

Н.О. Безденежних¹
 В.С. Жильчук²
 М.В. Глянько³
 І.М. Адаменко¹
 Ю.Й. Кудрявець¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

²Краматорський онкодиспансер, Краматорськ

³Рівненський обласний онкологічний диспансер, Рівне, Україна

Ключові слова: колоректальний рак, епітеліально-мезенхімальний перехід, білки адгезії, ERCC1, прогностичні маркери.

ЕКСПРЕСІЯ В ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ МАРКЕРІВ ЕПІТЕЛІАЛЬНО- МЕЗЕНХІМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДУ ТА БІЛКІВ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ В ЯКОСТІ ПРОГНОСТИЧНОГО ПОКАЗНИКА У ХВОРИХ НА КОЛОРЕКТАЛЬНИЙ РАК

Мета: оцінити корелятивний зв'язок між експресією маркерів епітеліально-мезенхімального переходу пухлинних клітин і білків, асоційованих із лікарською стійкістю, та дослідити їх прогностичну значущість у перебігу пухлинного процесу у хворих на колоректальний рак (КРР). **Об'єкт і методи:** досліджено зразки пухлин 50 хворих на КРР III–IV стадії (T3N0M0, T4N0M0), із них хворих на рак прямої кишки (верхньо- і середньоампулярного відділу) — 39, рак ободової кишки — 11 осіб. Застосовано морфологічні, імуногістохімічні та статистичні методи. Оцінювали наявність білків E-кадгерину, Торо II- α , ERCC1, Twist у гістологічних зрізах первинних пухлин. **Результати:** встановлено, що достовірно інформативним показником для прогнозування більшої тривалості безрецидивного періоду та покращення загальної виживаності є такі фенотипові характеристики пухлинних клітин: E-кадгерин⁺/ERCC1⁻, E-кадгерин⁺/Торо II- α ⁻, Twist⁻/Торо II- α ⁻. Комплекси маркерів пухлинних клітин E-кадгерин⁻/ERCC1⁺ та E-кадгерин⁻/Торо II- α ⁺ асоційовані з погіршенням прогнозу перебігу захворювання, зі скороченням безрецидивного періоду та зниженням показників виживаності. За результатами кореляційного аналізу зв'язку експресії окремих антигенів із виживаністю встановлено, що тільки наявність E-кадгерин⁺ клітин у пухлинах свідчить про позитивний прогноз щодо виживаності хворого, тоді як наявність Торо II- α та ERCC1 достовірно погіршує прогноз щодо перебігу пухлинного процесу при КРР. **Висновок:** визначення експресії в первинній пухлині білків Twist і E-кадгерину, асоційованих з епітеліально-мезенхімальним переходом, та білків лікарської стійкості Торо II- α та ERCC1 є інформативним та ефективним комплексом маркерів для прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на КРР за умов проведення хіміотерапії.

Наразі підбір ефективної хіміотерапії (ХТ) для лікування хворих на колоректальний рак (КРР) залишається серйозною проблемою, оскільки нерідко використання сучасних терапевтичних схем не супроводжується очікуваним позитивним ефектом. Це зумовлює необхідність пошуку нових шляхів підвищення ефективності медикаментозного лікування. Серед таких підходів в останні роки особливу увагу дослідників привертає так звана таргетна терапія, що базується на здатності препаратів модифікувати конкретні молекули — патогенетичні ланки процесу злоякісної трансформації клітин, а також фено-

типові властивості пухлинних клітин (ПК). Можна сподіватися, що такі дослідження в майбутньому дадуть позитивні результати, проте нині в медикаментозному лікуванні хворих на КРР використовують традиційні схеми цитотоксичної ХТ; найефективнішими з них вважають FOLFOX і FOLFIRI, що включають препарати платини, іринотекан і 5-флуороурацил. Слід, однак, зазначити, що позитивна відповідь на лікування цими препаратами не перевищує 50%, а іноді й зовсім відсутня [1–4]. Це означає актуальність пошуку предиктивних маркерів резистентності ПК до цитостатиків, оскільки за її

наявності високотоксична ХТ із низкою побічних ефектів стає недоцільною.

