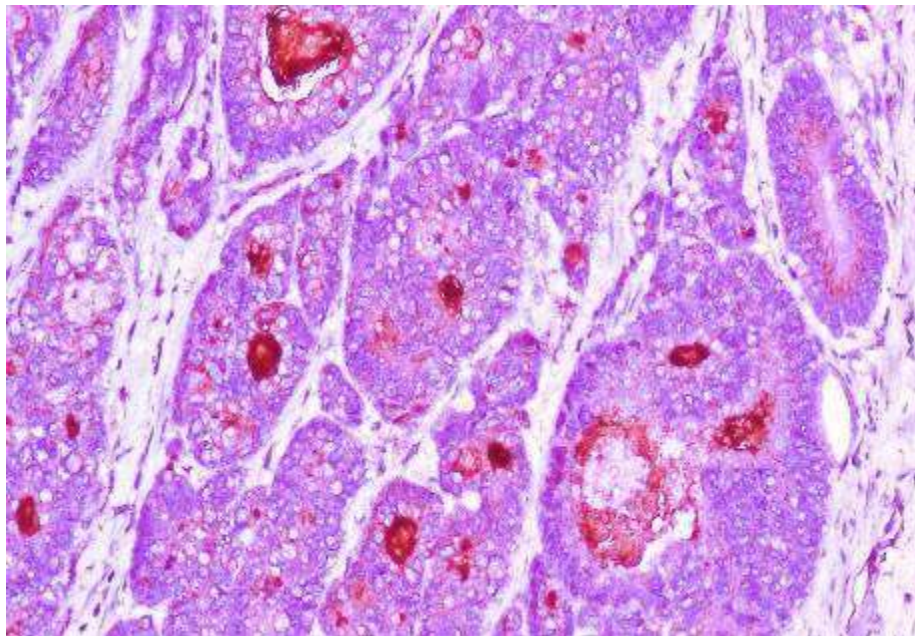


Рисунок 4.11 – Середній рівень мембранно-цитоплазматичної експресії VEGF-A в колоректальній аденокарциномі II стадії. Мо *a-Hu VEGF Ab-3*, Clone *JH121*. 36. × 200.

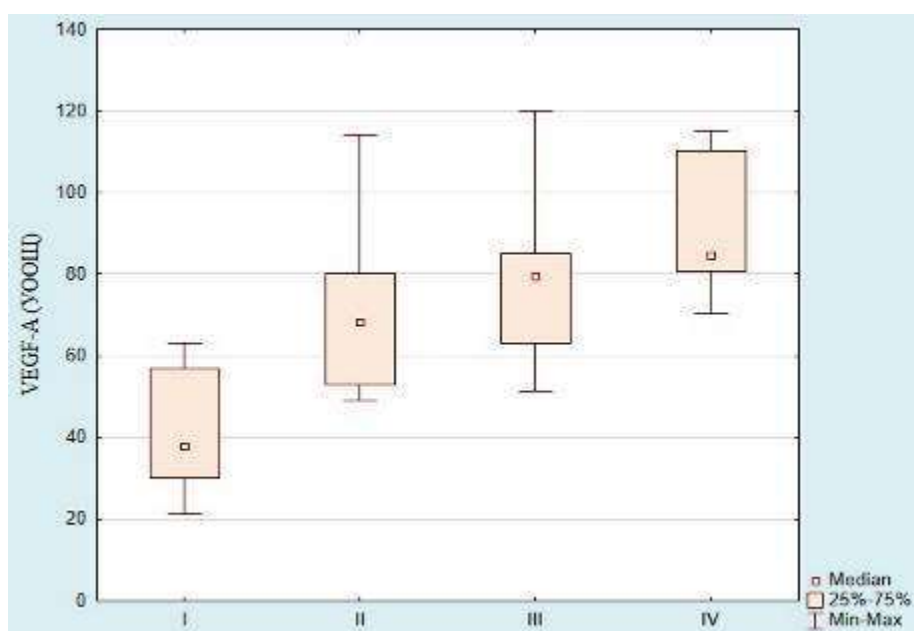


Рисунок 4.12 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії VEGF-A клітинами колоректальної аденокарциноми I, II, III, IV стадій.

Встановлено також, що мембрано-цитоплазматична експресія VEGFR-1 виявляється лише в клітинах стромы КРА на II-IV стадіях її прогресування (КРА I стадії характеризується виключно негативною ІГХ реакцією з VEGFR-1). КРА II-IV стадій характеризується низьким рівнем експресії VEGFR-1, медіана якої складає 23,15 (15,96 ; 30,23) УООЩ (рис. 4.13). При цьому в КРА II стадії позитивна ІГХ реакція з антитілами до VEGFR-1 виявляється в 40 % випадків, медіана експресії маркера складає 19,58 (15,78 ; 23,02) УООЩ. В КРА III стадії позитивна ІГХ реакція з антитілами до VEGFR-1 виявляється в 60 % випадків, медіана експресії маркера дорівнює 23,15 (22,29 ; 30,02) УООЩ. В КРА IV стадії позитивна ІГХ реакція з антитілами до VEGFR-1 виявляється також в 60 % випадків, медіана експресії VEGFR-1 сягає 28,74 (15,64 ; 33,17) УООЩ. Згідно критерію χ^2 VEGFR-1-імунопозитивні випадки КРА II-IV стадій, визначаються достовірно частіше VEGFR-1-імунонегативних випадків ($p < 0,05$). Статистично значуща різниця між показниками експресії VEGFR-1 на II, III, IV стадіях прогресування КРА відсутня ($p > 0,05$).

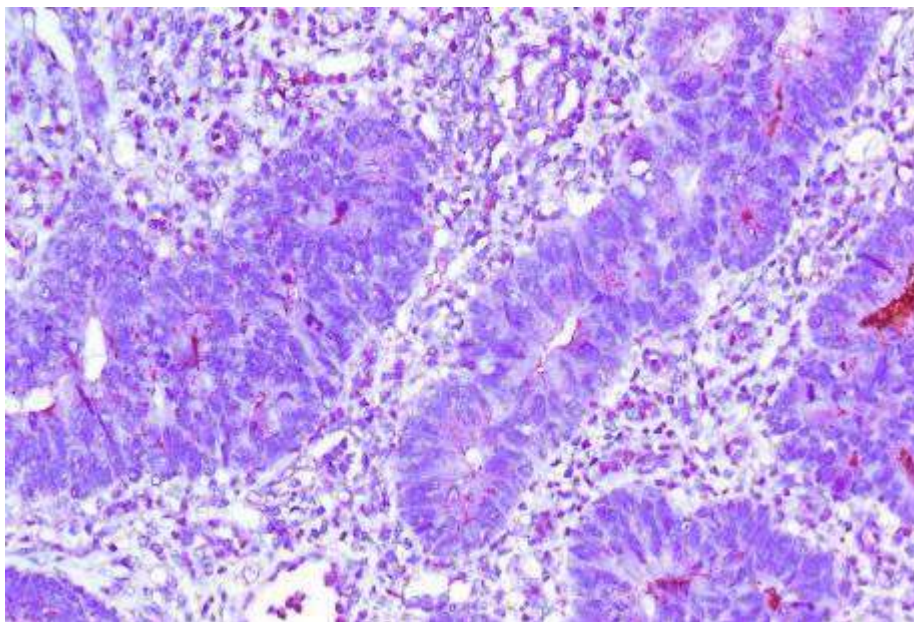


Рис. 4.13 Низький рівень мембрано-цитоплазматичної експресії VEGFR-1 в колоректальній аденокарциномі II стадії. *Rb a Hu VEGFR-1*. 36. \times 200.

Мембрано-цитоплазматична експресія VEGFR-2 виявляється в ракових клітинах і ендотеліоцитах судин КРА в 100 % досліджених випадків. Встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем експресії VEGFR-2, медіана якої становить 85,68 (64,65 ; 110,64) УООЩ (рис. 4.14).

На I-IV стадіях прогресування КРА рівень експресії VEGFR-2 змінюється наступним чином: в I стадії медіана експресії VEGFR-2 дорівнює 52,75 (39,14 ; 70,22) УООЩ; в II стадії медіана експресії VEGFR-2 складає 82,71 (63,14 ; 111,19) УООЩ; в III стадії медіана експресії VEGFR-2 сягає 104,17 (96,04 ; 111,02) УООЩ; в IV стадії медіана експресії VEGFR-2 дорівнює 99,91 (86,15 ; 120,29) УООЩ.

Таким чином, встановлено статистично значуще зростання рівня експресії VEGFR-2 при прогресуванні КРА від I до II стадії: 52,75 (39,14 ; 70,22) УООЩ I стадії vs. 82,71 (63,14 ; 111,19) УООЩ II стадії ($p < 0,05$; рис. 4.15). Медіана експресії VEGFR-2 клітинами КРА II стадії є достовірно на 36,23 % вищою в порівнянні із медіаною експресії VEGFR-2 клітинами КРА I стадії.

Показники експресії VEGFR-2 клітинами КРА II-IV стадій дещо коливаються, проте, статистично значущо не відрізняються: 82,71 (63,14 ; 111,19) УООЩ II стадії vs. 104,17 (96,04 ; 111,02) УООЩ III стадії ($p > 0,05$), 104,17 (96,04 ; 111,02) УООЩ III стадії vs. 99,91 (86,15 ; 120,29) УООЩ IV стадії ($p > 0,05$). Так, медіана експресії VEGFR-2 клітинами КРА III стадії є дещо вищою за медіану експресії VEGFR-2 клітинами КРА II стадії, проте статистично значущо не відрізняється. А медіана експресії VEGFR-2 клітинами КРА IV є навіть дещо нижчою за медіану експресії VEGFR-2 клітинами КРА III стадії, проте також статистично значущо не відрізняється.

Звертає на себе увагу, що достовірне зростання медіани експресії VEGFR-2 відбувається саме при прогресуванні ранніх стадій колоректальної аденокарциноми – від I до II стадії. Це спостереження є аналогічним попередньому: в цьому дослідженні також було показано, що достовірне

зростання рівня експресії VEGF-A відбувається саме при прогресуванні КРА від I до II стадії.

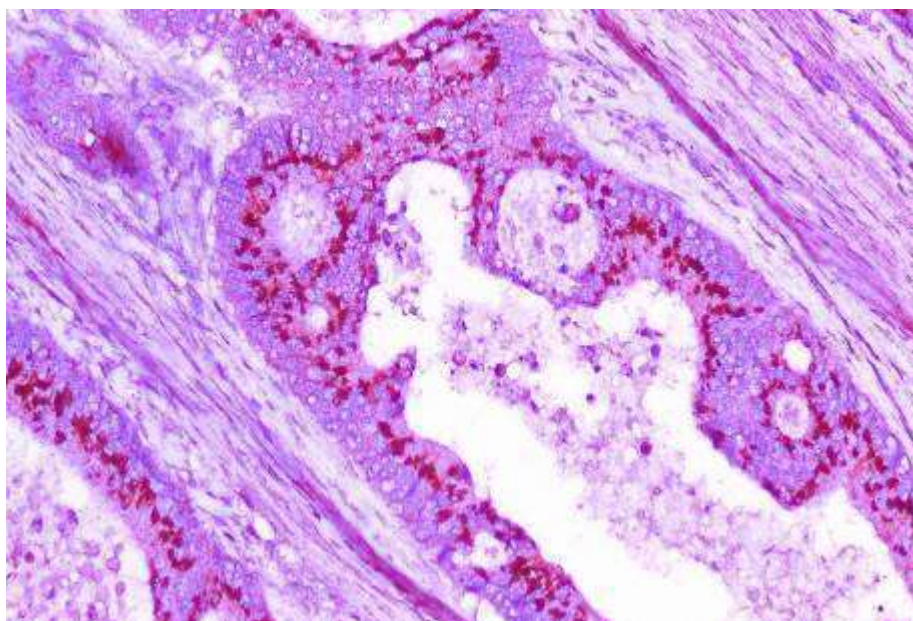


Рисунок 4.14 – Середній рівень мембранно-цитоплазматичної експресії VEGFR-2 в колоректальній аденокарциномі II стадії. *Rb a Hu VEGFR2 Ab-1*.
36. × 200.

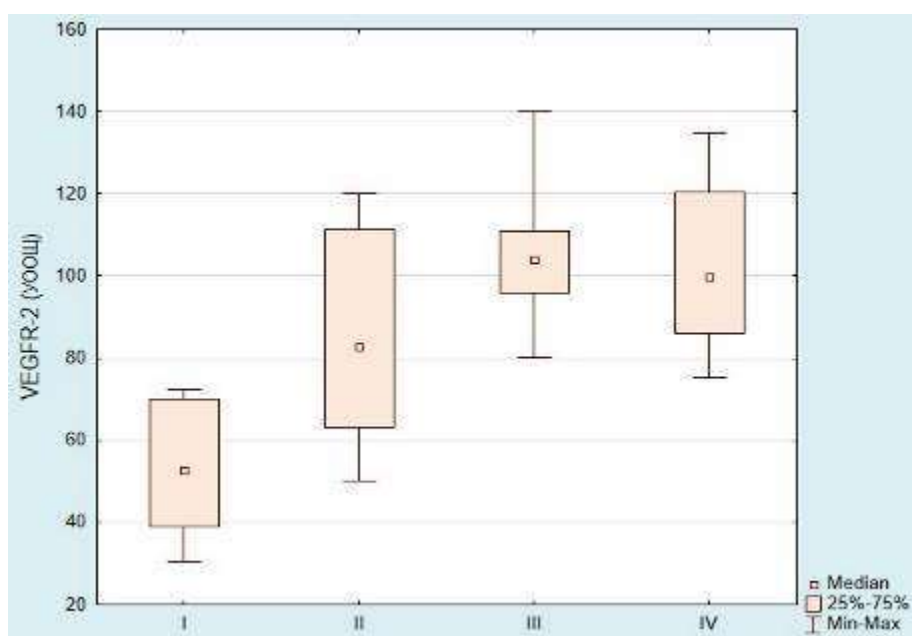


Рисунок 4.15 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії VEGFR-2 клітинами колоректальної аденокарциноми I, II, III, IV стадій.

Мембранна експресія CD34 виявляється в 100 % досліджених випадків виключно в ендотеліоцитах судин КРА. Встановлено, що медіана кількості мікросудин в СПЗМ, визначена в колоректальній аденокарциномі за експресією CD34, дорівнює медіані 94,50 (72,50 ; 114,00) (рис. 4.16). Показники кількості мікросудин в СПЗМ на II-IV стадіях прогресування КРА мають наступні параметри: в I стадії КРА медіана кількості мікросудин в СПЗМ складає 91,50 (51,00 ; 111,00); в II стадії КРА медіана кількості мікросудин в СПЗМ складає 88,50 (63,00 ; 115,00); в III стадії КРА цей показник дорівнює 96,50 (72,00 ; 128,00); в IV стадії – складає 95,00 (80,00 ; 115,00). При цьому різниця між показниками кількості мікросудин в СПЗМ в карциномі I, II, III і IV стадій не є статистично значущою ($p > 0,05$).

За результатами кореляційного аналізу рівнів експресії ІГХ маркерів неангіогенезу в КРА визначена наявність прямого сильного ($r = 0,85$, $p < 0,05$) кореляційного зв'язку між середніми рівнями експресії VEGF-A і VEGFR-2 (табл. 4.2). Статистично значущих кореляцій між рівнями ІГХ експресії інших досліджених маркерів неангіогенезу в колоректальній аденокарциномі не виявлено.

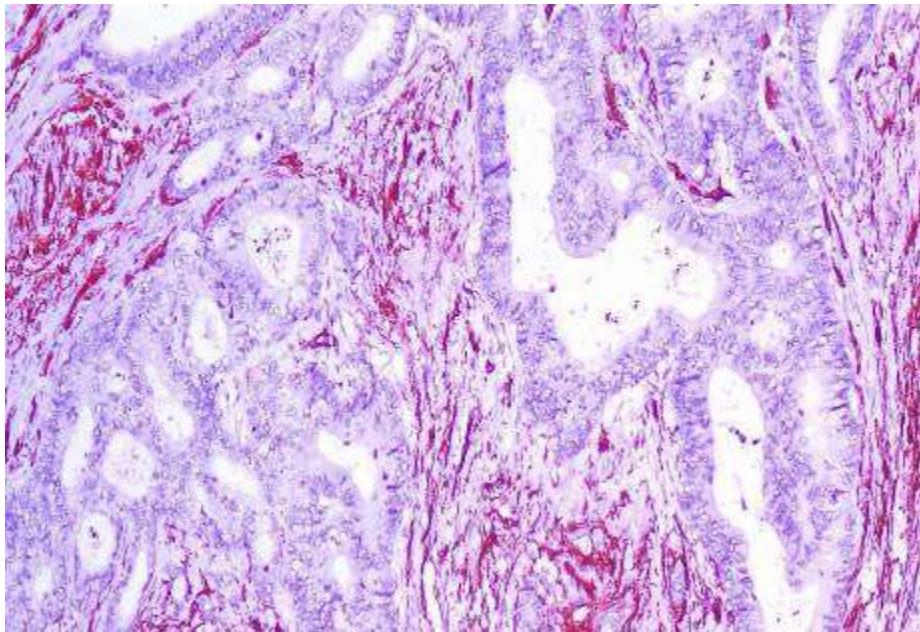


Рисунок 4.16 – Експресія CD34 в колоректальній аденокарциномі.
Mo a-Hu CD34, Clone QBEnd/10. 36. × 100.

Таблиця 4.2 – Кореляційні зв'язки між рівнями експресії VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34 в колоректальній аденокарциномі

	VEGF-A	VEGFR-1	VEGFR-2	CD34
VEGF-A	1,00	0,37	0,85*	0,34
VEGFR-1	0,37	1,00	0,31	0,14
VEGFR-2	0,85*	0,31	1,00	0,26
CD34	0,34	0,14	0,26	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Таким чином вивчено основні ІГХ параметри неоангіогенезу в КРА на кожній із чотирьох послідовних стадій її прогресування.

4.3 Характеристика експресії маркерів стовбурових клітин в колоректальній аденокарциномі

Стовбурові клітини та стовбурові властивості (“stemness”) інших клітин КРА вивчені з використанням ІГХ маркерів CD44, ALDH1, EpCAM.

Встановлено, що мембранно-цитоплазматична експресія CD44 виявляється в клітинах строми КРА. Медіана кількості CD44-ІМПЗ клітин в КРА дорівнює 61,26 (42,58 ; 79,15) % (рис. 4.17).

Проведено також оцінку медіани кількості CD44+ клітин на кожній із стадій прогресування КРА. Визначено, що медіана кількості CD44+ клітин в КРА I стадії дорівнює 31,41 (19,87 ; 42,15) %, в II стадії цей показник дорівнює 48,26 (35,44 ; 61,45) %, в III стадії – сягає 78,36 (61,13 ; 80,06) %, в IV стадії медіана кількості CD44+ клітин складає 75,75 (69,35 ; 80,33) %. Таким чином, виявлена тенденція до зростання кількості CD44+ клітин в КРА на I-IV стадіях її прогресування, за наявності статистично значущої різниці між показниками кількості CD44+ клітин в КРА I – III стадій ($p < 0,05$; рис. 4.18).

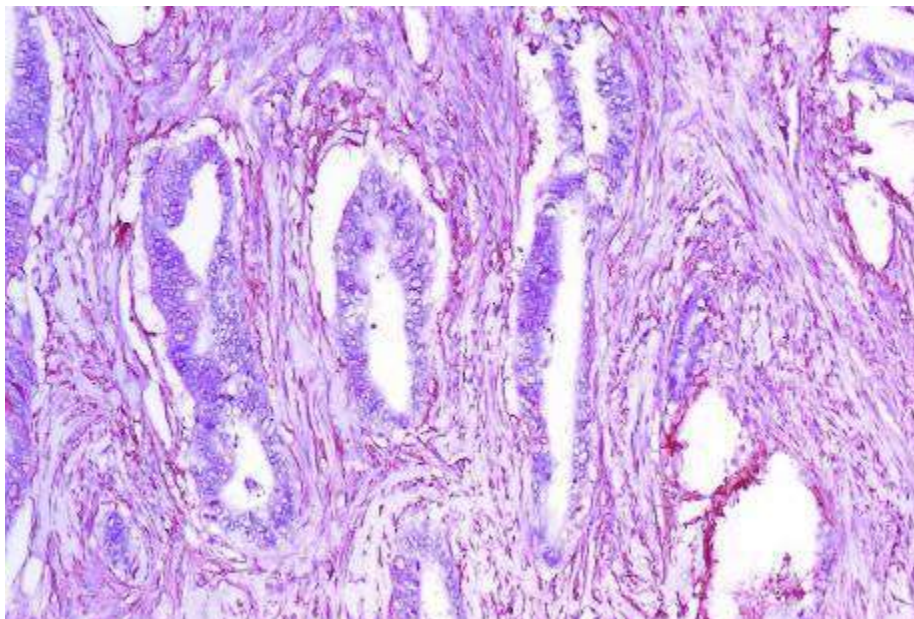


Рисунок 4.17 – Мембрано-цитоплазматична експресія CD44 клітинами стромы колоректальної аденокарциноми. *Mo a Hu CD44 Std./HCAM Ab-4 Clone 156-3C11*. 36. × 100.

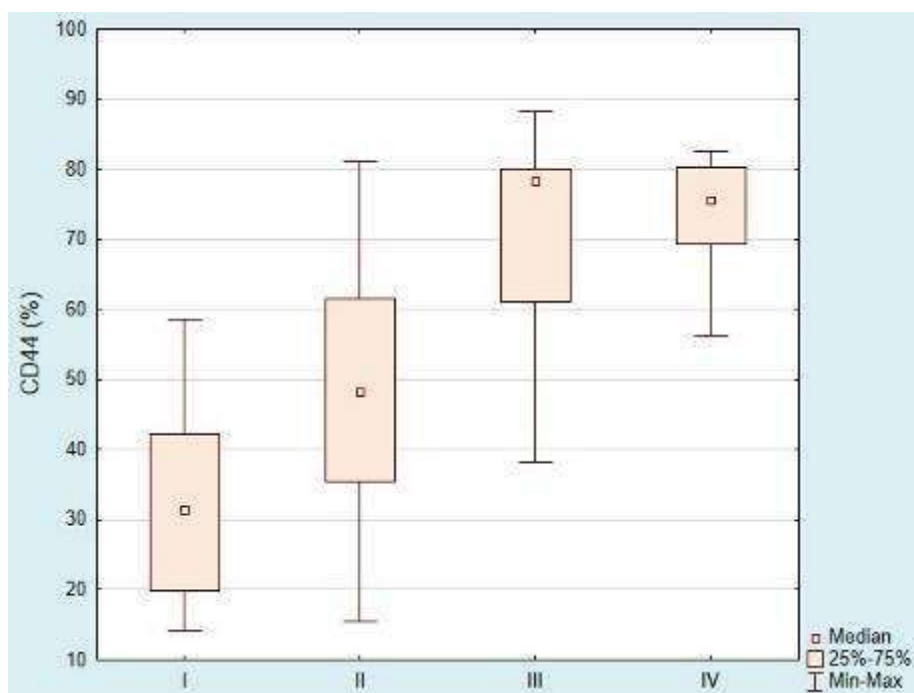


Рисунок 4.18 – Порівняльний аналіз кількості CD44+ клітин в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Визначено, що цитоплазматична експресія ALDH1 виявляється в клітинах стромы (в 100 % досліджених випадків КРА) і в ракових клітинах

(в 50 % досліджених випадків КРА II-IV стадій). Медіана кількості ALDH1-ІМПЗ клітин стромы КРА становить 40,22 (22,54 ; 47,77) %, медіана кількості ALDH1-ІМПЗ ракових клітин КРА дорівнює 42,15 (32,06 ; 50,42) % (рис. 4.19).

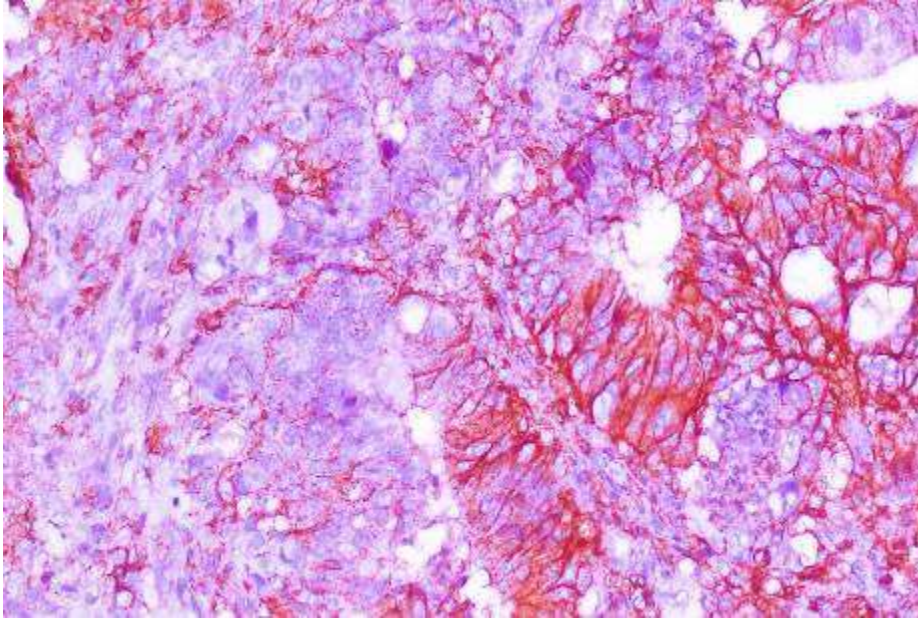


Рисунок 4.19 – Цитоплазматична експресія ALDH1 раковими і стромальними клітинами колоректальної аденокарциноми. *Rb a Hu ALDH1A1*. 35. × 100.

Проведено також оцінку медіан кількості ALDH1+ клітин стромы і ракових клітин на кожній із стадій прогресування КРА. Встановлено, що медіана кількості ALDH1+ стромы в КРА I стадії дорівнює 20,66 (18,51 ; 21,47) %, в II стадії цей показник складає 25,75 (20,56 ; 32,86) %, в III стадії цей показник збільшується до 44,93 (41,17 ; 50,01) %, а в IV стадії – сягає 48,36 (42,15 ; 55,17) %. Медіана кількості ALDH1+ ракових клітин в КРА II стадії дорівнює 37,17 (31,07 ; 47,18) %, в КРА III стадії цей показник складає 34,25 (26,47 ; 42,15) %, а в КРА IV стадії – збільшується до 50,56 (45,84 ; 61,38) %.

Таким чином, виявлено зростання кількості ALDH1-ІМПЗ клітин в КРА при її прогресуванні, з наявністю статистично значущої різниці між показниками кількості ALDH1+ клітин стромы в КРА I – III стадій (зростання

на 54,02 %, $p < 0,05$, рис. 4.20), а також між показниками кількості ALDH1+ ракових клітин в КРА III – IV стадій (зростання на 32,26 %, $p < 0,05$, рис. 4.21).

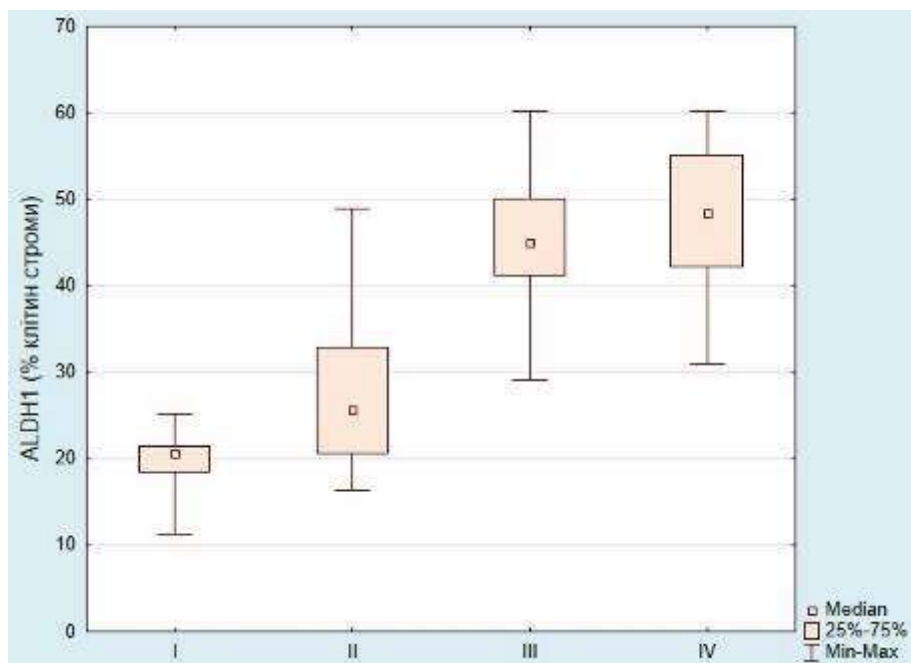


Рисунок 4.20 – Порівняльний аналіз кількості ALDH1+ клітин стромы в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

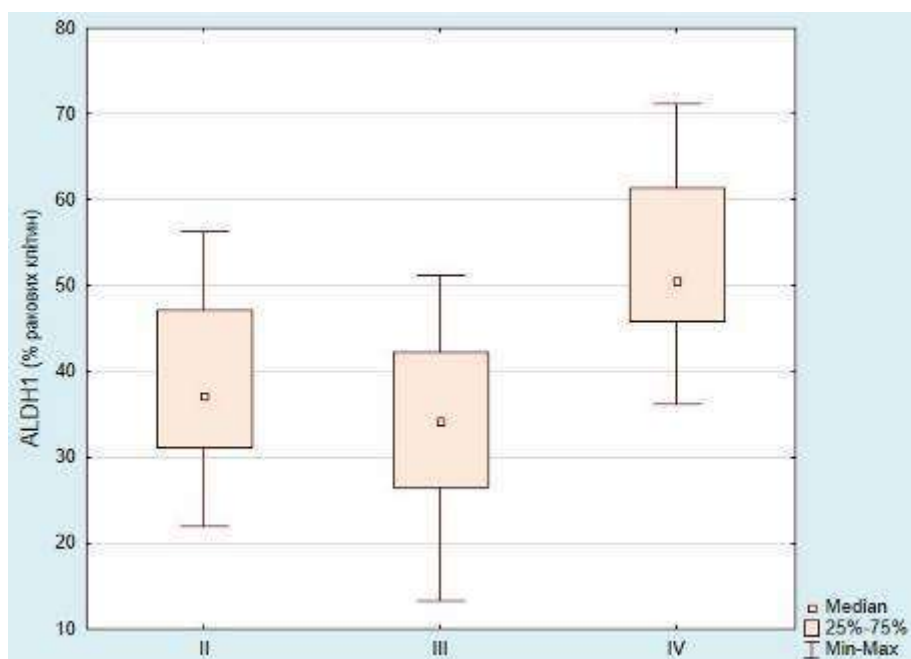


Рисунок 4.21 – Порівняльний аналіз кількості ALDH1+ ракових клітин в колоректальній аденокарциномі II, III, IV стадій.

При ІГХ дослідженні встановлено, що експресія ЕрСМ в КРА є мембрано-цитоплазматичною та виявляється в ракових клітинах. КРА характеризується середнім рівнем експресії ЕрСМ, медіана якої складає 90,86 (80,24 ; 99,02) УООЩ (рис. 4.22).

Показники експресії ЕрСМ на I-IV стадіях прогресування КРА змінюються наступним чином. Медіана експресії ЕрСМ раковими клітинами в КРА I стадії дорівнює 76,18 (72,69 ; 80,24) УООЩ, в КРА II стадії – дорівнює 83,96 (78,17 ; 90,55) УООЩ, в КРА III стадії – складає 92,33 (91,18 ; 105,34) УООЩ, в КРА IV стадії – сягає 107,85 (96,78 ; 120,34) УООЩ. Таким чином, виявлено зростання експресії ЕрСМ в ракових клітинах КРА при її прогресуванні, з наявністю статистично значущої різниці між показниками експресії ЕрСМ раковими клітинами КРА II–IV стадій. Медіана експресії ЕрСМ раковими клітинами КРА IV стадії є статистично значущо на 22,16 % вищою за медіану експресії ЕрСМ раковими клітинами КРА II стадії ($p < 0,05$; рис. 4.23).

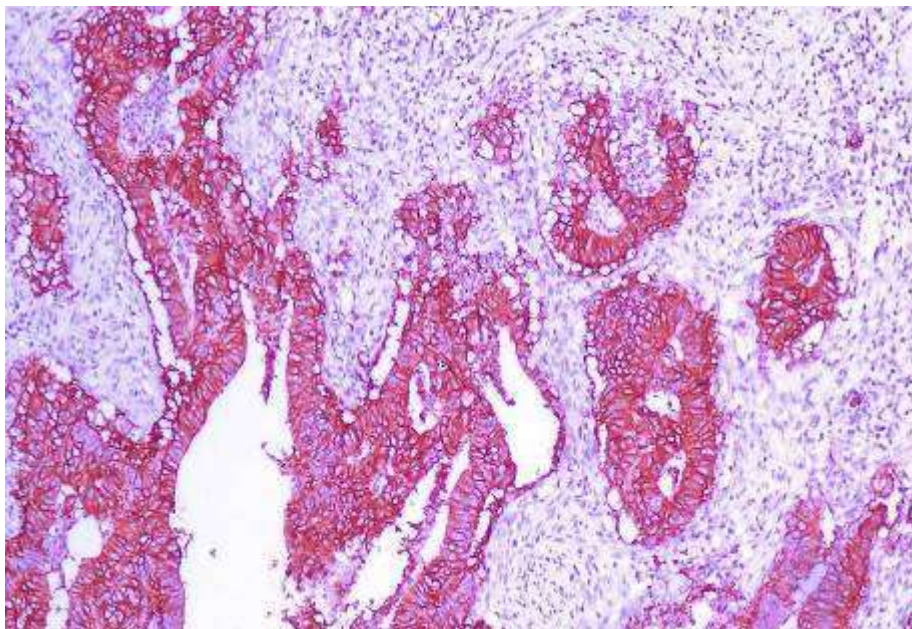


Рисунок 4.22 – Мембрано-цитоплазматична експресія ЕрСМ раковими клітинами колоректальної аденокарциноми. *Rb a Hu ErCAM*. 36. × 100.

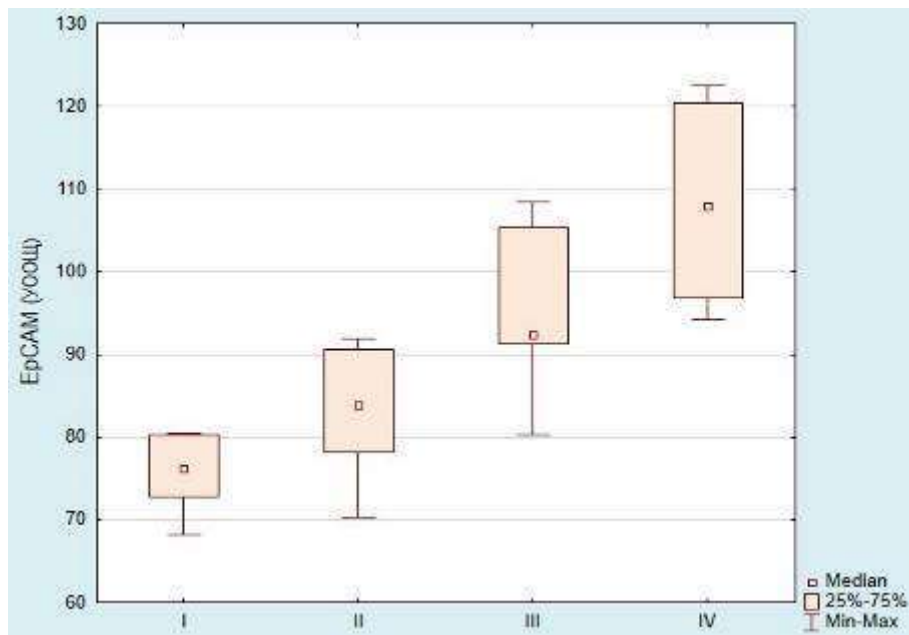


Рисунок 4.23 – Порівняльний аналіз рівнів експресії ЕрСАМ в колоректальній аденокарциномі II, III, IV стадій.

Результати проведеного кореляційного аналізу вказують на наявність взаємозв'язків між показниками експресії ІГХ маркерів стовбурових клітин і показниками експресії маркерів проліферативно-апоптотичної активності клітин КРА (табл. 4.3). Перш за все, встановлено прямий середньої сили зв'язок між показниками кількості ALDH1+ клітин строми і ракових клітин ($r = 0,55$, $p < 0,05$), прямий сильний зв'язок між показниками кількості CD44+ клітин строми і ALDH1+ ракових клітин ($r = 0,78$, $p < 0,05$), а також прямий середньої сили зв'язок між показниками кількості CD44+ клітин строми і ЕрСАМ+ ракових клітин ($r = 0,56$, $p < 0,05$). Окрім того, встановлено наступні кореляції: зворотній середньої сили зв'язок між показником кількості CD44+ клітин строми і середнім рівнем проліферативної активності клітин КРА ($r = -0,62$, $p < 0,05$), зворотній слабкий зв'язок між показником кількості ALDH1+ клітин строми і низьким рівнем апоптозу в КРА ($r = -0,49$, $p < 0,05$), прямий слабкий зв'язок між показником кількості ALDH1+ ракових клітин і середнім рівнем накопичення онкопротеїну p53 в КРА ($r = 0,44$, $p < 0,05$).

Таблиця 4.3 – Кореляційні зв'язки між рівнями експресії CD44, ALDH1, EpCAM, Ki-67, p53, каспази-3 в колоректальній аденокарциномі

	CD44	ALDH1 строма	ALDH1 ракові клітини	EpCAM	Ki-67	p53	каспаза-3
CD44	1,00	0,29	0,78*	0,56*	-0,62*	0,26	-0,10
ALDH1 строма	0,29	1,00	0,55*	0,29	-0,10	0,32	-0,49*
ALDH1 ракові клітини	0,78*	0,55*	1,00	0,32	-0,11	0,44*	-0,23
EpCAM	0,56*	0,29	0,32	1,00	-0,19	0,24	0,36
Ki-67	-0,62*	-0,10	-0,11	-0,19	1,00	0,34	0,70*
p53	0,26	0,32	0,44*	0,24	0,34	1,00	0,32
каспаза-3	-0,10	-0,49*	-0,23	0,36	0,70*	0,32	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Таким чином вивчено основні ІГХ характеристики експресії маркерів стовбурових клітин CD44, ALDH1, EpCAM в КРА на кожній із чотирьох послідовних стадій її прогресування.

