

І.С. Шпонька
О.О. Бондаренко
І.О. Молокова

Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, Україна

Надійшла: 14.05.2021

Прийнята: 13.06.2021

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.2.59-67>

УДК 616-007.43:616-089.844

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КОЛОРЕКТАЛЬНОЇ КАРЦИНОМИ: ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ДЕМОНСТРАЦІЯ КЛІНІЧНИХ ВИПАДКІВ ТА ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

Shpon'ka I.S. , Bondarenko O.O.  ✉, Molokova I.O.  Molecular and genetic features of colorectal carcinoma: pathomorphological demonstration of clinical cases and literature review.

Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most widespread malignancies worldwide; its morbidity rate is on the third place amidst the most common cancers. According to present data, such molecular markers as CyD1, HIF1 α , LC3B, p21, p53 as well as the detection of KRAS gene amplification could be used for evaluation of tumor grade, its invasiveness, risk of metastases, sensitivity to anti-EGFR treatment, and further prognosis for patient's survive. **Objective.** The purpose of this study was to make a literature review of the CRC molecular diagnostic approaches and demonstrate 5 cases of colorectal carcinoma in patients of Dnipro-city region in purpose to reveal their molecular-genetic features. **Methods.** Five formalin fixed paraffin embedded specimens of colorectal carcinoma from patients of Dnipro-city region were evaluated pathomorphologically with histological, immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization methods. **Results.** Case study revealed increased level of p53, p21, and LC3B expression, minor elevation of CyD1 and HIF1 α expression in demonstrated samples. Amplification of KRAS gene was not found. **Conclusion.** Our data analysis had revealed multiple studies dedicated to CRC molecular diagnostics with controversial results, what could be explained by both variable methodological approaches and epidemiological peculiarities of CRC in different sites of the globe. Therefore, there is a necessity in empirical identification of the molecular-genetic features of colorectal carcinomas in patients of our region that could improve current state of the art in CRC diagnostic and treatment approaches. Achieved data are the result of the trial and our research of this issue is ongoing.

Key words: colorectal carcinoma, CyD1, HIF1 α , LC3B, p21, p53, KRAS amplification, FISH.

Citation:

Shpon'ka IS, Bondarenko OO, Molokova IO. [Molecular and genetic features of colorectal carcinoma: pathomorphological demonstration of clinical cases and review]. Morphologia. 2021;15(2):59-67. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2021.2.59-67>

 Shpon'ka I.S. 0000-0002-7561-6489

 Bondarenko O.O. 0000-0002-9739-9219

 Molokova I.O. 0000-0001-9702-7434

✉ olex.o.bondarenko@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Колоректальна карцинома (CRC) є третьою найбільш поширеною злоякісною пухлиною та займає четверте місце серед смертності від раку в усьому світі [1]. В Україні частота CRC становить від 11,5 випадків для раку прямої кишки та анального отвору до 13,3 випадків раку ободової кишки на 100 000 населення та продовжує зростати. Рання діагностика CRC має велике практичне значення, адже дозволяє попередити розвиток метастазів, провести своєчасне ефективне лікування та значно покращити подальший прогноз для здоров'я та життя пацієнта. Проблема

полягає у тому, що рак ободової кишки в Україні виявляють на 1 та 2 стадіях лише у 51,9%, рак прямої кишки та анального отвору – у 60,7% випадків [2]. Тож на чому можна було б зосередити увагу майбутніх досліджень для вирішення проблеми ранньої діагностики CRC?

Серед широкого спектру молекулярно-генетичних маркерів біологічних властивостей, які б дозволили прогнозувати її поведінку, відповідь на таргетну терапію, вірогідність метастазування та потенційну агресивність, можна відокремити ті маркери біологічної поведінки, що репрезентуватимуть регуляцію клітинного

циклу (p21, CyD1), проліферативну активність (Ki67), реакцію пухлинних клітин на гіпоксичний стан (HIF), аутофагічні процеси (LC3B), стабільність геному (p53, маркери мікросателітної нестабільності) та шляхи сигнальної трансдукції (наприклад, мутації гену KRAS).