Обнадійливим у такому разі є визначення у ПК ферментів групи топоізомерази, зокрема топоізомерази I [5], яка функціонально відіграє важливу роль у період реплікації та транскрипції ДНК. Нині в практику ХТ при КРР міцно увійшов іринотекан — напівсинтетичний розчинний дериват камптотечину. Він гідролізується *in vivo* в активний метаболіт SN-38 та стабілізує комплекс топоізомерази I з ДНК, перешкоджаючи його дисоціації та з'єднанню ниток ДНК. Іринотекан належить до фазоспецифічних препаратів, що максимально пошкоджують клітини, які знаходяться в S-фазі [6]. Тому наявність (активність) у ПК топоізомерази I може слугувати маркером чутливості певної пухлини до іринотекану й інших препаратів, механізм дії яких пов'язаний з порушенням репарації розривів ДНК у процесі клітинного поділу. Топоізомераза II-альфа (Торо II- α) [6] є відомим маркером чутливості ПК (у тому числі КРР) до дії антрациклінових протипухлинних препаратів та етопозиду і теніпозиду [9], а також мішенню для препаратів платини [7, 8]. Інгібітори дії Торо II- α призводять до зупинки розходження ланцюгів ДНК у S-фазі клітинного циклу. Оскільки активність Торо II- α у клітині залежить від фази клітинного циклу, то ефективність препаратів-інгібіторів корелює зі ступенем проліферативної активності клітин [10, 11]. Інгібітори топоізомераз стабілізують Торо II- α і запобігають репарації розриву, що є сигналом для початку процесу апоптозу, після чого активуються білки p53, p21/waf, відбувається блок клітинного циклу, вивільнення цитохрому С і активація каспаз 8, 9, 3 [12].

Суттєву роль у формуванні лікарської стійкості пухлин відіграють ферменти, що беруть участь у репарації ДНК після пошкодження протипухлинними засобами. Серед таких ферментів слід насамперед згадати ERCC1, ERCC2, XRCC1 та їхні аналоги [13–17]; щодо цих маркерів чітко доведено взаємозв'язок між низьким рівнем їх експресії та відповіддю пухлини на цитостатик (карбоплатин або оксаліплатин) при злоякісних пухлинах яєчника, стравоходу, шлунка і товстої кишки [18, 19]. Встановлено, зокрема, що втрата активності гена *XRCC1* у результаті мутації супроводжується зниженням інтенсивності репараційних процесів у ДНК і, як наслідок, реалізацією протипухлинного ефекту цитостатиків [20, 21].

Окрім вивчення білків, пов'язаних безпосередньо з лікарською чутливістю/стійкістю, ми вважали за необхідне та актуальне розглянути в роботі й експресію маркерів епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) ПК, оскільки цей процес відіграє провідну роль у набутті клітинами злоякісного фенотипу та лікарської стійкості. При пухлинній прогресії активація ЕМП призводить до набуття ПК здатності до інвазії та міграції, що, у свою чергу, спричиняє активацію метастазування і прогресивний розвиток злоякісного процесу в цілому [22–25].

Стандартні зміни, що відбуваються при ЕМП, включають, насамперед, підвищення експресії N- і VE-кадгеринів та віментину, ядерну релокалізацію β -катеніну й підвищену експресію низки транскрипційних факторів (Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist, E47). Цей процес стимулює також утворення стовбурових ПК, в яких пригнічена експресія E-кадгеринів, підвищена здатність до міграції та інвазії, а також активується здатність до самовідновлення і стійкість до апоптозу. Ідентифікація ЕМП при прогресуванні захворювання (у тому числі КРР) залишається однією з центральних проблем, оскільки ЕМП стає мішенню для розробки протипухлинних препаратів [26, 27].

Наведені дані свідчать, що загибель ПК під дією цитостатиків контролюється певними регуляторними системами клітин, а інформація про функціональний стан цих систем може бути корисною з погляду прогнозування клінічної результативності дії того чи іншого цитостатика. На нашу думку, найбільший інтерес у контексті лікарської стійкості та ступеня пухлинної прогресії КРР становить експресія білків Торо II- α та ERCC1 в асоціації з наявністю експресії білків ЕМП. Характер експресії цих маркерів у ПК вірогідно дозволить прогнозувати ефективність тих чи інших схем лікарської терапії та особливості перебігу пухлинного процесу у пацієнтів із КРР.