4.4 Порівняльний аналіз високодиференційованої аденокарциноми і high-grade поліпів дистальної товстої кишки

При мікроскопічному дослідженні встановлено, що високодиференційована (G_1) КРА є схожою з high-grade аденомами і зубчастими утвореннями ДТК: наявні численні залози, в тому числі кістозно розширені та / або розташовані «спинка до спинки», численні мітози, виразне подовження та гіперхромність ядер, які в тій чи іншій мірі зберігають базальну орієнтацію, помітне потоншення муцинового шару, аж до повного його зникнення. При цьому ключовою гістологічною ознакою, що дозволяє відрізнити високодиференційовану карциному від диспластичного поліпа в біоптаті, є інвазія атипичних клітин в субмукозний шар.

ІГХ параметри high-grade аденом і гіперпластичних поліпів ДТК детально охарактеризовані в 3-му розділі (див. табл. 3.1, 3.2 і т. д.)

При ІГХ дослідженні визначено, що високодиференційована КРА I-II стадій характеризується високим рівнем клітинної проліферації: медіана експресії Ki-67 становить 79,66 (73,85; 86,17) %. За результатами порівняльного аналізу встановлено, що високодиференційована КРА I-II стадій характеризується статистично значущо більшим рівнем проліферації за Ki-67 в порівнянні з high-grade традиційними зубчастими аденомами і гіперпластичними поліпами ($p < 0,05$, рис. 4.24). Так, рівень експресії Ki-67 у високодиференційованій КРА I-II стадій є на 13,44 % більшим за рівень експресії цього маркера high-grade традиційними зубчастими аденомами, а також є на 37,20 % більшим за рівень експресії Ki-67 high-grade гіперпластичними поліпами. Класичні high-grade аденоми ДТК (тубулярні, тубуло-ворсинчасті, ворсинчасті аденоми) статистично значущо не відрізняються за рівнем клітинної проліферації ($p > 0,05$, рис. 4.24).

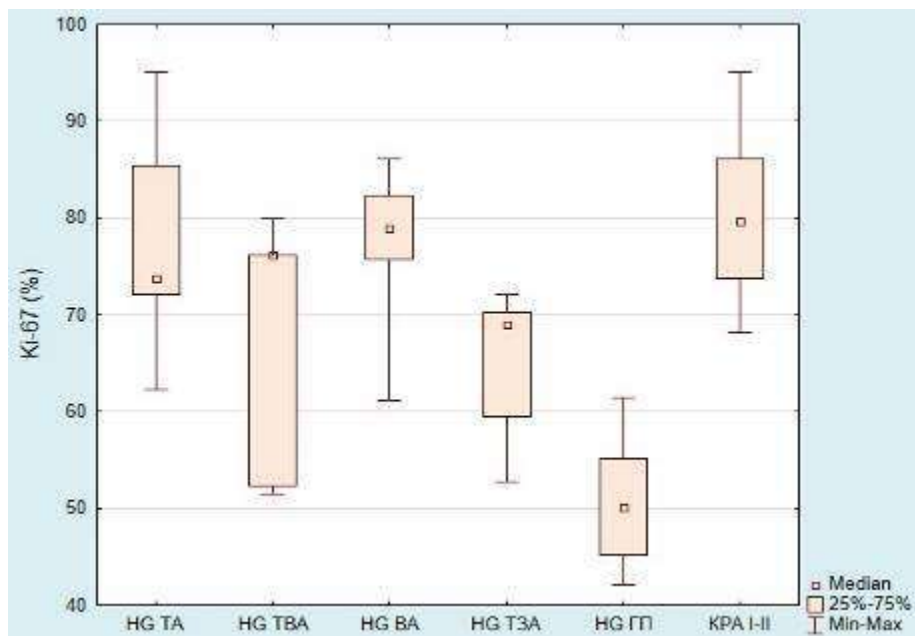


Рисунок 4.24 – Порівняльний аналіз рівнів експресії Ki-67 в high-grade тубулярних аденомах (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденомах (HG TBA), ворсинчастих аденомах (HG BA), традиційних зубчастих аденомах (HG T3A), гіперпластичних поліпах (HG ГП) і у високодиференційованій колоректальній аденокарциномі I-II стадій (КРА I-II).

Встановлено, що у високодиференційованій КРА I-II стадій має місце середній рівень накопичення онкопротеїну p53, а медіана експресії однойменного маркеру становить 70,68 (51,80 ; 89,08) %.

За результатами порівняльного аналізу встановлено, що високодиференційована КРА I-II pTNM стадій характеризується статистично значущо більшим рівнем експресії p53 в порівнянні з high-grade тубулярними аденомами, тубуло-ворсинчастими аденомами, традиційними зубчастими аденомами і гіперпластичними поліпами. Так, рівень експресії p53 у високодиференційованій КРА I-II стадій є на 37,09 % більшим за рівень експресії p53 в high-grade тубулярних аденомах, на 45,35 % більшим за рівень експресії p53 в high-grade тубуло-ворсинчастих аденомах, на 42,46 % більшим за рівень експресії p53 в high-grade традиційних зубчастих аденомах, а також на 61,07 % більшим за рівень експресії p53 в high-grade гіперпластичних поліпах ($p < 0,05$, рис. 4.25).

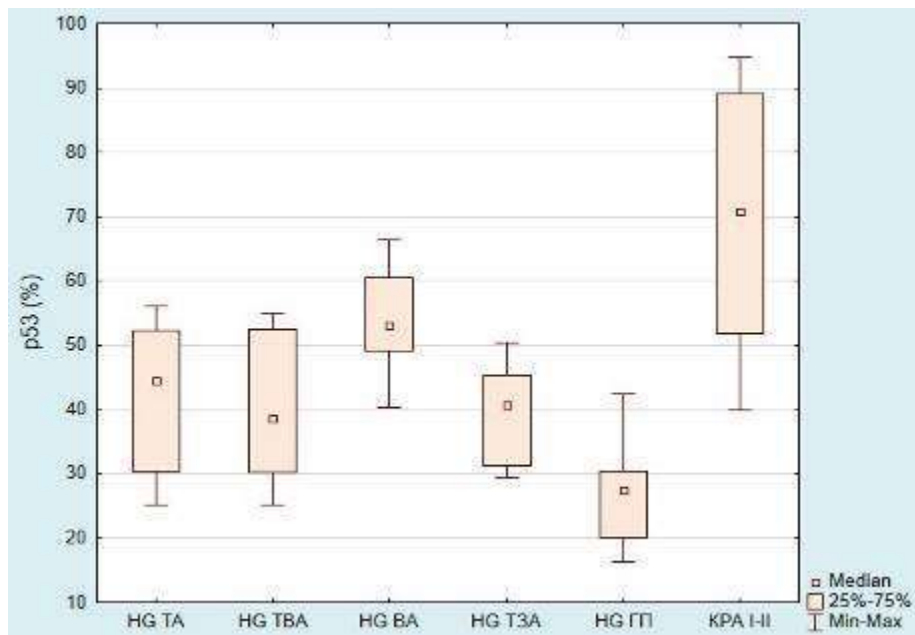


Рисунок 4.25 – Порівняльний аналіз рівнів експресії p53 в high-grade тубулярних аденомах (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденомах (HG TBA), ворсинчастих аденомах (HG BA), традиційних зубчастих аденомах (HG T3A), гіперпластичних поліпах (HG ГП) і у високодиференційованій колоректальній аденокарциномі I-II стадій (КРА I-II).

Виняток складають high-grade ворсинчасті аденоми, що статистично значущо не відрізняються за рівнем накопичення p53 ($p > 0,05$, рис. 4.25). Адже, медіана експресії p53 в high-grade ворсинчастих аденомах наближається до медіани експресії маркера в високодиференційованій КРА I-II стадій.

Визначено, що високодиференційована КРА I-II стадій характеризується середнім рівнем апоптозу: медіана експресії каспази-3 становить 56,43 (53,82 ; 66,73) УООЩ. Високодиференційована КРА I-II стадій характеризується статистично значущо більшим рівнем апоптозу за експресією каспази-3 в порівнянні з high-grade гіперпластичними поліпами ($p < 0,05$, рис. 4.26). Так, медіана експресії каспази-3 у високодиференційованій КРА I-II стадій є на 38,18 % більшою за медіану експресії каспази-3 high-grade гіперпластичними поліпами. Інші досліджені high-grade аденоми і зубчасті утворення ДТК статистично значущо не відрізняються за рівнем апоптозу від високодиференційованої КРА I-II стадій ($p > 0,05$, рис. 4.26).

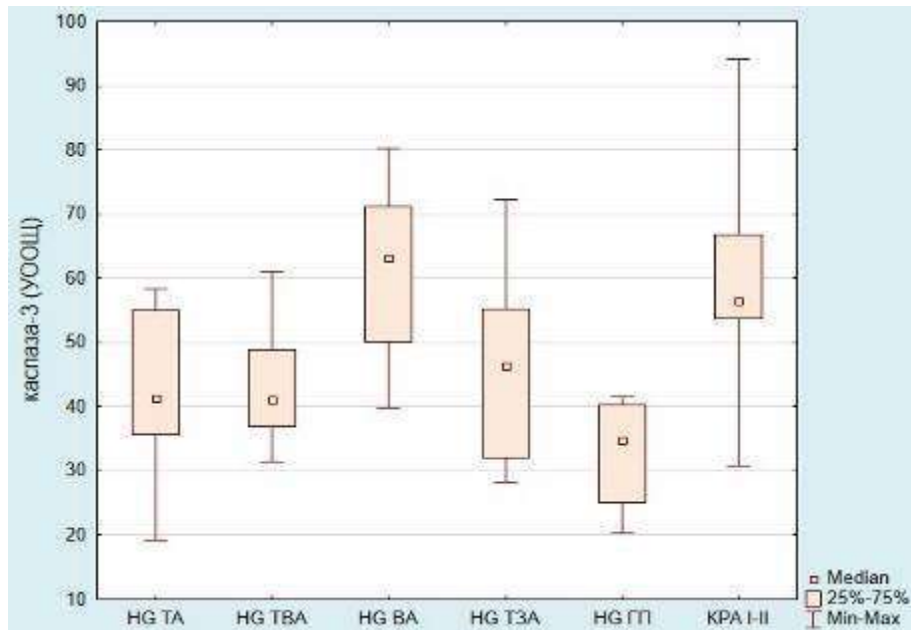


Рисунок 4.26 – Порівняльний аналіз рівнів експресії каспази-3 в high-grade тубулярних аденомах (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденомах (HG TBA), ворсинчастих аденомах (HG BA), традиційних зубчастих аденомах (HG T3A), гіперпластичних поліпах (HG ГП) і у високодиференційованій колоректальній аденокарциномі I-II стадій (КРА I-II).

Високодиференційована КРА I-II стадій відрізняється середнім рівнем експресії VEGF-A (медіана дорівнює 60,22 (53,12 ; 71,26) УООЩ), а також середнім рівнем експресії VEGFR-2 (медіана дорівнює 81,71 (62,42 ; 90,26) УООЩ). За результатами порівняльного аналізу встановлено, що рівні експресії VEGF-A та VEGFR-2 клітинами високодиференційованої КРА I-II стадій є достовірно вищими в порівнянні з усіма дослідженими high-grade аденомами і зубчастими утвореннями ДТК ($p < 0,05$) (рис. 4.27, 4.28).

Рівень експресії VEGF-A в високодиференційованій КРА I-II стадій є на 53,18 %, 35,01 %, 51,90 % вищим за аналогічний показник high-grade аденом (тубулярних, тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих, відповідно). Окрім того, рівень експресії VEGF-A в високодиференційованій КРА I-II стадій є на 49,08 % вищим за рівень експресії VEGF-A в high-grade традиційних зубчастих аденомах і на 57,20 % вищим за рівень експресії VEGF-A в high-grade гіперпластичних поліпах ДТК (рис. 4.27).

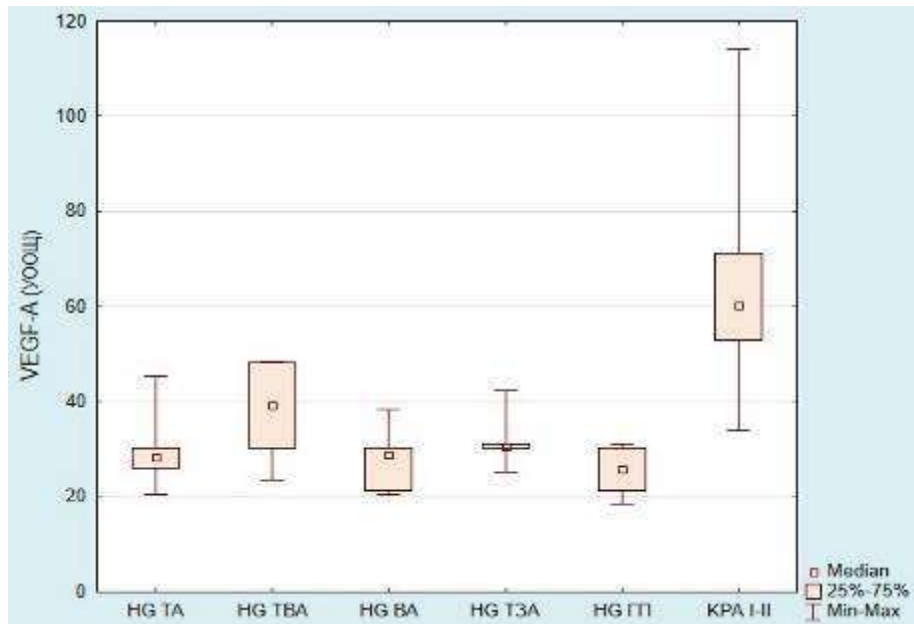


Рисунок 4.27 – Порівняльний аналіз рівнів експресії VEGF-A в high-grade тубулярних аденомах (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденомах (HG TBA), ворсинчастих аденомах (HG BA), традиційних зубчастих аденомах (HG T3A), гіперпластичних поліпах (HG ГП) і у високодиференційованій колоректальній аденокарциномі I-II стадій (КРА I-II).

Встановлено, що рівень експресії VEGFR-2 клітинами високодиференційованої КРА I-II стадій є на 31,20 % вищим за рівень експресії VEGFR-2 клітинами high-grade тубулярних аденом, на 36,82 % вищим за рівень експресії VEGFR-2 клітинами high-grade тубуло-ворсинчастих аденом, а також на 28,85 % вищим за рівень експресії VEGFR-2 клітинами high-grade ворсинчастих аденом. Окрім того, рівень експресії VEGFR-2 клітинами високодиференційованої КРА I-II стадій є на 25,17 % вищим за вищим за рівень експресії VEGFR-2 клітинами high-grade традиційних зубчастих аденом і на 37,97 % вищим за вищим за рівень експресії VEGFR-2 клітинами high-grade гіперпластичних поліпів ДТК.

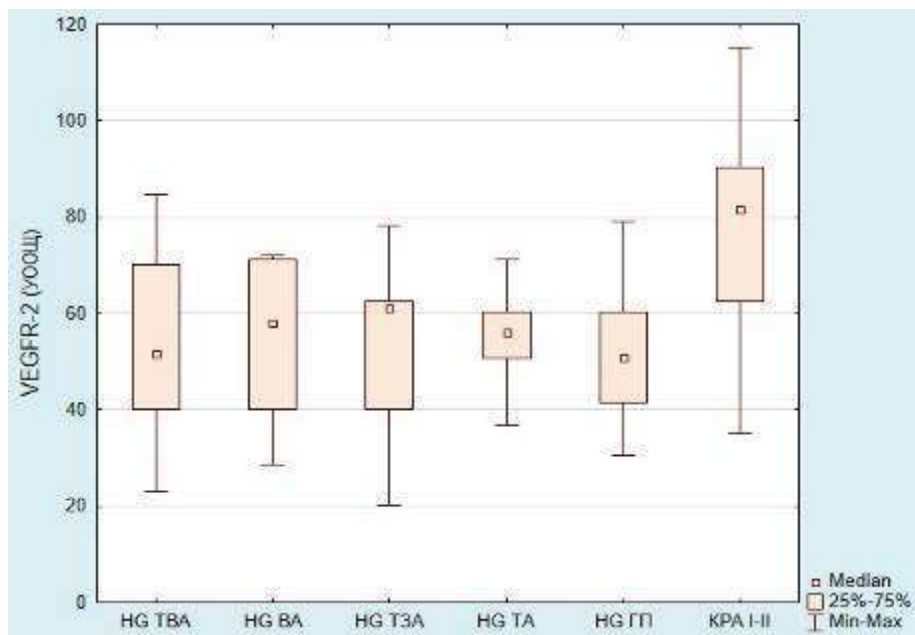


Рисунок 4.28 – Порівняльний аналіз рівнів експресії VEGFR-2 в high-grade тубулярних аденомах (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденомах (HG TBA), ворсинчастих аденомах (HG BA), традиційних зубчастих аденомах (HG T3A), гіперпластичних поліпах (HG ГП) і у високодиференційованій колоректальній аденокарциномі I-II стадій (КРА I-II).

Медіана кількості мікросудин в СПЗМ (за експресією CD34) у високодиференційованій КРА I-II стадій склала 60,50 (43,00 ; 86,00). Проведено порівняльний аналіз показників кількості мікросудин в СПЗМ у

високодиференційованій КРА I-II стадій і показників кількості мікросудин в СПЗМ в усіх досліджених high-grade аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК: порівняння показника карциноми і high-grade тубулярних аденом – 60,50 (43,00 ; 86,00) vs. 51,00 (49,00 ; 55,00), порівняння показника карциноми і high-grade тубуло-ворсинчастих аденом – 60,50 (43,00 ; 86,00) vs. 58,00 (41,00 ; 66,00), порівняння показника карциноми і high-grade ворсинчастих аденом – 60,50 (43,00 ; 86,00) vs. 50,50 (42,00 ; 61,00), порівняння показника карциноми і high-grade традиційних зубчастих аденом – 60,50 (43,00 ; 86,00) vs. 44,50 (32,00 ; 52,00), порівняння показника карциноми і high-grade гіперпластичних поліпів – 60,50 (43,00 ; 86,00) vs. 51,00 (48,00 ; 55,00) ($p > 0,05$, рис. 4.29). За результатами проведеного порівняльного аналізу встановлено відсутність статистично значущої різниці між показником кількості мікросудин в СПЗМ у високодиференційованій КРА I-II стадій і показником кількості мікросудин в СПЗМ в усіх досліджених high-grade аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК.

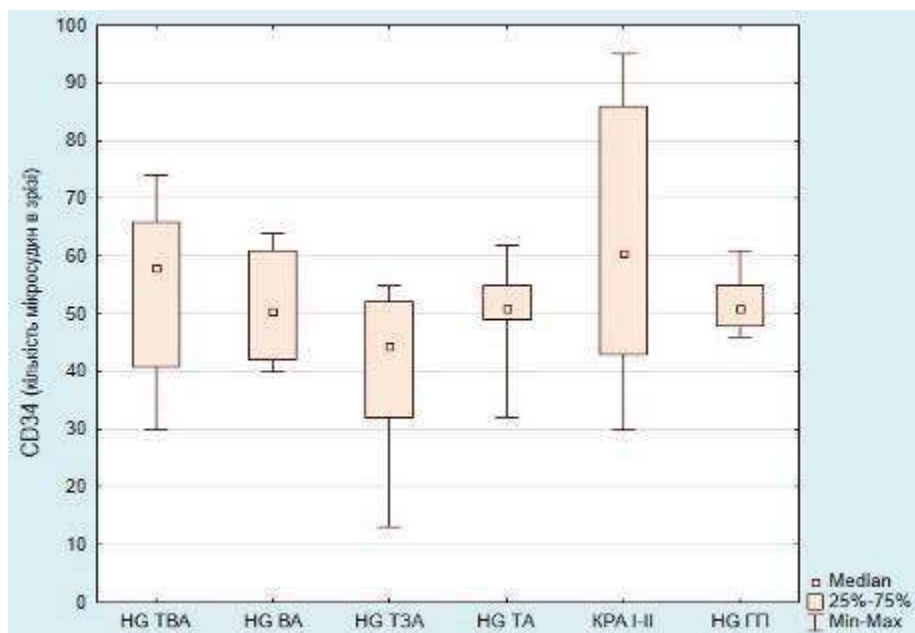


Рисунок 4.29 – Порівняльний аналіз показників експресії CD34 в high-grade тубулярних аденомах (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденомах (HG TBA), ворсинчастих аденомах (HG BA), традиційних зубчастих аденомах (HG T3A), гіперпластичних поліпах (HG ГП) і у високодиференційованій колоректальній аденокарциномі I-II стадій (КРА I-II).

Згідно отриманих даних, медіана відносної площі CD44+ клітин строми у високодиференційованій КРА I-II стадій дорівнює 71,17 (65,33 ; 79,30) % і є статистично значущо вищою в порівнянні з дослідженими high-grade класичними аденомами, зубчастими аденомами і гіперпластичними поліпами ДТК ($p < 0,05$, рис. 4.30). Так, медіана відносної площі CD44+ клітин строми у високодиференційованій КРА I-II стадій є на 19,42 % вищою за аналогічний показник high-grade тубулярних аденом, на 18,88 % – high-grade тубуло-ворсинчастих аденом, на 15,27 % – high-grade ворсинчастих аденом. Показник відносної площі CD44+ клітин строми у високодиференційованій КРА I-II стадій також є на 7,89 % більшим за аналогічний показник high-grade традиційних зубчастих аденом і на 46,36 % більшим за аналогічний показник high-grade гіперпластичних поліпів ДТК.

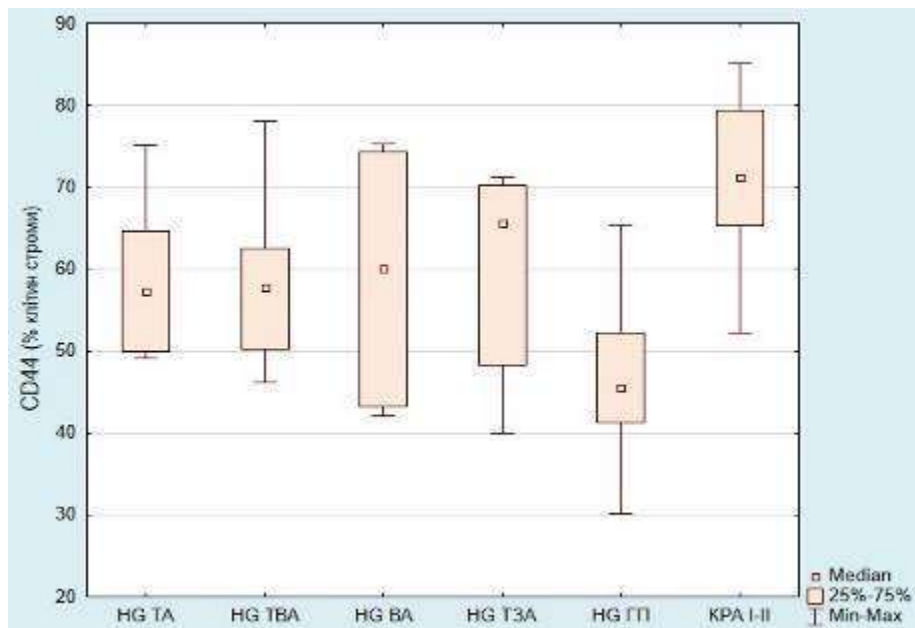


Рисунок 4.30 – Порівняльний аналіз показників експресії CD44 клітинами строми high-grade тубулярних аденом (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденом (HG TBA), ворсинчастих аденом (HG BA), традиційних зубчастих аденом (HG TZA), гіперпластичних поліпів (HG ГП) і високодиференційованої колоректальної аденокарциноми I-II стадій (KPA I-II).

За даними ІГХ досліджень у високодиференційованій КРА I-II стадій медіана відносної площі ALDH1-позитивних клітин стромі дорівнює 53,09 (43,60 ; 57,43) %. Показники ALDH1+ клітин стромі у високодиференційованій КРА I-II стадій є статистично значущо вищими в порівнянні з усіма дослідженими high-grade аденомами і зубчастими утвореннями ДТК ($p < 0,05$, рис. 4.31). Так, медіана відносної площі ALDH1+ клітин стромі у високодиференційованій КРА I-II стадій є на 50,43 % вищою за медіану площі ALDH1+ клітин стромі high-grade тубулярних аденом, на 29,97 % вищою за медіану площі ALDH1+ клітин стромі high-grade тубуло-ворсинчастих аденом і на 31,01 % вищою за медіану площі ALDH1+ клітин стромі high-grade ворсинчастих аденом. Показник відносної площі ALDH1+ клітин стромі у карциномі також є на 39,22 % вищим за показник площі ALDH1+ клітин стромі high-grade зубчастих аденом і на 58,28 % вищим за показник площі ALDH1+ клітин стромі high-grade гіперпластичних поліпів ДТК.

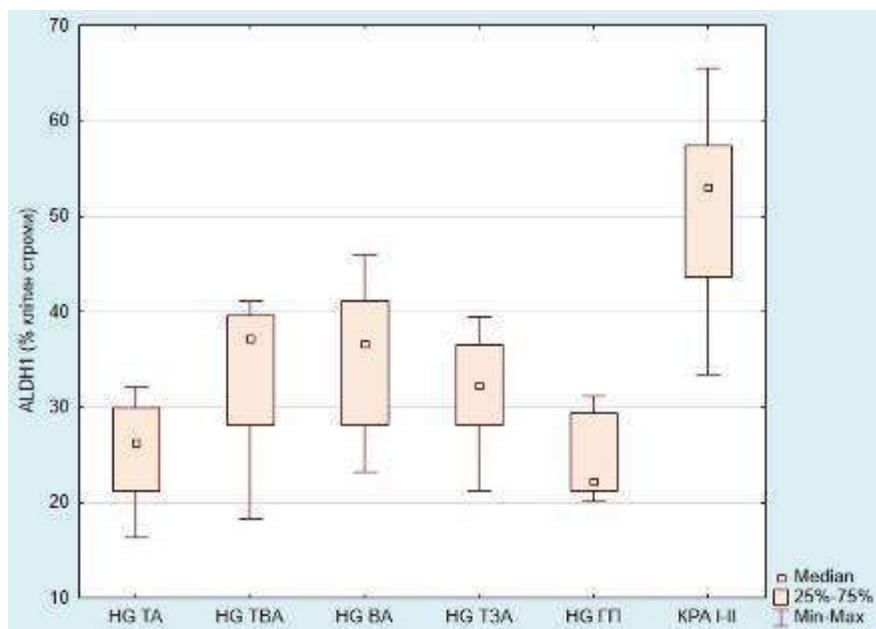


Рисунок 4.31 – Порівняльний аналіз експресії ALDH1 клітинами стромі high-grade тубулярних (HG TA), тубуло-ворсинчастих (HG TBA), ворсинчастих аденом (HG BA), традиційних зубчастих аденом (HG TZA), гіперпластичних поліпів (HG ГП) і високодиференційованої колоректальної аденокарциноми I-II стадій (КРА I-II).

За даними ІГХ досліджень у високодиференційованій КРА I-II стадій медіана відносної площі ALDH1-позитивних ракових клітин становить 25,31 (18,22 ; 32,15) %. Порівняльний аналіз показників відносної площі ALDH1-позитивних ракових клітин КРА I-II стадій і відносної площі ALDH1-позитивних епітеліоцитів досліджених high-grade аденом і зубчастих новоутворень ДТК вказує на наступне. Показник відносної площі ALDH1-позитивних ракових клітин КРА I-II стадій є статистично значущо на 44,10 % вищим за показник відносної площі ALDH1-позитивних епітеліоцитів в high-grade гіперпластичних поліпах ($p < 0,05$, рис. 4.32). Показник відносної площі ALDH1-позитивних ракових клітин КРА I-II стадій статистично значущо не відрізняється від показників відносної площі ALDH1+ епітеліоцитів в high-grade тубулярних, тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих аденомах, а також в high-grade традиційних зубчастих аденомах ДТК ($p > 0,05$, рис. 4.32).

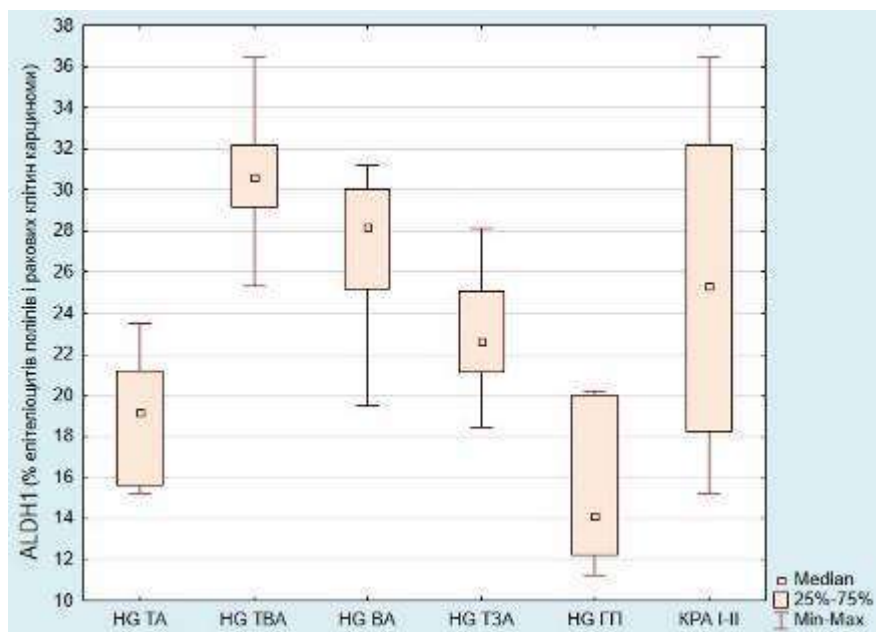


Рисунок 4.32 – Порівняльний аналіз експресії ALDH1 епітеліоцитами high-grade тубулярних (HG TA), тубуло-ворсинчастих (HG TBA), ворсинчастих аденом (HG BA), традиційних зубчастих аденом (HG T3A), гіперпластичних поліпів (HG ГП) і раковими клітинами високодиференційованої колоректальної аденокарциноми I-II стадій (КРА I-II).

Встановлено, що високодиференційована КРА I-II стадій характеризується середнім рівнем експресії ЕрСАМ, медіана якої становить 73,72 (65,02 ; 80,24) УООЩ. За цим показником високодиференційована КРА I-II стадій статистично значущо не відрізняється від експресії ЕрСАМ епітеліоцитами high-grade аденом і зубчастих новоутворень ДТК: порівняння показників карциноми і high-grade тубулярних аденом – 73,72 (65,02 ; 80,24) vs. 67,65 (62,47 ; 71,15), карциноми і high-grade тубуло-ворсинчастих аденом – 73,72 (65,02 ; 80,24) vs. 73,57 (68,15 ; 78,15), карциноми і high-grade ворсинчастих аденом – 73,72 (65,02 ; 80,24) vs. 73,17 (66,36 ; 80,34), карциноми і high-grade традиційних зубчастих аденом – 73,72 (65,02 ; 80,24) vs. 68,48 (65,21 ; 74,15), карциноми і high-grade гіперпластичних поліпів – 73,72 (65,02 ; 80,24) vs. 67,65 (64,32 ; 73,24) ($p > 0,05$, рис. 4.33).

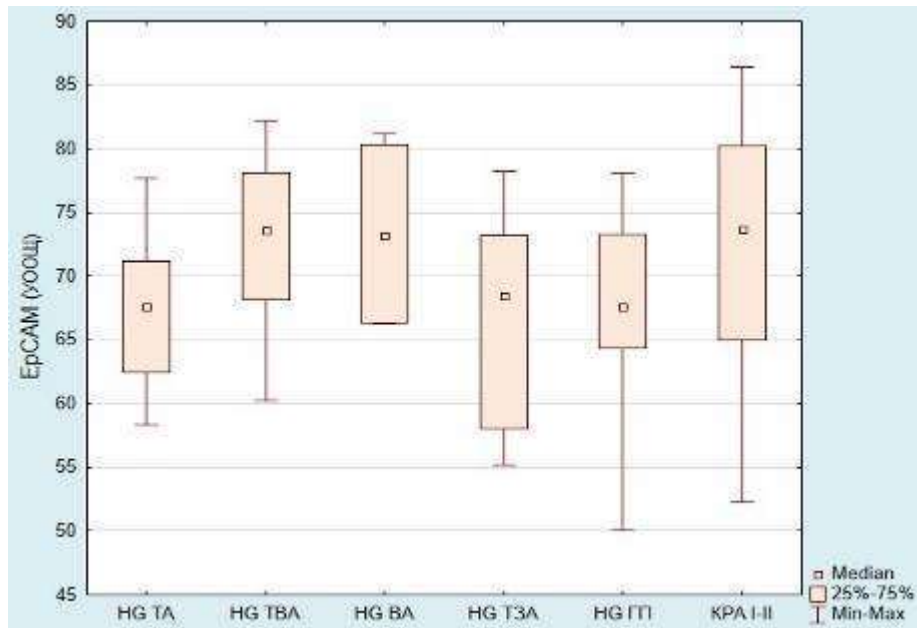


Рисунок 4.33 – Порівняльний аналіз показників експресії ЕрСАМ епітеліоцитами high-grade тубулярних аденом (HG TA), тубуло-ворсинчастих аденом (HG TBA), ворсинчастих аденом (HG BA), традиційних зубчастих аденом (HG TZA), гіперпластичних поліпів (HG GP) і раковими клітинами високодиференційованої колоректальної аденокарциноми I-II стадій (КРА I-II).

Таким чином проведено комплексний порівняльний аналіз ІГХ параметрів проліферативно-апоптотичної активності клітин, неоангіогенезу, а також експресії маркерів стовбурових клітин (CD44, ALDH1, EpCAM) в високодиференційованій КРА I-II стадій і high-grade аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК.

Резюме. Досліджено параметри проліферації, апоптозу, неоангіогенезу і експресії маркерів стовбурових клітин в колоректальній аденокарциномі. Проведено порівняння цих параметрів для кожної із стадій прогресування КРА, а також порівняння цих параметрів в високодиференційованій КРА I-II і high-grade поліпах ДТК.

Встановлено, що КРА характеризується підвищеною відносною нормлізованою експресією мРНК гену *Ki-67*, що знижується в прогресуванні карциноми від I до IV стадії в 6 разів (від 3,20 (2,31 ; 3,59) до 0,52 (0,28 ; 1,04), відповідно) і корелює із результатами паралельно проведеного ІГХ дослідження білка *Ki-67*, згідно яких експресія маркеру також знижується у вивченій послідовності (від 73,95 (61,57 ; 81,38) % до 27,37 (20,96 ; 39,24) %, відповідно).

Також встановлено, що КРА характеризується підвищеною експресією мРНК гену *TP53*, що зростає в прогресуванні карциноми від I до IV стадії (від 2,15 (0,82 ; 2,30) до 7,80 (5,99 ; 8,92), відповідно) і корелює із результатами паралельно проведеного ІГХ дослідження білка *p53* у вивченій послідовності (від 25,39 (13,56 ; 30,32) % до 80,31 (68,08 ; 91,48) %, відповідно).

Окрім того, встановлено, що КРА характеризується зниженням експресії каспази-3 при прогресуванні від I до IV стадії (від 54,60 (52,53 ; 62,48) УООЩ до 25,66 (18,03 ; 26,27) УООЩ, відповідно), що прямо корелює із середнім рівнем ІГХ експресії *Ki-67* ($r = 0,71$, $p < 0,05$).

Транскрипційна активність гену *KRAS* зростає при прогресуванні КРА від I до IV стадії (медіана експресії мРНК гену *KRAS* в I стадії складає

0,42 (0,36 ; 0,43), в IV стадії – 2,91 (1,85 ; 3,50), за наявності «стрибка» підвищення медіани експресії мРНК цього гену на II стадії прогресування. Встановлено наявність статистично значущих кореляцій між підвищеними показниками транскрипційної активності *KRAS* і низьким рівнем ІГХ експресії каспази-3 ($r = -0,44$, $p < 0,05$), а також підвищеними показниками транскрипційної активності *KRAS* і *TP53* ($r = 0,43$, $p < 0,05$).

Відносно показників неоангіогенезу в прогресуванні колоректальної аденокарциноми отримано наступні дані. КРА характеризується середніми рівнями експресії VEGF-A і VEGFR-2, що зростають при прогресуванні пухлини від I до IV стадії. Медіана експресії VEGF-A зростає від 37,80 (30,22 ; 56,89) УООЩ на I стадії до 84,69 (80,66 ; 110,28) УООЩ на IV стадії. Медіана експресії VEGFR-2 зростає від 52,75 (39,14 ; 70,22) УООЩ на I стадії до 99,91 (86,15 ; 120,29) УООЩ на IV стадії. Окрім того, ці показники взаємопов'язані прямим сильним кореляційним зв'язком ($r = 0,85$, $p < 0,05$). При цьому для обох маркерів є властивим «стрибок» медіани експресії на II стадії прогресування КРА.

Експресія VEGFR-1 визначається лише в КРА II-IV стадій, за відсутності достовірного зростання показників у вивченій послідовності. Кількість мікросудин в СПЗМ, оцінена за експерсією CD34, також статистично значущо не змінюється при прогресуванні КРА від I до IV стадії.