Мета

Продемонструвати імуногістохімічний та генетичний профіль зразків колоректальної карциноми пацієнтів Дніпропетровського регіону з урахуванням таких властивостей, як регуляція клітинного циклу (p21, CyD1), реакція на гіпоксичний стан (HIF1 α), аутофагічні процеси (LC3B), стабільність геному (p53) та шляхи сигнальної трансдукції (макромутації гену KRAS), а також обґрунтувати доцільність використання вищеперелічених маркерів для подальших досліджень CRC на підставі огляду літератури.

Матеріали та методи

Для дослідження було відібрано зразки післяопераційного матеріалу п'яти хворих із діагнозом колоректального раку після проведеної операції Гартмана в Дніпропетровській обласній клінічній лікарні ім. І.І. Мечникова. Були виключені зразки тканин пацієнтів після проведення хіміотерапії та рецидивні пухлини після попереднього лікування. До вибірки потрапили пацієнти віком від 58 до 71 року, з них один (20%) пацієнт із високодиференційованою, два (40%) пацієнти з помірнодиференційованою та ще два (40%) з низькодиференційованою CRC. Статеві-вікова характеристика хворих, зразки яких були відібрані для дослідження, представлена у таблиці 1.

Таблиця 1
Статеві-вікова характеристика хворих, відібраних для дослідження

Пацієнт	Вік, років	Стать	Ступінь диференціювання
1	67	Ч	Низький
2	63	Ч	Високий
3	58	Ч	Низький
4	71	Ж	Помірний
5	66	Ж	Помірний

Гістологічний метод

Парафінові блоки відібраних випадків були взяті з архіву Дніпропетровського обласного патологоанатомічного бюро; з них було виготовлено зрізи товщиною 4 мкм за допомогою ротарційного мікротому. Депарафіновані та регідратовані зрізи забарвлювали гематоксилін-еозин, обробляли імуногістохімічно або з використанням флюоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) та вивчали за допомогою мікроскопу Axio Imager 2 (Zeiss, Німеччина) на збільшеннях $\times 200$, $\times 400$ та $\times 630$.

Імуногістохімічні методи

Підготовлені зрізи товщиною 3-5 мкм, нанесені на адгезивні предметні скельця Superfrost (Thermo, Німеччина), оброблялися 3% розчином перекису водню у 70% метанолі протягом 20 хвилин при кімнатній температурі для блокування активності ендогенної пероксидази. Після промивки зрізів у натрій-фосфатному буфері (PBS) проводили демаскування антигенів шляхом їх нагрівання на водяній бані в цитратному буфері (pH=6.0) протягом 20 хвилин при температурі 98 $^{\circ}$ C. Після охолодження та промивання в PBS, скельця інкубувалися з блокуючою сироваткою протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. У якості первинних використовувалися антитіла до CyD1, p21, p53, LC3B та HIF1 α (розведення 1:800, усі – Abcam, Великобританія).

Проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологій камері при температурі 4 $^{\circ}$ C упродовж ночі. Подальшу обробку проводили з використанням системи візуалізації UltraVision Quanto (Thermo Scientific, США) згідно інструкції користувача. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково фарбували гематоксиліном Джіла протягом 30 секунд.

Флюоресцентна гібридизація *in situ*

Підготовлені зрізи товщиною 4 мкм оброблялися термічно шляхом їх нагрівання на водяній бані в цитратному буфері (pH=6.0) упродовж 15 хвилин при температурі 98 $^{\circ}$ C, промивалися у дистильованій воді та інкубувалися розчином свинячого пепсину в 0,01M HCl при 37 $^{\circ}$ C протягом 15 хвилин. Потім зрізи промивалися в одинарному розчині натрій-цитратного буферу (1x SCC), дегідрувалися у розчинах ізопропанолу з висхідними концентраціями та висушувалися на повітрі. На висушені зрізи у темному приміщенні наносилися 10 мкл ДНК зонду ZytoLight SPEC KRAS/CEN 12 Dual Color Probe (ZytoVision, Німеччина), покривалися покривними скельцями 10 \times 10 мм та герметизувалися гумовим клеєм. Підготовлені таким чином зразки розміщували у гібридизаційній камері CytoBrite (США) та, згідно програми, обробляли термічно 10 хвилин при 75 $^{\circ}$ C з подальшою інкубацією при 37 $^{\circ}$ C протягом 16 годин. Після проведення гібридизації, обережно знімали гумовий клей та промивали зрізи у 0,4x SCC на водяній бані при 75 $^{\circ}$ C, зневоднювали, висушували та дофарбовували флюоресцентним ядерним барвником DAPI (Sigma, Німеччина) у темному приміщенні протягом 15 хвилин.