Метою роботи було оцінити корелятивний зв'язок між експресією маркерів ЕМП ПК і білків, асоційованих із лікарською стійкістю, та дослідити їх прогностичну значущість у перебігу пухлинного процесу у хворих на КРР.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідження включено (за інформованою згодою пацієнтів) клінічні дані 50 хворих на первинний КРР III–IV стадії (T3N0M0, T4N0M0); із них хворих на рак прямої кишки (верхньо- і середньоампулярного відділу) — 39, на рак ободової кишки — 11. Середній вік пацієнтів — 57,2 року (від 37 до 81 року). Серед хворих були 24 жінки (48%) і 26 чоловіків (52%). Гістологічно всі пухлини були верифіковані як аденокарциноми (10% — низькодиференційований рак, 63% — помірnodиференційований, 27% — високодиференційований).

Усі хворі проходили лікування у період з 2011 до 2015 року у Рівненському обласному онкологічному диспансері та отримували терапію відповідно до стандартів під час виявлення захворювання: у неоад'ювантному режимі — курс телегамматерапії, ад'ювантному режимі — від 4 до 6 курсів поліхіміотерапії за схемою FOLFOX. Типи проведених операцій на прямій кишці: черевно-анальна резекція — 27, передня резекція прямої кишки — 12; на ободовій кишці: геміколонектомія — 11. Час спостереження в ретроспективній групі — 4 роки. У кожного пацієнта ще до початку лікування отримана згода на можливість

використання біопсійного матеріалу та інформаційних даних для аналізу і ретроспективного вивчення.

Імунофенотип ПК оцінювали у гістологічних зрізах первинних пухлин за допомогою класичного імуногістохімічного методу (ІГХ), визначаючи експресію Е-кадгерину, Торо II- α , ERCC1, Twist. Моноклональні антитіла anti-E-cadherin (Thermo Scientific), anti-Twist1 (GeneTex), anti-ERCC1 (Abcam), anti-Tоро II (Thermo Scientific) наносили на зрізи в розведеннях і на час за інструкцією виробника, після чого застосовували систему візуалізації Poly Vue (Thermo Scientific, ОПТЕК), кон'юговану з пероксидазою, та визначали активність ферменту із застосуванням як субстрату діамінобензидину (Thermo Scientific, ОПТЕК). Оцінку результатів проводили напівкількісним методом за відсотком позитивно забарвлених ПК по всьому полю гістологічного зрізу. Клітини вважали позитивними за наявності забарвлення мембран клітин (при дослідженні Е-кадгерину), цитоплазми і ядра (Торо II- α , ERCC1, Twist), у тому числі в ізольованих кластерах чи комплексах клітин. Підрахунок позитивних (+) клітин проводили, використовуючи мікроскоп AxioStar Plus (Carl Zeiss, Німеччина) при збільшенні у 400–1000 разів, та оцінювали за допомогою класичного методу H-Score:

$$S = 1A + 2B + 3C,$$

де S — показник «H-Score», значення якого знаходяться у межах від 0 (білок не експресується) до 300 (сильна експресія у 100% клітин); А — відсоток слабо забарвлених клітин, В — відсоток по-

мірно забарвлених клітин, С — відсоток сильно забарвлених клітин.

Використано такі статистичні підходи: стандартний описовий, параметричний і непараметричний методи (t-критерій Стьюдента), регресійний і кореляційний аналіз (за Пірсоном). Загальну виживаність (ЗВ) хворих аналізували за методом Каплана — Мейера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виходячи з питань, порушених у роботі, досліджено такі комплекси антигенів, що характеризують імунофенотип ПК КРР: Е-кадгерин/ERCC1, Е-кадгерин/Торо II- α , Twist/ERCC1, Twist/Торо II- α . Такий підхід щодо зв'язку маркерів ЕМП з білками, асоційованими з лікарською стійкістю ПК, раніше не використовувався, однак згадані антигенні комплекси можуть бути досить інформативними та перспективними для прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на КРР за умов відповідного лікування.

Вказані фенотипові ознаки ПК проаналізовано у зіставленні з даними щодо перебігу патологічного процесу: наявністю прогресії захворювання чи безрецидивного періоду на час спостереження та 4-річною ЗВ залучених у дослідження пацієнтів (рис. 1, а–г). Крім того, проведено порівняння характеру експресії антигенних комплексів у ПК із ЗВ хворих за даними регресійного аналізу (табл. 1).