Встановлено, що прогресування колоректальної аденокарциноми супроводжується зростанням експресії маркерів стовбурових клітин з наступними особливостями. При прогресуванні карциноми від I до II стадії остовірно збільшується відсоток CD44-позитивних клітин строми (на 34,92 % – від 31,41 (19,87 ; 42,15) % до 48,26 (35,44 ; 61,45) %, відповідно). При прогресуванні карциноми від I до III стадії в ній зростає відсоток ALDH1-позитивних клітин строми (на 57,28 % – від 20,66 (18,51 ; 21,47) % до 48,36 (42,15 ; 55,17) %, відповідно). При прогресуванні колоректальної аденокарциноми від II до III стадії в ній також збільшується рівень експресії ERСAM раковими клітинами (на 9,07 % – від 83,96 (78,17 ; 90,55) до 92,33

(91,18 ; 105,34) УООЩ, відповідно). При прогресуванні аденокарциноми від III до IV стадії в пухлині збільшується відсоток ALDH1-позитивних ракових клітин (на 32,26 % – від 34,25 (26,47 ; 42,15) % до 50,56 (45,84 ; 61,38) %, відповідно), а також рівень експресії ERСAM раковими клітинами (на 14,40 % – від 92,33 (91,18 ; 105,34) до 107,85 (96,78 ; 120,34) УООЩ, відповідно).

Аналіз даних, отриманих при порівнянні ІГХ-параметрів високодиференційованої КРА I-II стадій і high-grade поліпів ДТК, виявив низку статистично значущих відмінностей. Високодиференційована КРА I-II стадій відрізняється від звичайних high-grade тубулярних, тубуло-ворсинчастих і ворсинчастих аденом ДТК за низкою параметрів. Так, високодиференційована КРА I-II стадій відрізняється значущо більшою медіаною експресії p53 в порівнянні із тубулярними аденомами (37,09 % достовірної різниці) і тубуло-ворсинчастими аденомами (45,35 % достовірної різниці). Виняток складають ворсинчасті аденоми, які суттєво не відрізняються за цим показником. Окрім того, високодиференційована КРА I-II стадій відрізняється значущо більшою медіаною експресії VEGF-A в порівнянні із тубулярними аденомами 53,18 %, достовірної різниці), тубуло-ворсинчастими (35,01 % достовірної різниці) і ворсинчастими аденомами (51,90 % достовірної різниці); значущо більшою медіаною експресії VEGFR-2 в порівнянні із тубулярними аденомами 31,20 %, достовірної різниці), тубуло-ворсинчастими (36,82 % достовірної різниці) і ворсинчастими аденомами (28,85 % достовірної різниці); значущо більшою медіаною площі відносної експресії CD44 клітинами строми в порівнянні із тубулярними аденомами 19,42 %, достовірної різниці), тубуло-ворсинчастими (18,88 % достовірної різниці) і ворсинчастими аденомами (15,27 % достовірної різниці); а також значущо більшою медіаною площі відносної експресії ALDH1 клітинами строми в порівнянні із тубулярними аденомами 50,43 %, достовірної різниці), тубуло-ворсинчастими (29,97 % достовірної різниці) і ворсинчастими аденомами (31,01 % достовірної різниці).

Встановлено також, що високодиференційована КРА I-II стадій відрізняється від high-grade зубчастих аденом і гіперпластичних поліпів ДТК за низкою ПГХ-параметрів. Так, високодиференційована КРА I-II стадій відрізняється значущо більшою медіаною експресії Ki-67 в порівнянні із традиційними зубчастими аденомами (13,44 % достовірної різниці) і гіперпластичними поліпами (37,20 % достовірної різниці); значущо більшою медіаною експресії p53 в порівнянні із традиційними зубчастими аденомами (42,46 % достовірної різниці) і гіперпластичними поліпами (61,07 % достовірної різниці); значущо більшою медіаною експресії VEGF-A в порівнянні із традиційними зубчастими аденомами (49,08 % достовірної різниці) і гіперпластичними поліпами (57,20 % достовірної різниці); значущо більшою медіаною експресії VEGFR-2 А в порівнянні із традиційними зубчастими аденомами (25,17 % достовірної різниці) і гіперпластичними поліпами (37,97 % достовірної різниці); значущо більшою медіаною площі відносної експресії CD44 клітин строми в порівнянні із традиційними зубчастими аденомами (7,89 % достовірної різниці) і гіперпластичними поліпами (46,36 % достовірної різниці); а також значущо більшою медіаною площі відносної експресії ALDH1 клітин строми в порівнянні із традиційними зубчастими аденомами (39,22 % достовірної різниці) і гіперпластичними поліпами (58,28 % достовірної різниці).

Матеріали розділу відображені у 9-х статтях [150-158] та у 2-х тезах [159 - 160].

РОЗДІЛ 5
ПОКАЗНИКИ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-МЕЗЕНХІМАЛЬНОЇ
ТРАНСФОРМАЦІЇ І МУЦИНОВОГО ФЕНОТИПУ ПРИ
ПРОГРЕСУВАННІ КОЛОРЕКТАЛЬНОЇ АДЕНОКАРЦИНОМИ, А
ТАКОЖ КОМПЛЕКСНИЙ АНАЛІЗ ПАРАМЕТРІВ МЕТАСТАТИЧНОЇ
АДЕНОКАРЦИНОМИ

5.1 Молекулярно-генетична та імуногістохімічна характеристика показників експресії E-кадгерину і β -катеніну в колоректальній аденокарциномі

Ключові показники епітеліально-мезенхімальної трансформації визначені в паралельному молекулярно-генетичному дослідженні транскрипційної активності генів *CDH1* і *CTNNB1* та ІГХ дослідженні рівня експресії кодованих ними E-кадгерину і β -катеніну в одних і тих же зразках колоректальної аденокарциноми на I, II, III, IV стадіях її прогресування.

За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено, що а КРА характеризується зниженою транскрипційною активністю гену *CDH1*: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену складає 0,35 (0,09 ; 0,70). Тобто, цей показник є зниженим відносно аналогічного показника незміненої слизової оболонки ДТК, який був умовно контрольним при проведенні ПЛР.

Аналіз показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* виявив її зниження при прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* в КРА I стадії складає 0,88 (0,42 ; 1,14); в КРА II стадії вона дорівнює 0,48 (0,23 ; 1,13); в КРА III стадії вона зменшується до 0,15 (0,09 ; 0,36); а в КРА IV стадії вона складає 0,08 (0,04 ; 0,41).

Таким чином, має місце тенденція до зниження показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* при прогресуванні

колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії з наявністю достовірної різниці між показниками в II і в III стадіях КРА: 0,48 (0,23 ; 1,13) vs. 0,15 (0,09 ; 0,36), $p < 0,05$ (рис. 5.1).

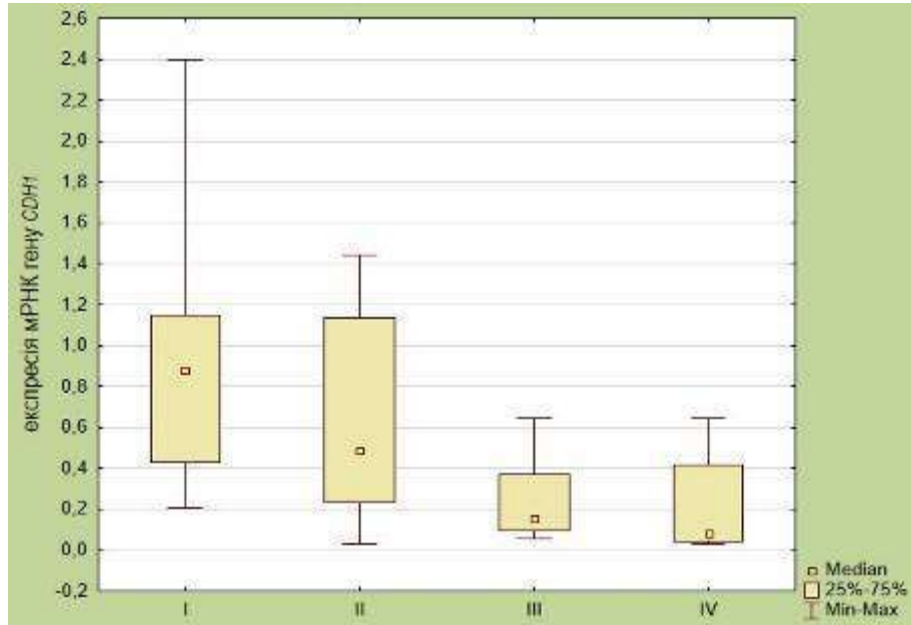


Рисунок 5.1 – Порівняльний аналіз показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV pTNM стадій.

Паралельні ІГХ дослідження показали, що КРА характеризується низьким рівнем мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину, медіана якої становить 43,74 (31,42 ; 85,60) УООЩ (рис. 5.2).

Ця закономірність простежується при аналізі рівня експресії Е-кадгерину на I, II, III, IV стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми: медіана експресії Е-кадгерину в I стадії КРА дорівнює 88,09 (60,22 ; 112,34) УООЩ, в II стадії КРА медіана експресії Е-кадгерину складає 55,70 (41,15 ; 98,07) УООЩ, в III стадії КРА медіана експресії Е-кадгерину зменшується до 32,58 (30,21 ; 44,58) УООЩ, в IV стадії КРА цей показник дорівнює 24,82 (23,02 ; 40,81) УООЩ.

Таким чином, має місце тенденція до зниження показників експресії Е-кадгерину при прогресуванні КРА від I до IV стадії з наявністю достовірної різниці між показниками експресії Е-кадгерину в II і в III стадіях:

55,70 (41,15 ; 98,07) УООЩ vs. 32,58 (30,21 ; 44,58) УООЩ, $p < 0,05$ (рис 5.3). Ці результати узгоджуються із даними, отриманими при паралельно проведеному МГ дослідженні транскрипційної активності гену *CDH1*, що вже було наведено вище.

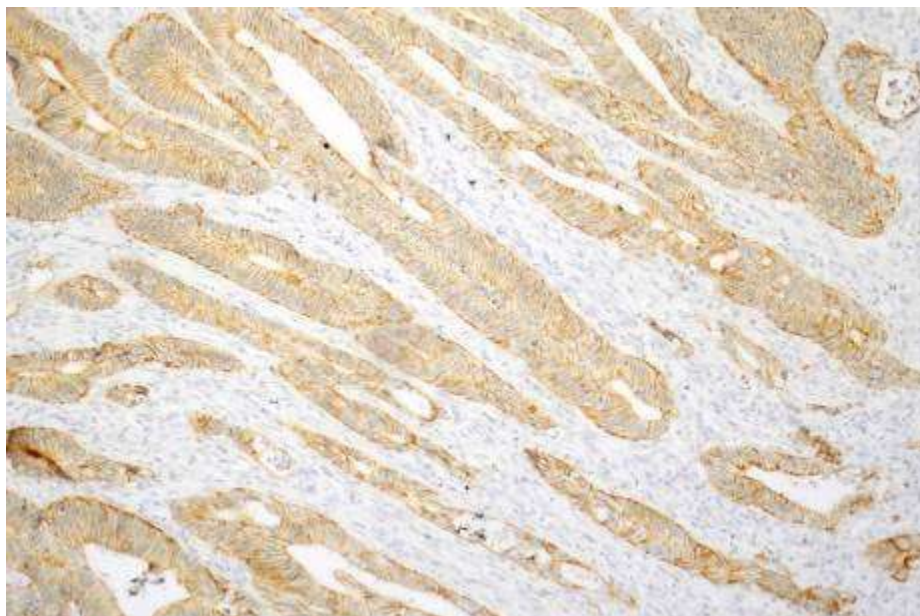


Рисунок 5.2 – Низький рівень мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину раковими клітинами колоректальної аденокарциноми. *Мо a-Hu E-Cadherin, Clone 43 EP 700 Y. 36. × 100.*

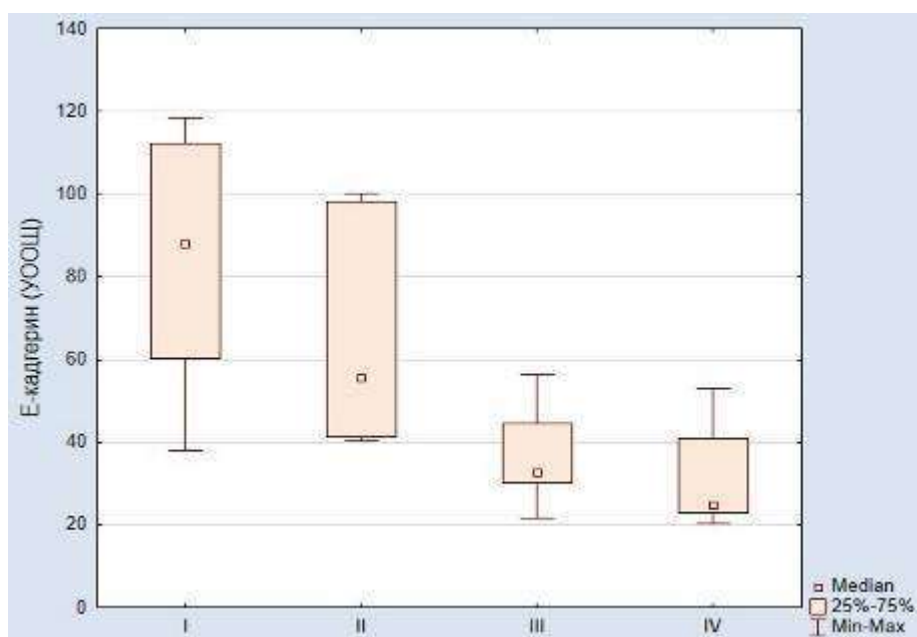


Рисунок 5.3 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії Е-кадгерину в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено, що колоректальна аденокарцинома характеризується підвищеною транскрипційною активністю гену *CTNNB1*: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* складає 2,63 (1,55 ; 5,09).

Аналіз показників експресії мРНК *CTNNB1* на I, II, III, IV стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми вказує на наступні результати: медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* в КРА I стадії складає 2,88 (2,38 ; 5,38), в КРА II стадії медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* дещо збільшується до 3,83 (2,59 ; 5,99), в КРА III стадії медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* дорівнює 2,02 (1,38 ; 6,95), а в КРА IV стадії цей показник складає 2,27 (1,23 ; 2,93).

Тобто, на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА мають місце стабільно підвищені показники транскрипційної активності гену *CTNNB1* (в порівнянні з нормальною слизовою оболонкою ДТК) за відсутністю статистично значущої відмінності між показниками окремих стадій (рис. 5.4).

За результатами ІГХ дослідження встановлено, що КРА характеризується високим рівнем мембранно-цитоплазматичної експресії β -катеніну, медіана експресії якого становить 117,35 (111,69 ; 120,32) УООЩ (рис. 5.5).

Рівень експресії β -катеніну на I, II, III, IV стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми має наступні особливості: медіана експресії β -катеніну в КРА I стадії дорівнює 116,73 (112,28 ; 120,06) УООЩ, в КРА II стадії медіана експресії β -катеніну складає 120,23 (116,06 ; 135,16) УООЩ, в КРА III стадії медіана експресії β -катеніну складає 115,85 (110,09 ; 120,23) УООЩ, в КРА IV стадії цей показник дорівнює 115,59 (111,11 ; 120,37) УООЩ.

Таким чином, на I, II, III, IV стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми мають місце стабільно підвищені показники експресії

β -катеніну за відсутністю статистично значущої відмінності між показниками окремих стадій (рис. 5.6).

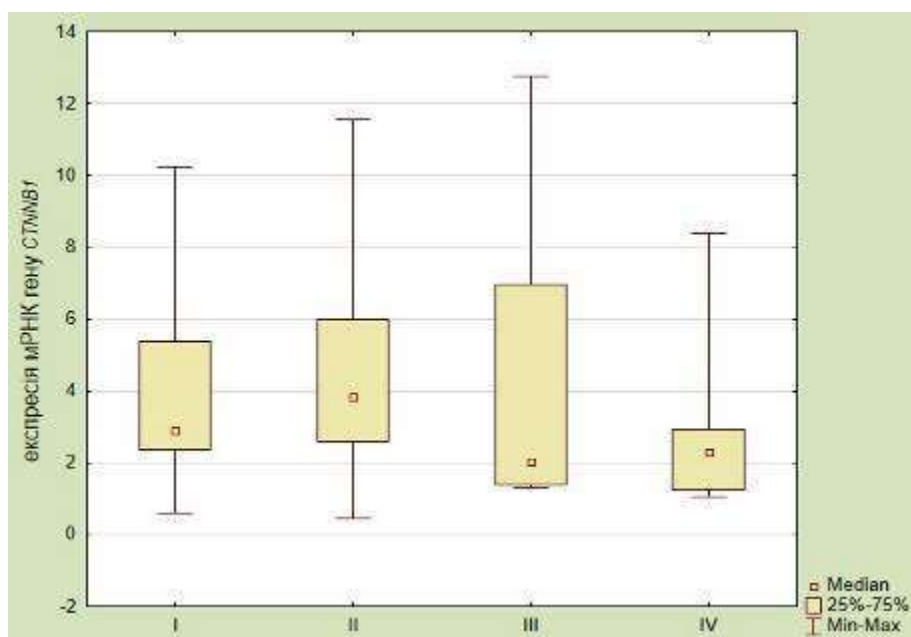


Рисунок 5.4 – Порівняльний аналіз показників відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

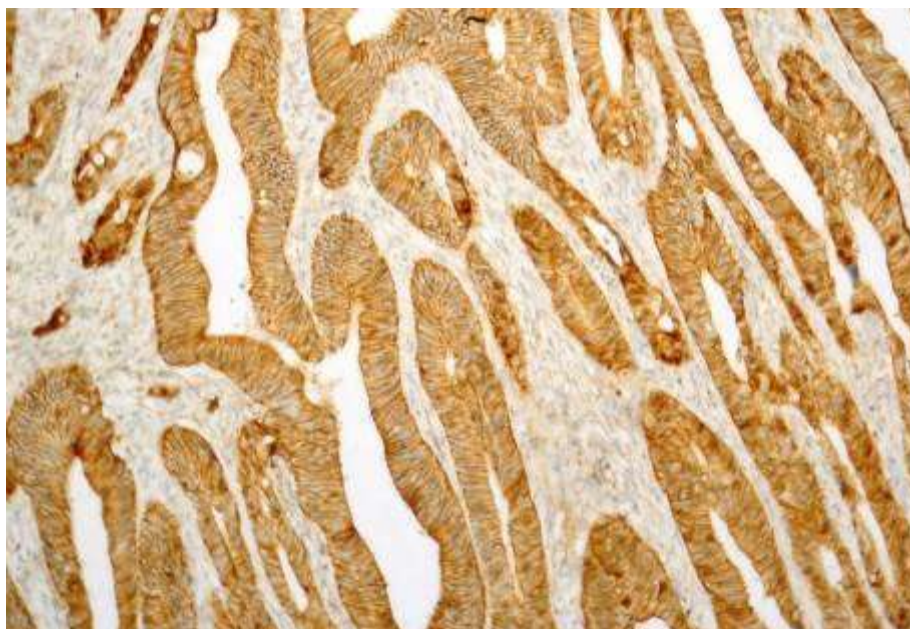


Рисунок 5.5 – Високий рівень мембранно-цитоплазматичної експресії β -катеніну раковими клітинами колоректальної аденокарциноми. *Mo a Hu Beta-Catenin*. $36. \times 100$.

Цей висновок узгоджується із даними, отриманим при паралельно проведеному молекулярно-генетичному дослідженні транскрипційної активності гену *CTNNB1*, що вже було наведено вище.

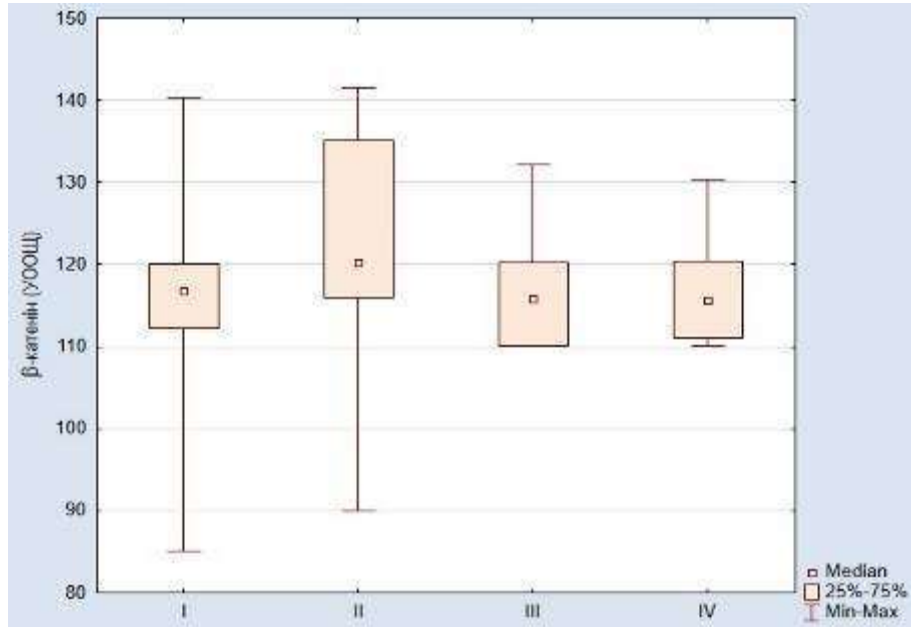


Рисунок 5.6 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії β-катеніну в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Також нами було проведено кореляційний аналіз вивчених показників відносної нормалізованої експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1*, кодованих ними білків Е-кадгерину і β-катеніну, а також показника відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в колоректальній аденокарциномі, результати якого наведені в табл. 5.1.

Кореляційний аналіз підтвердив наявність прямого сильного зв'язку між зниженим показником відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* і низьким рівнем імуногістохімічної експресії Е-кадгерину ($r = 0,90$, $p < 0,05$), а також прямого сильного зв'язку між підвищеним показником відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* і високим рівнем імуногістохімічної експресії β-катеніну ($r = 0,74$, $p < 0,05$) в колоректальній аденокарциномі. Також виявлено кореляції між показниками відносної

нормалізованої експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1*, а також рівнями імуногістохімічної експресії Е-кадгерину і β -катеніну.

Таблиця 5.1 – Кореляційні зв'язки між рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS*, а також імуногістохімічної експресії Е-кадгерину і β -катеніну в колоректальній аденокарциномі

	<i>CDH1</i>	Е-кадгерин	<i>CTNNB1</i>	β -катенін	<i>KRAS</i>
<i>CDH1</i>	1,00	0,90*	-0,00	-0,26	-0,41*
Е-кадгерин	0,90*	1,00	0,01	-0,21	-0,47*
<i>CTNNB1</i>	-0,00	0,01	1,00	0,74*	0,20
β -катеніну	-0,26	-0,21	0,74*	1,00	0,41*
<i>KRAS</i>	-0,41*	-0,47*	0,20	0,41*	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Визначені зворотні середньої сили зв'язки між підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS* і зниженою транскрипційною активністю гену *CDH1* ($r = -0,41$, $p < 0,05$) та низьким рівнем імуногістохімічної експресії Е-кадгерину ($r = -0,47$, $p < 0,05$); також наявний прямий середньої сили зв'язок між підвищеною транскрипцією гену *KRAS* і високим рівнем імуногістохімічної експресії β -катеніну ($r = 0,41$, $p < 0,05$) в колоректальній аденокарциномі. Також виявлено кореляції між показниками відносної нормалізованої експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1* ($r = -0,41$, $p < 0,05$), а також показником відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* і рівнями імуногістохімічної експресії Е-кадгерину ($r = -0,47$, $p < 0,05$) і β -катеніну ($r = 0,41$, $p < 0,05$).

Таким чином вивчено молекулярно-генетичні особливості транскрипційної активності генів *CDH1* і *CTNNB1*, а також особливості імуногістохімічної експресії кодованих ними білків Е-кадгерину і β -катеніну на кожній із чотирьох послідовних стадій прогресування КРА.

5.2 Особливості експресії маркерів епітеліального і мезенхімального фенотипів в колоректальній аденокарциномі

При вивченні клітин КРА епітеліального фенотипу встановлено, що мембранно-цитоплазматична експресія Е-кадгерину в 100 % досліджених зразків КРА виявляється в ракових клітинах, що формують залозоподібні структури (G_1 і G_2 карциноми) (див. рис.5.2), або солідні пласти (G_3 карциноми). В серійних зрізах 76,6 % зразків КРА визначається мембранно-цитоплазматична експресія СК-20 виключно в ракових клітинах, а в 40 % КРА експресія СК-20 виявляється в ракових клітинах і одночасно – в окремих клітинах строми різних форм та розмірів (рис. 5.7).

Особливості імуногістохімічної експресії Е-кадгерину в колоректальній аденокарциномі, а також на кожній окремій стадії прогресування КРА, вже було описано в попередньому розділі, адже цей показник також було досліджено в контексті вивчення особливостей функціонування молекул Е-кадгерину і β -катеніну в кишковому канцерогенезі.

Відносно особливостей експресії СК-20, що є ще одним маркером епітеліального фенотипу (окрім Е-кадгерину) встановлено наступне. Колоректальна аденокарцинома характеризується середнім рівнем експресії СК-20: медіана експресії маркеру становить 54,28 (41,55 ; 70,27) УООЩ. Окрім того, виявлено статистично значуще зниження експресії СК-20 на I, II, III, IV стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми: медіана експресії СК-20 в КРА I стадії становить 84,17 (73,17 ; 92,63) УООЩ, в КРА II стадії медіана експресії СК-20 знижується до 62,15 (54,14 ; 70,27) УООЩ, в КРА III стадії медіана експресії СК-20 складає 46,82 (41,24 ; 53,48) УООЩ, в КРА IV стадії медіана експресії СК-20 дорівнює 33,72 (24,14 ; 41,59) УООЩ. Порівняльний аналіз вказує на наявність достовірної різниці між медіанами експресії СК-20 на кожній окремій стадії прогресування КРА ($p < 0,05$; рис. 5.8).

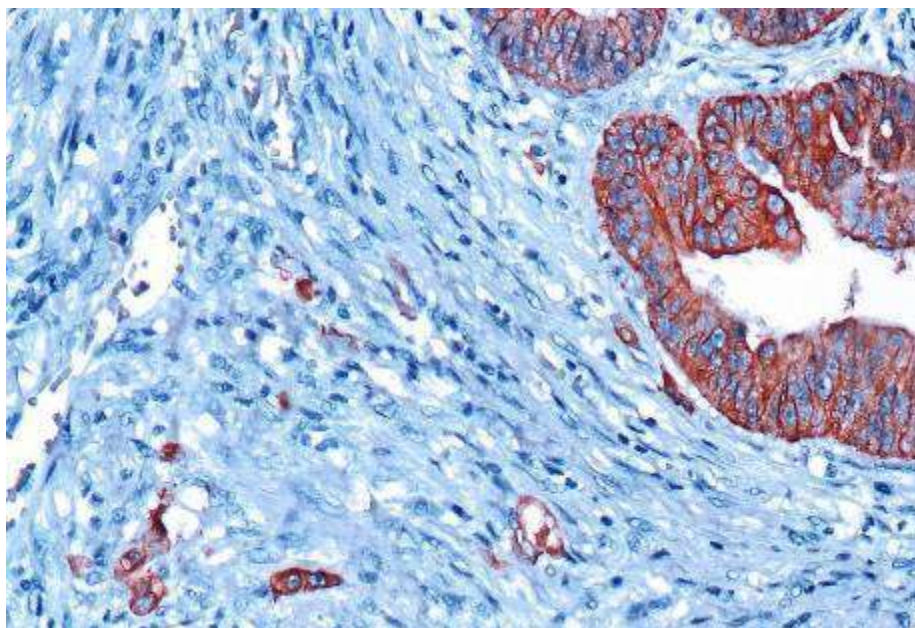


Рисунок 5.7 – Мембранно-цитоплазматична експресія СК-20 в ракових клітинах, що формують залозоподібні структури, а також в окремих клітинах, вільно розташованих в стромі колоректальної аденокарциноми. *Mo a-Hu Cytokeratin 20, Clone Ks20.8. 3б. × 200.*

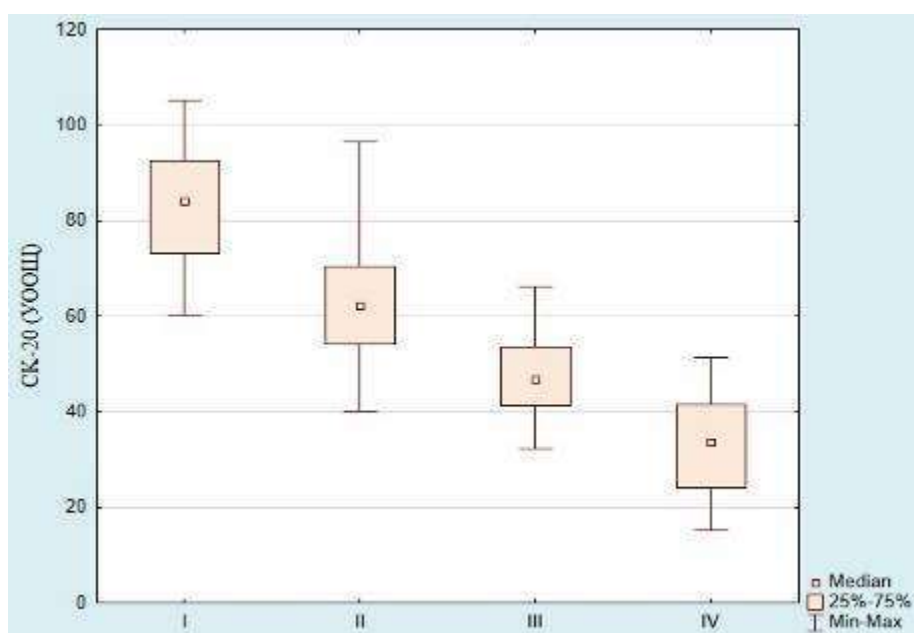


Рисунок 5.8 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії СК-20 в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

З метою вивчення клітин колоректальної аденокарциноми, що мають властивості мезенхімального фенотипу (включаючи клітини, що зазнають

епітеліально-мезенхімальної трансформації), було використано імуногістохімічні маркери віментин і α -SMA, та отримані наступні дані.

Встановлено, що експресія віментину в КРА є мембранно-цитоплазматичною та виявляється в клітинах строми в 100 % досліджених зразків карциноми. Віментин-ІМПЗ клітини включають як типові стромальні клітини, що мають веретеноподібну форму, так і атипові клітини різних форм та розмірів, що вільно розташовані в пухлинній стромі. Відзначається тенденція до скупчення віментин+ клітин поблизу залозоподібних структур, сформованих раковими клітинами (рис. 5.9) та кластерів ракових клітин.

Визначено, що КРА характеризується середнім рівнем експресії віментину, медіана експресії якого становить 95,23 (80,22 ; 110,21) УООЩ. За результатами ІГХ досліджень виявлено зростання експресії віментину на I, II, III, IV стадіях прогресування неметастатичної КРА отримано наступні дані. Медіана експресії віментину в КРА I стадії становить 70,22 (61,15 ; 78,65) УООЩ, в КРА II стадії медіана експресії віментину дорівнює 86,65 (80,22 ; 97,55) УООЩ, в КРА III стадії медіана експресії віментину зростає до 103,88 (90,31 ; 115,24) УООЩ, в КРА IV стадії медіана експресії віментину сягає 108,45 (96,33 ; 119,15) УООЩ (рис. 5.10).

Таким чином, при прогресуванні КРА від I до II стадії медіана експресії віментину статистично значущо на 18,97 % збільшується ($p < 0,05$). При прогресуванні КРА від II до III стадії медіана експресії віментину також статистично значущо на 16,59 % збільшується ($p < 0,05$). Сумарно при прогресуванні карциноми від I до III стадії цей показник збільшується на 35,56 %. А при прогресуванні карциноми від III до IV збільшення показника медіани експресії віментину не є статистично значущим ($p < 0,05$). Таким чином, статистично значуще збільшення показників експресії віментину має місце при прогресуванні КРА від I до III стадії ($p < 0,05$, рис. 5.10), тобто, як на ранніх, так і на просунутих стадіях прогресування пухлини, і відбувається паралельно із зниженням показників експресії маркерів епітеліального фенотипу, що вже було описано вище.

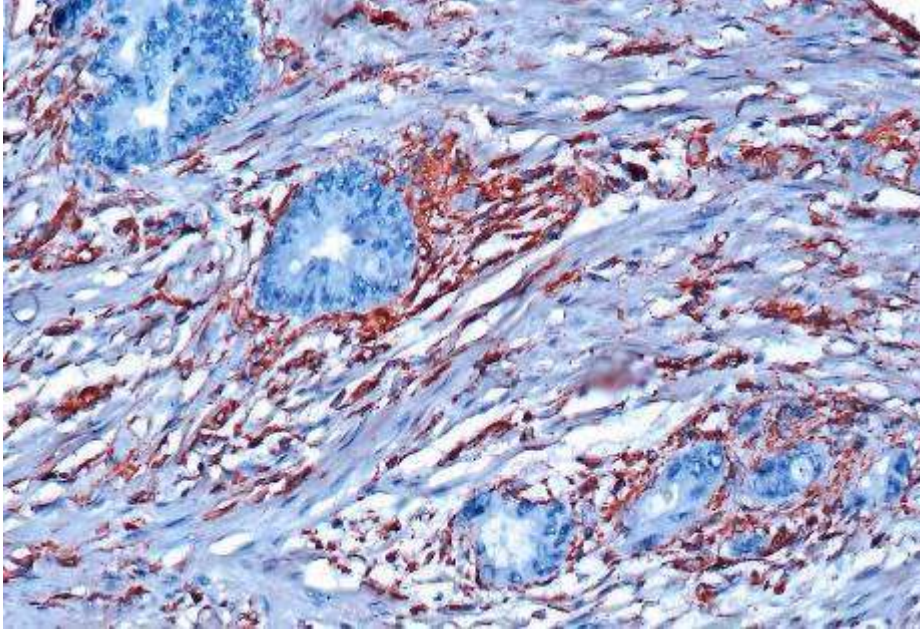


Рисунок 5.9 – Мембранно-цитоплазматична експресія віментину клітинами строми колоректальної аденокарциноми, що згруповані поблизу комплексів ракових клітин. *Mo a Hu Vimentin Ab-2*. Зб. $\times 200$.

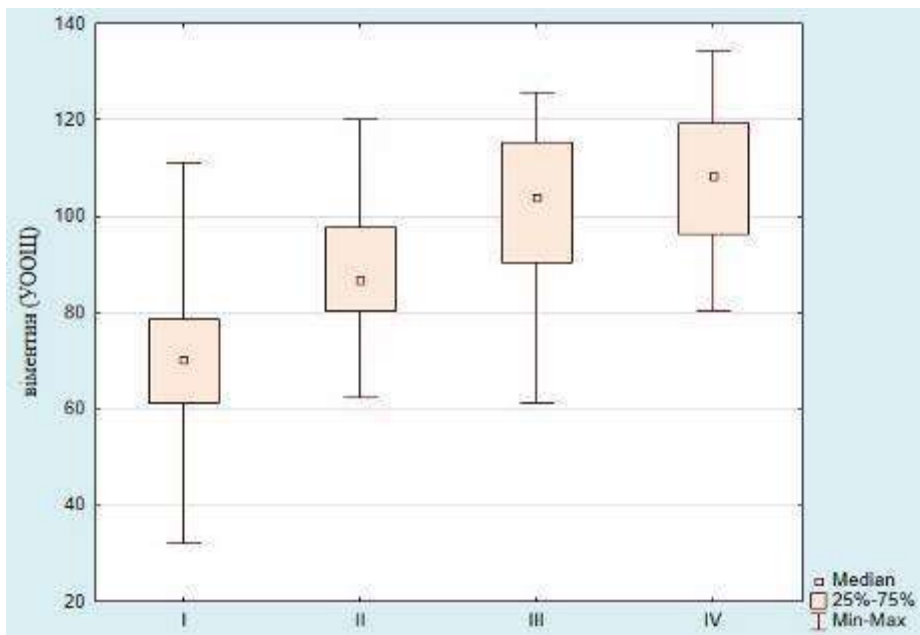


Рисунок 5.10 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії віментину в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

За результатами ІГХ дослідження експресії α -SMA визначено, що в 100 % досліджених зразків КРА мембранно-цитоплазматична експресія α -SMA виявляється в окремих веретеноподібних клітинах строми, скупчення яких

визначаються поблизу залозоподібних структур, сформованих раковими клітинами (рис. 5.11), або ж кластерів ракових клітин.

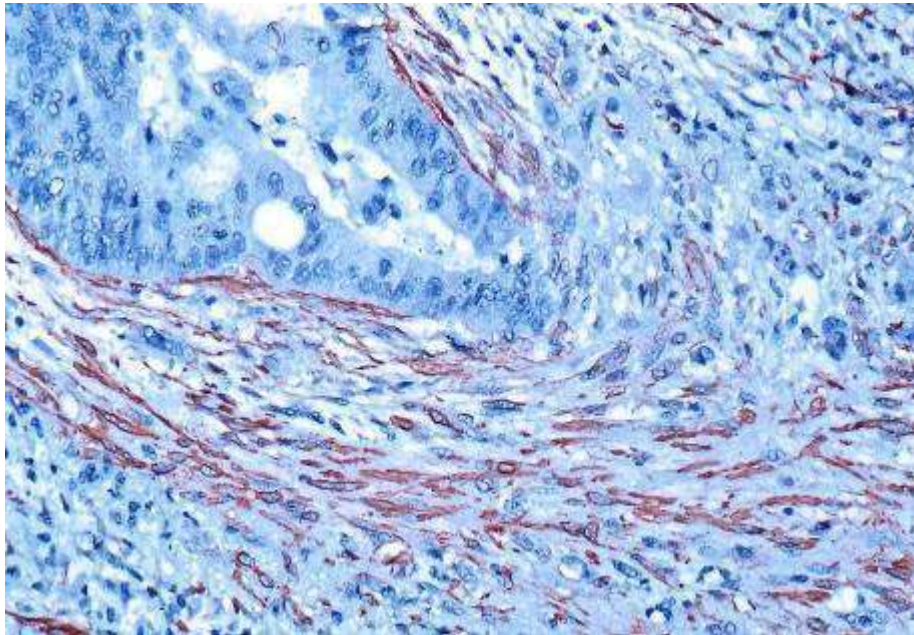


Рисунок 5.11 – Мембранно-цитоплазматична експресія α -SMA веретеноподібними клітинами строми колоректальної аденокарциноми, що мають тенденцію до локації поблизу комплексів ракових клітин. *Mo a-Hu Alpha Smooth Muscle Actin, Clone 1A4*. $36. \times 200$.

Встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем експресії α -SMA, медіана експресії якого становить 75,71 (60,22 ; 90,34) УООЩ. Експресія α -SMA зростає на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА: медіана експресії α -SMA в I стадії становить 41,15 (31,71 ; 48,98) УООЩ, в II стадії вона дорівнює 70,21 (55,47 ; 80,22) УООЩ, в III стадії вона зростає до 88,74 (75,54 ; 95,14) УООЩ, ; в IV стадії – сягає 90,84 (80,34 ; 96,35) УООЩ (рис. 5.12). За даними порівняльного аналізу статистично значуще збільшення показників експресії α -SMA спостерігається при прогресуванні КРА від I до III стадії ($p < 0,05$).

Нами також проведено кореляційний аналіз вивчених показників експресії маркерів епітеліального і мезенхімального фенотипів клітин КРА, результати якого наведені в табл. 5.2. За результатами кореляційного аналізу встановлено наявність прямих кореляцій між показниками експресії маркерів

одного й того ж самого фенотипу в КРА: наявний прямий сильний зв'язок між низьким рівнем експресії Е-кадгерину і середнім рівнем експресії СК-20 ($r = 0,74$, $p < 0,05$), що є маркерами епітеліального фенотипу; наявний прямий середньої сили зв'язок між середніми рівнями експресії віментину і α -SMA ($r = 0,53$, $p < 0,05$), що є маркерами мезенхімального фенотипу.

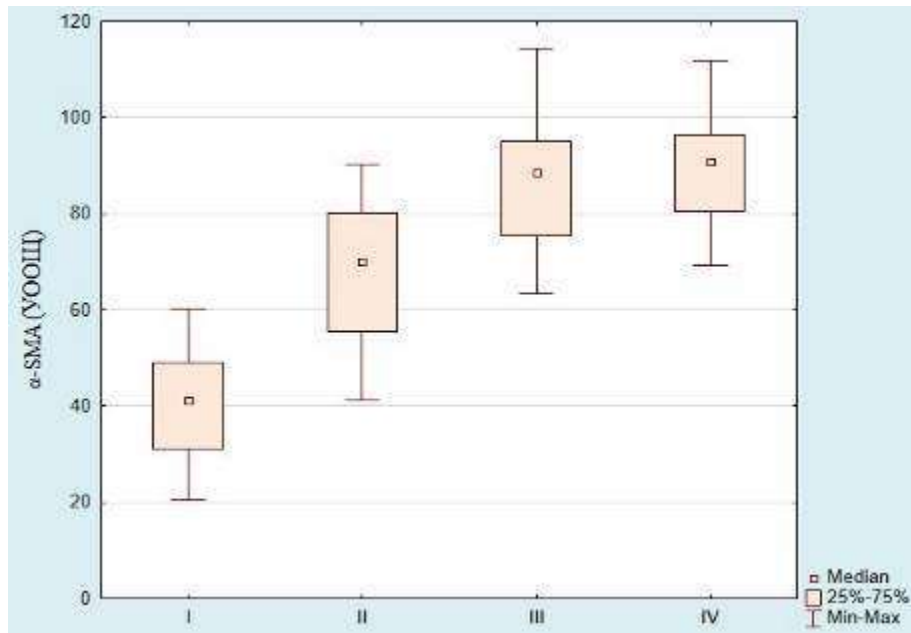


Рисунок 5.12 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії α -SMA в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Таблиця 5.2 – Кореляційні зв'язки між рівнями імуногістохімічної експресії Е-кадгерину, СК-20, віментину, α -SMA в колоректальній аденокарциномі

	Е-кадгерин	СК-20	віментин	α -SMA
Е-кадгерин	1,00	0,74*	-0,43*	-0,53*
СК-20	0,74*	1,00	-0,65*	-0,69*
віментин	-0,43*	-0,65*	1,00	0,53*
α -SMA	-0,53*	-0,69*	0,53*	1,00

Примітка. * – статистично значущий кореляційний зв'язок ($p < 0,05$).

Окрім того, встановлено наявність зворотних кореляцій між показниками експресії маркерів різних фенотипів в КРА. Так, було

встановлено зворотній середньої сили зв'язок між низьким рівнем експресії E-кадгерину і середнім рівнем експресії віментину ($r = -0,43$, $p < 0,05$), а також середнім рівнем експресії α -SMA ($r = -0,53$, $p < 0,05$); а також зворотній середньої сили зв'язок між середнім рівнем експресії СК-20 і середнім рівнем експресії віментину ($r = -0,65$, $p < 0,05$), а також середнім рівнем експресії α -SMA ($r = -0,69$, $p < 0,05$).

Таким чином вивчено основні ІГХ показники епітеліально-мезенхімального переходу на кожній із чотирьох послідовних стадій прогресування КРА.

5.3 Імуногістохімічна характеристика муцинового фенотипу ракових клітин колоректальної аденокарциноми

Особливості муцинового фенотипу клітин неспецифікованої КРА вивчені на I, II, III, IV стадіях її прогресування з урахуванням експресії раковими клітинами MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC та кишкового фактору транскрипції Cdx-2.

Встановлено, що в 86 % досліджених зразків КРА в ракових клітинах виявляється мембранно-цитоплазматична експресія MUC1 середнього рівня (рис. 5.13), медіана експресії якого дорівнює 60,27 (50,26 ; 69,54) УООЩ. Згідно критерію χ^2 MUC1+ пухлини трапляються частіше імунонегативних пухлин ($p < 0,05$).

Експресія MUC1 має певні особливості на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА. Так в карциномах I стадії медіана експресії MUC1 раковими клітинами складає 42,15 (38,14 ; 55,26) УООЩ, в II стадії медіана експресії MUC1 раковими клітинами зростає до 65,54 (55,39 ; 70,04) УООЩ, в III стадії медіана експресії MUC1 дорівнює 65,42 (60,24 ; 71,24) УООЩ, а в IV стадії медіана експресії MUC1 складає 67,71 (55,26 ; 78,29) УООЩ (рис. 5.14).

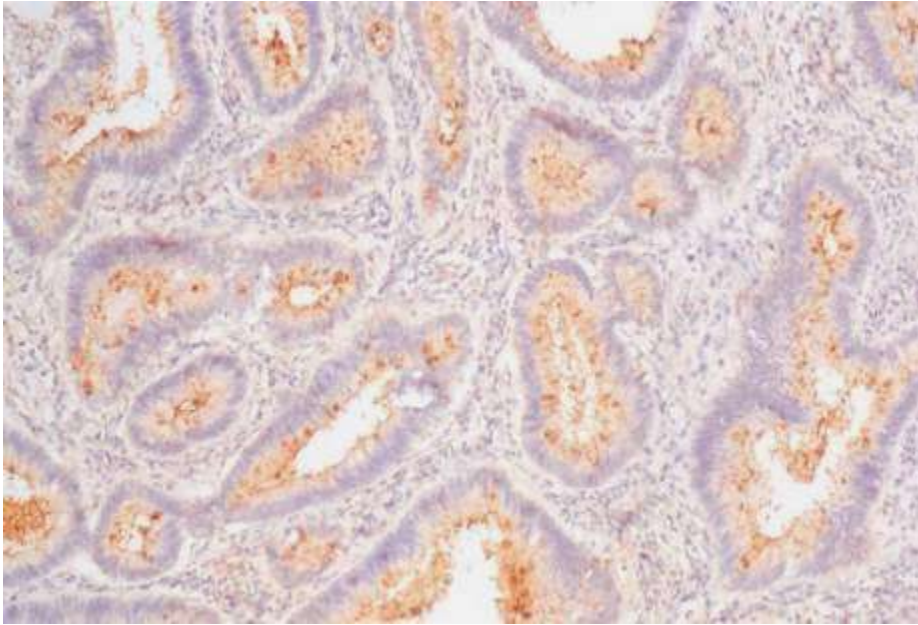


Рисунок 5.13 – Мембранно-цитоплазматична експресія MUC1 в колоректальній аденокарциномі. *Po Rb A-Hu MUC-1 (Epitope Specific Rabbit Antibody)*. 3б. × 100.

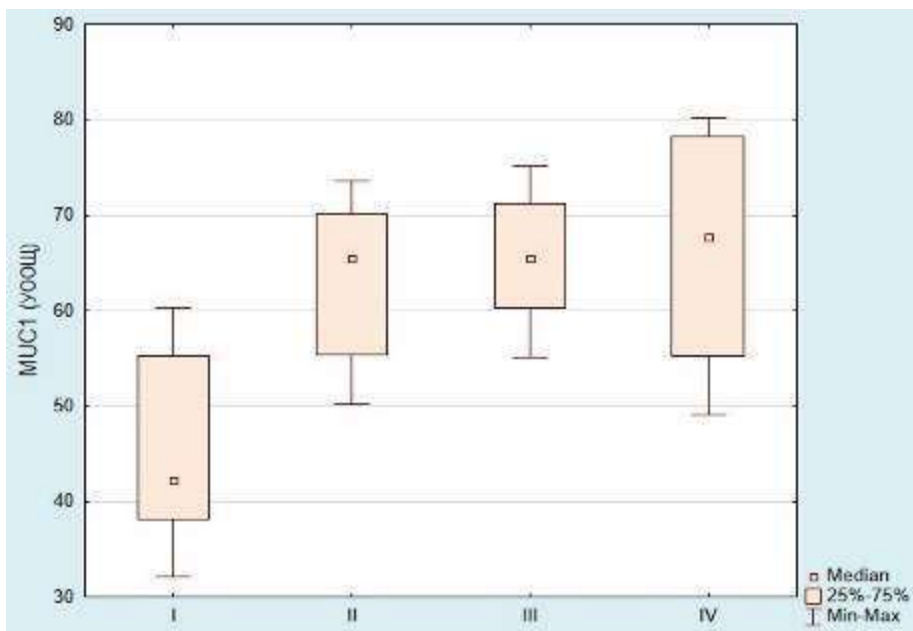


Рисунок 5.14 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії MUC1 в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Таким чином, виявлено статистично значуще на 35,58 % зростання рівня експресії MUC1 раковими клітинами при прогресуванні КРА від I до II стадії ($p < 0,05$). В подальшому прогресуванні КРА медіана експресії MUC1 раковими клітинами дещо коливається, проте, достовірно не змінюється.

Встановлено, що в 88 % зразків неспецифікованої КРА в окремих ракових клітинах виявляється мембранно-цитоплазматична експресія MUC2 низького рівня, медіана експресії MUC2 складає 25,49 (20,08 ; 31,50) УООЩ (рис. 5.15). Згідно критерію χ^2 MUC2+ пухлини трапляються частіше іммунонегативних пухлин ($p < 0,05$).

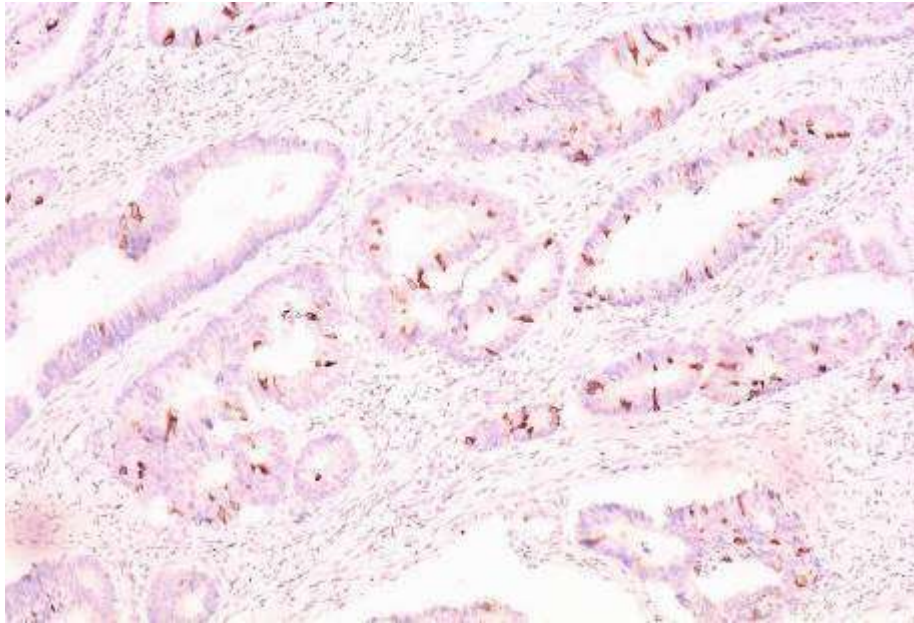


Рисунок 5.15 – Мембранно-цитоплазматична експресія MUC2 окремими раковими клітинами колоректальної аденокарциноми. *Мо a Ни Mucin 2 (MUC2) Ab-2, Clone M53. 36. × 100.*

Досліджено особливості експресії MUC2 на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА. У вивченій послідовності медіана експресії маркеру змінюється наступним чином: в I стадії медіана експресії MUC2 раковими клітинами складає 42,17 (35,54 ; 55,26) УООЩ, в II стадії медіана експресії MUC2 раковими клітинами складає 23,14 (17,26 ; 28,46) УООЩ, в III стадії медіана експресії MUC2 раковими клітинами складає 21,41 (17,47 ; 27,46) УООЩ, в IV стадії медіана експресії MUC2 раковими клітинами складає 22,44 (18,14 ; 26,35) УООЩ. Таким чином, виявлено статистично значуще на 45,13 % зниження рівня експресії MUC2 раковими клітинами при прогресуванні КРА від I до II стадії ($p < 0,05$; рис. 5.16).

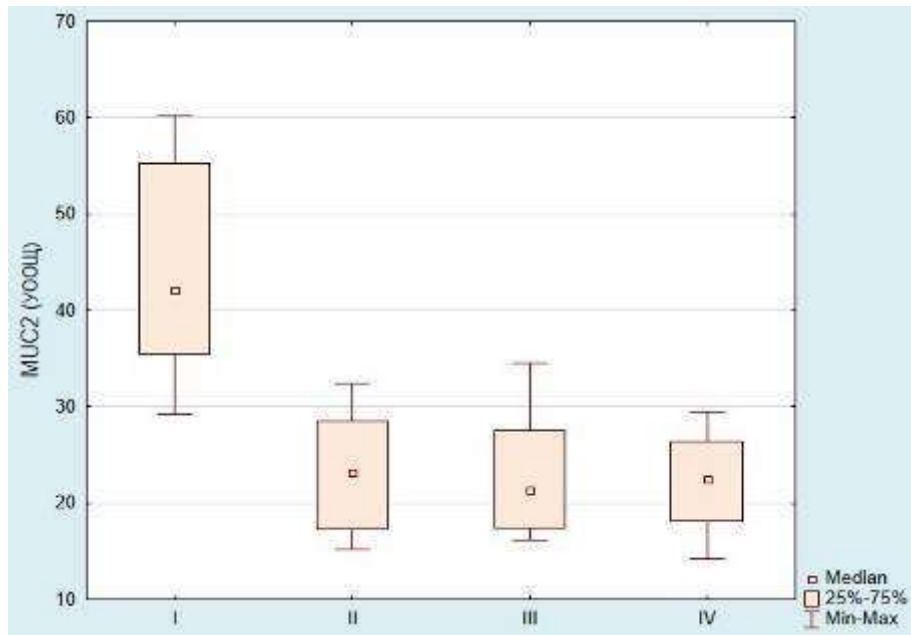


Рисунок 5.16 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії MUC2 в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Встановлено, що КРА характеризується низьким рівнем мембранної експресії MUC4 раковими клітинами, яка виявляється лише в 38 % досліджених зразків. Згідно критерію χ^2 MUC4+ пухлини трапляються рідше іммунонегативних пухлин ($p < 0,05$). Медіана експресії MUC4 в іммунопозитивних випадках складає 38,65 (25,92 ; 42,05) УООЩ (рис. 5.17).

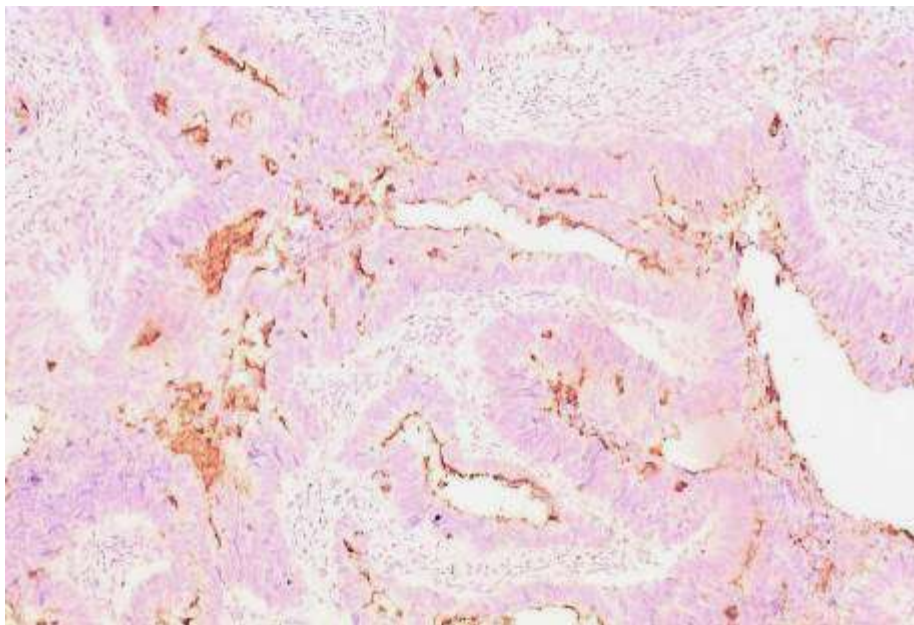


Рисунок 5.17 – Мембранна експресія MUC4 раковими клітинами колоректальної аденокарциноми. *Po Rb A-Hu MUC4*. 36. \times 100.

При аналізі експресії MUC4 на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА визначено: в I стадії медіана експресії MUC4 раковими клітинами складає 50,06 (40,04 ; 59,86) УООЩ, в II стадії медіана експресії MUC4 знижується до 31,41 (21,15 ; 40,04) УООЩ, в III стадії медіана експресії MUC4 дорівнює 36,41 (24,46 ; 38,84) УООЩ, в IV стадії – складає 32,42 (22,46 ; 38,84) УООЩ (рис. 5.18).

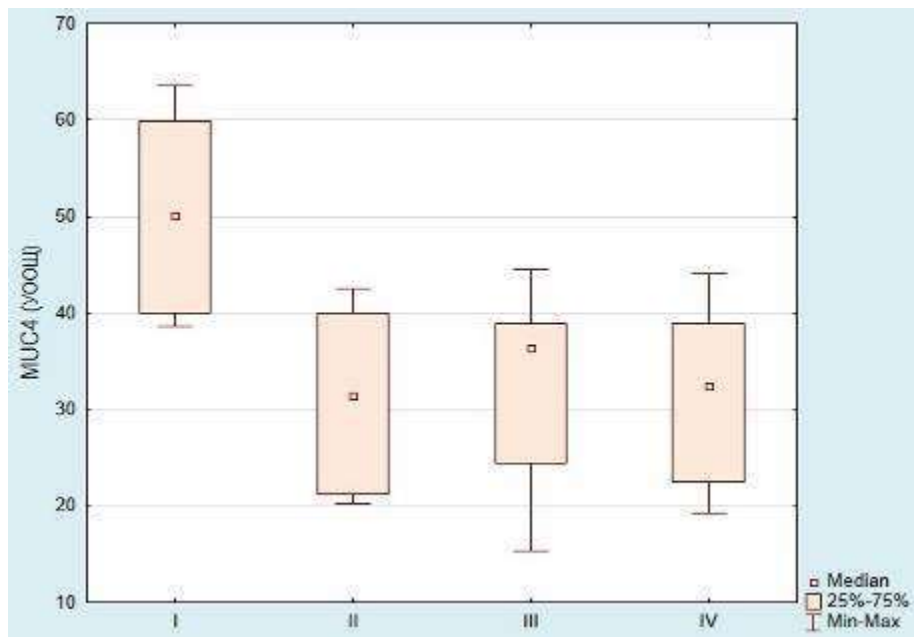


Рисунок 5.18 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії MUC4 в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Таким чином, встановлено статистично значуще на 37,26 % зниження рівня експресії MUC4 раковими клітинами неспецифікованої КРА при її прогресуванні від I до II стадії ($p < 0,05$).

Встановлено, що в 22 % зразків неспецифікованої КРА в окремих ракових клітинах виявляється мембранно-цитоплазматична експресія MUC5AC середнього рівня, медіана якої складає 63,74 (49,49 ; 70,23) УООЩ (рис. 5.19). Згідно критерію χ^2 MUC5AC+ пухлини трапляються рідше іммунонегативних пухлин ($p < 0,05$).

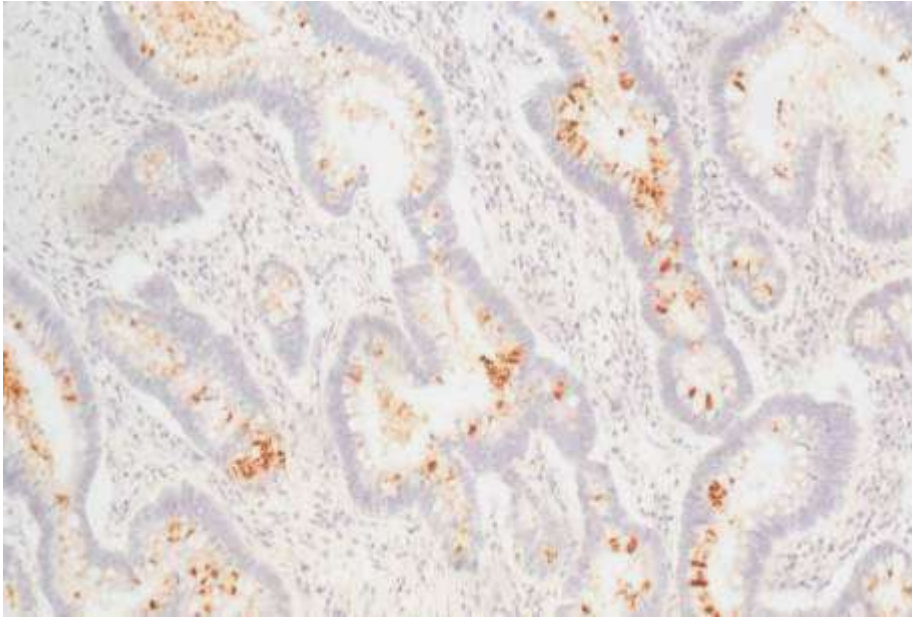


Рисунок 5.19 – Мембранно-цитоплазматична експресія MUC5AC окремими раковими клітинами колоректальної аденокарциноми. *Mo a Hu Mucin 5AC (MUC5AC), Clone 45M1. 3б. × 100.*

За результатами аналізу показників експресії MUC5AC на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА визначено, що: в I стадії медіана експресії MUC5AC раковими клітинами складає 61,68 (42,15 ; 70,25) УООЩ, в II стадії медіана експресії MUC5AC раковими клітинами дорівнює 60,26 (40,51 ; 69,35) УООЩ, в III стадії медіана експресії MUC5AC раковими клітинами не достовірно зростає до 71,87 (61,23 ; 78,79) УООЩ, в IV стадії медіана експресії MUC5AC раковими клітинами дорівнює 60,26 (50,03 ; 68,13) УООЩ. Таким чином, показники експресії раковими клітинами MUC5AC на I-IV стадіях прогресування КРА статистично значущо не відрізняються ($p > 0,05$).

В 100 % досліджених випадків КРА характеризується ядерно-цитоплазматичною експресією Cdx-2 середнього рівня, медіана експресії якої становить 78,38 (55,98 ; 88,65) УООЩ (рис. 5.20).

Особливості експресії Cdx-2 на I, II, III, IV стадіях прогресування КРА є наступними. В I стадії КРА медіана експресії маркера складає 54,15 (41,96 ; 59,43) УООЩ, в II стадії вона дорівнює 66,21 (55,22 ; 76,25) УООЩ, в III стадії КРА – зростає до 88,35 (80,04 ; 98,16) УООЩ, в IV стадії – дорівнює

88,34 (80,36 ; 95,12) УООЩ ($p < 0,05$; рис. 5.21). Тобто, виявлено статистично значуще на 25,06 % збільшення рівня експресії Cdx-2 раковими клітинами при прогресуванні КРА від II до III стадії.

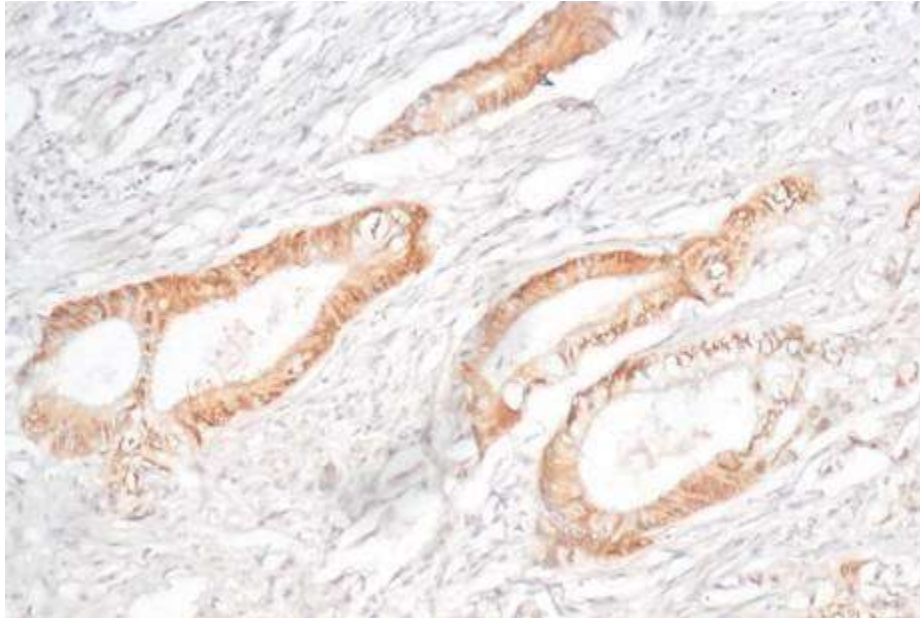


Рисунок 5.20 – Ядерно-цитоплазматична експресія Cdx-2 в колоректальній аденокарциномі. *Mo a Hu CDX2, Clone DAK-CKX2. 36. × 200.*

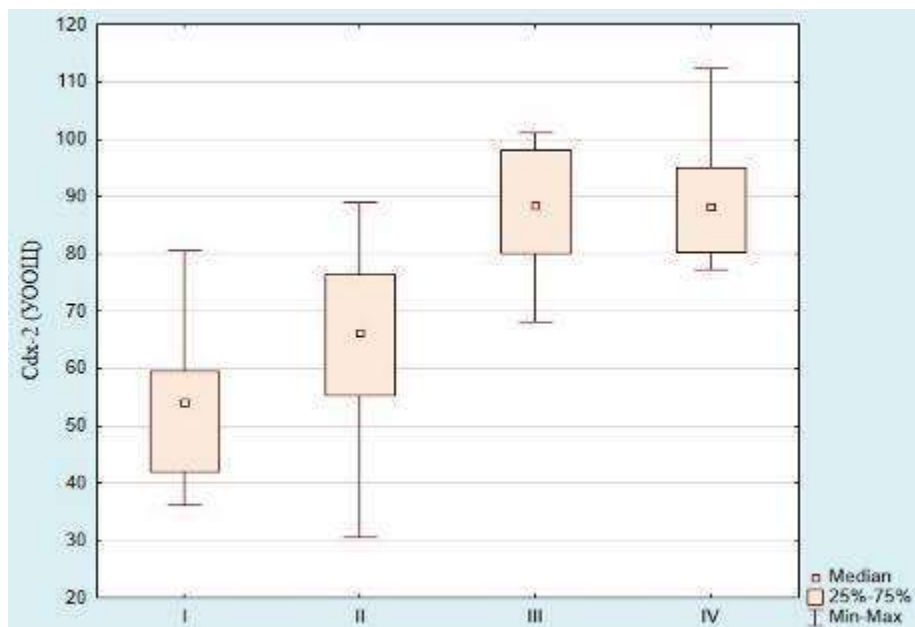


Рисунок 5.21 – Порівняльний аналіз показників імуногістохімічної експресії Cdx-2 в колоректальній аденокарциномі I, II, III, IV стадій.

Таким чином вивчено особливості експресії маркерів муцинового фенотипу на кожній із чотирьох послідовних стадій прогресування КРА.

5.4 Порівняльний аналіз імуногістохімічних і молекулярно-генетичних параметрів неметастатичної та метастатичної колоректальної аденокарциноми

Виконано порівняльний аналіз імуногістохімічних показників в підгрупі неметастатичної КРА (56 випадків, I-II стадії: T₁₋₄ N₀ M₀, G₁₋₃) та в підгрупі метастатичної КРА (64 випадки, III-IV стадії: T₁₋₄ N₁₋₂ M₁, G₁₋₃). В цих підгрупах проаналізовані показники проліферативно-апоптотичних властивостей клітин (рівні експресії Ki-67, p53, каспази-3), ІГХ показники неоангіогенезу (рівні експресії VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34), наявність та кількість клітин із властивостями стовбурових (за рівнями експресії CD44, ALDH1, EpCAM), показники муцинового фенотипу (рівні експресії MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, Cdx-2), показники епітеліально-мезенхімальної трансформації (рівні експресії E-кадгерину, β-катеніну, СК-20, віментину, α-SMA), а також показники експресії мРНК генів *Ki-67*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS*, і ІГХ експресії кодованих ними білків (Ki-67, p53, E-кадгерину, β-катеніну, відповідно).

Згідно результатів проведеного ІГХ дослідження неметастатична і метастатична КРА характеризуються середніми рівнями клітинної проліферації – медіана експресії Ki-67 в неметастатичній КРА становить 58,44 (43,54 ; 74,90) %, а медіана експресії Ki-67 в метастатичній КРА становить експресії Ki-67 в неметастатичній КРА становить 37,12 (27,37 ; 40,89) %. Ці показники достовірно на 36,49 % відрізняються, тобто, достовірно на 36,49 % більшим є рівень клітинної проліферації в неметастатичній КРА (табл. 5.3).

Також згідно результатів проведеного ІГХ дослідження неметастатична і метастатична КРА характеризуються середніми рівнями накопичення

онкопротеїну p53 – медіана експресії p53 в неметастатичній КРА становить 39,97 (24,61 ; 61,14) %, а медіана експресії p53 в метастатичній КРА становить експресії Ki-67 в неметастатичній КРА становить 72,91 (48,15 ; 85,36) %. Ці показники достовірно на 45,18 % відрізняються, тобто, достовірно на 45,18 % більшим є рівень накопичення онкопротеїну p53 в метастатичній КРА (табл. 5.3).

Окрім того, неметастатична КРА характеризується середнім рівнем апоптозу (за експресією каспази-3), медіана експресії маркеру становить 54,45 (46,73 ; 62,48) УООЩ, в той час як метастатична КРА характеризується низьким рівнем апоптозу за експресією каспази-3, медіана експресії маркеру становить 26,55 (21,67; 34,74) УООЩ. Таким чином, метастатична КРА відрізняється достовірно нижчим на 51,24 % низьким рівнем апоптозу, в порівнянні з неметастатичною карциномою (табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Показники експресії Ki-67, p53, каспази-3 в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі (КРА)

Експресія маркеру	Медіана експресії в неметастатичній КРА	Медіана експресії в метастатичній КРА	Значення p
Ki-67	58,44 (43,54 ; 74,90) %	37,12 (27,37 ; 40,89) %	p < 0,05
p53	39,97 (24,61 ; 61,14) %	72,91 (48,15 ; 85,36) %	p < 0,05
каспаза-3	54,45 (46,73 ; 62,48) УООЩ	26,55 (21,67; 34,74) УООЩ	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Встановлено, що неметастатична і метастатична КРА характеризуються середніми рівнями експресії VEGF-A і VEGFR-2. Медіана експресії VEGF-A в неметастатичній КРА дорівнює 55,24 (37,80; 68,24) УООЩ, в метастатичній КРА – 81,24 (70,94; 99,67) УООЩ. Порівняльний аналіз вказує на те, що рівень експресії VEGF-A є достовірно на 32,02 % вищим в метастатичній карциномі. Медіана експресії VEGFR-2 в неметастатичній КРА дорівнює 64,65 (50,27; 82,71) УООЩ, в метастатичній КРА – 99,91 (91,09; 113,16) УООЩ. Порівняльний аналіз вказує на те, що

рівень експресії VEGFR-2 є достовірно на 35,30 % вищим в метастатичній карциномі (табл. 5.4).

Неметастатична КРА характеризується вкрай низьким рівнем експресії VEGFR-1, медіана експресії маркеру дорівнює 19,58 (15,76; 23,02) УООЩ. Метастатична КРА характеризується низьким рівнем експресії VEGFR-1, медіана експресії маркеру дорівнює 24,12 (18,96; 31,43) УООЩ. Порівняльний аналіз вказує на те, що різниця між цими показниками не є статистично значущою (табл. 5.4).

Показник кількості мікросудин в СПЗМ в неметастатичній КРА складає 88,50 (63,00; 112,00), а в метастатичній КРА цей показник становить 95,50 (76,50; 119,50). За результатами порівняльного аналізу статистично значуща різниця між цими показниками відсутня (табл. 5.4).

Таблиця 5.4 – Показники експресії VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, CD34 в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі (КРА)

Експресія маркеру	Медіана експресії в неметастатичній КРА	Медіана експресії в метастатичній КРА	Значення р
VEGF-A	55,24 (37,80; 68,24) УООЩ	81,24 (70,94; 99,67) УООЩ	p < 0,05
VEGFR-1	19,58 (15,76; 23,02) УООЩ	24,12 (18,96; 31,43) УООЩ	p > 0,05
VEGFR-2	64,65 (50,27; 82,71) УООЩ	99,91 (91,09; 113,16) УООЩ	p < 0,05
CD34	88,50 (63,00; 112,00)	95,50 (76,50; 119,50)	p > 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Встановлено, що неметастатична КРА характеризується медіаною кількості CD44+ клітин строми, що дорівнює 42,17 (28,56 ; 54,21) %, в той час як метастатична КРА характеризується медіаною кількості CD44+ клітин строми, що дорівнює 77,71 (63,69 ; 80,19) %. Порівняльний аналіз вказує на те, що метастатична КРА відрізняється достовірно на 45,74 % вищим показником відносної площі CD44+ клітин строми, порівняно із неметастатичною карциномою (табл. 5.5).

Неметастатична КРА характеризується медіаною кількості ALDH1+ клітин строми, що дорівнює 22,15 (19,36 ; 31,12) %, в той час як метастатична КРА характеризується медіаною кількості ALDH1+ клітин строми, що дорівнює 45,77 (41,23 ; 51,17) %. Порівняльний аналіз вказує на те, що метастатична КРА відрізняється достовірно на 51,58 % вищим показником відносної площі ALDH1+ клітин строми, порівняно із неметастатичною карциномою (табл. 5.5).

Окрім того, неметастатична КРА характеризується медіаною кількості ALDH1+ ракових клітин, що дорівнює 37,17 (31,07 ; 47,18) %, в той час як метастатична КРА характеризується медіаною кількості ALDH1+ ракових клітин, що дорівнює 42,42 (33,14 ; 50,56) %. За результатами порівняльного аналізу статистично значуща різниця між цими показниками відсутня (табл. 5.5).

Також неметастатична і метастатична КРА характеризуються середніми рівнями експресії ЕрСМ раковими клітинами – в неметастатичній карциномі медіана експресії маркера становила 80,24 (74,76 ; 90,18) УООЩ, в той час як в метастатичній карциномі медіана експресії маркера становила 99,02 (92,14 ; 108,38) УООЩ. Таким чином, медіана експресії ЕрСМ раковими клітинами є достовірно на 18,97 % вищою в метастатичній КРА, при її порівнянні з неметастатичною (табл. 5.5).

Таблиця 5.5 – Показники експресії CD44, ALDH1, ЕрСМ в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі (КРА)

Експресія маркера і її локація	Медіана експресії в неметастатичній КРА	Медіана експресії в метастатичній КРА	Значення p
CD44 в клітинах строми	42,17 (28,56 ; 54,21) %	77,71 (63,69 ; 80,19) %	p < 0,05
ALDH1 в клітинах строми	22,15 (19,36 ; 31,12) %	45,77 (41,23 ; 51,17) %	p < 0,05
ALDH1 в ракових клітинах	37,17 (31,07 ; 47,18) %	42,42 (33,14 ; 50,56) %	p > 0,05
ЕрСМ в ракових клітинах	80,24 (74,76 ; 90,18) УООЩ	99,02 (92,14 ; 108,38) УООЩ	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

За результатами ІГХ дослідження встановлено, що неметастатична КРА характеризується середнім рівнем експресії Е-кадгерину (медіана експресії маркеру становить 85,60 (43,15; 100,14) УООЩ), високим рівнем експресії β -катеніну (медіана експресії маркеру становить 119,22 (112,30; 127,72) УООЩ), середнім рівнем експресії СК-20 (медіана експресії маркеру становить 70,21 (60,24; 85,15) УООЩ), а також середніми рівнями експресії віментину (медіана експресії маркеру становить 81,14 (70,22; 92,35) УООЩ) і α -SMA (медіана експресії маркеру становить 55,36 (42,15; 71,21) УООЩ).

Метастатична КРА, в свою чергу, характеризується низьким рівнем експресії Е-кадгерину (медіана експресії маркеру становить 31,42 (23,57; 43,74) УООЩ), високим рівнем експресії β -катеніну (медіана експресії маркеру становить 41,45 (32,21; 48,88) УООЩ), низьким рівнем експресії СК-20 (медіана експресії маркеру становить 41,45 (32,21; 48,88) УООЩ), високим рівнем експресії віментину (медіана експресії маркеру становить 105,73 (93,83; 115,35) УООЩ) і середнім рівнем експресії α -SMA (медіана експресії маркеру становить 90,22 (80,22 ; 96,23) УООЩ).