Результати та їх обговорення

При проведенні патогістологічного дослідження зразків у пацієнта №1 було встановлено низькодиференційовану аденокарциному (відсоток утворення залозистих структур <50%) сигмовидної кишки з інвазією у м'язовий шар та брунькуванням інвазивного фронту пухлини. Імуногістохімічно виявлено підвищення експресії маркеру CyD1 (рис. 1, А) та відсутність

експресії LC3B (рис. 2, A). В гістологічних зразках пацієнта №2 виявлено високодиференційовану аденокарциному сигмовидної кишки (95% пухлинних клітин утворювали залозисті структури) з інвазією у м'язовий шар, а при проведенні імуногістохімічного дослідження – помірну експресію p53 (рис. 1, D).

У пацієнта №3 було виявлено низькодифе-

ренційовану аденокарциному низхідної ободової кишки з інвазією у м'язовий шар та адипозну тканину з брудкуванням інвазивного фронту пухлини, некрозами та виразкуванням пухлинної тканини. У зразках відмічене підвищення експресії HIF1 α (рис. 2, D) та виразна внутрішньоядерна експресія супресорного білка p53 (рис. 1, C).

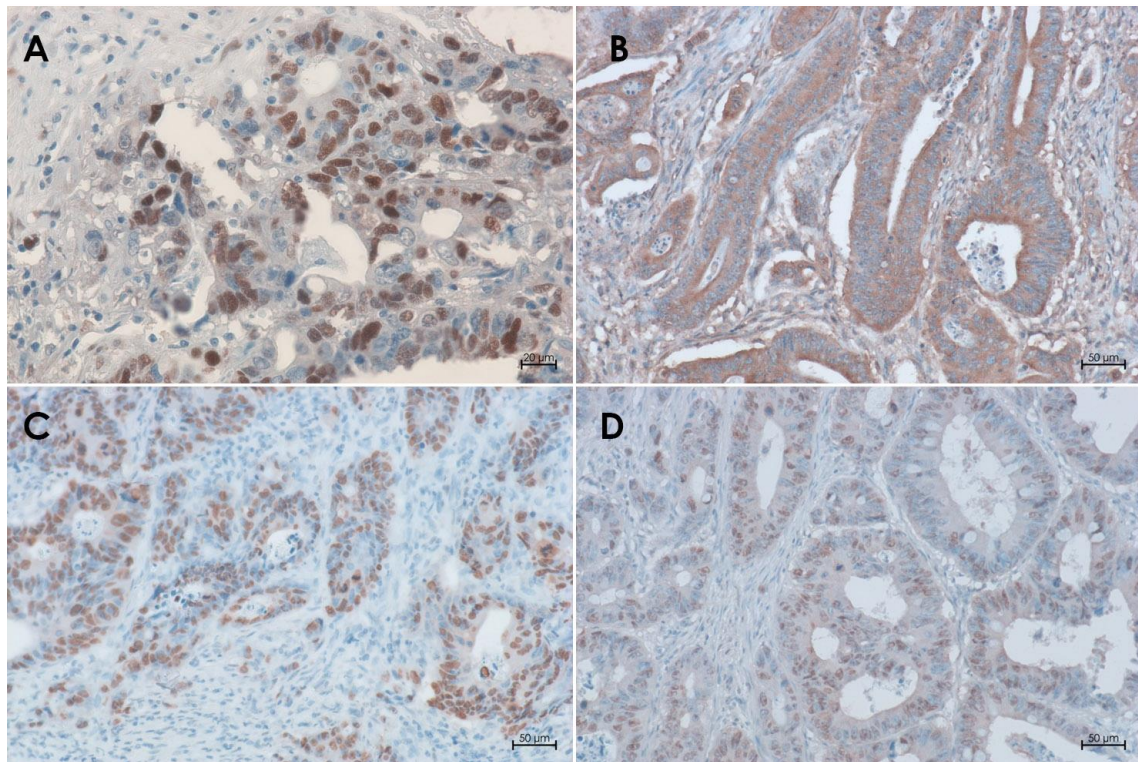


Рис. 1. Експресія маркерів CyD1, p21 та p53 у зразках, що досліджувались. А – CyD1, пацієнт №1, $\times 400$; В – пацієнт №3, експресія p21, $\times 200$; С – p53, пацієнт №3, $\times 200$; D – p53, пацієнт №2, $\times 200$. Імунопероксидазний метод.

Помірнодиференційована аденокарцинома була виявлена у зразках пацієнтів №4 та №5 (утворення залозистих структур приблизно у 70-75% відсотків пухлинної тканини). Локалізація і рівень інвазії у пацієнта №4 були низхідна ободова з переходом на сигмовидну кишку та з