За отриманими даними щодо зв'язку комплексів досліджених ПК із ЗВ хворих і перебігом пухлин-

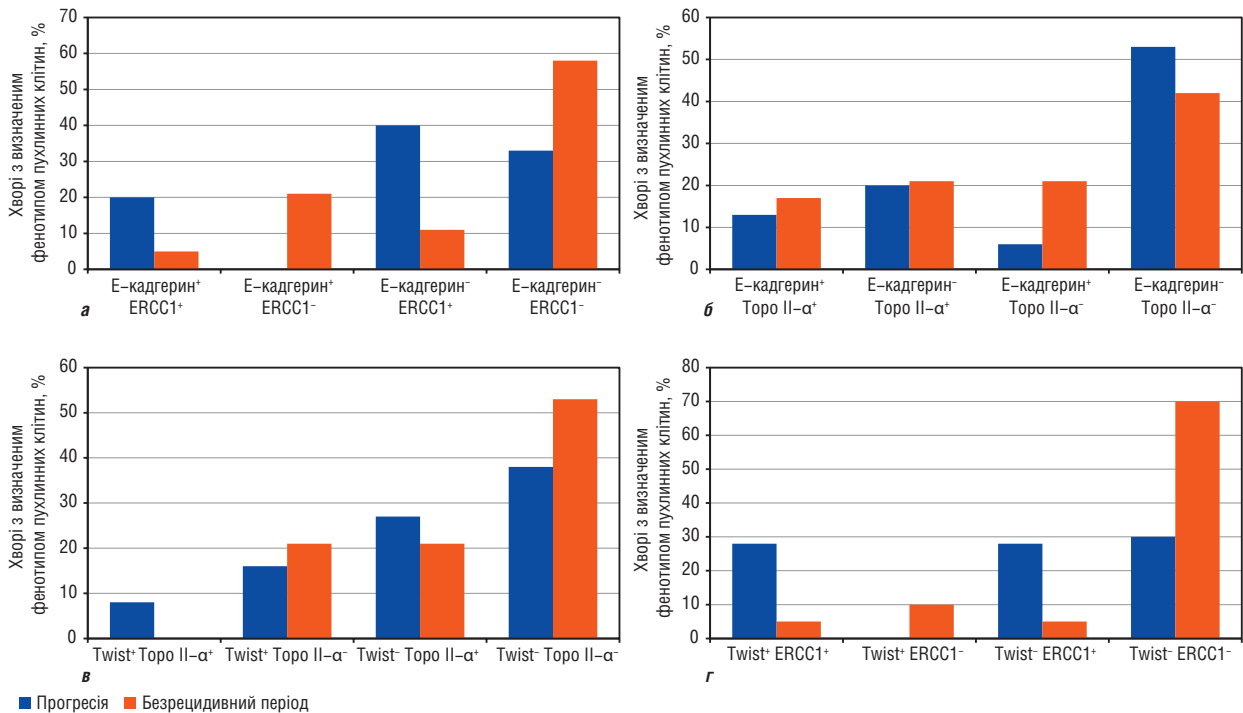


Рис. 1. Зв'язок фенотипових антигенних комплексів Е-кадгерин/ERCC1 (а), Е-кадгерин/Торо II- α (б), Twist/Торо II- α (в), Twist/ERCC1 (г), що експресуються в ПК, із характером перебігу пухлинного процесу у хворих на КРР

Оцінка залежності ЗВ хворих на КРР від характеру експресії антигенних маркерів ЕМП і білків, асоційованих із лікарською стійкістю

Коефіцієнт	Фенотип пухлинного матеріалу (за результатами ІГХ аналізу)							
	Е-кадгерин ⁺ ERCC1 ⁺	Е-кадгерин ⁺ ERCC1 ⁻	Е-кадгерин ⁻ ERCC1 ⁺	Е-кадгерин ⁻ ERCC1 ⁻	Е-кадгерин ⁺ Торо II-α ⁺	Е-кадгерин ⁺ Торо II-α ⁻	Е-кадгерин ⁻ Торо II-α ⁺	Е-кадгерин ⁻ Торо II-α ⁻
β	0,09	0,25	-0,5*	0,8*	-0,5	0,11	-0,22*	0,43*
Коефіцієнт	Фенотип пухлинного матеріалу (за результатами ІГХ аналізу)							
	Twist ⁺ Торо II-α ⁺	Twist ⁺ Торо II-α ⁻	Twist ⁻ Торо II-α ⁺	Twist ⁻ Торо II-α ⁻	Twist ⁺ ERCC1 ⁺	Twist ⁺ ERCC1 ⁻	Twist ⁻ ERCC1 ⁺	Twist ⁻ ERCC1 ⁻
β	н/д	0,13*	0,1*	0,54*	0,14	0,13	0,19	0,5

*p<0,05; н/д – недостатньо даних для аналізу.