За результатами порівняльного аналізу встановлено, що рівень експресії Е-кадгерину, що є маркером епітеліального фенотипу, є достовірно на 63,30 % нижчим в метастатичній КРА, при її порівнянні із неметастатичною карциномою. Рівень експресії СК-20, що також є маркером епітеліального фенотипу, є достовірно на 40,97 % нижчим в метастатичній КРА, при її порівнянні із неметастатичною карциномою. Також встановлено, що рівень експресії віментину, що є маркером мезенхімального фенотипу, є достовірно на 23,26 % вищим в метастатичній КРА, при її порівнянні із неметастатичною карциномою. А рівень експресії α -SMA, що також є маркером мезенхімального фенотипу, є достовірно на 38,64 % вищим в метастатичній карциномі, при її порівнянні із неметастатичною карциномою (табл. 5.6).

Таблиця 5.6 – Показники експресії Е-кадгерину, β -катеніну, СК-20, віментину, α -SMA в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі (КРА)

Експресія маркеру	Медіана експресії в неметастатичній КРА	Медіана експресії в метастатичній КРА	Значення р
Е-кадгерин	85,60 (43,15; 100,14) УООЩ	31,42 (23,57; 43,74) УООЩ	p < 0,05
β -катенін	119,22 (112,30; 127,72) УООЩ	115,61 (110,71; 120,30) УООЩ	p > 0,05
СК-20	70,21(60,24; 85,15) УООЩ	41,45 (32,21; 48,88) УООЩ	p < 0,05
віментин	81,14 (70,22; 92,35) УООЩ	105,73 (93,83; 115,35) УООЩ	p < 0,05
α -SMA	55,36 (42,15; 71,21) УООЩ	90,22 (80,22 ; 96,23) УООЩ	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Встановлено, що неметастатична КРА характеризується середніми рівнями експресії MUC1 (медіана експресії маркеру становить 55,32 (42,15 ; 65,54) УООЩ), MUC5AC (медіана експресії маркеру становить 60,26 (42,15 ; 69,35) УООЩ), Cdx-2 (медіана експресії маркеру становить 55,98 (48,98 ; 68,34) УООЩ) і низькими рівнями експресії MUC2 (медіана експресії маркеру становить 30,50 (23,14 ; 42,17) УООЩ), MUC4 (медіана експресії маркеру становить 40,04 (31,41 ; 50,06) УООЩ).

Метастатична КРА, в свою чергу, також середніми рівнями експресії MUC1 (медіана експресії маркеру становить 65,89 (58,39 ; 73,22) УООЩ), MUC5AC (медіана експресії маркеру становить 66,34 (55,17 ; 75,45) УООЩ), Cdx-2 (медіана експресії маркеру становить 88,34 (80,36 ; 95,23) УООЩ) і низькими рівнями експресії MUC2 (медіана експресії маркеру становить 21,92 (18,14 ; 26,56) УООЩ), MUC4 (медіана експресії маркеру становить 34,41 (24,46 ; 38,84) УООЩ).

При цьому порівняльний аналіз вказує на те, що метастатичну карциному відрізняє від неметастатичної статистично значущо на 16,05 % вищий рівень експресії MUC1, статистично значущо на 36,64 % вищий рівень

експресії Cdx-2, а також статистично значущо на 28,14 % нижчий рівень експресії MUC2 і на 14,07 % нижчий рівень експресії MUC4 (табл. 5.7).

Рівень експресії MUC5AC є середнім, виявляється з однаковою частотою та лише в окремих випадках в двох досліджуваних підгрупах, статистично значуща різниця за рівнем експресії цього маркера відсутня (табл. 5.7).

Таблиця 5.7 – Показники експресії MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, Cdx-2 в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі (КРА)

Експресія маркеру	Медіана експресії в неметастатичній КРА	Медіана експресії в метастатичній КРА	Значення р
MUC1	55,32 (42,15 ; 65,54) УООЩ	65,89 (58,39 ; 73,22) УООЩ	p < 0,05
MUC2	30,50 (23,14 ; 42,17) УООЩ	21,92 (18,14 ; 26,56) УООЩ	p < 0,05
MUC4	40,04 (31,41 ; 50,06) УООЩ	34,41 (24,46 ; 38,84) УООЩ	p < 0,05
MUC5AC	60,26 (42,15 ; 69,35) УООЩ	66,34 (55,17 ; 75,45) УООЩ	p > 0,05
Cdx-2	55,98 (48,98 ; 68,34) УООЩ	88,34 (80,36 ; 95,23) УООЩ	p < 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

За результатами ПЛР дослідження встановлено, що неметастатична і метастатична КРА характеризуються підвищеною транскрипційною активністю генів *Ki-67*, *TP53*, *KRAS*, *CTNNB1*, а також зниженою транскрипційною активністю гену *CDH1*. Показник медіани відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* в неметастатичній КРА становив 2,96 (2,30 ; 3,54), а в метастатичній карциномі – 1,12 (0,48 ; 1,41). Показник медіани відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в неметастатичній КРА становив 2,55 (1,16 ; 3,00), а в метастатичній карциномі – 6,24 (3,80; 8,80). Показник медіани відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* в неметастатичній КРА становив 1,20 (0,41 ; 1,60), а в метастатичній карциномі – 2,66 (1,56 ; 2,93). Показник медіани відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNNB1* в неметастатичній КРА

становив 3,42 (2,48 ; 5,69), а в метастатичній карциномі – 2,04 (1,35 ; 3,87). Показник медіани відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* в неметастатичній КРА становив 0,66 (0,27 ; 1,14), а в метастатичній карциномі – 0,09 (0,06 ; 0,39).

При порівняльному аналізі ІГХ і МГ показників неметастатичної і метастатичної КРА (табл. 5.8) встановлено, що результати паралельних молекулярно-генетичних і імуногістохімічних досліджень узгоджуються між собою. Метастатичну КРА відрізняють статистично значущо нижчі рівні транскрипційної активності генів *Ki-67* (на 62,17 %) і *CDH1* (на 86,37 %), а також статистично значущо нижчі рівні ІГХ експресії протеїнів, що кодуються цими генами, про що вже було сказано вище.

Таблиця 5.8 – Показники відносної нормалізованої експресії мРНК генів *Ki-67*, *TP53*, *KRAS*, *CDH1*, *CTNNB1* і імуногістохімічної експресії *Ki-67*, p53, Е-кадгерину, β-катеніну в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі (КРА)

Визначена експресія	Медіана експресії в неметастатичній КРА	Медіана експресії в метастатичній КРА	Значення p
мРНК <i>Ki-67</i>	2,96 (2,30 ; 3,54)	1,12 (0,48 ; 1,41)	p < 0,05
<i>Ki-67</i>	58,44 (43,54 ; 74,90) %	37,12 (27,37 ; 40,89) %	p < 0,05
мРНК <i>TP53</i>	2,55 (1,16 ; 3,00)	6,24 (3,80 ; 8,80)	p < 0,05
p53	39,97 (24,61 ; 61,14) %	72,91 (48,15 ; 85,36) %	p < 0,05
мРНК <i>KRAS</i>	1,20 (0,41 ; 1,60)	2,66 (1,56 ; 2,93)	p < 0,05
мРНК <i>CDH1</i>	0,66 (0,27 ; 1,14)	0,09 (0,06 ; 0,39)	p < 0,05
Е-кадгерину	85,60 (43,15 ; 100,14) УООЩ	31,42 (23,57 ; 43,74) УООЩ	p < 0,05
мРНК <i>CTNNB1</i>	3,42 (2,48 ; 5,69)	2,04 (1,35 ; 3,87)	p > 0,05
β-катеніну	119,22 (112,30 ; 127,72) УООЩ	115,61 (110,71 ; 120,30) УООЩ	p > 0,05

Примітка. **p < 0,05** – статистично значуща різниця.

Метастатичну КРА також відрізняють статистично значущо вищі рівні відносної нормалізованої експресії мРНК генів *TP53* (на 59,17 %) і *KRAS* (на 54,89 %), а також статистично значущо вищий рівень ІГХ експресії онкопротеїну p53 (табл. 5.8), про що вже було сказано вище.

Резюме. Досліджено параметри епітеліально-мезенхімальної трансформації та муцинового фенотипу в колоректальній аденокарциномі. Проведено порівняння цих параметрів для кожної із стадій прогресування КРА. Окрім того, проведено комплексний аналіз усіх досліджених МГ і ІГХ параметрів в неметастатичній та метастатичній колоректальній аденокарциномі.

Встановлено, що КРА характеризується зниженою транскрипційною активністю гену *CDH1*, що зменшується в 11 разів при прогресуванні карциноми від I до IV стадії, а також корелює з низьким рівнем експресії Е-кадгерину, що також знижується в дослідженій послідовності (на 71,83 %). При цьому КРА характеризується стабільно підвищеною транскрипційною активністю гену *CTNNB1*, що достовірно не змінюється при прогресуванні карциноми від I до IV стадії, і корелює зі стабільно високим рівнем експресії β -катеніну, який також достовірно не змінюється в дослідженій послідовності. Додатково, між підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS* і високим рівнем експресії β -катеніну встановлено прямий середньої сили кореляційний зв'язок ($r = 0,41$, $p < 0,05$) та між підвищеною транскрипційною активністю гену *KRAS* і низьким рівнем експресії Е-кадгерину – зворотній середньої сили кореляційний зв'язок ($r = -0,47$, $p < 0,05$).

Показано, що зниження експресії Е-кадгерину при прогресуванні КРА від I до IV стадії відбувається паралельно із зниженням на 59,94 % експресії ще одного маркера епітеліального фенотипу – СК-20. За результатами дослідження ІГХ експресії маркерів мезенхімального фенотипу в КРА, при

прогресуванні карциноми від I до IV стадії достовірно на 35,26 % підвищуються рівні експресії віментину і на 54,71 % достовірно підвищуються рівні експресії α -SMA.

За даними кореляційного аналізу наявний прямий сильний зв'язок між низьким рівнем експресії E-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 ($r = 0,53$, $p < 0,05$), що відображає паралельне зниження рівнів експресії маркерів епітеліального фенотипу і збільшення рівнів експресії маркерів мезенхімального фенотипу. 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 ($r = -0,69$, $p < 0,05$), що відображає взаємозв'язок між втратою епітеліальних властивостей і набуттям мезенхімальних властивостей.

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

Аналіз результатів, отриманих при порівнянні неметастатичної і метастатичної колоректальної аденокарциноми, виявив низку статистично значущих відмінностей. Метастатична КРА відрізняється від неметастатичної достовірно нижчим рівнем проліферації (на 36,49 % за експресією Ki-67) і нижчим на 42,38 % рівнем відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67*. Метастатична КРА відрізняється від неметастатичної статистично значущо вищими рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* (на 23,34 %) і експресії

онкопротеїну p53 (на 45,18 %), а також вищим рівнем відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS* (на 55,27 %),

Метастатична колоректальна аденокарцинома відрізняється від неметастатичної карциноми достовірно вищими рівнями експресії маркерів неоангіогенезу: метастатичну карциному відрізняє на 32,04 % вищий рівень експресії VEGF-A і на 35,30 % вищий рівень експресії VEGFR-2.

Метастатична колоректальна аденокарцинома відрізняється від неметастатичної карциноми значущо нижчими рівнями експресії пухлинними клітинами маркерів епітеліального фенотипу та вищими рівнями експресії пухлинними клітинами маркерів мезенхімального фенотипу. Так, рівень експресії E-кадгерину є на 63,30 % нижчим в метастатичній КРА при її порівнянні із неметастатичною карциномою, а рівень експресії СК-20 є на 40,97 % нижчим в метастатичній КРА при її порівнянні із неметастатичною карциномою. Рівень експресії віментину є на 23,26 % вищим в метастатичній КРА при її порівнянні із неметастатичною карциномою, а рівень експресії α -SMA є на 38,64 % вищим в метастатичній КРА при її порівнянні із неметастатичною карциномою.

Окрім того, встановлено, що метастатична колоректальна аденокарцинома відрізняється достовірно на 16,05 % більшим рівнем експресії пан-епітеліального мембранного муцину MUC1, в порівнянні із неметастатичною карциномою, а також достовірно на 36,64 % більшим рівнем експресії кишкового фактору транскрипції Cdx-2 в порівнянні із неметастатичною карциномою. Метастатична КРА також відрізняється достовірно на 28,14 % нижчим рівнем експресії MUC2 в порівнянні із неметастатичною карциномою, а також достовірно на 14,07 % нижчим рівнем експресії MUC4 в порівнянні із неметастатичною карциномою.

Також встановлено, що метастатична колоректальна аденокарцинома відрізняється статистично значущо більшими показниками експресії маркерів стовбурових клітин. Так, було встановлено, що метастатична КРА відрізняється достовірно на 18,97 % більшим рівнем експресії ЕрСМ

раковими клітинами, достовірно на 45,74 % більшим показником відносної площі CD44-позитивних клітин строми, а також достовірно на 51,61 % більшим показником відносної площі ALDH1-позитивних клітин строми.

Матеріали розділу відображені у 8-х статтях [161-168] та у 1-х тезах [169].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В цьому дослідженні було встановлено, що аденоми і зубчасті новоутворення дистальної товстої кишки характеризуються середнім рівнем проліферативної активності клітин (за експресією Ki-67), низькими та середніми рівнями накопичення онкопротеїну p53 (за експресією однойменного маркеру), а також низьким рівнем апоптозу (за експресією каспази-3). При цьому було показано, що в усіх досліджених гістологічних варіантах high-grade поліпів ДТК рівні проліферації та накопичення p53 є достовірно вищими, а рівень апоптозу є достовірно нижчим, порівняно із аналогічними low-grade поліпами ДТК. При цьому виняток склали ворсинчасті аденоми, в яких не було встановлено достовірної різниці між рівнями апоптозу за умов дисплазії низького та високого ступеня. Адже, вже в ворсинчастих аденомах з дисплазією низького ступеня ці показники наближаються до значень аналогічних показників в ворсинчастих аденомах з дисплазією високого ступеня.

За даними літератури збільшення проліферативної активності клітин в прогресії звичайних колоректальних аденом в 70 % випадків обумовлено мутаціями гену APC. Мутації цього гену призводять до перманентної активації Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду, що, в свою чергу, призводить до зростання продукції прозапальних цитокінів, пригніченню апоптозу, надлишкової активації проліферації, а також до епітеліально-мезенхімальної трансформації [11]. Звичайні колоректальні аденоми згідно літературних даних характеризуються діапазоном середніх значень рівня експресії Ki-67 [11], що узгоджується із отриманими в цьому дослідженні даними. Відносно ворсинчастих аденом, для яких не було встановлено достовірного зростання клітинної проліферації (за медіанами експресії Ki-67) при порівнянні показників low-grade і high-grade поліпів, треба зазначити, що ці поліпи мають найбільший злоякісний потенціал (за даними літератури

[1, 9]). В цій роботі було показано, що вже на етапі low-grade дисплазії ворсинчасті аденоми характеризуються медіаною експресії Ki-67, що наближується до високого рівня (65,15 (62,44 ; 70,22) %) і достовірно перевищує медіани експресії Ki-67 інших досліджених low-grade аденом і зубчастих новоутворень ДТК. Базуючись на цьому, можна припустити, що в прогресії ворсинчастих аденом мутації, що є пусковими для активації надлишкової проліферації, відбуваються раніше.

Відносно зубчастих новоутворень відомо, що найбільш ранніми молекулярно-генетичними аномаліями, що обумовлюють запуск їх прогресування, є мутації генів *KRAS* та / або *BRAF*. Ці мутації призводять до метилювання CpG острівців, внаслідок чого відбувається сайленсинг низки тумор-супресорних генів і, як наслідок, втрата контролю над рівнями проліферації та апоптозу епітеліоцитів [16]. Зубчасті новоутворення товстої кишки згідно літературних даних характеризуються діапазоном середніх значень рівня експресії Ki-67 [16], що узгоджується із отриманими в цьому дослідженні даними.

Обидва механізми, що описані вище для звичайних аденом і зубчастих новоутворень, запускають не тільки надлишкову проліферацію, а й блокування шляхів апоптозу [9, 16]. Тобто, підвищений темп новоутворення нових клітинних поколінь асоціюється із пригніченням елімінації старих та / або дефектних клітин, що є ідеальною умовою для прогресування будь-якої неоплазії. Це узгоджується із результатами кореляційного аналізу, який був проведений в контексті даного дослідження: показано, що показники експресії маркерів проліферації та апоптозу (Ki-67, p53, каспази-3) в аденомах і зубчастих новоутвореннях дистальної товстої кишки статистично значущо корелюють.

Порівняльний аналіз даних, отриманих для high-grade поліпів і високодиференційованої КРА I-II стадій вказує на те, що рівень проліферації в high-grade традиційних зубчастих аденомах і гіперпластичних поліпах є достовірно нижчим аніж рівень проліферації в карциномі. Показники

проліферативної активності клітин інших high-grade поліпів достовірно не відрізняються від показників проліферативної активності клітин високодиференційованої КРА. Базуючись на цьому спостереженні можна припустити, що мутації, типові для прогресування зубчастих поліпів, менше впливають на проліферацію (в меншій мірі прискорюють її) порівняно із мутаціями, що типові для прогресування звичайних колоректальних аденом (адже, для звичайних аденом не було виявлено достовірної різниці).

Імуногістохімічно блокування шляхів апоптозу відображається в зростанні рівня експресії p53 і зниженні рівня експресії каспази-3, що було показано в цій роботі. Адже, за даними літератури відомо, що протеїн p53, який вдається виявити в ядрах клітин використовуючи ІГХ дослідження, не є нормальним («диким») варіантом протеїну. Це протеїн, який є мутантним і не здатним до запуску апоптотичного каскаду (на відміну від «дикого»). А отже, збільшення його експресії відображає «накопичення» генетичних помилок, що призводять до блокування шляхів апоптозу [45-48]. В літературі було описано переважно середній рівень експресії p53 в товстокишкових поліпах з тяжкою дисплазією [9, 170, 171], при цьому системний аналіз показників експресії цього маркера для кожного окремого гістологічного варіанта поліпів товстої кишки був досі відсутній. Рівні експресії каспази-3 в поліпах товстої кишки за даними літератури значно варіюють – переважно в діапазоні низьких – середніх значень [172-174], що узгоджується з отриманими даними. Треба зазначити, що отримані дані суттєво доповнили літературні дані системним аналізом досліджених показників окремо для кожного гістологічного варіанту аденом і зубчастих новоутворень дистальної товстої кишки.

Порівняльний аналіз даних, отриманих для high-grade поліпів і високодиференційованої КРА I-II стадій вказує на те, що усі досліджені різновиди high-grade поліпів, окрім ворсинчастих аденом, відрізняються достовірно нижчими показниками накопичення p53. А медіана експресії p53 в high-grade ворсинчастих аденомах наближується до аналогічного показника

високодиференційованої КРА I-II стадій. Це спостереження узгоджується із даними щодо найбільшого злякисного потенціалу ворсинчастих аденом, порівняно із іншими товстокишковими поліпами [1, 9].

Для гіперпластичних поліпів ДТК була виявлена відмінність: лише в гіперпластичних high-grade поліпах рівень експресії каспази-3 є достовірно вищим порівняно із високодиференційованою КРА I-II стадій. Це вказує на те, що в гіперпластичних поліпах навіть на просунутих стадіях прогресії диспластичних змін зберігається достатньо високий рівень проліферативної активності клітин. Це може пояснювати статистичні дані, згідно яких гіперпластичні поліпи товстої кишки малігнізуються відносно рідше зубчастих і звичайних аденом товстої кишки [9]. Адже, інші досліджені high-grade поліпи (звичайні аденоми і зубчасті аденоми) достовірно не відрізняються від високодиференційованої КРА I-II стадій за рівнем апоптозу, оціненим за експресією каспази-3.

В КРА в контексті дослідження проліферації та апоптозу було вивчено також транскрипційну активність гену *KRAS*. Встановлено, що при прогресії КРА від I до II стадії статистично значущо збільшується експресія мРНК гену *KRAS*. Окрім того, відносний нормалізований рівень мРНК гену *KRAS* є статистично значущо вищим для метастатичної КРА, при порівнянні з неметастатичною карциномою. За даними літератури активуючі мутації *KRAS* є причиною зростання транскрипційної активності цього гену в кишковому канцерогенезі. Зазвичай це точкові мутації в 12 і 13 кодонах – транзиція G-A та / або трансверсія G-T, що призводять до синтезу ГТФази з аномальною активністю [175]. В роботі А. Т. Voutin et al. (2017) було показано зростання рівня транскрипційної активності *KRAS* в послідовності «аденома-карцинома» [176]. За даними цього дослідження [176] аномальна активність *KRAS*, що проявляється в дослідженій послідовності, в більшості випадків асоціюється із зниженням активності генів APC і TP53, а також із надмірною активацією TGF- β -сигнального каскаду. Також в окремих роботах повідомлялось щодо зростання транскрипційної активності гену *KRAS* при

збільшені рівня глибини інвазії раку товстої кишки [177], а також при появі регіонарних метастазів [176].

Окрім того, в літературі було знайдено низку робіт, присвячених вивченню взаємозв'язків між аномальною активністю гену *KRAS* і рівнями проліферативно-апоптотичної активності ракових клітин КРР [177-179]. Результати цих робіт є суперечливими, що слугувало поштовхом для проведення власного дослідження цього питання.

Було встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем клітинної проліферації. При прогресії пухлини від I до II стадії статистично значущо знижується рівень проліферації, оцінений за імуногістохімічною експресією Ki-67, а також за рівнем відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67*. Окрім того, показано, що метастатична КРА відрізняється від неметастатичної статистично значущо нижчими рівнями проліферації (за даними паралельних ІГХ і МГ досліджень). Літературні дані стосовно показників проліферативної активності клітин КРА значно варіюють – середній показник індексу проліферації за різними даними становить від 9 % до 61 % [50, 180-182]. Отриманий в цьому дослідженні показник індексу проліферації КРА (41,20 (36,62 ; 59,42) %) входить у цей діапазон. В літературі також було описано кореляції між рівнем експресії Ki-67 і деякими клініко-морфологічними характеристиками пухлини, такими як глибина інвазії [181] та ступень диференціювання [182]. В проведеній роботі цих кореляцій виявлено не було, проте, було встановлено достовірну різницю між показниками експресії маркера клітинної проліферації в КРА I і II стадій, а також в неметастатичній і метастатичній КРА. Отримані дані свідчать про зниження проліферативної активності ракових клітин КРА при прогресуванні пухлини, що є феноменом, адже, зазвичай саме інтенсифікація клітинної проліферації формує основу прогресування новоутворень. Проте, добре відомо, що до прогресування колоректального раку залучається широкий спектр молекулярно-генетичних змін, окрім інтенсифікації проліферації [179], які, вірогідно, відіграють домінуючу роль в прогресуванні пухлини.

Основні з цих молекулярно-генетичних змін були вивчені в цьому дослідженні і будуть детальніше розглянуті далі.

Було також досліджено зв'язки між показниками ІГХ експресії Ki-67, МГ аналізу рівня відносної нормалізованої експресії мРНК гену *Ki-67* і МГ аналізу мРНК гену *KRAS*. Згідно отриманих даних статистично значущі кореляції між цими показниками відсутні. Це вказує на те, що зниження проліферативної активності клітин КРА в пухлинній прогресії опосередковується сигнальними шляхами, не пов'язаними із RAS-протеїном. В літературі було знайдено дані, згідно яких зниження проліферативної активності ракових клітин в прогресуванні КРА може бути опосередкованим одним із регуляторних ефектів молекул CD44, що експресуються на поверхні клітин із властивостями стовбурових. Адже, відомо, що CD44 можуть як стимулювати, так і пригнічувати проліферативну активність ракових клітин в залежності від щільності клітинного мікрооточення [79]. Детальніше цей механізм, а також результати власного дослідження з питання кореляцій між експресією Ki-67 і CD44 будуть висвітлені трохи пізніше, у відповідному підрозділі аналізу результатів власних досліджень (що присвячений аналізу та узагальненню результатів ІГХ дослідження експресії маркерів стовбурових клітин в КРА).

Було встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем накопичення онкопротеїну p53, а також статистично значущо вищими показниками ІГХ експресії p53 і відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* в метастатичній КРА при порівнянні з неметастатичною карциномою. Ген *TP53* відомий як «сторож геному», оскільки його нормальний білковий продукт (так званий «дикий» p53) забезпечує виправлення ушкоджень ДНК при їх виникненні, а при неможливості виправлення цих ушкоджень забезпечує апоптоз – ліквідацію клітини з ураженим генетичним матеріалом. Високі рівні активності *TP53* в карциномах обумовлені експресією мутантного p53, що є онкопротеїном. Мутантний p53 не здатний до запуску апоптозу і, навіть навпаки, може

блокувати передачу сигналів по відповідним сигнальним каскадам [11, 12]. За даними літератури мутації p53 трапляються в 40 % – 50 % випадків спорадичного КРА, при цьому показники експресії відповідного ПГХ маркеру значно варіюють в кожній окремій карциномі [30, 45, 47, 186]. В цьому дослідженні був отриманий середній показник експресії (а саме, медіана експресії) p53 в КРА, що дорівнює 52,59 (51,14 ; 28,49) %. В значній кількості публікацій повідомлялось про те, що середній та високий рівні експресії p53 в КРА асоціюються із погіршенням прогностичних показників та просунутими формами хвороби [30, 45, 47, 186]. Отримані в цьому дослідженні дані узгоджуються із даними досліджень останніх років, в яких було показано достовірне зростання рівня експресії p53 в прогресуванні КРА [12, 45 - 48].

В цій роботі також було досліджено зв'язки між показниками ПГХ експресії p53, МГ аналізу рівня відносної нормалізованої експресії мРНК гену *TP53* і МГ аналізу рівня відносної нормалізованої експресії мРНК гену *KRAS*. Встановлено наявність прямої слабкої, проте, статистично значущої кореляції між підвищеними рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК генів *TP53* і *KRAS* ($r = 0,43$, $p < 0,05$). Виявлений взаємозв'язок 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, серед яких – E2F і FOXO3a. Останні є також мішенями для фосфорилляції кіназою АКТ, що є одним із ключових ланцюгів РІЗК/АКТ/mTOR-сигнального каскаду. Так, функціональна активність зазначеного сигнального каскаду асоціюється із активним станом кінази АКТ. Остання, за рахунок кіназної активності фосфорилює значну кількість молекул, серед яких – E2F і FOXO3a. Останні знатні регулювати як «дикий», так і мутантний p53. Надмірна активація «дикого» p53 призводить до передчасної загибелі клітин, а от активація мутантного p53, що

накопичується в КРА, має зворотній ефект – ефект підвищення виживаності клітин, ядра яких містять мутантний білок [179].

Вище вже згадувалось дослідження T. Voutin et al. (2017), в якому було показано зростання рівня транскрипційної активності гену *KRAS* в послідовності «аденома-карцинома» паралельно зі зниженням транскрипційної активності гену *TP53*. Але ж в тій роботі зниження активності *TP53* прив'язують до аномальної активності TGF- β -сигнального каскаду, що не є функціонально пов'язаним із RAS-протеїном [176].

Було встановлено, що КРА характеризується низьким рівнем апоптозу (за експресією каспази-3). Окрім того, встановлено, що рівень апоптозу в КРА, оцінений за експресією каспази-3, статистично значущо знижується при прогресії карциноми від II до III стадії, а також від є статистично значущо нижчим в метастатичній КРА при порівнянні з неметастатичною карциномою. За даними літератури КРА характеризується переважно низькими показниками експресії каспази-3 [172, 187, 188]. В одній з робіт також було показано зниження рівня експресії каспази-3 в прогресуванні КРА [183]. Зустрічаються поодинокі повідомлення, щодо високих показників експресії каспази-3 в КРА. При цьому слід зазначити, що в таких дослідженнях було показано взаємозв'язок між високим рівнем експресії каспази-3 і вкрай несприятливими прогностичними показниками [189, 190].

В цьому дослідженні був отриманий показник медіани експресії каспази-3, що дорівнює 37,78 (26,27 ; 54,60) УООЩ (відповідає низькому рівню експресії маркера). Окрім того, було встановлено наявність прямого сильного кореляційного зв'язку ($r = 0,70$, $p < 0,05$) між середнім рівнем проліферації клітин КРА (за Ki-67) і низьким рівнем їх апоптозу (за каспазою-3), що відображає тенденцію до паралельного зниження рівнів проліферативної та апоптотичної активності клітин в прогресії КРА. Загальновідомими механізмом блокування апоптозу є експресія мутантного білка p53, що не здатний до запуску програми апоптозу за умов необхідності [184, 185], про що вже було сказано раніше. Проте, проведений в цьому дослідженні

кореляційний аналіз на виявив статистично значущих зв'язків між низькими показниками експресії каспази-3 і показниками експресії p53 / TP53 в КРА. Це ніяк не виключає добре відому антиапоптотичну активність мутантного p53, проте вказує на більшу значимість інших механізмів дисрегуляції апоптозу в прогресії КРА. Серед можливих – епітеліально-мезенхімальний перехід ракових клітин, який, як відомо, асоціюється із значним підвищенням виживаності трансформованих клітин [122]. Раніше вже було зазначено, що зниження показників експресії Ki-67 може бути пов'язане з ЕМП [183]. Тобто, паралельне та статистично пов'язане зниження показників експресії обох маркерів – Ki-67 і каспази-3 може бути обумовлено ЕМП.

За результатами дослідження неоангіогенезу було встановлено, що аденоми і зубчасті новоутворення ДТК характеризуються низьким та середніми показниками експресії відповідних маркерів. При цьому показники експресії VEGF-A, VEGFR-2 і CD34 в low-grade і high-grade поліпах статистично значущо не відрізняються. Виняток склали гіперпластичні поліпи ДТК, для яких було встановлено достовірне зростання кількості мікросудин в СПЗМ, оцінене за експресією CD34, при прогресії від дисплазії низького ступеня до дисплазії епітелію високого ступеня в цих поліпах.

В літературі було описано активацію неоангіогенезу в послідовності «нормальна слизова оболонка товстої кишки – поліп – карцинома» із підвищенням ІГХ експресії відповідних маркерів [58, 191]. Отримані в нашому дослідженні дані вказують на більш пізню значущу активацію неоангіогенезу – при прогресії від поліпа з дисплазією високого ступеня до карциноми, про що буде сказано дещо пізніше. Звертає на себе увагу, що гіперпластичні поліпи ДТК відрізняються від інших досліджених аденом і зубчастих новоутворень ДТК достовірним зростанням показників експресії CD34 при прогресії від дисплазії епітелію низького ступеня до дисплазії епітелію високого ступеня. Добре відомо, що звичайні аденоми і зубчасті утворення товстої кишки значно відрізняються між собою [9]. Окрім того, в

літературі було знайдено численні повідомлення, щодо морфологічної та молекулярної неоднорідності групи зубчастих новоутворень товстої кишки [9, 19, 192, 193]. Новоутворення цієї групи були об'єднані за принципом наявності гістологічної зубчастості, проте мають багато відмінностей [9]. Таких як, наприклад, характер зубчастості, який в гіперпластичних поліпах і зубчастих утвореннях на широкій основі є цитоплазматичним, а в традиційних зубчастих аденомах формується за рахунок численних ектопічних крипт [19]. В літературі також було описано відмінності молекулярно-генетичних альтерацій в зубчастих новоутвореннях: в традиційних зубчастих аденомах зазвичай виявляють гіперекспресію MLH1, виразну експресію p53 та p16, в той час як в гіперпластичних поліпах і зубчастих утвореннях на широкій основі зазвичай виявляють втрату експресії MLH1, відсутність або ж низькі показники експресії p53 і p16 [192]. В цій роботі було встановлено, що лише в гіперпластичних high-grade поліпах рівень апоптозу оцінений за каспазою-3 є достовірно вищим за аналогічний показник високодиференційованої КРА I-II стадії. Таким чином, встановлене збільшення кількості мікросудин в СПЗМ в прогресуванні гіперпластичних поліпів від дисплазії епітелію низького ступеня до дисплазії епітелію високого ступеня можна вважати ще однією специфічною ознакою саме цього субтипу зубчастих новоутворень ДТК.

Порівняльний аналіз даних, отриманих для high-grade поліпів і високодиференційованої КРА I-II стадій вказує на те, що усі досліджені різновиди high-grade поліпів відрізняються достовірно нижчими показниками експресії маркерів VEGF-A, VEGFR-2, CD34 аніж показники експресії цих маркерів в карциномі. Це вказує на значну інтенсифікацію неоангіогенезу саме на етапі трансформації high-grade товстокишкового поліпа в карциному. А також узгоджується із даними стосовно встановлених особливостей параметрів неоангіогенезу в КРА, сутність яких полягає в суттєвих змінах досліджених параметрів неоангіогенезу на перших двох стадіях прогресії пухлини. Детальний аналіз цих параметрів викладений далі. Літературні дані

стосовно параметрів неоангіогенезу в КРА вказують на підвищення відповідних показників в прогресуванні пухлини [59, 64-66], проте, даних аналогічних тим, що були отримані в цій роботі, знайдено не було (що вказують на конкретні точки – етапи підвищення показників неоангіогенезу).

В цій роботі було показано, що КРА характеризується середніми рівнями експресії маркерів неоангіогенезу VEGF-A і VEGFR-2. При прогресії КРА встановлено тенденцію до зростання рівнів експресії цих маркерів за наявності статистично значущої різниці між медіанами їх експресії в карциномах I і II стадій (в карциномах II та кожної наступної стадії медіани експресії цих маркерів є достовірно вищими за відповідні медіани карцином I стадії). Окрім того, показано, що рівні експресії VEGF-A і VEGFR-2 є достовірно вищими у випадках метастатичної КРА при їх порівнянні з випадками неметастатичної карциноми. Наявний також прямий сильний статистично значущий зв'язок між середніми рівнями експресії VEGF-A і VEGFR-2 в КРА ($r = 0,85$, $p < 0,05$). Встановлена кореляція обумовлена фізіологічним механізмом: молекули VEGF-A є афінними до рецепторів VEGFR-2, і, зв'язуючись, передають сигнал до поділу ендотеліоцитів з метою формування нових мікроциркуляторних судин [64]. Цей механізм працює і за умов неопластичного процесу, про що зустрічаються повідомлення в літературі [64, 65, 194].

В дослідженні Ch. Ding et al. (2016) було показано, що метастатична КРА відрізняється від неметастатичної карциноми статистично значущо більшими показниками експресії VEGF-A і VEGFR-2 [66]. 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. Однак, за результатами проведеної роботи, максимальний «стрибок» рівнів експресії VEGF-A і VEGFR-2 (із наявністю статистично значущої різниці) спостерігається при прогресії КРА від I до II стадії, що може бути обумовлено залученням сигнальних шляхів, які забезпечують реалізацію інвазивного потенціалу пухлини. Зокрема, за результатами проведеної

роботи було показано, що при прогресії КРА від I до II стадії також відбувається статистично значуще зростання рівня транскрипційної активності гену *KRAS*. Базуючись на цих даних можна припустити, що активація неоангіогенезу на перших двох стадіях КРА опосередковується залученням сигнальних каскадів, функціонально пов'язаних із RAS-протеїном.

За даними літератури рецептори сімейства VEGFR здатні до регуляції функції деяких інших тирозинкіназних рецепторів, серед яких – RTKs, EGFR, Smet [66, 68, 195]. Останні, в свою чергу, залучаються до функціонування MAPK/ERK-сигнального шляху, що відповідає переважно за регуляцію клітинної проліферації та виживаності, а також до функціонування PI3K/AKT/Mtor-сигнального шляху, що відповідає переважно за клітинний метаболізм і фенотип. RAS-протеїн є білком-трансдуктором, що забезпечує безпосередню передачу сигналів із тирозинкіназних рецепторів до внутрішньоклітинних молекул, що є ланцюгами вищезазначених сигнальних каскадів [196].

Згідно отриманих даних, експресія VEGFR-1 виявляється лише в клітинах КРА II-IV стадій. Для колоректальної аденокарциноми I стадії характерною є негативна ІГХ реакція з антитілами до VEGFR-1. КРА II-IV стадій характеризується низьким рівнем експресії VEGFR-1, а достовірна різниця між показниками, отриманими для кожної окремої стадії КРА, відсутня. Сучасні літературні дані щодо функції та значення VEGFR-1 в кишковому канцерогенезі є суперечливими. Незважаючи на те, що за фізіологічних умов VEGFR-1 виконує анти-ангіогенну функцію, підвищення експресії VEGFR-1 в карциномах асоціюється із активацією неоангіогенезу [65]. В дослідженні M. H. Wu et al. (2014) показано, що експресія VEGFR-1 асоціюється із дефектами шару періцитів і адвентиціального шару, що призводить до підвищеної проникності незрілих новоутворених мікросудин. Це створює умови для промоції метастазування, обумовлюючи, таким чином, більш високі показники експресії VEGFR-1 в метастатичних карциномах

[197]. В дослідженнях M. Canavese et al. (2016) [64], N. D'Haene et al. (2018) [65] було показано переважно низькі рівні експресії VEGFR-1 в КРА, що узгоджується із отриманими в цій роботі даними. Більше того, в цих дослідженнях [64, 65] було зроблено висновок щодо асоціації підвищених рівнів експресії VEGFR-1 в КРА із несприятливим прогнозом для життя пацієнтів. Все це вказує на те, що механізми функціонування VEGFR-1 в умовах кишкового канцерогенезу, очевидно, спотворюються і працюють на прогресування пухлини.

Згідно отриманих даних, КРА характеризується показником кількості мікросудин в СПЗМ (за експресією CD34), медіана якого дорівнює 94,50 (72,50 ; 114,00). Різниця між показниками кількості мікросудин в СПЗМ в колоректальній аденокарциномі I, II, III і IV стадій не є статистично значущою. В літературі було знайдено повідомлення щодо наявності статистично значущої різниці між показниками кількості мікросудин, оціненими за експресією CD34 в неметастатичній та метастатичній КРА (із переважанням цих показників в останній групі) [67, 70]. S. C. Toma et al. (2018) повідомляли, що підвищення рівня експресії CD34 в метастатичній КРА асоціюється із підвищеною експресією кодуючого гену *CD34*, що вказує на наявність «поломки» на рівні гену [70]. Проте, отримані в цьому дослідженні дані вказують на відсутність достовірної різниці між показниками кількості мікросудин в СПЗМ на окремих стадіях розвитку карциноми.