інвазією у м'язовий шар, а у пацієнта №5 – ректосигма та м'язовий шар, відповідно. Імуногістохімічно у №4 було виявлено виразну експресію LC3B у залозах нормальної слизової товстого кишківника (рис. 2, B) та у клітинах CRC (рис. 2, C). У свою чергу, лише пацієнт №5 продемонстрував виразну експресію білка p21 (рис. 1, B).

Крім того, після проведення FISH серед досліджуваних зразків не було виявлено макромутацій гену KRAS у вигляді ампліфікації або делеції зазначеного гену. Також не було знайдено ознак анеупloidії відповідної 12 хромосоми у досліджуваних зрізах (рис. 3). Уцілому, співвідношення кількості візуалізованих центромерів 12 хромосоми та генних локусів KRAS

складало 1:1, тобто демонструвало нормальний каріотип за даною хромосомою і відповідним генним локусом.

Аналізуючи вплив кожного з продемонстрованих маркерів на властивості CRC, найбільшу увагу слід приділити проліферативним властивостям пухлини, насамперед тим маркерам, які б могли продемонструвати роботу клітинного циклу в пухлинних клітинах, що вочевидь відбиватиме швидкість пухлинної прогресії. CyD1 є протоонкогеном, який виступає мітогенним сенсором, регулюючи перехід клітини із фази G1 клітинного циклу у фазу S [3]. Як відомо, у звичайних умовах його функцію блокують інгібітори циклін-D1-залежної кінрази (CDK), такі як p21 та p27 [4]. Згідно даних літератури, аномальна експресія CyD1 спостерігається у третині усіх CRC [5]. Крім того, було продемонстровано, що підвищення експресії pRb, p16 та CyD1 спостерігається як у короректальних аденомах, так і у карциномах, що демонструє (что-то демонструє) [6].