ного процесу встановлено, що достовірно інформативним показником прогнозування подовження тривалості безрецидивного періоду та покращення ЗВ є фенотипові характеристики антигенів: Е-кадгерин⁻/ERCC1⁻, Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻, Е-кадгерин⁺/Торо II-α⁻, Twist⁻/Торо II-α⁻. За умов наявності ПК із фенотипом Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ прогноз перебігу захворювання погіршується, простежується достовірно (p < 0,05) зниження частоти випадків безрецидивного періоду та показників виживаності. Подібні результати щодо виживаності (на рівні тенденції) спостерігали і при антигенному профілі ПК Е-кадгерин⁻/Торо II-α⁺ (див. табл. 1).

Після отримання результатів щодо інформативності запропонованих комплексів маркерів було оцінено окремих внесок кожного з них у прогноз перебігу захворювання, а саме — проаналізовано зв'язок позитивної експресії досліджених антигенів

(Е-кадгерин, ERCC1, Twist і Торо II-α) із ЗВ хворих на КРР (табл. 2). За результатами кореляційного аналізу (за Пірсоном) встановлено, що тільки наявність Е-кадгерин⁺ ПК у біопсійному матеріалі свідчить про позитивний прогноз щодо виживаності хворого, тоді як наявність експресії Торо II-α та ERCC1 достовірно погіршує його (див. табл. 2, рис. 2, а–г).

Слід згадати, що Е-кадгерин є маркером епітеліальних клітин, і його наявність у ПК найчастіше свідчить про зниження їх метастатичного потенціалу та менш агресивну поведінку. Транскрипційний фактор Twist (антагоніст Е-кадгерину) найчастіше міститься у клітинах з агресивним мезенхімальним фенотипом та активується саме за наявності процесу ЕМП у ПК при набутті ними метастатичної активності [28–32]. Антиген Twist є негативним прогностичним маркером щодо перебігу пухлинного проце-