При цьому, як вже зазначалось вище, нами було встановлено статистично значущо вищі рівні експресії VEGF-A і VEGFR-2 в КРА II стадії при порівнянні із карциномою I стадії, а також у випадках метастатичної КРА при їх порівнянні з випадками неметастатичної карциноми. Базуючись на цьому можна зробити висновок, що активація неангіогнезу, яка безумовно відбувається в ході кишкового канцерогенезу (висновок зроблено базуючись на встановлених змінах показників експресії маркерів неоангіогенезу VEGF-A і VEGFR-2), забезпечує новоутворення судин відповідно об'єму новоутвореної тканини, без статистично значущого збільшення щільності новоутворених

мікросудин (висновок зроблено базуючись на відсутності достовірних змін кількості мікросудин в СПЗМ за експресією CD34).

За результатами вивчення експресії маркерів стовбурових клітин в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК було отримано наступні дані. Маркер стовбурових клітин CD44 експресується як епітеліоцитами, так і окремими клітинами строми поліпів. В звичайних колоректальних аденомах ДТК медіана CD44+ клітин строми сягає 59,38 (49,21 ; 70,16) %, а медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 30,11 (22,10 ; 36,69) %; в зубчастих новоутвореннях ДТК медіана CD44+ клітин строми складає 45,86 (40,02 ; 52,46) %, а медіана CD44+ епітеліоцитів дорівнює 29,23 (18,34 ; 41,18) %. В літературі було описано низькі та середні рівні експресії CD44 клітинами строми та епітелію товстокишкових поліпів [82, 87, 198, 199], що узгоджується із отриманими нами даними.

При цьому порівняльний аналіз показників експресії CD44 в поліпах з різним ступенем диспластичних змін не виявив статистично значущої різниці ані в звичайних колоректальних аденомах, ані в зубчастих новоутвореннях ДТК. Проте інформація щодо прогностичної цінності цього маркеру для оцінки прогресування поліпів товстої кишки відсутні. Нами це питання буде розглянуто дещо далі, в контексті порівняння даних, отриманих щодо експресії CD44 в high-grade поліпах ДТК і в КРА.

Звертає на себе увагу розподіл CD44+ епітеліоцитів в гіперпластичних поліпах і зубчастих утвореннях на широкій основі, що повторює розподіл Ki-67+ епітеліоцитів в тих самих новоутвореннях. В цій роботі було показано, що зубчасті новоутворення на широкій основі (як без дисплазії, так і з low-grade дисплазією) характеризуються локалізованим розподілом CD44+ епітеліоцитів в нижній та середній третині кишкових крипт. Гіперпластичні поліпи також характеризуються розподілом CD44+ епітеліоцитів переважно в нижній та середній третині кишкових крипт, проте в 42 % випадків low-grade гіперпластичних поліпів і в 100 % випадків high-grade гіперпластичних поліпів цей патерн змінюється на дифузний. Всі інші досліджувані поліпи

ДТК (звичайні аденоми та зубчасті аденоми) характеризуються виключно дифузним розподілом CD44+ епітеліоцитів (по всій довжині кишкових крипт). Такі ж самі закономірності розподілу було описано відносно експресії Ki-67 епітеліоцитами аденом і зубчастих утворень ДТК: в гіперпластичних поліпах і зубчастих утвореннях на широкій основі Ki-67+ епітеліоцити локалізовані в межах нижньої та середньої третини кишкових крипт, в той час як в звичайних колоректальних аденомах і традиційних зубчастих аденомах Ki-67+ епітеліоцити розташовані по всій довжині кишкових крипт. Згідно загальних уявлень щодо популяції стовбурових клітин в кишківнику, ці клітини розташовуються в базальних відділах кишкових крипт і, в ході поділу і подальшого диференціювання, поступово просуваються в напрямку вгору [75]. В літературі також було описано збереження цього патерну розподілу в гіперпластичних поліпах і зубчастих утвореннях на широкій основі, а також зміну цього патерну в аденомах [19], що узгоджується із отриманими нами даними.

Було також вивчено експресію маркера стовбурових клітин ALDH1 в аденомах і зубчастих новоутвореннях ДТК. В звичайних колоректальних аденомах ДТК медіана експресії ALDH1+ клітин строми дорівнює 25,25 (20,04 ; 31,27) %, медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів – 21,16 (17,13 ; 28,18) %; в зубчастих новоутвореннях ДТК медіана експресії ALDH1+ клітин строми складає 24,52 (21,18 ; 29,36) %, медіана експресії ALDH1+ епітеліоцитів складає 15,81 (11,15 ; 20,04) %. В літературі було описано переважно низькі рівні експресії ALDH1 клітинами строми та епітелію товстокишкових поліпів [91-93], що узгоджується із отриманими нами даними.

За результатами порівняльного аналізу встановлено, що тубуло-ворсинчасті, ворсинчасті, а також традиційні зубчасті high-grade аденоми, характеризує достовірна більша кількість ALDH1+ клітин строми та епітеліоцитів при їх порівнянні з аналогічними low-grade аденомами. В дослідженні N. M. Abdullah et al. (2016) було показано достовірне збільшення

показників кількості ALDH1+ в доброякісних поліпах товстої кишки при їх порівнянні з показниками нормальної слизової оболонки [200]. Дослідники пояснили це збільшенням кількості клітин, що мають властивості стовбурових, ще на етапі доброякісного поліпа [200]. Отримані в нашій роботі дані вказують на значуще збільшення цих клітин в прогресії товстокишкових поліпів, а також зазначають яких саме – тубуло-ворсинчастих, ворсинчастих і традиційних зубчастих аденом.

Окрім того, встановлено, що в диспластичних поліпах експресія ALDH1 виявляється як в епітеліоцитах, так і в клітинах строми. В зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії експресія цього маркера виявлялась виключно в клітинах строми. А у вогнищах low-grade дисплазії зубчастих утворень на широкій основі експресія ALDH1 виявлялась і в епітеліоцитах, як і в усіх інших поліпах. За даними літератури ALDH1 є маркером ракових стовбурових клітин, а також клітин, що мають властивості стовбурових [88]. Таким чином, ALDH1+ клітини поліпів товстої кишки є клітинами строми та епітеліоцитами, що набули певних властивостей стовбурових клітин (зокрема, експресія ALDH1). Адже, в пулі стовбурових клітин дорослих товстої кишки (в епітеліоцитах базальних відділів кишкових крипт) експресія цього маркера не виявляється [91].

Було також вивчено експресію маркера стовбурових клітин ЕрСМ в аденомах і зубчастих утвореннях ДТК. Встановлено, що медіана експресії ЕрСМ в аденомах ДТК дорівнює 66,22 (58,44 ; 70,57) УООЩ, а в зубчастих новоутвореннях медіана експресії ЕрСМ 60,79 (49,15 ; 67,29) УООЩ. В літературі було описано переважно середні рівні експресії ALDH1 клітинами строми та епітелію товстокишкових поліпів [98, 106], що узгоджується із отриманими нами даними.

За результатами порівняльного аналізу встановлено, що тубулярні, тубуло-ворсинчасті, ворсинчасті, а також традиційні зубчасті high-grade аденоми характеризує статистично значущо більший рівень експресії ЕрСМ диспластично зміненими епітеліоцитами при їх порівнянні з аналогічними

low-grade аденомами. Таким чином, виняток становили гіперпластичні поліпи. В літературі не було знайдено аналогічних або ж суперечливих даних. Вочевидь, відсутність статистично значущого зростання експресії ЕрСМ в гіперпластичних поліпах є ще однією відмінністю цих поліпів, що підтверджує концепцію гетерогенності поліпоподібних новоутворень товстої кишки, про яку вже згадувалось раніше.

Окрім того, встановлено наявність достовірної різниці між показниками експресії ЕрСМ в зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії та в low-grade зубчастих утвореннях на широкій основі. Ще одним цікавим спостереженням були різні патерни експресії ЕрСМ в зубчастих утвореннях на широкій основі без дисплазії та з low-grade дисплазією: в поліпах без дисплазії виявляється мембранний патерн експресії ЕрСМ, в той час як в low-grade поліпах – мембранно-цитоплазматичний (що властивий і іншим дослідженим різновидам диспластичних поліпів). Причиною зміну патерну експресії ЕрСМ з мембранного (в утвореннях та зразках слизової без дисплазії) на мембранно-цитоплазматичний (за умов диспластичних змін) є протеоліз ЕрІСД за наступною його олігомеризацією [97]. В нормі ЕрІСД може як підлягати протеолізу, так і не підлягати протеолізу. Не зазнаючи протеолізу, ЕрІСД знаходиться в пов'язаному із цитоскелетом стані. При впливі дезінтегринів і АДАМ-17 на ЕрІСД відбувається протеоліз, що призводить до розрізнення ЕрІСД і цитоскелету, а також його подальшого розпаду на дрібніші фрагменти. Останні, в свою чергу, можуть зв'язуватись з окремими інтрацелюлярними білками-трансдукторами, що опосередковують активацію низки сигнальних шляхів [95, 97]. Так, наприклад, фрагменти ЕрІСД можуть зв'язуватись з FHL-2 протеїном, що призводить до активації Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду. Фрагменти ЕрІСД також здатні взаємодіяти з RAS-протеїном, запускаючи таким чином фосфорилування АКТ з наступною активацією РІЗК-Акт-сигнального шляху [95]. В карциномах, за досі неясної причини, відбувається спонтанний протеоліз з наступною олігомеризацією ЕрІСД, що

призводить до суттєвого збільшення молекулярної маси домену і прояві його при ІГХ дослідженні з використанням домен-неспецифічних антитіл [97]. Це було описано в спеціалізованій літературі та є поясненням можливої зміни патерну експресії EpCAM. В цьому дослідженні було показано більш ранню зміну патерну експресії EpICD – не етапі прогресії поліпів-прекурсорів КРА.

Порівняльний аналіз даних, отриманих для high-grade поліпів і високодиференційованої КРА I-II стадій вказує на те, що усі досліджені різновиди high-grade поліпів відрізняються достовірно нижчими показниками кількості CD44⁺ і ALDH1⁺ клітин строми. Це вказує на значне збільшення кількості клітин із властивостями стовбурових, що локалізуються в стромі поліпа, на етапі трансформації high-grade товстокишкового поліпа в колоректальну аденокарциному. Також було встановлено ще одну відмінність гіперпластичних поліпів. Окрім показників експресії, що вказані вище, high-grade гіперпластичні поліпи також відрізняються достовірно нижчою кількістю ALDH1⁺ епітеліоцитів (порівняно із кількістю ALDH1⁺ ракових клітин високодиференційованої КРА).

В цій роботі було показано, що КРА характеризується мембранно-цитоплазматичною експресією маркера стовбурових клітин CD44 клітинами строми. Медіана відносної площі CD44⁺ клітин в колоректальній аденокарциномі становить 61,26 (42,58 ; 79,15) %. Відомо, що молекула CD44 складається із HA-зв'язуючого екстрацеллюлярного домену (HA – hyaluronic acid), трансмембранного і інтрацеллюлярного доменів [79, 84], наявність яких обумовлює мембранно-цитоплазматичний патерн імуногістохімічного забарвлення при використанні відповідних антитіл. Відомо також, що експресія CD44 властива різним клітинам солідних пухлин, переважна більшість з яких є лімфоцитами і раковими стовбуровими клітинами [76].

За даними літератури рівень експресії CD44 в КРА є достовірно більшим за рівень експресії цього маркера в незмінній слизовій оболонці товстої кишки [84]. Більший рівень експресії CD44 в злоякісних

новоутвореннях зазвичай є обумовлений: 1) більшою кількістю молекул CD44 в структурі клітинних мембран, що обумовлено більшою потребою в них (особливості їх функціонування в умовах канцерогенезу буде описано далі); 2) наявністю пулу ракових стовбурових клітин, яким властива експресія CD44, що відсутній в нормальній слизовій оболонці [76, 78]. Відносно останнього пункту треба зазначити, що в нормальній слизовій оболонці товстої кишки, а також в доброякісних неоплазіях, що включають поліпи, CD44 експресується клітинами строми (переважно за рахунок лімфоцитів) і епітеліоцитами базальних відділів кишкових крипт, що є клітинами-попередниками та звичайними стовбуровими клітинами дорослих [84, 201, 202]. В КРА, як вже було зазначено раніше, експресія CD44 виявляється виключно в стромальному компоненті пухлини, що узгоджується із літературними даними, і пояснюється дизорганізацією пулу РСК порівняно зі пулом звичайних стовбурових клітин, а також наявністю субпопуляції мезенхімальних стовбурових клітин серед РСК [201, 202].

Встановлено статистично значуще зростання медіани відносної площі CD44+ клітин строми КРА при її прогресуванні від I до II стадії. Це спостереження знаходить обґрунтування в сучасних літературних даних щодо функціонування CD44 в умовах кишкового канцерогенезу. Відомо, що CD44 може як стимулювати, так і пригнічувати проліферативну активність ракових клітин в залежності від щільності клітинного мікрооточення. Адже, за умов низької щільності клітин мікрооточення пухлини білок merlin фосфорилується та утворює комплекси із ERM і CD44. Комплекс merlin + CD44 зв'язується із РТК-рецепторами, що призводить до активації Ras/Raf/Mek/Erk-сигнального каскаду, серед ефектів якої – стимуляція клітинної проліферації. За умов високої щільності клітин мікрооточення пухлини фосфорилляція білка merlin зупиняється, що попереджує активацію Ras/Raf/Mek/Erk-сигнального каскаду, відповідно, і пригнічує клітинну проліферацію. Таким чином CD44 контролює щільність клітинного складу карцином, забезпечуючи оптимальні умови для прогресії ракових клітин [79].

Цей описаний в літературі механізм узгоджується із отриманими даними кореляційного аналізу: встановлено наявність зворотного середньої сили зв'язку між середнім рівнем клітинної проліферації (за Ki-67) і кількістю CD44⁺ клітин в КРА ($r = -0,62$, $p < 0,05$). Окрім того, цей механізм разом із встановленою кореляцією пояснює зниження рівня проліферативної активності клітин в прогресії КРА, що був описаний в даній роботі.

Згідно сучасних літературних даних молекули CD44 залучені до епітеліально-мезенхімального переходу, що формує базис пухлинної інвазії та метастазування. Механізм залучення CD44 до ЕМП полягає в наступному. Одним із драйверних факторів транскрипції епітеліально-мезенхімального переходу є ZEB1. ЕМП-індукована супресія ESPR1 (epithelial splicing regulatory protein 1) контролює альтернативний сплайсинг CD44, що є причиною зсуву в експресії CD44 від варіантних (v) до стандартної (s) ізоформи. Що є цікавим, молекули CD44 здатні самостійно активувати експресію ZEB1, сприяючи таким чином запуску (або підтримці) ЕМП і експресії CD44s. Цей механізм відомий як «CD44s-ZEB1-регуляторна петля», суть якої полягає в незалежній від зовнішніх стимулів підтримці експресії ZEB1 та пригніченню ESPR1, а також в промоції синтезу CD44s [203]. В цьому дослідженні вивчалась експресія саме стандартної ізоформи CD44. Було показано, що метастатична КРА відрізняється від неметастатичної достовірно вищим показником відносної площі CD44⁺ клітин строми, що узгоджується із даними щодо активного залучення цієї молекули до процесу епітеліально-мезенхімального переходу, який, згідно сучасних уявлень, реалізується в ході стадійної прогресії КРА [109].

Згідно літературних даних описані вище механізми функціонування CD44 реалізуються саме молекулами CD44, що розташовані в структурі мембран РСК. Проте, треба зазначити, що на сьогодні не існує ІГХ маркеру, який дозволяє виділити виключно стовбурові клітини певного типу в мікропрепараті. З метою виділення пулу стовбурових клітин, які цікавлять

дослідників, зазвичай використовують комбінацію ІГХ маркерів, експресія яких є властивою для стовбурових клітин [72, 73, 204].

В цій роботі також було вивчено особливості експресії маркеру стовбурових клітин ALDH1 в КРА. Встановлено, що КРА характеризується цитоплазматичною експресією ALDH1 клітинами строми і раковими клітинами. Медіана площі ALDH1+ клітин строми в КРА становить 40,22 (22,54 ; 47,77) %, медіана площі ALDH1+ ракових клітин в КРА становить 42,15 (32,06 ; 50,42) %. Встановлено достовірне зростання кількості ALDH1+ клітин строми при прогресії КРА від I до III стадії, а також достовірне зростання кількості ALDH1+ ракових клітин при прогресії КРА від III до IV стадії. Також встановлено наявність зворотного слабкого зв'язку між кількістю ALDH1+ клітин строми і низьким рівнем апоптозу (за каспазою-3) в КРА ($r = -0,49$, $p < 0,05$) та прямого слабкого зв'язку 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 безумовно залучений до кишкового канцерогенезу, зокрема до пригнічення апоптозу клітин КРА. В літературі було знайдено повідомлення що в ALDH1+ клітинах виявляється коекспресія анти-апоптотичних молекул Bcl-2 і ABCG2 [91]. Окрім того, в роботі S. Tian et al. (2018) був описаний зворотний зв'язок між TRAIL-індукованим апоптозом та кількістю ALDH1+ клітин в недрібноклітинній карциноми легені. Згідно даних зазначеного дослідження високий рівень експресії ALDH1 асоціюється зі збільшенням кількості DR-4 і DR-5 рецепторів, що призводить до надмірної активації MEK/ERK-сигнального каскаду, одним із ефектом якого є резистентність до апоптотичних стимулів [205].

Ще одним цікавим спостереженням цього дослідження є 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. За даними спеціалізованої літератури ALDH1 є маркером стовбурових клітин, експресія якого

відзначається як в звичайних, так і в ракових стовбурових клітинах [90-92]. В наукових дослідженнях експресія ALDH1 в КРА відзначається як в ракових, так і в стромальних клітинах пухлини [90, 92], що узгоджується із отриманими в цьому дослідженні даними. Було описано експресію ALDH1 клітинами веретеноподібної форми інвазивного фронту назофарінгеальної карциноми [206]. Були також описані значущі кореляції між показниками експресії ALDH1 і маркерами ЕМП, зокрема, зворотній сильний зв'язок між експресією ALDH1 і Е-кадгерину [91, 92]. Відомо, що мезенхімальні стовбурові клітини синтезують ЕМП-індукуючі фактори – цитокіни (IL-1, IL-6), хемокіни (CCL5, CXCL1, CXCL5, CXCL7, CXCL8) і фактори росту (EGF, HGF, PDGF, TGF- β). Ці фактори паракринно «оркеструють» програму ЕМП ракових клітин, активуючі фактори транскрипції Twist, Snail, Slug, ZEB1 і ZEB2. Останні, в свою чергу, пригнічують активність генів, що кодують білки адгезії, десмосом і щільних контактів, паралельно підвищуючи активність генів, що кодують N-кадгерин, фібронектин і віментин [207, 208].

Раніше в цій роботі вже було описано механізм асоціації підвищеної експресії ALDH1 із активацією MEK/ERK-сигнального каскаду в контексті реалізації антиапоптотичного ефекту. Окрім цього ефекту, активація зазначеного каскаду є одним із шляхів запуску ЕМП ракових клітин [205]. В цій роботі також було показано достовірно більший показник відносної площі ALDH1+ клітин строми в метастатичній КРА при його порівнянні з аналогічним показником неметастатичної карциноми, що узгоджується із даними щодо активного залучення цієї молекули до процесу ЕМП.

Таким чином, ALDH1+ клітини строми КРА є власне раковими стовбуровими клітинами, в той час як ALDH1+ ракові клітини є пулом ракових клітин, залучених у процес ЕМП. Це пояснює достовірно більші показники експресії ALDH1 раковими клітинами на найбільш просунутій – IV стадії хвороби.

В цій роботі також було вивчено особливості експресії маркеру стовбурових клітин EpCAM. Встановлено, що КРА характеризується

середнім рівнем мембрано-цитоплазматичної експресії ЕрСММ раковими клітинами. Медіана експресії ЕрСММ раковими клітинами КРА становила 90,86 (80,24 ; 99,02) УООЩ. За даними літератури, ІГХ реакція з використанням антитіл до ЕрСММ в зразках нормальної слизової оболонки товстої кишки характеризується мембранним патерном забарвлення окремих епітеліоцитів. Це пов'язано із особливостями будови молекул ЕрСММ, адже, екстрацеллюлярний і трансмембранний домени ЕрСММ мають значущо більшу молекулярну масу порівняно із термінальним інтрацеллюлярним доменом ЕрІСД, який також називають коротким. Для виявлення ЕрІСД з нормальних зразків використовують домен-специфічні антитіла. З їх використанням зазвичай проявляється цитоплазматична, а іноді – також і перинуклеарна та / або ядерна експресія маркера, що пов'язано із процесами протеолітичного розщеплення ЕрІСД, що відбувається при його залученні до функціонування сигнальних каскадів [209], про які буде сказано дещо пізніше.

В цьому дослідженні було показано мембрано-цитоплазматичну експресію ЕрСММ в КРА, що не є властива нормальної слизовій оболонці товстої кишки [95, 98], а також зубчастим утворенням на широкій основі без дисплазії. Вище вже було описано механізм зміни патерну експресії ЕрСММ з мембранного на мембрано-цитоплазматичний за умов диспластичних змін, що зберігається і за умов прогресії КРА.

В літературі також було описано ядерну експресію ЕрСММ в карциномах, що пояснюється можливістю зв'язування фрагментів ЕрІСД з β -катеніном і LEF-1 з наступною транслокацією цього комплексу до клітинного ядра. Що, до речі, є ще одним механізмом активації Wnt/ β -катенінового сигнального шляху опосередковано ЕрСММ [95, 98]. Однак, в проведеному дослідженні не було виявлено ядерного патерну імунозабарвлення ЕрСММ. Окрім того, в проведеному дослідженні не було виявлено і ядерної експресії β -катеніну, про що буде сказано дещо пізніше.

В цьому дослідженні було показано статистично значуще збільшення показників експресії ЕрСМ при прогресуванні КРА від II до IV стадії, а також від неметастатичної до метастатичної стадії. Як вже зазначалось вище, фрагменти ЕрІСД можуть взаємодіяти із RAS-протеїном, активуючи таким чином РІЗК-Акт-сигнальний шлях [95]. Ці дані узгоджуються із даними отриманими в цьому дослідженні, відповідно, вказують на залучення РІЗК-Акт-сигнального шляху до реалізації прогресивних (II-IV) стадій КРА і її метастатичного потенціалу.

Окрім того, в цьому дослідженні було показано наявність статистично значущих кореляцій між показниками експресії маркерів стовбурових клітин в КРА. Було встановлено наявність прямих кореляцій різної сили між кількістю CD44+ клітин строми і ALDH1+ ракових клітин ($r = 0,78$, $p < 0,05$), а також експресією ЕрСМ раковими клітинами ($r = 0,56$, $p < 0,05$); прямого зв'язку між кількістю ALDH1+ клітин строми і ракових клітин ($r = 0,55$, $p < 0,05$). Ці кореляційні зв'язки вказують на паралельне залучення відповідних молекул до реалізації ЕМП в ході прогресування КРА.

В цьому дослідженні було показано, що КРА характеризується зниженим рівнем транскрипційної активності гену *CDH1*, що корелює з низьким рівнем експресії Е-кадгерину, а також підвищеним рівнем транскрипційної активності гену *CTNNB1*, що корелює з високим рівнем експресії β -катеніну.

Згідно отриманих даних, тенденція до пригнічення транскрипційної активності *CDH1* реалізується під час кишкового канцерогенезу та прогресує від I до IV стадії розвитку КРА. Встановлено, що КРА I стадії медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CDH1* становить 0,88 (0,42 ; 1,14), в той час як в КРА IV стадії цей показник становить 0,08 (0,04 ; 0,41); В КРА I стадії медіана експресії Е-кадгерину становить 88,09 (60,22 ; 112,34) УООЩ, в той час як в КРА IV стадії цей показник становить 24,82 (23,02 ; 40,81) УООЩ. Зниження експресії *CDH1* і, відповідно, кодованого ним Е-кадгерину формує основу порушення адгезивних міжклітинних зв'язків, у

результаті чого ракові клітини отримують можливість відокремлюватись одна від одної. Разом із іншими ланками ЕМП здатність до відокремлення є важливим фактором реалізації інвазивних та метастатичних агресивних властивостей ракових клітин [54]. Адже, в цій роботі було показано статистично значущу різницю між показниками транскрипційної активності гену *CDH1* та експресії E-кадгерину в неметастатичній і метастатичній КРА (з достовірно більш низькими показниками в останній).

За даними фахової літератури, втрата експресії E-кадгерину за умов кишкового канцерогенезу може бути зумовлена мутаціями, епігенетичними аномаліями, а також активністю ендоцитозу та протеолізу, що зростає [112]. Серед найбільш поширених причин зниження експресії E-кадгерину в КРА – пригнічення експресії гену *CDH1* специфічними факторами транскрипції (Snail, Slug тощо), які активуються на початку ЕМП [210], а також посттрансляційна модифікація молекул E-кадгерину (O-mannosylation тощо) [211]. За даними S. A. Kim et al. (2016) зниження експресії гену *CDH1* в КРА асоціюється з інвазивною стадією розвитку пухлини, а також з її лімфогенним метастазуванням; дослідники виключили асоціацію зниження експресії цього гену з віддаленим метастазуванням КРА [112]. За даними J. Bruun et al. (2014) зниження мембранно-цитоплазматичної експресії E-кадгерину в колоректальних карциномах асоціюється зі достовірним зниженням п'ятирічної виживаності пацієнтів (дані аналізу виживаності 903 хворих) [213].

Окрім того, звертає на себе увагу ще один виявлений в цьому дослідженні факт. В прогресії КРА відбувається як зниження експресії E-кадгерину, так і збільшення експресії ЕрСAM, яке було проаналізовано в цьому розділі дещо раніше. Обидві молекули (E-кадгерин і ЕрСAM) відносять до молекул міжклітинної адгезії, проте, вони мають властивості функціонального антагонізму. Цей антагонізм полягає в тому, що підвищення експресії ЕрСAM асоціюється зі зниженням експресії α -актину та паралельним підвищенням розчинності цитоплазматичного домену

Е-кадгерину (що було описано в низці робіт [98, 209], проте точний механізм все ще лишається не ясним). Окрім того, гіперекспресія ЕрСАРМ призводить до перерозподілу молекул α -актину, залучених до формування контактів з Е-кадгерином, на користь ЕрІСД [98, 209]. Таким чином, зростання кількості РСК та ракових клітин, що мають властивості стовбурових (включаючи експерсію ЕрСАРМ), є ще однією причиною зниження експресії Е-кадгерину в КРА.

Також виявлено стабільно підвищену транскрипційну активність гену *CTNНВ1* і підвищений рівень експресії кодованого ним β -катеніну в КРА. Встановлено, що КРА І стадії медіана відносної нормалізованої експресії мРНК гену *CTNНВ1* становить 2,88 (2,38 ; 5,38), в той час як в КРА ІV стадії цей показник становить 2,27 (1,23 ; 2,93); В КРА І стадії медіана експресії β -катеніну становить 116,73 (112,28 ; 120,06) УООЩ, в той час як в КРА ІV стадії цей показник становить 115,59 (111,11 ; 120,37) УООЩ. Тобто, наведені показники статистично значущо не відрізняються, проте, вказують на стабільне підвищення транскрипційної активності гену *CTNНВ1* і експресії β -катеніну на всіх стадіях прогресування КРА.

Найбільш поширеним варіантом молекулярно-генетичних аномалій, що забезпечують підвищення рівня експресії β -катеніну в ході кишкового канцерогенезу, є мутації гену *АРС*. Це точкові мутації, що призводять до аномалій функціонування так званого «комплексу деструкції». Білок АРС входить до складу цього комплексу та за нормальних умов конкурує з молекулами Е-кадгерину за зв'язування з молекулами β -катеніну, а також забезпечує фосфорилювання останніх разом із Ахіп і GSK3 β . Типовим наслідком мутацій *АРС* є надмірне накопичення β -катеніну в цитоплазмі з наступною активацією Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду [118]. Однак, треба зазначити, що такий варіант підвищення експресії β -катеніну не асоціюється зі зростанням транскрипційної активності гену, яке було встановлено в цій роботі.

За даними P. J. Morin et al. (2016), головною причиною підвищення експресії *CTNNB1* в кишковому канцерогенезі є точкові мутації цього гену. Вчені довели, що мутації генів *CTNNB1* і *APC* є взаємовиключними для КРА. Показано, що мутації *APC* зазвичай призводять до порушення нормальної схеми роботи Wnt/ β -катенінового сигнального шляху, в той час як мутації *CTNNB1* не асоціюються із порушенням функції цього каскаду, при цьому в обох випадках спостерігається надмірне накопичення β -катеніну в цитоплазмі, а іноді – і в клітинному ядрі [116]. В цій роботі було виявлено виключно мембрано-цитоплазматичний патерн експресії β -катеніну клітинами КРА. Комплексний аналіз отриманих даних вказує на те, що саме мутації *CTNNB1*, що не впливають на функціонування Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду, призводять до підвищення експресії гену та його білкового продукту в прогресії КРА.

Проведений кореляційний аналіз підтвердив узгодження результатів паралельних ІГХ і МГ досліджень: встановлено прямі сильні зв'язки між зниженим рівнем транскрипційної активності гену *CDH1* і зниженим рівнем ІГХ експресії кодованого ним Е-кадгерину ($r = 0,90$, $p < 0,05$), а також між підвищеним рівнем транскрипційної активності гену *CTNNB1* і підвищеним рівнем ІГХ експресії кодованого ним β -катеніну ($r = 0,74$, $p < 0,05$) в колоректальній аденокарциномі. Окрім того, дослідження E. Lemieux et al. (2015) [214] стало приводом для вивчення кореляцій між рівнями транскрипційної активності генів *CDH1*, *CTNNB1*, гену *KRAS*, а також ІГХ експресії Е-кадгерину і β -катеніну.

Було виявлено зворотні слабкі зв'язки між зниженим рівнем транскрипційної активності гену *CDH1* і підвищеним рівнем транскрипційної активності гену *KRAS* ($r = -0,41$, $p < 0,05$), а також підвищеним рівнем транскрипційної активності гену *KRAS* і зниженим рівнем ІГХ експресії Е-кадгерину ($r = -0,47$, $p < 0,05$) в КРА. Виявлені зв'язки знаходять обґрунтування в сучасній літературі. Відомо, що Е-кадгерин залучається до механізмів міжклітинних взаємодій, оскільки його екстрацелюлярний домен

здатен до зв'язування з рецепторами епідермального фактору росту (EGFR). Зв'язуючись з EGFR, E-кадгерин перешкоджає приєднанню лігандів до рецепторів, що за умов нормального функціонування передають сигнали на внутрішньоклітинний білок RAS (кодований геном *KRAS*) [215]. Це може пояснити виявлений нами зворотній зв'язок, адже зниження експресії E-кадгерину асоціюється зі збільшенням кількості «вільних» рецепторів EGFR, що потребують відповідної (більшої) кількості молекул RAS, забезпечуваної відповідним (підвищеним) рівнем транскрипційної активності гену *KRAS*. Окрім того, відомо, що активація гену *KRAS* асоціюється з активацією низки факторів транскрипції, серед яких є Snail. Останній, в свою чергу, відомий своєю здатністю до пригнічення транскрипції гену *CDH1* шляхом гіперметилування його промоторного регіону [210]. Цей механізм пояснює зворотній зв'язок між рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *CDH1*.

Також було виявлено прямий слабкий зв'язок між підвищеним рівнем транскрипційної активності гену *KRAS* і підвищеним рівнем ІГХ експресії β -катеніну ($r = 0,41$, $p < 0,05$) в КРА. Цей зв'язок знаходить обґрунтування в зазначеній вище роботі E. Lemieux et al. (2015) [214]. За даними дослідників механізм цієї асоціації полягає в наступному: патологічна активація гену *KRAS*, що реалізується за умов кишкового канцерогенезу та обумовлюється низкою соматичних мутацій, призводить до MEK-залежного фосфорилування Dvl-молекул (ці молекули забезпечують передачу сигналів з Fz-рецепторів до основного протеїну «комплексу деструкції» Axin, забезпечуючи таким чином активацію Wnt/ β -катенінового сигнального шляху). Наслідком фосфорилування Dvl-молекул є блок сигналів з Fz-рецепторів, що унеможлиблює активацію канонічного Wnt-каскаду. Отже, навіть за умов стимуляції клітин Wnt-лігандами, надмірного накопичення β -катеніну не відбувається, оскільки «комплекс деструкції» функціонує і забезпечує деградацію молекул β -катеніну [214]. Наведений механізм пояснює результати проведеного нами дослідження: підвищений рівень

транскрипційної активності гену *CTNNB1* (базуючись на літературних даних, обумовлений мутаціями) забезпечує високий рівень експресії β -катеніну; спостерігається мембранно-цитоплазматична експресія β -катеніну за відсутності імунозабарвлених ядер, тобто, рівень експресії маркера не сягає критичних значень, які відповідають транслокації молекул β -катеніну в ядра клітин, що вказує на збереження функції «комплексу деструкції». Таким чином, можна заключити, що провідна роль в прогресії КРА належить зниженню експресії гену *CDH1* і кодованого ним Е-кадгерину, наслідком яких є втрата адгезивних міжклітинних зв'язків, асоційована та опосередкована аномальною активністю гену *KRAS*, в той час як Wnt/ β -катеніновий сигнальний шлях, вочевидь, не залучається до реалізації механізмів прогресії КРА від I до IV стадії.

Було отримано дані, згідно яких при прогресуванні колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії відбувається паралельна втрата раковими клітинами епітеліального фенотипу (за експресією Е-кадгерину і СК-20) і збільшення кількості клітин з мезенхімальним фенотипом (за експресією віментину і α -SMA).

Найбільш універсальним маркером епітеліального фенотипу є Е-кадгерин [112]. Особливості ІГХ експресії цього маркера вже було детально викладено в цьому розділі. В контексті епітеліально-мезенхімального переходу слід зазначити, що серед найбільш поширених причин зниження експресії Е-кадгерину в КРА – пригнічення експресії *CDH1* факторами транскрипції Snail і Slug, які активуються на початку ЕМП [110]. Таким чином, зниження експресії Е-кадгерину є індикаторним відносно запуску ЕМП. Окрім того, отриманими даними молекулярно-генетичного дослідження було підтверджено паралельне зниження транскрипційної активності кодуєчого гену Е-кадгерину, що теж вже було детально викладено в цьому розділі.

Іншим маркером, що був використаний з метою оцінки епітеліального фенотипу в КРА, є СК-20, який є універсальним білком цитоскелету

епітеліальних клітин [120]. Отримані дані, згідно яких КРА характеризується середнім рівнем експресії СК-20 (медіана дорівнює 54,28 (41,55 ; 70,27) УООЩ), що достовірно знижується при прогресії карциноми від I до IV стадії, а також при її прогресії від неметастатичної до метастатичної стадії. СК-20 широко використовують з метою диференційної діагностики КРА із раком молочної залози, печінки, легенів і іншими злоякісними новоутвореннями [120]. При цьому в спеціалізованій літературі все частіше зустрічаються повідомлення щодо СК-20-негативних випадків КРА, що за різними даними становлять від 10 % до 25 % від загальної кількості цих пухлин [120, 216, 217]. Згідно отриманих даних випадки СК-20-негативних карцином складають 23,4 % від загальної кількості досліджених КРА, що узгоджується з літературними даними. За даними дослідження Jaudah Al-Maghrabi et al. (2018) СК-20-негативні КРА це переважно пухлини із високим рівнем мікросателітної нестабільності (MSI-H-фенотип) [120].

Встановлена в цій роботі пряма сильна кореляція між низьким рівнем експресії E-кадгерину і середнім рівнем експресії СК-20 ($r = 0,74$, $p < 0,05$) в КРА, які знижуються при прогресії карциноми, вказує на втрату ознак епітеліального фенотипу раковими клітинами в ході кишкового канцерогенезу. Слід також зазначити, що на відміну від E-кадгерину, експресія якого відмічається виключно в ракових клітинах, що формують залозоподібні структури і пласти, експресія СК-20 відмічається також і у вільно розташованих в стромі клітинах різних форм та розмірів. Ці клітини, вірогідно, є раковими клітинами, що вже втратили адгезивні властивості (за відсутністю експресії E-кадгерину), але все же зберігають ознаки епітеліального фенотипу (за експресією СК-20). Саме такі клітини за даними літератури з найбільшою вірогідністю залучаються до процесу ЕМП [122].

З метою оцінки мезенхімального фенотипу в КРА були використані маркери віментин і α -SMA – молекули, що є властивими фібробластам, міофібробластам, а також тумор-асоційованим фібробластам [121]. Встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем експресії віментину

(медіана дорівнює 95,23 (80,22 ; 110,21) УООЩ), що достовірно зростає при прогресії карциноми від I до III стадії, а також при її прогресії від неметастатичної до метастатичної стадії.

За даними літератури, експресія віментину характеризує стромальний компонент пухлини, її відзначають у фібробластах (включаючи тумор-асоційовані фібробласти), ендотеліоцитах, а також в лімфоцитах [218]. В цій роботі було показано експресію віментину клітинами строми КРА із помітною тенденцією до скупчення віментин+ клітин поблизу комплексів, сформованих раковими клітинами. Відомо, що віментин+ клітини строми карцином виробляють цитокіни, що залучені до регуляції виживаності ракових клітин, реалізації їх фенотипу, різні аспекти прогресії, а також до регуляції неоангіогенезу [218]. Тенденція до скупчення віментин+ клітин поблизу ракових клітин відображає наявність цих паракринних механізмів. Також має місце певна дуальність відносно значущості віментин+ клітин в прогресії раку. З одного боку, збільшена кількість віментин+ імуніцитів в стромі пухлини є ознакою активності протипухлинної імунної відповіді, що пригнічує пухлинну прогресію та є сприятливою прогностичною ознакою [219]. З іншого боку, в низці робіт було показано асоціацію між збільшенням кількості віментин+ клітин в стромі та просунутими стадіями КРА, наявністю віддалених метастазів і погіршенням прогностичних показників [124, 128]. В роботі Y. Toyama et al. (2013) було встановлено достовірну пряму кореляцію між зростанням показників експресії віментину і зростанням активності фактору транскрипції Slug [128], активація якого, як вже зазначалось раніше, є однією із ключових ланок запуску ЕМП в кишковому канцерогенезі. При цьому точний механізм взаємодії віментину і Slug все ще лишається не вивченим.