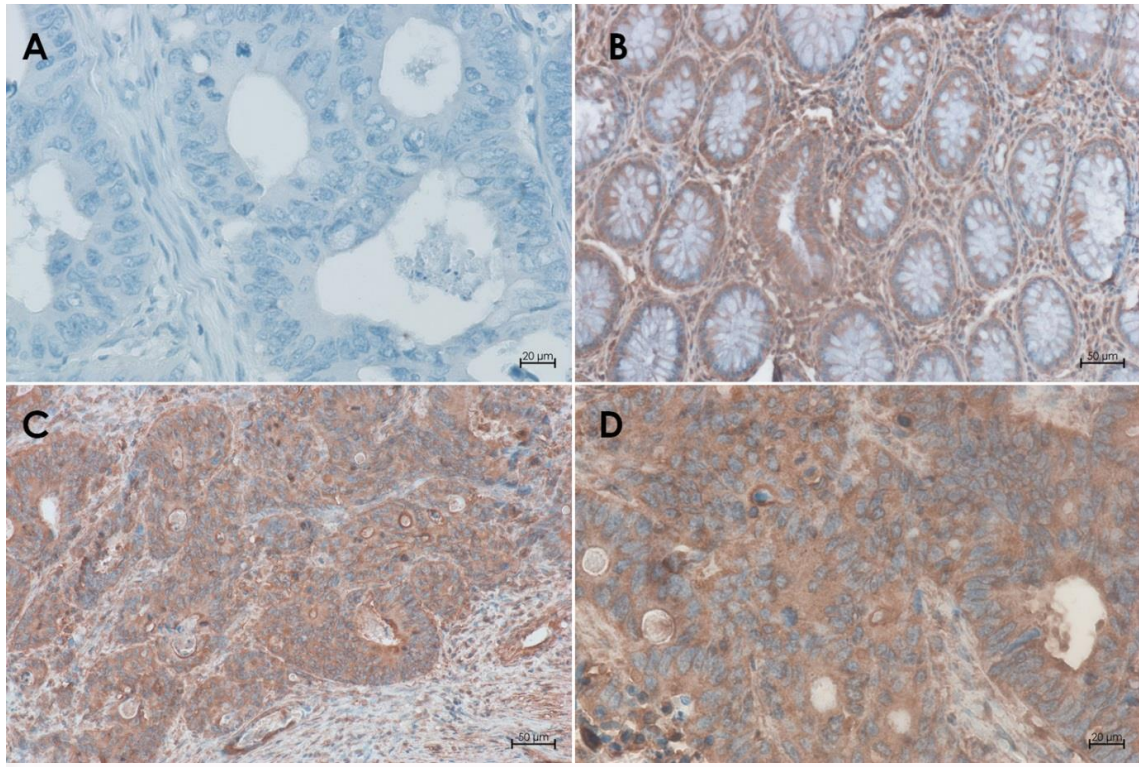


Рис. 2. Експресія маркерів LC3B та HIF1 α у зразках, що досліджувались. А – негативна реакція на LC3B, пацієнт №1, $\times 400$; В, С – пацієнт №4, експресія LC3B у нормальній слизовій, що оточує CRC, та, відповідно, в пухлині, $\times 200$; D – експресія HIF1 α , пацієнт №3, $\times 400$. Імунопероксидазний метод.

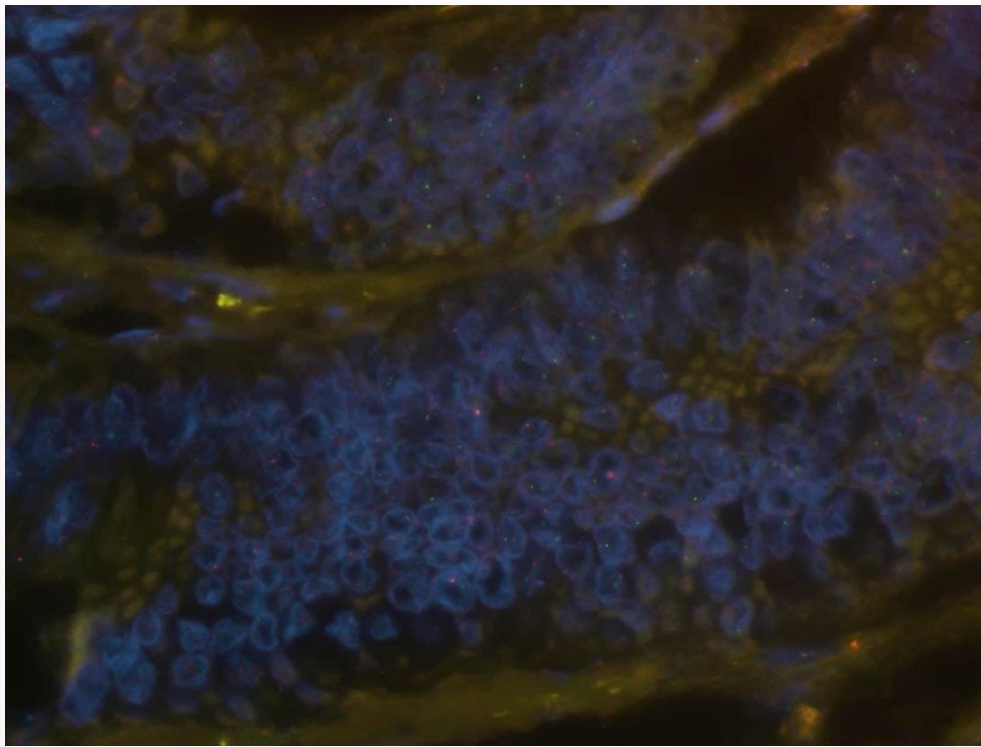


Рис. 3. Детекція гену KRAS у зразку помірно диференційованої CRC, $\times 630$. Помаранчевим марковані центромери 12 хромосоми, синім – DAPI забарвлення ядер клітин, зеленим – локуси гену KRAS.