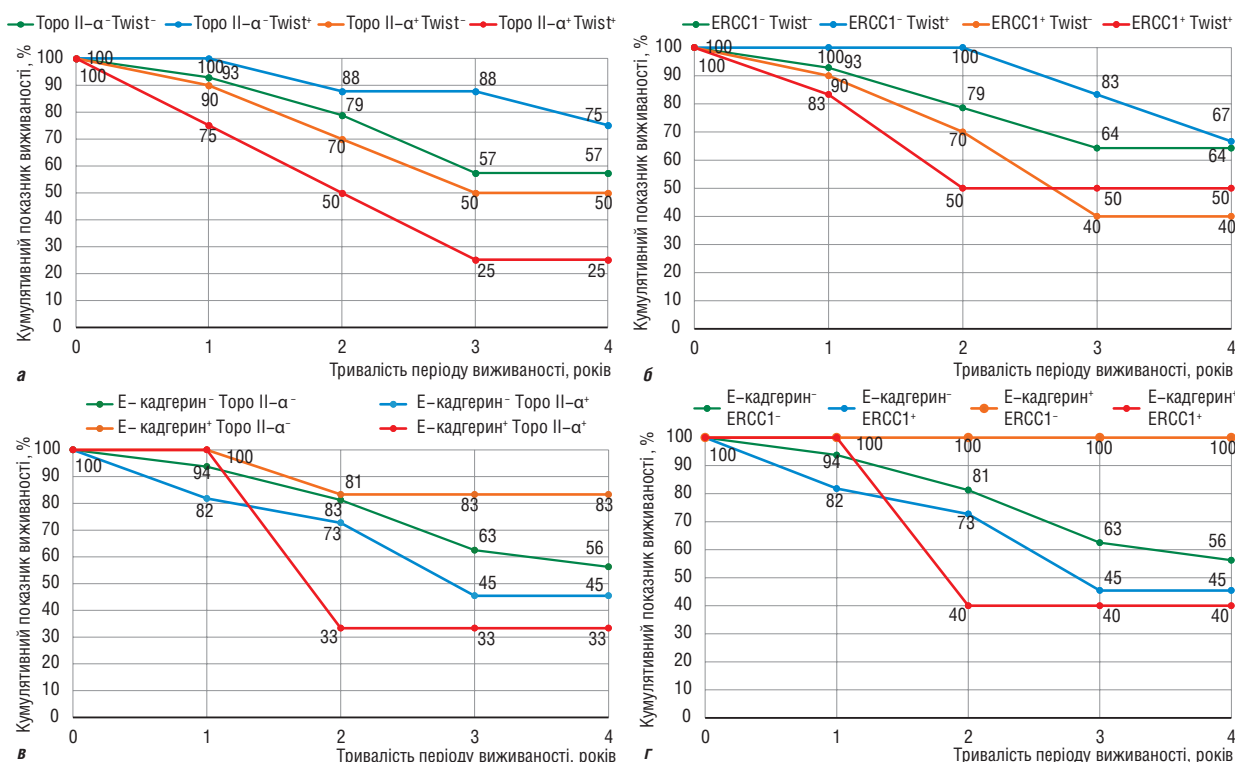


Рис. 2. Криві виживаності хворих на КРР за Капланом — Мейером залежно від характеру експресії маркерів лікарської стійкості та транскрипційних факторів ЕМП

су в комплексі з іншими маркерами, але як монофактор він, за результатами нашого дослідження, не є достовірним (див. табл. 2). Цей факт узгоджується з даними інших авторів щодо ролі транскрипційного фактора Twist як негативного прогностичного маркера у хворих на рак.

Таблиця 2

Кореляційний аналіз експресії антигенів у ПК із ЗВ хворих на КРР (за Пірсоном)

Антиген (позитивні ПК за результатами ІГХ аналізу H-Score методом)	Коефіцієнт кореляції
Twist	-0,35772
Е-кадгерин	0,53881*
ERCC1	-0,25000*
Торо II-α	-0,52985*

* $p < 0,05$.

Підсумовуючи дані ретроспективного аналізу та беручи до уваги використану лікувальну стратегію, можна зробити висновок, що для прогнозування ефективності застосування платиновмісних схем у хворих на КРР з використанням ХТ потрібна оцінка ПК як мінімум за двома маркерами — показниками Торо II-α та ERCC1. При цьому встановлено цікавий факт, що детекція цих антигенів (у комплексному чи монорежимі) у великій кількості клітин (частка позитивних клітин у пухлинах >40%) суттєво знижує відсоток пацієнтів у безрецидивний період і погіршує ЗВ при застосуванні стандартного підходу до лікування хворих на КРР платиновмісними схемами. Тобто, за нашими даними, можна зробити висновок, що у хворих із фенотипом ПК Торо II-α⁺ та ERCC1⁺ ефективність використання оксаліплатину в терапевтичних схемах значно знижується і застосування таких схем виявляється недостатньо аргументованим. Використання додаткових характеристик антигенного профілю ПК, зокрема маркерів процесу ЕМП, прямо впливає на прогностичну оцінку перебігу пухлинного процесу, в тому числі за умов проведення поліхіміотерапії.

Таким чином, отримані нами дані показали, що досліджені фенотипові маркери та їхні певні комбінації можуть бути досить інформативними для прогнозу перебігу раку та ЗВ хворих. Нині з'являється все більше даних щодо того, що ПК у процесі ЕМП характеризуються низькою чутливістю до протипухлинного впливу. Зокрема, показано, що в клітинах ліній КРР, у яких формують резистентність до платиновмісних препаратів, спостерігається домінування ознак мезенхімального фенотипу (зі зменшенням кількості Е-кадгерин⁺ клітин та збільшенням кількості віментин⁺ клітин). Частково це може бути пов'язано з активацією оксаліплатином програми ЕМП через активацію сигнального шляху Fas у злоякісно трансформованих клітинах [33, 34]. Крім того, відомо, що експресія індукторів ЕМП — SNAIL1 та TGFβ — у клітинах КРР підвищує їхню стійкість до флуороурацилу [35–37]. Дослідження нами характеру експресії в первинній пухлині маркерів ЕМП дає можливість передбачити наявність у популяції клітин із стовбуровими характеристиками.

Такі клітини, по-перше, відрізняються лікарською стійкістю, а по-друге, можуть утворювати дисеміновані пухлинні мікрометастази, що дуже важливо в контексті прогнозування перебігу пухлинного процесу.