Отримано дані, згідно яких КРА характеризується середнім рівнем експресії α -SMA (медіана дорівнює 75,71 (60,22 ; 90,34) УООЩ), що достовірно зростає при прогресії карциноми від I до III стадії, а також при її прогресії від неметастатичної до метастатичної стадії. За даними літератури

експресія α -SMA властива клітинам стромального компоненту пухлини – міофібробластам (що відносять до тумор-асоційованих фібробластів) і гладком'язовим клітинам (в складі стінок судин) [123]. В цьому дослідженні було встановлено експресію α -SMA веретеноподібними клітинами строми пухлини із чіткою тенденцією до їх скупчення поблизу структур, сформованих раковими клітинами.

В дослідженні G. M. Son et al. (2019) [220] було показано новий аспект значущості збільшення щільності строми КРР за рахунок зростання кількості тумор-асоційованих фібробластів. Традиційно вважалось, що менша щільність пухлинної строми є сприятливою для інфільтративного росту і міграції ракових клітин. В зазначені роботі [220] було показано, що збільшення щільності пухлинної строми призводить до зростання тиску на кластери ракових клітин, що сприяє їх розрізненню з подальшою інвазією та міграцією, а також сприяє зміні фенотипових властивостей – як одна із можливих ланок запуску ЕМП. В дослідженні C. J. Hanley et al. (2016) [221] було показано, що фіброзні компоненти ракової строми формують так звані «треки», що визначають напрямки міграції ракових клітин.

Встановлена в цій роботі пряма середньої сили кореляція між середніми рівнями експресії віментину і α -SMA ($r = 0,53$, $p < 0,05$) в КРА, які зростають при прогресії карциноми, вказує на збільшення кількості клітин із мезенхімальним фенотипом, в першу чергу за рахунок активних форм тумор-асоційованих фібробластів [111, 122, 123]. Тенденція до локації віментин+ і α -SMA+ клітин поблизу кластерів ракових клітин відображає дію паракринних механізмів [218], про які вже було сказано раніше. Стосовно походження клітин з мезенхімальним фенотипом, кількість яких зростає в карциномах, є два можливих пояснення (за даними літератури). Перше – це походження тумор-асоційованих фібробластів з пулу мезенхімальних стовбурових клітин [222]. Друге – це утворення тумор-асоційованих фібробластів в результаті ЕМП ракових клітин [122].

Встановлені зворотні слабкі та середньої сили зв'язки між показниками експресії маркерів епітеліального та мезенхімального фенотипів (див. відповідний розділ) відображають паралельну втрату раковими клітинами властивостей епітеліального фенотипу та збільшення кількості клітин із ознаками мезенхімального фенотипу в прогресуванні КРА.

Доведено, що органотропізм ракових клітин КРР є не-рандомним, а скоординованим процесом, до якого залучені як самі ракові клітини, так і компоненти клітинного мікрооточення. В літературі було знайдено інформацію про те, що органотропізм ракових клітин колоректального раку частково опосередковується P120-катеніном (P120CTN). Цей катенін за умов норми стабілізує молекули E-кадгерину. Втрата експресії P120-катеніну, відповідно, призводить до дестабілізації молекул E-кадгерину і сприяє таким чином розрізненню ракових клітин, що є першим кроком в напрямку їх метастазування [110 - 111]. А мутації гену, що кодує P120-катенін, з високою вірогідністю сприяють формуванню метастазів саме в паренхіматозних внутрішніх органах, де за умов норми спостерігається експресія цього протеїну (печінка, шлунок, легені). Це було доведено в низці досліджень, за результатами яких наявний прямий сильний кореляційний зв'язок між наявністю мутацій P120-катеніну і наявністю метастазів КРР в печінці, шлунку та легенях [114]. В нашому дослідженні було показано достовірну різницю між рівнями експресії E-кадгерину в метастатичній і неметастатичній КРА, що вже було детально описано раніше, і є непрямомою ознакою концепції епітеліального органотропізму віддалених метастазів колоректальної аденокарциноми.

Були також вивчені особливості муцинового фенотипу КРА. Встановлено, що MUC1+ колоректальна аденокарцинома характеризується середнім рівнем мембранно-цитоплазматичної експресії MUC1 раковими клітинами (медіана дорівнює 60,27 (50,26 ; 69,54) УООЩ). Експресія MUC1 виявляється в 86 % досліджених карцином, імунопозитивні карциноми зустрічаються достовірно частіше імунонегативних карцином. Літературні

дані щодо рівнів експресії MUC1 в КРА варіюють в широкому діапазоні – середній або високий рівень експресії маркера визначають в 30 % – 100 % карцином цієї локалізації [131-136], що узгоджується із отриманими нами даними.

В низці робіт було показано, що високий рівень експресії MUC1 в КРР прямо корелює з глибиною інвазії пухлини, наявністю метастазів, а також погіршенням прогнозу для життя пацієнтів [131, 133, 136]. В цьому дослідженні було показано, що прогресія колоректальної аденокарциноми від I до II стадії асоціюється із статистично значущим збільшенням рівня експресії MUC1. Порівняння показників, отриманих для неметастатичної і метастатичної КРА, також вказує на наявність достовірної різниці (достовірно більші показники експресії MUC1 властиві метастатичній карциномі). В літературі також було знайдено повідомлення, щодо достовірно більших показників експресії MUC1 в метастатичній КРА, порівняно із неметастатичною, що узгоджується із отриманими нами даними [131 - 134]. Більше того, автори зазначали, що MUC1 є перспективним біомаркером, за допомогою якого з певною мірою вірогідності можна робити висновок щодо наявності метастатичного ураження [134].

За даними літератури зростання показників експресії MUC1 пов'язано з посиленням глікозилуванням екстрацеллюлярного домену цих молекул. Воно відбувається в карциномах за досі не ясних причин. Проте, відомо, що гіперглікозилувані форми MUC1 відіграють суттєву роль в регуляції генів, що контролюють протипухлинну імунну відповідь і, як наслідок, відбувається пригнічення проліферації Т-лімфоцитів та ефективного лізису цитотоксичними лімфоцитами [223]. Це, зокрема, пояснює і слабо-виразну інфільтрацію імунітетами тканини КРА дистальних відділів товстої кишки [25, 26]. Окрім того, відомо, що MUC1 функціонує в якості медіатора низки ростових факторів, серед яких – фактор росту сполучної тканини (CTGF), тромбоцитарний фактор росту А і Б (PDGF-A, -B), які впливають на проліферацію та виживаність ракових клітин [131].

Встановлено також, що MUC2+ колоректальна аденокарцинома характеризується низьким рівнем мембранно-цитоплазматичної експресії MUC2 окремими раковими клітинами (медіана дорівнює 25,49 (20,08 ; 31,50) УООЩ), що достовірно знижується при прогресії карциноми від неметастатичної до метастатичної стадії. Експресія маркеру виявляється в 88 % досліджених карцином, імунопозитивні карциноми виявляються достовірно частіше імунонегативних карцином. В літературі було описано як випадки зниження, так і випадки збільшення експресії MUC2 в КРА [131-133, 137, 139, 224]. Проте більшість робіт все ж таки вказують на низький рівень експресії цього маркеру в КРА [133, 136, 137, 139, 224], що узгоджується із отриманими даними.

За даними J. Betge et al. (2016) зниження рівня експресії MUC2 в КРА обумовлено мутаціями генів *CIMP*, *V600E*, *BRAF* [133]. За даними A. Kasprzak et al. (2018) зниження експресії MUC2 в КРА прямо корелює зі зниженням експресії однойменного гену, що вказує на «поломку» на рівні транскрипції, або ж на структурні аномалії кодуючого гену [137]. Відомо, що MUC2 виконує протективну функцію по відношенню до епітелію кишківника, попереджаючи його безпосередній контакт із кишковою мікрофлорою. Якщо ж експресія MUC2 знижується, перш за все це призводить до хронічного запалення слизової оболонки через постійний контакт із кишковою мікрофлорою і значно підвищує ризик розвитку товстокишкових неоплазій. Окрім того, відомо, що значуще зниження рівня експресії MUC2 призводить до інтерлейкін-6-індукованого ЕМП, що безпосередньо відіграє роль в пухлинній прогресії. Адже, в експериментальній роботі було показано, що зниження експресії MUC2 корелює із зростанням експресії інтерлейкін-6. Значення останнього в реалізації ЕМП є добре відомим.

Іншим маркерним муцином, що за нормальних умов є властивим слизовій оболонці товстої кишки, є MUC4. Встановлено, що MUC4+ колоректальна аденокарцинома характеризується низьким рівнем мембранної

експресії MUC4 раковими клітинами (медіана дорівнює 38,65 (25,92 ; 42,05) УООЩ), що достовірно знижується саме при прогресії карциноми від I до II стадії, а також від неметастатичної до метастатичної стадії. Це узгоджується із літературними даними, згідно яких експресія цього маркера знижується в кишковому канцерогенезі [132, 139, 224]. Проте, молекулярні основи зниження експресії MUC4 в КРР і прогностична цінність цієї аномалії лишаються не вивченими [132, 139, 224].

За даними літератури експресія MUC4 знижується в кишковому канцерогенезі [132, 139, 224]. При цьому треба зазначити, що близько 75 % колоректальних карцином характеризуються низькими показниками експресії MUC4 або втратою експресії цього маркера, проте, близько 25 % колоректальних карцином характеризуються середніми або навіть підвищеними показниками експресії MUC4 раковими клітинами. В цьому дослідженні було показано, що 38 % КРА є імунопозитивними відносно MUC4, при цьому імунопозитивні випадки зустрічаються достовірно рідше імунонегативних випадків.

У відповідних роботах було показано, що середні та високі показники експресії MUC4 асоціюються із значно гіршим прогнозом для пацієнтів із КРР порівняно із прогнозом для пацієнтів із КРР, в яких визначається знижена експресія, або ж відсутність експресії MUC4 (особливо відносно прогнозу I і II стадій КРР) [131 - 132]. Звертає на себе увагу, що в нашому дослідженні було показано достовірне зниження рівня експресії MUC4 в КРА саме при прогресуванні пухлини від I до II стадії.

Зниження рівня експресії MUC4 в прогресуванні КРА зазвичай пов'язують із зміною фенотипових властивостей ракових клітин, зокрема, зі зміною їх муцинового фенотипу. А от підвищення рівня експресії MUC4 в прогресуванні відносно більш агресивних варіантів КРА пов'язують із наявністю домена MUC4, що структурно подібний до EGF і може виконувати роль модулятора HER2/ErbB2-тирозинкіназних рецепторів, що потенціює туморогенез. Це одним можливим поясненням є протективна функція

муцинового шару, що містить MUC4 і блокує цитотоксичну дію імуніцитів, блокуючи таким чином протипухлинну імунну відповідь [131 - 132].

Встановлено також, що MUC5AC+ колоректальна аденокарцинома характеризується середнім рівнем мембранно-цитоплазматичної експресії MUC5AC окремими раковими клітинами (медіана дорівнює 63,74 (49,49 ; 70,23) УООЩ). За даними літератури експресія MUC5AC, що в нормі не є властивою слизовій товстої кишки [133, 136, 138], в КРА обумовлена високим рівнем мікросателітної нестабільності [138] та / або перманентною активацією MAPK-сигнального каскаду, за рахунок цього активується декілька факторів транскрипції [139]. Серед останніх – E2F/DP – фактор, що регулює транскрипцію кількох генів, включаючи *MUC5AC* [139]. В цьому дослідженні було показано експресію MUC5AC в 22 % досліджених випадків КРА, при цьому імунопозитивні випадки зустрічаються достовірно рідше імунонегативних випадків. В цьому дослідженні також було показано, що відсутність статистично значущих змін між показниками експресії MUC5AC на окремих стадіях прогресування колоректальної аденокарциноми. Проте, сама по собі експресія цього маркера в матеріалі товстої кишки є значущою патологічною зміною.

Встановлено, що КРА характеризується середнім рівнем ядерно-цитоплазматичної експресії Cdx-2 раковими клітинами (медіана дорівнює 78,38 (55,98 ; 88,65) УООЩ), що виявляється в 100 % досліджених КРА та достовірно збільшується при прогресуванні пухлини від II до III стадії, а також від неметастатичної до метастатичної стадії. В літературі було описано переважно підвищення експресії Cdx-2 в КРР [139, 140, 142, 180, 225-227], при цьому немає чітких пояснень цьому феномену. Адже, Cdx-2 є добре відомим тумор-супресором, що здатний до інактивації Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду і «зупинці» клітин в G0 фазі клітинного циклу [140]. Проте, слід зазначити, що комплексний аналіз результатів проведеної роботи вказує на те, що Wnt/ β -катеніновий каскад, вірогідно, не відіграє суттєвої ролі в прогресії КРА. Вочевидь, Cdx-2 не справляється з метою пригнічення

пухлинного прогресії на розвинутих (II-III) стадіях КРА, оскільки є інші домінуючі молекулярні механізми, що активуються на цих стадіях. Проте, наростаюча експресія маркеру відображає «спробу» Cdx-2 пригнічувати ріст пухлини.

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 %, відповідно).

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 експресію 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 ЕрСАР 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 ERСAM 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: ЕрСАМ-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 дистальної товстої кишки та колоректальної аденокарциноми доцільно врахувати наступні параметри:

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

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

3. При прогресуванні від I до IV стадії в колоректальній аденокарциномі зростає транскрипційна активність *KRAS* і *TP53* та експресія p53, підвищена транскрипційна активність *CTNNB1* та експресія β-катеніну, знижена транскрипційна активність *Ki-67* і *CDH1* та знижена експресія E-кадгерину, а також визначаються показники епітеліально-мезенхімальної трансформації: знижується експресія CK-20, зростають експресія віментину і α-SMA.

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

5. Про високий метастатичний потенціал колоректальної аденокарциноми свідчить сукупність імуногістохімічних 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*, *E-кадгерину*, *СК-20*, *MUC2* і *MUC4*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Publication of WHO Classification of Tumours. 5th Edition. Vol. 1 : Digestive System Tumours. Editorial Board, 2019. 551 p.
2. Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd gastroenterologiczny*. 2019. Vol. 14 (2). P. 89–103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.
3. Worldwide incidence and mortality of colorectal cancer and human development index (HDI): an ecological study. *WCRJ*. 2019. Vol. 6. P. e1433.
4. Torre L., Siegel R., Jemal A. Global Cancer Facts & Figures Atlanta : American Cancer Society, 2021. 72 p.
5. Рак в Україні, 2018-2019 / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. Й. Михайлович та ін. *Бюл. національного канцер-реєстру України*. 2020. № 21.
6. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality / M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne et al. *Gut*. 2017. Vol. 66 (4). P. 683–691. DOI : 10.1136/gutjnl-2015-310912.
7. Kudo's Classification for Colon Polyps Assessment Using a Deep Learning Approach / S. Patino-Barrientos, D. Sierra-Sosa, B. Garcia-Zapirain et al. *Appl. Sciences-Basel*. 2020. Vol. 10 (2). Article 501.
8. Munding J., Tannapfel A. Epidemiology of Colorectal Adenomas and Histopathological Assessment of Endoscopic Specimens in the Colorectum. *Viszeralmedizin*. 2014. Vol. 30 (1). P. 10–16. <https://doi.org/10.1159/000357744>.
9. Crockett S. D., Nagtegaal I. D. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2019. Vol. 157 (4). P. 949–966.e4.

10. Driver mutations of the adenoma-carcinoma sequence govern the intestinal epithelial global translational capacity / W. L. Smit, C. N. Spaan, R. J. de Boer et al. *PNAS*. 2020. Vol. 117 (41). P. 25560–25570.
11. Talseth-Palmer B. A. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 2017. Vol. 15 (5). <https://doi.org/10.1186/s13053-017-0065-x>.
12. APC Mutations Are Not Confined to Hotspot Regions in Early-Onset Colorectal Cancer / A. Aitchison, C. Hakkaart, R. C. Day et al. *Cancers*. 2020. Vol. 12 (12). P. 3829.
13. The Role of Angiogenesis in Colorectal Polyps and Cancer, a Review / H. Asadzadeh Aghdai, Z. Pezeshkian, M. Abdollahpour-Alitappeh et al. *Med. Lab. J.* 2018. Vol. 12 (4). P. 1–6.
14. Risk factors of traditional serrated adenoma and clinicopathologic characteristics of synchronous conventional adenoma / J. Kim, J. Y. Lee, S. W. Hwang et al. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2019. Vol. 90 (4). P. 636–646.e9.
15. Risk of Metachronous High-Risk Adenomas and Large Serrated Polyps in Individuals With Serrated Polyps on Index Colonoscopy: Data From the New Hampshire Colonoscopy Registry / J. C. Anderson, L. F. Butterly, C. M. Robinson et al. *Gastroenterology*. 2018. Vol. 154 (1). P. 117–127.e2.
16. Crockett S. D., Nagtegaal I. D. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology*. 2019. Vol. 157 (4). P. 949–966.e4. ДУБЛІЙ № 9
17. Sessile Serrated Adenomas: An Evidence-Based Guide to Management / S. D. Crockett, D. C. Snover, D. J. Ahnen, J. A. Baron. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2015. Vol. 13 (1). P. 11–26.e1.
18. Jaravaza D. R., Rigby J. M. Hyperplastic polyp or sessile serrated lesion? The contribution of serial sections to reclassification. *Diagn. Pathol.* 2020. Vol. 15. Article number: 140. <https://doi.org/10.1186/s13000-020-01057-0>.

19. Зубчатые образования (serrated lesions) толстой кишки / О. А. Харлова, Н. В. Данилова, П. Г. Мальков и др. *Арх. патологии.* 2015. Т. 77, № 1. С. 60–68. <https://doi.org/10.17116/patol201577160>.
20. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum / J. E. East, W. S. Atkin, A. C. Bateman et al. *Gut.* 2017. Vol. 66 (7). P. 1181–1196.
21. Sessile Serrated Polyps and Colon Cancer Prevention / S. Rashtak, R. Rego, S. R. Sweetser, F. A. Sinicrope. *Cancer Prev. Res.* 2017. Vol. 10 (5). P. 270–278;
22. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature / B. Baran, N. M. Ozupek, N. Y. Tetik et al. *Gastroenterol. Res.* 2018. Vol. 11 (4). P. 264–273. <https://doi.org/10.14740/gr1062w>.
23. Is there a difference between right-versus left-sided colon cancers? Does side make any difference in long-term follow-up? / L. A. Bustamante-Lopez, S. C. Nahas, C. Nahas et al. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva : ABCD.* 2019. Vol. 32 (4). P. e1479.
24. Clinico-pathological and oncological differences between right and left-sided colon cancer (stages I-III): analysis of 950 cases / A Cienfuegos, J., Baixauli, J. Arredondo et al. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2018. Vol. 110 (3). P. 138–144.
25. Immune checkpoints as a target for colorectal cancer treatment / A. Passardi, M. Canale, M. Valgiusti, P. Ulivi. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18 (6). P. 1324. DOI : 10.3390/ijms18061324.
26. Hanna D. L., Lenz H.-J. How We Treat Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2020. Vol. 18 (5). P. 253–257.

27. Vatandoust S., Price T. J., Karapetis C. S. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 21 (41). P. 11767–11776. DOI : 10.3748/wjg.v21.i41.11767.
28. Advances in the care of patients with mucinous colorectal cancer / N. Huguen, G. Brown, R. Glynne-Jones et al. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016. Vol. 13 (6). P. 361–369. DOI : 10.1038/nrclinonc.2015.140.
29. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects / M. Fleming, S. Ravula, S. F. Tatishchev, H. L. Wang. *J. Gastrointestinal. Oncol.* 2012. Vol. 3 (3). P. 153–173. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>.
30. Desmoplasia influenced recurrence of disease and mortality in stage III colorectal cancer within five years after surgery and adjuvant therapy / M. Zippi, G. De Toma, G. Minervini et al. *Saudi J. Gastroenterol.* 2017. Vol. 23 (1). P. 39–44. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.199114>.
31. Dang H., Harryvan T. J., Hawinkels L. Fibroblast Subsets in Intestinal Homeostasis, Carcinogenesis, Tumor Progression, and Metastasis. *Cancers.* 2021. Vol. 13 (2). P. 183. <https://doi.org/10.3390/cancers13020183>.
32. Cervical lymph node enlargement as the initial manifestation of rectal cancer / T. H. Xie, P. Su, J. G. Hong, H. Zhang. *BMC Gastroenterol.* 2021. Vol. 21 (1). P. 57. <https://doi.org/10.1186/s12876-021-01628-5>.
33. AJCC Cancer Staging Manual / eds : M. B. Amin, S. Edge, F. Greene et al. 8 edition. Springer International Publishing, 2017. 1032 p.
34. Letai A. Apoptosis and Cancer. *Ann. Rev. Cancer Biol.* 2017. Vol. 1 (1). P. 275–294.
35. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets / M. A. Feitelson, A. Arzumanyan, R. J. Kulathinal et al. *Semin. Cancer Biol.* 2015. Vol. 35 (Suppl.). P. S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>.

36. Prognostic Importance of Ki-67 in Breast Cancer and Its Relationship with Other Prognostic Factors / G. Kanyılmaz, B. B. Yavuz, M. Aktan et al. *Eur. J. Breast Health.* 2019. Vol. 15 (4). P. 256–261. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.4778>.
37. Soliman N. A., Yussif S. M. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol. Med.* 2016. Vol. 13 (4). P. 496–504. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066>.
38. Immunohistochemical Study of ER, PR, Ki67 and p53 in Endometrial Hyperplasias and Endometrial Carcinomas / N. Masjeed, S. Khandeparkar, A. R. Joshi et al. *J. Clin. Diagnostic Res.* 2017. Vol. 11 (8). P. EC31–EC34. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/28750.10475>.
39. Augmented expression of Ki-67 is correlated with clinicopathological characteristics and prognosis for lung cancer patients: an up-dated systematic review and meta-analysis with 108 studies and 14,732 patients / Dm. Wei, Wj. Chen, Rm. Meng et al. *Respir. Res.* 2018. Vol. 19. P. 150. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0843-7>.
40. Prognostic relevance of induced and spontaneous apoptosis of disseminated tumor cells in primary breast cancer patients / N. Krawczyk, A. Hartkopf, M. Banys et al. *BMC Cancer.* 2014. Vol. 14. P. 394. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-394>.
41. Apoptosis and genes involved in oral cancer - a comprehensive review / R. Dwivedi, R. Pandey, S. Chandra, D. Mehrotra. *Oncol. Rev.* 2020. Vol. 14 (2). P. 472. <https://doi.org/10.4081/oncol.2020.472>.
42. SOX12 promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis by regulating asparagine synthesis / F. Du, J. Chen, H. Liu et al. *Cell Death Dis.* 2019. Vol. 10. P. 239. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1481-9>.

43. The atypical cyclin CNTD2 promotes colon cancer cell proliferation and migration / A. Sánchez-Botet, L. Gasa, E. Quandt et al. *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. P. 11797. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30307-x>.
44. BEX2 promotes tumor proliferation in colorectal cancer / Y. Hu, Q. Xiao, H. Chen et al. *Int. J. Biol. Sci.* 2017. Vol. 13 (3). P. 286–294. DOI : 10.7150/ijbs.15171.
45. Nakayama M., Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J. Mol. Cell Biol.* 2019. Vol. 11 (4). P. 267–276. DOI : 10.1093/jmcb/mjy075.
46. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation / X. L. Li, J. Zhou, Z. R. Chen, W. J. Chng. *World J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 21 (1). P. 84–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>.
47. p53 expression status is associated with cancer-specific survival in stage III and high-risk stage II colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy / H. J. Oh, J. M. Bae, X. Wen et al. *Br. J. Cancer.* 2019. Vol. 120. P. 797–805. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0429-2>.
48. The p53-signaling pathway and colorectal cancer: Interactions between downstream p53 target genes and miRNAs / M. L. Slattery, L. E. Mullany, R. K. Wolff et al. *Genomics.* 2019. Vol. 111 (4). P. 762–771.
49. Mulyawan I. M. Role of Ki67 protein in colorectal cancer. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2019. Vol. 7, N 2. P. 644–648.
50. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer / N. Melling, C. M. Kowitz, R. Simon et al. *J. Clin. Pathol.* 2016. Vol. 69 (3). P. 209–214.
51. Ki67/MIB-1 predicts better prognoses in colorectal cancer patients received both surgery and adjuvant radio-chemotherapy: A meta-analysis of 30 studies / D.-D. Xiong, X.-G. Lin, Rong-Quan He et al. *Int. J. Clin. Experim. Med.* 2017. Vol. 10 (2). P. 1788–1804.

52. Pattern of epithelial cell proliferation in colorectal mucosa of normal subjects and of patients with adenomatous polyps or cancer of the large bowel / M. Ponz de Leon, L. Roncucci, P. Di Donato et al. *Cancer Res.* 1988. Vol. 48 (14). P. 4121–4126.

53. Apoptosis in the Colonic Crypt, Colorectal Adenomata, and Manipulation by Chemoprevention / N. J. West, E. D. J. Courtney, A. P. Poullis, R. J. Leicester. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2009. Vol. 18 (6). P. 1680–1687. DOI : 10.1158/1055-9965.EPI-09-0006.

54. Regulation of Caspase Expression and Apoptosis by Adenomatous Polyposis Coli / T. Chen, I. Yang, R. Irby et al. *J. Yeatman Cancer Res.* 2003. Vol. 63 (15). P. 4368–4374.

55. Apoptotic Cell Death and Its Relationship to Carcinogenesis in Colorectal Carcinoma / S. Tsujitani, H. Shirai, S. Tatebe et al. *Cancer.* 1996. Vol. 77 (8 Suppl.). P. 1711–1716.

56. The Role of Angiogenesis in Colorectal Polyps and Cancer: a Review / H. Asadzade-Aghdaei, Z. Pezeshkian, M. Atitappeh et al. *Med. Lab. J.* 2018. Vol. 12 (4). P. 1–6. ДУБЛІВ № 13

57. Correlation between microvascular characteristics and the expression of MVD, IGF-1 and STAT3 in the development of colonic polyps carcinogenesis / H. Liu, J. Wu, X. C. Liu et al. *Experim. Ther. Med.* 2017. Vol. 13 (1). P. 49–54.

58. Colorectal polypoid lesions and expression of vascular endothelial growth factor in a consecutive series of endoscopic and surgical patients / C. Ruffolo, L. Toffolatti, F. Canal et al. *Tumour Biol.* 2017. Vol. 39 (3). P. 1–9.

59. VEGFR2 regulates endothelial differentiation of colon cancer cells / Zh. Liu, L. Qi, Y. Li et al. *BMC Cancer.* 2017. Vol. 17 (1). P. 593.

60. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Front. Oncol.* 2018. Vol. 8. P. 248.

61. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment / C. O. Madu, S. Wang, C. O. Madu, Y. Lu. *J. Cancer*. 2020. Vol. 11 (15). P. 4474–4494. DOI :10.7150/jca.44313.
62. Lugano R., Ramachandran M., Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020. Vol. 77. P. 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.
63. Rajabi M., Mousa S. A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines*. 2017. Vol. 5 (2). P. 34. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020034>.
64. Biology and therapeutic implications of VEGF-A splice isoforms and single-nucleotide polymorphisms in colorectal cancer / M. Canavese, D. T. Ngo, G. J. Maddern et al. *Int. J. Cancer*. 2017. Vol. 140 (10). P. 2183–2191.
65. The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer / N. D’Haene, C. Koopmansch, Y.-R. Van Eycke et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19 (11). P. 3536.
66. Combined application of anti-VEGF and anti-EGFR attenuates the growth and angiogenesis of colorectal cancer mainly through suppressing AKT and ERK signaling in mice model / C. Ding, L. Li, T. Yang et al. *BMC Cancer*. 2016. Vol. 16 (1). P. 791.
67. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer / Y. Kimura, S. Morohashi, T. Yoshizawa et al. *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 13 (2). P. 1551–1557.
68. Intracrine VEGF signaling mediates the activity of prosurvival pathways in human colorectal cancer cells / R. Bhattacharya, X. C. Ye, R. Wang et al. *Cancer Res.* 2016. Vol. 76 (10). P. 3014–3024.

69. Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma / I. C. Deliu, C. D. Neagoe, M. Bezna et al. *Romanian J. Morphol. Embriol.* 2016. Vol. 57 (3). P. 1025–1030.
70. Correlations between CD34 Immunolabelled Blood Vessels and CD34 mRNA Expression in Colorectal Cancer / S. C. Toma, C. D. Uscatu, B. S. Ungureanu et al. *Curr. Health Sci. J.* 2018. Vol. 44 (1). P. 60–63.
71. Cancer stem cells: An insight / R. B. Moharil, A. Dive, S. Khandekar, A. Bodhade. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2017. Vol. 21, issue 3. P. 463. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_132_16.
72. Najafi M., Farhood B., Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J. Cell Physiol.* 2019. Vol. 234, issue 6. P. 8381–8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>.
73. Najafi M., Mortezaee K., Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci.* 2019. Vol. 234. P. 116781. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116781>.
74. Cancer stem cells in progression of colorectal cancer / Y. Zhou, L. Xia, H. Wang et al. *Oncotarget.* 2017. Vol. 9, issue 70. P. 33403–33415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>
75. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives / M. A. Puglisi, V. Tesori, W. Lattanzi et al. *World J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 19 (20). P. 2997–3006. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i20.2997>.
76. Morath I., Hartmann T., Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2016. Vol. 81. P. 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>.
77. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells / L. Wang, X. Zuo, K. Xie et al. *Methods Mol Biol.* 2018. Vol. 1692. P. 31–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_3.

78. Senbanjo L. T., Chellaiah M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017. Vol. 5. P. 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>.
79. Inoue K., Fry E. Aberrant Splicing of Estrogen Receptor, HER2, and CD44 Genes in Breast Cancer. *Genetics Epigenetics.* 2015. Vol. 7. P. 19–32. <https://doi.org/10.4137/GEG.S35500>.
80. Evaluation of the role of CD44 as a cancer stem cell marker in colorectal carcinoma: immunohistochemical study / N. S. Holah, H. A. Aiad, N. Y. Asaad et al. *Menoufia Med. J.* 2017. Vol. 30 (1). P. 174–183.
81. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications / C. Chen, S. Zhao, A. Karnad, J. W. Freeman. *J. Hematol. Oncol.* 2018. Vol. 11. P. 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>.
82. Basakran N. S. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med. J.* 2015. Vol. 36 (3). P. 273–279. DOI : 10.15537/smj.2015.3.9622.
83. Novel CD44-downstream signaling pathways mediating breast tumor invasion / A. Ouhtit, B. Rizeq, H. A. Saleh et al. *Int. J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 14 (13). P. 1782–1790. DOI : 10.7150/ijbs.23586.
84. Xia P., Xu X. Prognostic significance of CD44 in human colon cancer and gastric cancer: Evidence from bioinformatic analyses. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, issue 29. P. 45538–45546. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9998>.
85. Evaluation of the correlation of KAI1/CD82, CD44, MMP7 and beta-catenin in the prediction of prognosis and metastasis in colorectal carcinoma / Q. Wu, Y. Yang, S. Wu et al. *Diagn. Pathol.* 2015. Vol. 10. P. 176. DOI : 10.1186/s13000-015-0411-0.
86. Clinical significance of CD44 variants expression in colorectal cancer / X. D. Li, M. Ji, J. Wu et al. *Tumori.* 2013. Vol. 99. P. 88–92. DOI : 10.1700/1248.13794.

87. CD44 expression in intestinal epithelium and colorectal cancer is independent of p53 status / J. Zeilstra, S. P. Joosten, L. Vermeulen et al. *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (8). P. e72849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072849>.

88. Vassalli G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019. Vol. 2019. P. 15. <https://doi.org/10.1155/2019/3904645>.

89. Acetaldehyde and Retinaldehyde Metabolizing Enzymes in Colon and Pancreatic Cancers / S. Singh, J. Arcaroli, D. C. Thompson, et al. *Adv. Experim. Med. Biol*. 2015. Vol. 815. P. 281–294. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09614-8_16.

90. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC) / F. Ma, H. Li, Y. Li, et al. *Medicine*. 2017. Vol. 96, issue 14. P. e6561. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006561>.

91. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis / J. Chen, Q. Xia, B. Jiang et al. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, issue 12. P. e0145164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145164>.

92. Molecular profiling of ALDH1+ colorectal cancer stem cells reveals preferential activation of MAPK, FAK, and oxidative stress pro-survival signalling pathways / R. Vishnubalaji, M. Manikandan, M. Fahad et al. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, issue 17. P. 13551–13564. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24420>.

93. Expression of Aldehyde Dehydrogenase (ALDH1) and ATP Binding Cassette Transporter G2 (ABCG2) in Iraqi Patients with Colon Cancer and the Relation with Clinicopathological Features / N. A. Mahmood, Z. S. Abdulghany, I. M. Al-Sudani et al. *Int. J. Mol. Cell Med*. 2018. Vol. 7, issue 4. P. 234–240. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.4.234>.

94. High ALDH1 expression in colorectal carcinoma could predict early onset of the disease / L. Vermani, N. S. Kumar, A. Talukdar et al. *Cancer Res.* 2019. Vol. 79 (13). Abstr. 4924. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-4924>.
95. Boesch M., Spizzo G., Seeber A. Concise Review: Aggressive Colorectal Cancer: Role of Epithelial Cell Adhesion Molecule in Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Stem Cells Translational Med.* 2018. Vol. 7. P. 495–501. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0289>.
96. Chai X. B., Song R. F., Xu F. Expression changes in epithelial cell adhesion molecule during colorectal cancer tumorigenesis. *Genet. Mol. Res.* 2015. Vol. 14 (3). P. 7624–7629. <https://doi.org/10.4238/2015.July.13.6>.
97. Keller L., Werner S., Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress.* 2019. Vol. 3 (6). P. 165–180. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.188>.
98. Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM / M. Pavsic, G. Guncar, K. Djinovic-Carugo, B. Lenarcic. *Nat. Communicat.* 2014. Vol. 28 (5). P. 4764. <https://doi.org/10.1038/ncomms5764>.
99. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells / L. Dollé, N. D. Theise, E. Schmelzer et al. *Am. J. Physiol.* 2015. Vol. 308 (4). P. 233–250. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00069.2014>.
100. Abdrah R. M., Rashad H. M. Significance of epithelial cell adhesion molecule and epidermal growth factor receptor expression in papillary thyroid carcinoma: an immunohistochemical study. *Egypt. J. Pathol.* 2019. Vol. 39 (1). P. 159–164. https://doi.org/10.4103/EGJP.EGJP_20_19.
101. Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma / C. Eichelberg, F. K. Chun, J. Bedke et al. *Int. J. Cancer.* 2013. Vol. 132 (12). P. 2948–2955. <https://doi.org/10.1002/ijc.27970>.

102. Prognostic value of the expression of epithelial cell adhesion molecules in head and neck squamous cell carcinoma treated by definitive radiotherapy / N. Murakami, T. Mori, S. Nakamura et al. *J. Radiation Res.* 2019. Vol. 60 (6). P. 803–811. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz053>.

103. Relationship between epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression and gastric cancer patients: A systematic review and meta-analysis / M. Dai, F. Yuan, C. Fu et al. *PloS one.* 2017. Vol. 12 (4), P. e0175357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175357>.

104. Markers of pancreatic cancer stem cells and their clinical and therapeutic implications / A. Gzil, I. Zarebska, W. Bursiewicz et al. *Mol. Biol. Rep.* 2019. Vol. 46 (6). P. 6629–6645. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05058-1>.

105. Is Ep-CAM Expression a Diagnostic and Prognostic Biomarker for Colorectal Cancer? A Systematic Meta-Analysis / S. Han, S. Zong, Q. Shi et al. *EBioMedicine.* 2017. Vol. 20. P. 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.05.025>.

106. The molecular basis of EPCAM expression loss in Lynch syndrome-associated tumors / C. Huth, M. Kloor, A. Y. Voigt et al. *Modern Pathol.* 2012. Vol. 25 (6). P. 911–916. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.30>.

107. Molecular Characterization of "Sessile Serrated" Adenoma to Carcinoma Transition in Six Early Colorectal Cancers / R. Cappellesso, M. Lo Mele, E. Rosa-Rizzotto et al. *Pathology, Research and Practice.* 2019. Vol. 215 (5). P. 957–962. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.02.001>.

108. Molecular characterization of sessile serrated adenoma/polyps with dysplasia/carcinoma based on immunohistochemistry, next-generation sequencing, and microsatellite instability testing: a case series study / T. Murakami, Y. Akazawa, N. Yatagai et al. *Diagnostic Pathol.* 2018. Vol. 13 (1). P. 88. <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0771-3>.

109. Epithelial Mesenchymal Transition in Cancer Progression: Preventive Phytochemicals / S. Illam, A. Narayanankutty, S. E. Mathew et al. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 2017. Vol. 11, issue 3. P. 234–246. <https://doi.org/10.2174/1574892812666170424150407>.
110. Vu T., Datta P. K. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers.* 2017. Vol. 9, issue 12. P. 171. <https://doi.org/10.3390/cancers9120171>.
111. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer / Q. C. Zhu, R. Y. Gao, W. Wu, H. L. Qin. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013. Vol. 14, issue 5. P. 2689–2698. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.5.2689>.
112. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications / S. H. M. Wong, C. M. Fang, L. H. Chuah et al. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 2018. Vol. 121. P. 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>.
113. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis / N. Christou, A. Perraud, S. Blondy et al. *Oncol. Lett.* 2017. Vol. 13 (6). P. 4571–4576.
114. Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9 / M. H. Lu, C. C. Huang, M. R. Pan et al. *Clin. Cancer Res.* 2012. Vol. 18 (23). P. 6416–6425.
115. β -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток / А. В. Исаева, А. П. Зима, И. П. Шабалова и др. *Вестн. Рос. академии мед. наук.* 2015. Т. 70, № 4. С. 475–483.
116. Morin P. J., Kinzler K. W., Sparks A. B. β -Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics. *Cancer Res.* 2016. Vol. 76 (19). P. 5587–5589.