Результати дослідження підтверджують досить обмежені наразі відомості щодо вагомості ролі ЕМП у перебігу патологічного процесу у хворих на КРР. Визначення запропонованого нами антигенного фенотипового комплексу в первинних пухлинах КРР показало значущість та інформативність такого підходу для прогнозування перебігу хвороби у пацієнтів із КРР.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що достовірно інформативними показниками прогнозування тривалості безрецидивного періоду та ЗВ хворих в умовах ХТ є такі фенотипові антигенні комплекси: Е-кадгерин⁺/ERCC1⁻, Е-кадгерин⁺/Торо II-α⁻, Twist⁻/Торо II-α⁻. У свою чергу, антигенні комплекси у ПК Е-кадгерин⁻/ERCC1⁺ та Е-кадгерин⁻/Торо II-α⁺ асоційовані з погіршенням прогнозу перебігу захворювання зі зниженням частоти, зменшенням тривалості безрецидивного періоду та зниженням ЗВ.

2. За результатами кореляційного аналізу зв'язку експресії окремих антигенів із ЗВ при КРР встановлено, що тільки наявність Е-кадгерин⁺ клітин у пухлинному матеріалі свідчить про позитивний прогноз щодо характеру перебігу пухлинного процесу та виживаності пацієнтів, тоді як експресія в ПК антигенів Торо II-α та ERCC1 достовірно погіршує його.

3. Показано, що застосування одночасного визначення експресії маркерів ЕМП ПК і білків Торо II-α та ERCC1 є інформативним та ефективним комплексом при прогнозуванні перебігу пухлинного процесу у хворих на КРР.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients. *J Clin Oncol*. 2015; 33: 1787–96.
2. Grothey A, Goldberg RM. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 2159–70.
3. Marsh S. Pharmacogenetics of colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 2607–16.
4. Чехун ВФ, Максим'як ГІ, Жильчук ВС та ін. Шляхи вдосконалення медикаментозної терапії хворих на рак прямої кишки з метастазами в печінку: переваги метрономного режиму хіміотерапії. *Онкологія* 2011; 3: 229–33.
5. Шляховенко ВО. Ферменти і рак. *Онкологія*. Вибрані лекції. Київ: Здоров'я України, 2010: 321–34.
6. Wang JC. Untangling the double helix. DNA entanglement and the action of the DNA topoisomerases. *Cold Spring Harbor* 2009: 245.
7. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2009; 1: 261–6.

8. **Поповская ТН.** Перспективные подходы к лекарственной терапии онкологических больных с участием молекулярно-генетических характеристик опухоли (по материалам X Российского онкологического конгресса). *Международ мед журн* 2006; **4**: 126–32.
9. **Tsavaris N, Lazaris A, Kosmas C, et al.** Topoisomerase I and Pcs protein expression in primary colorectal cancer and recurrences following 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; **64**: 391–8.
10. **Свириновский АИ, Григорович СА.** Плейотропная резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям при В-клеточных лимфолифферативных заболеваниях. *Мед новости* 2005; **9**: 5–16.
11. **Liu D, Huang C, Kameyama K, et al.** Topoisomerase II α and p53 in lung carcinoma. *Cancer* 2002; **94**: 2239–47.
12. **Chen Q, Gong B, Almasan A.** Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 227–33.
13. **Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iqbal S, et al.** A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; **21**: 3075–9.
14. **Kawashima A, Takayama H, Tsuyimura A.** A review of ERCC1 gene in bladder cancer: implications for carcinogenesis and resistance to chemoradiotherapy. *Adv Urol* 2012: 812398.
15. **Проценко СА.** Будущее лекарственной терапии злокачественных новообразований. XII Российский онкологический конгресс. Москва, 2008: 98–102.
16. **Имянитов ЕН, Пожарский КМ, Хансон КП.** Молекулярная медицина в онкологии. Лекции по фундаментальной онкологии. Под ред.: *ВМ Моисеенко, АФ Урманчеевой, КП Хансона.* Санкт-Петербург: ООО «Издательство Н-Л», 2004: 17–27.
17. **Viguier J, Boige V, Miquel C, et al.** ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; **11** (17): 6212–7.
18. **Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, et al.** Orotate phosphoribosyltransferase gene polymorphism predicts toxicity in patients treated with bolus 5-fluorouracil regimen. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 3928–34.
19. **Hartwig A, Blessing H, Schwerdtle T, Walter I.** Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. *Toxicology* 2003; **193**: 161–9.
20. **Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, et al.** Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 965–71.
21. **Orlandi A, Salvatore M, Basso M, et al.** ERCC1, KRAS mutation, and oxaliplatin sensitivity in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2012; **30**: abstr 489.
22. **Polyak K, Weinberg RA.** Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 265–73.
23. **Kalluri R, Weinberg R.** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1420–8.
24. **Hollier BG, Evans K, Mani SA.** The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; **14**: 29–43.
25. **McConkey DJ, Choi W, Marquis L, et al.** Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; **28**: 335–44.
26. **Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, et al.** Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Upd* 2008; **11**: 123–51.
27. **Kudryavets YuI, Bezdenezhnykh NO, Lykhova OO, et al.** The role of interferon as a modifier of epithelial-mesenchymal transition in tumor cells. *Exp Oncol* 2011; **33**: 178–81.
28. **Peinado H, Portillo F, Cano A.** Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004; **48**: 365–75.
29. **Vernon AE, LaBonne C.** Tumor metastasis: A new Twist on epithelial mesenchymal transitions. *Curr Biol* 2004; **14**: R719–21.
30. **Celesti G, Di Caro G, Bianchi P, et al.** Presence of Twist1-positive neoplastic cells in the stroma of chromosome-unstable colorectal tumors. *Gastroenterology* 2013; **145**: 647–57.
31. **Valdes-Mora F, Gomez Del Pulgar T, Bandres E, et al.** TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; **16**: 78–87.
32. **Okada T, Suehiro Y, Ueno K, et al.** TWIST1 hypermethylation is observed frequently in colorectal tumors and its overexpression is associated with unfavorable outcomes in patients with colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; **49**: 452–62.
33. **Yang AD.** Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 4147–53.
34. **Zheng HX, Cai YD, Wang YD, et al.** Fas signaling promotes motility and metastasis through epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *Oncogene* 2013; **32**: 1183–92.
35. **Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, et al.** Epithelial-mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **390**: 1061–5.
36. **Papageorgis P, Cheng K, Ozturk S, et al.** Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. *Cancer Res* 2011; **71**: 998–1008.
37. **Cao H, Xu E, Liu H, et al.** Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* 2015; **211**: 557–69.

THE EXPRESSION OF MARKERS OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION AND DRUG RESISTANCE PROTEINS AS A PROGNOSTIC INDICATOR IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

N.O. Bezdenezhnykh, V.E. Zhylchuk, M.V. Glanko, I.M. Adamenko, Yu.I. Kudryavets

Summary. Objective: To evaluate the correlation between the expression of epithelial-mesenchymal transition markers of tumor cells and proteins that are associated with drug resistance, and to investigate their prognostic significance in the course of tumor disease in patients with colorectal cancer (CRC). **Subjects and methods:** tumor material from 50 patients with CRC stage III–IV (T3N0M0, T4N0M0), including patients with rectal cancer (upper-ampulla and medium-ampulla part) — 39, colon cancer — 11. It was used morphological, immunohistochemical and statistical methods; characterized by the presence of protein: E-cadherin, *Topo II- α* , ERCC1, Twist in histological sections of primary tumors. The course of tumor disease was evaluated by survival rate of patients. **Results:** it was found that reliably informative indicator for prediction of an increase of disease-free period and improve overall survival are the following phenotypic characteristics of tumor cells: E-cadherin⁺/ERCC1⁻, E-cad-

*herin⁺/Topo II- α ⁻, Twist⁻/Topo II- α ⁻. Complete sets of markers E-cadherin⁻/ERCC1⁺ and E-cadherin⁻/Topo II- α ⁺ are associated with worsening prognosis of the disease and with a decrease of disease-free period and survival of patients. According to the results of correlation analysis of the relationship of the expression of specific antigens with survival was found that only the presence of E-cadherin⁺ cells in the tumors indicates a positive prognosis for survival, while the presence of Topo II- α and ERCC1 significantly worsens the prognosis for tumor course during CRC. **Conclusion:** determining in tumor expression of Twist and E-cadherin proteins, which associated with epithelial-mesenchymal transition and drug resistance proteins Topo II- α and ERCC1 are informative and effective sets of*

markers for prognosis of neoplastic process in patients with CRC during chemotherapy.

Key Words: colorectal cancer, epithelial-mesenchymal transition, adhesion proteins, ERCC1, prognostic markers.

Адреса для листування:

Безденежних Н.О.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: beznalia@mail.ru

Одержано: 19.11.2015