117. The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma / G. M. Bourroul, H. J. Fragoso, J. W. Gomes et al. *Einstein*. 2016. Vol. 14 (2). P. 135–142.
118. Analysis of Wnt and β -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer / N. Yoshida, T. Kinugasa, K. Ohshima et al. *Anticancer Res*. 2015. Vol. 35 (8). P. 4403–4410.
119. Multifaceted role of keratins in epithelial cell differentiation and transformation / C. Dmello, S. S. Srivastava, R. Tiwari et al. *J. Biosci*. 2019. Vol. 44, issue 33. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9864-8>.
120. Al-Maghrabi J., Emam E., Gomaa W. Immunohistochemical staining of cytokeratin 20 and cytokeratin 7 in colorectal carcinomas: Four different immunostaining profiles. *Saudi J. Gastroenterol*. 2018. Vol. 24, issue 2. P. 129–134. https://doi.org/10.4103/sjg.SJG_465_17.
121. Vimentin on the move: new developments in cell migration / R. A. Battaglia, S. Delic, H. Herrmann, N. T. Snider. *F1000Res*. 2018. Vol. 15, issue 7. P. 1796. <https://doi.org/10.12688/f1000research>.
122. Ribatti D., Tamma R., Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl. Oncol*. 2020. Vol. 13, issue 6. P. 100773. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100773>.
123. Kuzet S., Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res*. 2016. Vol. 365. P. 607–619. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2467-x>.
124. Co-expression of cytokeratin and vimentin in colorectal cancer highlights a subset of tumor buds and an atypical cancer-associated stroma / S. N. Meyer, J. A. Galván, S. Zahnd et al. *Hum. Pathol*. 2019. Vol. 87. P. 18–27.
125. Human colorectal cancer cells induce vascular smooth muscle cell apoptosis in an exocrine manner / W. W. Li, H. Y. Wang, X. Nie et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8 (37). P. 62049–62056. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18893>.

126. Podoplanin, α -Smooth Muscle Actin or S100A4 Expressing Cancer-Associated Fibroblasts Are Associated with Different Prognosis in Colorectal Cancers / S. Y. Choi, R. Sung, S. J. Lee et al. *J. Korean Med. Sci.* 2013. Vol. 28 (9). P. 1293–1301.
127. Mesenchymal cells in colon cancer / V. Koliaraki, C. K. Pallangyo, F. R. Greten et al. *Gastroenterology*. 2017. Vol. 152 (5). P. 964–979.
128. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer / Y. Toiyama, H. Yasuda, S. Saigusa et al. *Carcinogenesis*. 2013. Vol. 34, issue 11. P. 2548–2557. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt282>.
129. Stromal Expression of Vimentin Predicts the Clinical Outcome of Stage II Colorectal Cancer for High-Risk Patients / L. G. Liu, X. B. Yan, R. T. Xie et al. *Med. Sci. Monitor*. 2017. Vol. 23. P. 2897–2905. <https://doi.org/10.12659/msm.904486>.
130. Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma / A. Shirahata, M. Sakata, K. Sakuraba et al. *Anticancer Res*. 2009. Vol. 29 (1). P. 279–281.
131. Mucin expression patterns in histological grades of colonic cancers in Ghanaian population / K. O. Danquah, E. Adjei, S. Ouayson, et al. *PanAfrican Med. J.* 2017. Vol. 27. P. 267–272.
132. Mucins and associated glycan signatures in colon adenoma-carcinoma sequence: prospective pathological implication(s) for early diagnosis of colon cancer / S. R. Krishn, S. Kaur, L. M. Smith et al. *Cancer Lett*. 2016. Vol. 374. P. 304–314.
133. MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in colorectal cancer: expression profiles and clinical significance / J. Betge, N.I. Schneider, L. Harbaum et al. *Virchows Arch*. 2016. Vol. 469. P. 255–265.

134. Nath S., Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 2014. Vol. 20. P. 332–342.
135. Fernandez H. R., Linden S. K. The aspirin metabolite salicylate inhibits lysine acetyltransferases and MUC1 induced epithelial to mesenchymal transition. *Nature.* 2017. Vol. 7. P. 5626–5638.
136. Immunohistochemical study of MUC1, MUC2 and MUC5AC in colorectal carcinoma and review of literature / M. V. Kesari, V. L. Gaopande, A. R. Joshi et al. *Indian J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 34. P. 63–67.
137. Kasprzak A., Siodła E., Andrzejewska M. Differential expression of mucin 1 and mucin 2 in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2018. Vol. 24. P. 4164–4177.
138. Gastric Proteins MUC5AC and TFF1 as Potential Diagnostic Markers of Colonic Sessile Serrated Adenomas/Polyps / M. Khaidakov, K. K. Lai, D. Roudachevski et al. *Am. J. Clin. Pathol.* 2016. Vol. 146. P. 530–537.
139. Predictive Gene Signatures: Molecular Markers Distinguishing Colon Adenomatous Polyp and Carcinoma / J. E. Drew, A. J. Farquharson, C. D. Mayer et al. *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. e113071.
140. Cdx1 and Cdx2 Function as Tumor Suppressors / A. Hryniuk, S. Grainger, J. G. A. Savury, D. Lohnes. *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. P. 33343–33354.
141. Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients / J. M. Bae, T. H. Lee, N. Y. Cho et al. *World J. Gastroenterol.* 2015. Vol. 21. P. 1457–1467.
142. CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer / P. Dalerba, D. Sahoo, S. Paik et al. *N. Engl. J. Med.* 2016. Vol. 374. P. 211–222.
143. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Морфология.* 2019.

T. 13, № 1. С. 67–75. http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2019-13-01/2019.4.12.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.1.67-75.

144. 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. Vol. 10 (7). P. 358–365. DOI : 10.5281/zenodo.3497436.

145. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression in serrated colonic polyps. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10 (11). P. 219–225. DOI : [http: 10.12775/JEHS.2020.10.11.021](http://10.12775/JEHS.2020.10.11.021).

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

147. 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, October 14-16, 2020)*. London, 2020. P. 616–620.

148. Шишкін М. А. Імуногістохімічна характеристика експресії VEGF-A і VEGFR-2 в поліпах та аденокарциномі дистальної товстої. *Теорія та практика сучасної морфології : матеріали IV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (м. Дніпро, 4-6 листоп. 2020 р.)*. Дніпро, 2020. С. 124–126.

149. Шишкін М. А. Імуногістохімічна характеристика експресії ALDH1 в зубчастих поліпах дистальної товстої кишки. *Медична наука у практику охорони здоров'я : матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. молодих учених (м. Полтава, 27 листоп. 2020 р.)*. Полтава, 2020. С. 37–38.

150. Шишкин 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.

151. Шишкин 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.
152. Шишкин М. А. Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы. *Патологія*. 2018. № 1(42). С. 49–56. DOI : 10.14739/2310-1237.2018.1.129447
153. 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. <http://morphology.dma.dp.ua/article/viewFile/185337/184936>.
154. 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. http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2019-13-04/2019.4.9.pdf.
155. Шишкин М. А., Христенко Т. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии CD44 в колоректальной аденокарциноме. *Морфологія*. 2020. Т. 14, № 2. С. 44–50. http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2020-14-02/2020.2.9.pdf.
156. Shyshkin M. A. Comparative analysis of CD44 expression in polyps and adenocarcinoma of the distal colon. *Вісник Укр. мед. стомат. академії*. 2020. Т. 20, № 3 (71). С. 173–178.
157. Шишкін М. А., Христенко Т. О. Порівняльна характеристика експресії ERСAM в поліпах і аденокарциномі дистальної товстої кишки. *Вісник Вінницького нац. мед. ун-ту*. 2020. Т. 24, № 2. С. 208–214.
158. 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.

159. Туманський В. О., Шишкін М. А. Характеристика транскрипційної активності гена KRAS та експресії маркерів апоптозу в клітинах колоректальної аденокарциноми. *Перспективи розвитку сучасної патології* : матеріали X Конгресу Патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вер. 2018 р.). Івано-Франківськ, 2018. С. 194–195.

160. 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 Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (м. Дніпро, 9-11 жовт. 2019 р.). Дніпро, 2019. С. 150.

161. 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.

162. 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.

163. Туманський В. О., Шишкін М. А. Особливості транскрипційної активності гену KRAS та його значення в колоректальній карциномі. *Вісник Вінницького нац. мед. ун-ту*. 2019. Т. 23, № 1. С. 153–157.

164. Шишкін 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.

165. 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.

166. Шишкин М. А., Фень С. В. Эпителиально-мезенхимальный переход в прогрессии колоректальной аденокарциномы. *Запорож. мед. журн.* 2020. Т. 22, № 5 (122). С. 694–700. DOI : 10.14739/2310-1210.2020.5.214747.

167. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Epithelial-mesenchymal transition and stem cells in colorectal cancer progression. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10 (10). P. 201–211. DOI : 10.12775/JEHS.2020.10.10.018.

168. 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.

169. 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 Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (м. Дніпро, 4-6 листоп. 2020р.). Дніпро, 2020. С. 126–127.

170. Elevated expression of p53 in early colon polyps in a pig model of human familial adenomatous polyposis / A. Sikorska, T. Flisikowska, M. Stachowiak et al. *J. Appl. Genet.* 2018. Vol. 59 (4). P. 485–491. DOI : 10.1007/s13353-018-0461-6.

171. Critical Role of p53 and K-ras in the Diagnosis of Early Colorectal Cancer: a One-year, Single-center Analysis / H. Y. Lu, R. T. Lin, G. X. Zhou et al. *Int. J. Med. Sci.* 2017. Vol. 14 (11). P. 1154–1162. DOI : 10.7150/ijms.20538.

172. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells / M. Zhou, X. Liu, Z. Li et al. *Int. J. Cancer*. 2018. Vol. 143 (4). P. 921–930. DOI : 10.1002/ijc.31374.
173. Loss of Caspase-3 sensitizes colon cancer cells to genotoxic stress via RIP1-dependent necrosis / M. Brown, B. Leibowitz, D. Chen et al. *Cell Death Dis.* 2015. Vol. 6. P. e1729. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.104>.
174. Interplay between apoptosis and autophagy in colorectal cancer / H. R. Qian, Z. Q. Shi, H. P. Zhu et al. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8 (37). P. 62759–62768.
175. Prognostic value of KRAS codon 13 gene mutation for overall survival in colorectal cancer: Direct and indirect comparison meta-analysis / M. S. Kwak, J. M. Cha, J. Y. Yoon et al. *Medicine*. 2017. Vol. 96, N 35. P. E7882.
176. Oncogenic *Kras* drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer / A. T. Boutin, W. T. Liao, M. Wang et al. *Genes Develop.* 2017. Vol. 31, N 4. P. 370–382.
177. Xiuli L., Jakubowski M., Hunt J. L. *KRAS* Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015. Vol. 135, N 2. P. 245–252.
178. Coulson R. Molecular Profiling in Resectable Colorectal Liver Metastases: The Role of KRAS Mutation Status in Assessing Prognosis in the Preoperative Setting. *J. Adv. Pract. Oncol.* 2015. Vol.6, N 5. P. 470–474.
179. Temraz S., Mukherji D., Shamseddine A. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, N 19. P. 22976–22988.
180. Expression of CDX-2 and Ki-67 in different grades of colorectal adenocarcinomas / A. Sen, S. R. Mitra, N. Das et al. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2015. N 2. P. 158–162.

181. Histochemical and immunohistochemical evidence of tumor heterogeneity in colorectal cancer / O. M. Zlatian, M. V. Comănescu, A. F. Roșu et al. *Roman. J. Morphol. Embryol.* 2015. N 1 (56). P. 175–181.
182. Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study) / A. Hegazy S. A. Daoud, W. S. Ibrahim et al. *Acad. J. Cancer Res.* 2014. Vol. 7, N 3. P. 168–172.
183. Rezanejad Bardaji H., Asadi M. H., Yaghoobi M. M. Long noncoding RNA VIM-AS1 promotes colorectal cancer progression and metastasis by inducing EMT. *Eur. J. Cell Biol.* 2018. Vol. 7. P. 1035–1048.
184. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate / A. Hafner, M. L. Bulyk, A. Jambhekar et al. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. Vol. 20. C. 199–210. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>.
185. Kasthuber E. R., Lowe S. W. Putting p53 in Context. *Cell.* 2017. Vol. 170 (6). P. 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>.
186. Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors / H. Li, J. Zhang, J. Tong et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20 (23). P. 5999. <https://doi.org/10.3390/ijms20235999>.
187. Expression Level of Caspase Genes in Colorectal Cancer / M. Asadi, D. Shanebandi, T. Asvadi Kermani et al. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2018. Vol. 19 (5). P. 1277–1280. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.5.1277>
188. The Caspase-3/PKC δ /Akt/VEGF-A Signaling Pathway Mediates Tumor Repopulation during Radiotherapy / J. Cheng, S. He, M. Wang et al. *Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 25 (12). P. 3732–3743.
189. Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, N 2. P. 448–454.
190. The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma / J. Alcaide, R. Funez, A. Rueda et al. *BMC Clin. Pathol.* 2013. Vol. 13. P. 24. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-13-24>

191. Molecular Fluorescence Endoscopy Targeting Vascular Endothelial Growth Factor A for Improved Colorectal Polyp Detection / J. J. Tjalma, P. B. Garcia-Allende, E. Hartmans et al. *J. Nucl. Med.* 2016. Vol. 57 (3). P. 480–485.
192. An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas / R. K. Pai, M. Bettington, A. Srivastava et al. *Mod. Pathol.* 2019. Vol. 32. P. 1390–1415. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0280-2>.
193. Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management / C. Rosty, D. G. Hewett, I. S. Brown et al. *J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 48. P. 287–302. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0720-y>.
194. Differences in Expression of VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Microvessel Density in Colorectal Cancer with Liver Metastasis / E. H. Jeong, Y. Kim, B. W. Min et al. *J. Pathol. Translat. Med.* 2010. Vol. 44 (6). P. 571–580.
195. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells / S. Samuel, F. Fan, L. H. Dang et al. *Oncogene.* 2011. Vol. 30 (10). P. 1205–1212.
196. K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas / N. Margetis, M. Kouloukoussa, K. Pavlou, et al. *In vivo.* 2017. Vol. 31, N 4. P. 527–542.
197. Galectin-1 induces vascular permeability through the neuropilin-1/vascular endothelial growth factor receptor-1 complex / M. H. Wu, N. W. Ying, T. M. Hong et al. *Angiogenesis.* 2014. Vol. 17. P. 839–849.
198. CD44 expression in benign and malignant colorectal polyps / R. Neumayer, H. R. Rosen, A. Reiner et al. *Dis. Colon Rectum.* 1999. Vol. 42. P. 50–55. <https://doi.org/10.1007/BF02235182>

199. Lgr5 and CD44 expressions in different types of intestinal polyps and colorectal cancer / N. Chai, W. Zhang, Y. Wang et al. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2013. Vol. 33 (7). P. 972–976.
200. Ahmed B. Sh., Ibraheem M. M., Abdullah N. M. Immunohistochemical expression of stem cell markers CD44, CD166 and ALDH1A1 in non neoplastic polyps of the colon in sample of Iraqi patients. *Basrah J. Surgery*. 2017. Vol. 23, issue 1. P. 37–44.
201. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis / Z. Wang, Y. Tang, L. Xie et al. *Front. Oncol.* 2019. Vol. 9. P. 309. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00309>.
202. CD44/CD133-Positive Colorectal Cancer Stem Cells are Sensitive to Trifluridine Exposure / K. Tsunekuni, M. Konno, N. Haraguchi et al. *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. P. 14861. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50968-6>.
203. A self-enforcing CD44s/ZEB1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells / B. T. Preca, K. Baidak, K. Mock et al. *Int. J. Cancer*. 2015. Vol. 137 (11). P. 2566–2577. <https://doi.org/10.1002/ijc.29642>.
204. Kuşoğlu A., Biray Avcı Ç. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*. 2019. Vol. 681. P. 80–85.
205. Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) Promotes the Toxicity of TRAIL in Non-Small Cell Lung Cancer Cells via Post-Transcriptional Regulation of MEK-1 Expression / S. Tian, D. H. Liu, D. Wang, et al. *Cell Physiol. Biochem*. 2018. Vol. 51, issue 1. P. 217–227. <https://doi.org/10.1159/000495202>.
206. Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma / A. Wu, W. Luo, Q. Zhang, et al. *Cancer Lett.* 2013. Vol. 330. P. 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.046>.

207. Lazenec G., Lam P. Y. Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. Vol. 1866 (2). P. 290–299. DOI : 10.1016/j.bbcan.2016.10.004.
208. Tumor specific recruitment and reprogramming of mesenchymal stem cells in tumorigenesis / L. Berger, Y. Shamai, K. L. Skorecki, M. Tzukerman. *Stem Cells*. 2016. Vol. 34 (4). P. 1011–1026. DOI : 10.1002/stem.2269.
209. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review) / L. Huang, Y. Yang, F. Yang et al. *Int. J. Mol. Med*. 2018. Vol. 42. P. 1771–1785. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3764>.
210. Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis / X. He, Z. Chen, M. Jia et al. *PLoS One*. 2013. Vol. 8 (7). P. e70858.
211. Buda A., Pignatelli M. E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis. *Cell Communicat. Adhesion*. 2011. Vol. 18 (6). P. 133–143.
212. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis / S. A. Kim, K. Inamura, M. Yamauchi et al. *Brit. J. Cancer*. 2016. Vol. 114 (2). P. 199–206.
213. Prognostic Significance of β -Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series / J. Bruun, M. Kolberg, J. M. Nesland et al. *Front. Oncol*. 2014. Vol. 21 (4). P. 118–120.
214. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer / E. Lemieux, S. Cagnol, K. Beaudry et al. *Oncogene*. 2015. Vol. 34 (38). P. 4914–4927.
215. Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer /

K. Nakamoto, H. Nagahara, K. Maeda et al. *Oncol. Lett.* 2013. Vol. 5 (4). P. 1295–1300.

216. CK7 expression associates with the location, differentiation, lymph node metastasis, and the Dukes' stage of primary colorectal cancers / F. Fei, C. Li, Y. Cao et al. *J. Cancer.* 2019. Vol. 10, issue 11. P. 2510–2519. <https://doi.org/10.7150/jca.29397>.

217. Diagnostic value of SATB2, CK7 and CK20 in colorectal cancer / J. Lyn, Y. Wang, F. Wang et al. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2015. Vol. 44, issue 8. P. 578–581.

218. Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells* / F. Danielsson, M. K. Peterson, H. Caldeira Araújo et al. *Cells.* 2018. Vol. 7, 10. P. 147. <https://doi.org/10.3390/cells7100147>.

219. The vimentin intermediate filament network restrains regulatory T cell suppression of graft-versus-host disease / C. McDonald-Hyman, J. T. Muller, M. Loschi et al. *J. Clin. Invest.* 2018. Vol. 128, issue 10. P. 4604–4621. <https://doi.org/10.1172/JCI95713>.

220. Comparisons of cancer-associated fibroblasts in the intratumoral stroma and invasive front in colorectal cancer / G. M. Son, M. S. Kwon, D.H. Shin et al. *Medicine.* 2019. Vol. 98, issue 18. P. e15164. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015164>.

221. A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers / C. J. Hanley, F. Noble, M. Ward et al. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7. P. 6159–74. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6740>.

222. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2016. Vol. 16, issue 9. P. 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.

223. MUC1-induced immunosuppression in colon cancer can be reversed by blocking the PD1/PDL1 signaling pathway / Y. Zhang, X. Dong, L. Bai et al. *Oncol. Lett.* 2020. Vol. 20. P. 317. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12180>.

224. Mucins and associated O-glycans based immunoprofile for stratification of colorectal polyps: clinical implication for improved colon surveillance / S. R. Krishn, S. Kaur, Y. M. Sheinin et al. *Oncotarget.* 2017. Vol. 8. P. 7025–7038.

225. CDX2: A Prognostic Marker in Metastatic Colorectal Cancer Defining a Better BRAF Mutated and a Worse KRAS Mutated Subgroup / K. Aasebø, A. Dragomir, M. Sundström et al. *Front. Oncol.* 2020. Vol. 10. P. 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00008>.

226. Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: results from two nationwide cohorts / T. F. Hansen, S. Kjær-Frifeldt, A. C. Eriksen et al. *Br. J. Cancer.* 2018. Vol. 119. P. 1367–1373. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0285-5>.

227. Singh J. Pattern of expression of CDX2 in colorectal cancer and its role in prognosis. *J. Global Oncology.* 2019. Vol. 5, suppl. P. 36.

ДОДАТОК А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Харківської медичної академії
 післядипломної освіти МОЗ
 України
 проф., д.м.н. Георгіяні М.А.

« 15 »



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

3. **Джерело інформації:**

Шишкін М. А. Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы / Шишкин М.А. // Патология. – 2018. – Т. 15, №1(42). – С. 49–56.

Туманський В.О., Шишкін М.А. Особливості транскрипційної активності гену KRAS та його значення в колоректальній карциномі. Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2019р. – Т.23, №1 – С. 153–157.

Шишкін М. А. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы / М. А. Шишкин. // Патология. – 2019. – Т.16, №2 (46). – С. 148–154.

Шишкін М. А., Туманський В. А., Христенко Т. А. Значення CD44- и ALDH1-позитивних стоволових кліток в прогресії колоректальної аденокарциноми. Патология. 2020. Т.17, №2 (49). С. 170–177

4. **Впроваджено:** молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

5. **Термін впровадження:** вересень 2020 року

6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України.

7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патологічної анатомії, а також в наукову роботу кафедри.

8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України (протокол від 09 вересня 2020р № 10).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
 Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України

д.мед.н., проф.

І.І. Яковцова

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
Медичного інституту
Сумського державного університету
МОН України
Проф. Лобода АІМ.

« 22 » 09 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

Джерело інформації:

Шишкін М. А. Молекулярно-іммуногістохімічна характеристика пролиферації і апоптоза опухольових кліток колоректальної аденокарциноми / Шишкін М.А. // Патологія. – 2018. – Т. 15, №1(42). – С. 49–56.

Туманський В.О., Шишкін М.А. Особливості транскрипційної активності гену KRAS та його значення в колоректальній карциномі. Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2019р. – Т.23, №1 – С. 153–157.

Шишкін М. А. Імуногістохімічна характеристика експресії VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 і CD34 при прогресивній колоректальної аденокарциноми / М. А. Шишкін. // Патологія. – 2019. – Т.16, №2 (46). – С. 148–154.

Шишкін М. А., Туманський В. А., Христенко Т. А. Значення CD44- і ALDH1-позитивних стволових кліток в прогресії колоректальної аденокарциноми. Патологія. 2020. Т.17, №2 (49). С. 170–177

1. **Впроваджено:** молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

2. **Термін впровадження:** вересень 2020 року

3. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії Сумського державного університету МОН України.

4. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

5. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету МОН України (протокол від 21 09 202 р № 4).

Завідувач кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету МОН України

д.мед.н., проф.

А.М. Романюк

ДОДАТОК АЗ



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** - молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

Джерело інформації:

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

Туманський В.О., Шишкін М.А. Особливості транскрипційної активності гену KRAS та його значення в колоректальній карциномі. Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2019р. – Т.23, №1 – С. 153–157.

Шишкін М. А. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы / М. А. Шишкін. // Патологія. – 2019. – Т.16, №2 (46). – С. 148–154.

Шишкін М. А., Туманський 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

1. **Впроваджено:** молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

2. **Термін впровадження:** вересень 2020 року

Базова установа, яка проводить впровадження: кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету

3. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.

4. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету

(протокол № 6 від 24.09 2020 р).

Завідувач кафедри патологічної анатомії і судової медицини
Запорізького державного медичного університету

д.мед.н., проф.



С.І Тертишний

ДОДАТОК А4

ЗАТВЕРДЖУЮ
Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Української медичної
стоматологічної академії
проф. В.М. Дворник



2020 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** епітеліально-мезенхімальна трансформація в прогресії колоректальної аденокарциноми.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

3. **Джерела інформації:**

3.1. Особливості транскрипційної активності генів CDH1, CTNNB1 та експресії кодованих ними молекул E-кадгерину, β -катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми / Шишкін М.А., Туманський В.О. // Патологія. – 2018. – Т. 15, №2(43). – С. 221–228.

3.2. Шишкін М. А., Фень С.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в прогрессии колоректальной аденокарциномы. Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, №5 (122). С. 694–700.

3.3. Shyshkin M.A., Khrystenko T.A. Epithelial-mesenchymal transition and stem cells in colorectal cancer progression. Journal of Education, Health and Sport. 2020. 10 (10). P. 201-211.

4. **Де і коли впроваджено:** кафедра патологічної анатомії з секційним курсом Української медичної стоматологічної академії, червень 2020 р. – вересень 2020 р.

5. **Результати застосування методу.** Отримані результати щодо епітеліально - мезенхімальної аденокарциноми товстої кишки впроваджені у навчальний процес зі здобувачами вищої освіти, лікарями інтернами (в лекційний курс, практичні заняття) та науково-дослідну роботу кафедри.

6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3).** Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити й підвищити знання студентів, лікарів-інтернів, аспірантів щодо особливостей прогресії колоректальної аденокарциноми.

7. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Пропозиція обговорена і затверджена на кафедральному засіданні № 3 від 24.09.2020 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедрою патологічної анатомії з секційним курсом
Української медичної стоматологічної академії
доктор медичних наук, професор

 Старченко І.І.

ДОДАТОК А5



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** молекулярно-генетичні та імуногістохімічні характеристики колоректальної аденокарциноми.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

3. **Джерело інформації:**

Шишкін М. А. Молекулярно-иммуногістохіміческая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы / Шишкін М.А. // Патологія. – 2018. – Т. 15, №1(42). – С. 49–56.

Туманський В.О., Шишкін М.А. Особливості транскрипційної активності гену KRAS та його значення в колоректальній карциномі. Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2019р. – Т.23, №1 – С. 153–157.

Шишкін М. А. Иммуногістохіміческая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы / М. А. Шишкін. // Патологія. – 2019. – Т.16, №2 (46). – С. 148–154.

4. **Впроваджено:** в КЗ «Дніпропетровське обласне патологоанатомічне бюро»

5. **Строки впровадження:** січень-жовтень 2020 року

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3) - запропоновані критерії ефективні**

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, яка проводила впровадження
Підвищення точності патологоанатомічної діагностики та прогнозу колоректальної аденокарциноми.	15 %	10 %

7. **Зауваження, додатки** не вносилися

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач відділення загальної патології

« 2 » // 2020 р.

Р.В. Лісуненко

ДОДАТОК А6

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник КУ «Запорізьке обласне
біро судово-медичної експертизи» ЗОР

А.В. Куртєв

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** імуногістохімічні параметри high-grade поліпів та аденокарциноми дистальної товстої кишки

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

3. **Джерело інформації:**

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. URL: <http://morphology.dma.dp.ua/article/viewFile/185337/184936>

Шишкін М. А., Христенко Т. А. Иммуногистохимическая характеристика неоангиогенеза в полипах и аденокарциноме дистальных отделов толстой кишки. Морфологія, 2019, Т. 13, №4. С. 43–49. URL: <http://www.morphology.dp.ua/pub/MORPHO-2019-13-04/2019.4.9.pdf>

4. **Впроваджено:** в КУ «Запорізьке обласне біро судово-медичної експертизи» ЗОР

5. **Строки впровадження:** січень-жовтень 2020 року

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)** - запропоновані критерії ефективні

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, яка проводила впровадження
Підвищення точності патологоанатомічної діагностики та прогнозу поліпів та аденокарциноми дистальної товстої кишки	15 %	10 %

7. **Зауваження, додатки** не вносилися

Відповідальний за впровадження

(зав. відділенням, підпис, ПІБ)

Громенко О.О.

« 02 » //

2020 р.

ДОДАТОК А7



ЗАТВЕРДЖУЮ

Генеральний директор
КНП «Чернігівське обласне
патологоанатомічне бюро» ЧОР

« » _____ В.О. Синиця
2020 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** епітеліально-мезенхімальна трансформація в прогресії колоректальної аденокарциноми.

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О..

3. **Джерело інформації:**

Особливості транскрипційної активності генів CDH1, CTNNB1 та експресії кодованих ними молекул E-кадгерину, β -катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми / Шишкін М.А., Туманський В.О. // Патологія. – 2018. – Т. 15, №2(43). – С. 221–228.

Шишкін М.А., Фень С.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в прогрессии колоректальной аденокарциномы. Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, №5 (122). С. 694-700.

4. **Впроваджено:** в КНП «Чернігівське обласне патологоанатомічне бюро» ЧОР.

5. **Строки впровадження:** листопад 2020 року.

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п. 3) - запропоновані критерії ефективні**

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, яка проводила впровадження
Підвищення точності патологоанатомічної діагностики та прогнозу колоректальної аденокарциноми.	15 %	12 %

7. **Зауваження, додатки** не вносилися.

Відповідальний за впровадження
завідувач Чернігівського
Г міського патологоанатомічного
відділення


(зав відділення, підпис, ПІБ)

Злепко Едвард Михайлович

«30» 11 2020 р.

ДОДАТОК А8

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
проф. В.В. М'ясоєдов
«09» 12 2020 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.):** імуногістохімічна і молекулярно-генетична характеристика епітеліально-мезенхімальної трансформації в прогресії колоректальної аденокарциноми.
- 2. Ким і коли запропонований:** Туманський В.О., проректор з наукової роботи, професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ, Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ, Фень С.В., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ; Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини; просп. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035.
- 3. Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.):**
 - 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.
 - Шишкін М.А., Фень С.В. Епітеліально-мезенхімальний перехід в прогресії колоректальної аденокарциноми. Запоріжський медичний журнал. 2020. Т. 22, №5(122). С. 694-700.
- 4. Де і коли введено:** кафедра патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, 2020 р.
- 5. Результати застосування методу за період з 02.11.2020 р. по 30.11.2020 р.:** Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Харківського національного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
- 6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити знання студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів і аспірантів щодо вдосконалення морфологічної діагностики колоректальної аденокарциноми на різних стадіях її розвитку за допомогою аналізу показника імуногістохімічної експресії маркерів епітеліального та мезенхімального фенотипів, рівнів експресії мРНК генів CDH1, CTNNB1 і кодованих ними молекул Е-кадгерину, β-катеніну та їхніх зв'язків із рівнем транскрипційної активності гена KRAS.
- 7. Зауваження, пропозицій:** немає.

Відповідальний(і) за впровадження
в.о. завідувача кафедри
патологічної анатомії ХНМУ

01.12.2020
(дата)

проф. І.В. Сорокіна

(відпис)

ДОДАТОК А9

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Начальник КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро» ООР

В.П. Бурлаченко

(керівник установи, в якій проведено впровадження)

« 8 » 12 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** епітеліально-мезенхімальна трансформація в прогресії колоректальної аденокарциноми

2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Туманський В.О., доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.

3. **Джерело інформації:**

Особливості транскрипційної активності генів CDH1, CTNNB1 та експресії кодованих ними молекул E-кадгерину, β-катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми / Шишкін М.А., Туманський В.О. // Патологія. – 2018. – Т. 15, №2(43). – С. 221–228.

Шишкін М. А., Фень С.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в прогрессии колоректальной аденокарциномы. Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, №5 (122). С. 694-700.

4. **Впроваджено:** в КУ «Одеське обласне патологоанатомічне бюро» ООР

5. **Строки впровадження:** листопад-грудень 2020 року

6. **Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)** - запропоновані критерії ефективні

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, яка проводила впровадження
Підвищення точності патологоанатомічної діагностики та прогнозу колоректальної аденокарциноми.	15 %	15 %

7. **Зауваження, додатки** не вносилися

Відповідальний за впровадження зав.Суворовським відділенням КУ «ООПАБ»
Матюшина Н.М.

« 2 » 12 2020 р.

ДОДАТОК А10

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Перший проректор з науково-педагогічної роботи
 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького
 МОЗ України
 Член-кореспондент НАМН України
 проф. М.Р. Гжегоцький

«20» 01 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** імуногістохімічні характеристики поліпів дистальної товстої кишки
2. **Установа розробника:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра патологічної анатомії і судової медицини. Автори: доцент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Шишкін М.А., асистент кафедри патологічної анатомії і судової медицини ЗДМУ Христенко Т.О.
3. **Джерело інформації:** Shyshkin M.A., Khrystenko T.A. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. Морфологія. 2019. Т. 13, №1. С. 67–75. URL: <http://www.morphology.dp.ua/pub/MORPHO-2019-13-01/2019.4.12.pdf>
 Шишкін М. А., Христенко Т. А. Иммуногістохіміческая характеристика неоваскуляризації в поліпах и аденокарциномі дистальних відділів товстої кишки. Морфологія. 2019. Т. 13, №4. С. 43–49. URL: <http://www.morphology.dp.ua/pub/MORPHO-2019-13-04/2019.4.9.pdf>
4. **Впроваджено** імуногістохімічні характеристики поліпів дистальної товстої кишки
5. **Термін впровадження:** вересень 2020 року
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова МОЗ України.
7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.
8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України (протокол від 30.12.2020р № 6).

Завідувач кафедри патологічної анатомії та судової медицини
 Львівського національного медичного університету
 ім. Данила Галицького МОЗ України

д.мед.н., проф.


 Ю.О. Поспішіль

ДОДАТОК Б
СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ
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. *(Дисертанту належить ідея та дизайн дослідження, відбір та аналіз архівного матеріалу, статистична обробка даних)*.
2. Шишкин М. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67 в опухолевых и стромальных клетках колоректальной аденокарциномы. М. А. Шишкин. *Патологія*. 2016. №2(37). С. 76–81. DOI: 10.14739/2310-1237.2016.2.80898.
3. Шишкин 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. 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. *(Дисертанту належить підбір матеріалу, аналіз результатів імуногістохімічного і молекулярно-генетичного досліджень, статистична обробка даних)*.
5. 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). *(Дисертанту належить проведення гістологічного та*

імуногістохімічного досліджень, описання морфологічної частини корисної моделі).

6. Шишкин 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

7. 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 *(Дисертанту належить проведення гістологічного та імуногістохімічного досліджень, аналіз результатів імуногістохімічного і молекулярно-генетичного досліджень, статистична обробка даних).*

8. Shyshkin M. A., Khrystenko T. A. Distal colonic polyps: immunohistochemical study of proliferation and apoptosis. *Морфологія*. 2019. Т. 13, №1. С. 67–75. URL: http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2019-13-01/2019.4.12.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.1.67-75. *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

9. Шишкин 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.

10. 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. *(Дисертанту належить проведення імуногістохімічного*

дослідження, аналіз результатів імуногістохімічного і молекулярно-генетичного досліджень, статистична обробка даних).

11. 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. URL: <http://morphology.dma.dp.ua/article/viewFile/185337/184936>. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.3.149-155.

12. 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 Учасстю (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.)*. Дніпро, 2019. С.150.

13. Шишкин М. А. Иммуногистохимическая характеристика экспрессии VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 и CD34 при прогрессировании колоректальной аденокарциномы. *Патология*. 2019. Т.16, №2 (46). С. 148–154. DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177075

14. 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. URL: http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2019-13-04/2019.4.9.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2019.4.43-49. (*Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних*).

15. Шишкин М. А., Христенко Т. А. Особенности иммуногистохимической экспрессии CD44 в колоректальной аденокарциноме. *Морфологія*. 2020. Т. 14, № 2. С. 44–50. URL: http://www.morphology.dp.ua/_pub/MORPHO-2020-14-02/2020.2.9.pdf. DOI: 10.26641/1997-9665.2020.2.44-50. (*Дисертанту належить дизайн роботи,*

проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

16. 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. (Дисертанту належать концепція і дизайн дослідження, збір даних, аналіз та інтерпретація даних).

17. 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. (Дисертанту належать концепція і дизайн дослідження, аналіз та інтерпретація даних, написання статті).

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

19. 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, October 14-16, 2020)*. London, 2020. P. 616–620.

20. 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. (Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

21. 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.

(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

22. Shyshkin M. A. Comparative analysis of CD44 expression in polyps and adenocarcinoma of the distal colon. *Вісник Українська медична стоматологічна академія*. 2020. Т. 20, № 3(71). С. 173–178.

23. 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: [http: 10.12775/JEHS.2020.10.11.021](http://10.12775/JEHS.2020.10.11.021).

(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

24. Шишкін 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. *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

25. 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](https://doi.org/10.26641/1997-9665.2020.3.124-131). *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

26. 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](https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.4.221242). *(Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).*

27. 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 Учасстю (м. Дніпро, 4-6 листопада 2020р.). Дніпро, 2020. С.126–127. (Дисертанту належить дизайн роботи, проведення і аналіз результатів імуногістохімічного досліджень, статистична обробка даних).

28. 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.

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. X Конгрес патологів України «*Перспективи розвитку сучасної патології*» (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 р.) – публікація тез, усна доповідь.
2. Міжнародна науково-практична конференція «*Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря*» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 р.) – публікація статті, усна доповідь.
3. III Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «*Теорія та практика сучасної морфології*» (м. Дніпро, 9-11 жовтня 2019 р.) – публікація тез, усна доповідь.
4. IV International Scientific and Practical Conference «*Actual trends of modern scientific research*» (Munich, Germany, October 11-13, 2020) – публікація тез.
5. III International Scientific and Practical Conference «*The world of science and innovation*» (London, United Kingdom, October 14-16, 2020) – публікація тез.
6. IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «*Теорія та практика сучасної морфології*» (м. Дніпро, 4-6 листопада 2020 р.) – публікація тез, усна доповідь.
7. Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «*Медична наука у практику охорони здоров'я*» (м. Полтава, 27 листопада 2020 р.) – публікація тез, усна доповідь.