Іншими дослідженнями було підтверджено, що гіперекспресія *CyD1* є ранньою подією у розвитку CRC, а критично важлива роль гіперекспресії цього онкогену у клітинній проліферації та трансформації в динаміці виявлена для частини колоректальних пухлин на мишиних моделях та зразках CRC людини [7]. Не зважаючи на це, роль гіперекспресії *CyD1* у тканині CRC досі являється предметом дискусій, адже існує велика кількість суперечливих досліджень, згідно яких даний онкомаркер асоційований із гіршим [8] або кращим прогнозом для пацієнта [9], або взагалі не має прогностичного значення [10].

Зміни роботи протеїнів групи HIF (Hypoxia induced factor) є ще однією важливою ознакою солідних пухлин, у тому числі – CRC [11]. У відповідь на гіпоксію пухлинні клітини активують гени, відповідальні за ангиогенез, виживання клітин, метаболізм глюкози та проліферативну активність [12]. Зміни у клітинах, індуковані гіпоксією, опосередковані трьома факторами сімейства білків Per-ARNT-Sim: HIF1 α , HIF2 α та HIF3 α , особливу роль серед яких у рості та прогресії пухлини відіграє HIF2 α [13]. У ряді досліджень було виявлено, що HIF2 α може індукувати проліферацію клітин шляхом підвищення активності гену *c-Myc* [14] та за рахунок потенціювання активності Yes-associated protein 1 (YAP1) – ефектору сигнального шляху Hippo, який функціонує у якості регулятора росту, проліферації та диференціювання клітин [15]. Однак, згідно останніх даних, у 67,5% випадків CRC спостерігається підвищена експресія HIF1 α та фактору ARK5, асоційованого із інвазивністю пухлини, стадією, ступенем диференціювання клітин пухлини та метастазуванням у лімфатичні вузли та печінку [16], що робить його гідним кандидатом для подальших досліджень.

Ki-67 – негістоновий ядерний протеїн, асоційований з клітинною проліферацією [17]. Згідно наявних досліджень, у пацієнтів з CRC Ki-67 зазвичай асоційований із високим гістологічним грейдом пухлини, ураженням лімфатичних вузлів та коротшим безрецидивним інтервалом [18]. У ряді досліджень Ki-67 пропонується на роль кандидата достовірного маркера метастазування CRC через наявність чіткої кореляції між індексом Ki-67 та кількістю циркулюючих пухлинних клітин у крові [19]. В свою чергу, виявлення зростання експресії SMAD та підвищення Ki-67 у CRC корелює із метастазуванням у печінку [20]. Тим не менш, існують дослідження, згідно яких Ki-67 є маркером гіршого прогнозу [21], а також такі, за результатами яких гіперекспресія Ki-67 є маркером, напроти, сприятливого прогнозу [22].

Крім того, експресія Ki-67 у CRC, аденомах та інтактній слизовій кишківника значно відрізняються (79,3%, 44,8%, 25% відповідно),

що робить цей маркер привабливим кандидатом для прогностичних висновків та скринінгових досліджень [23].

LC3B, легкий ланцюг 3B протеїну, асоційованого з мікротрубочками, є одним із головних маркерів аутофагії та виявляється внутрішньо-клітинно як у здорових, так і в пухлинних клітинах. Процес аутофагії є досить поширеним та асоційований із пухлинними і непухлинними захворюваннями, а його порушення грають важливу роль у появі мікросателітної нестабільності та прогресії пухлини [24]. Цікаво, що у ряді досліджень було продемонстровано, що саме негативна експресія LC3B та інших протеїнів, асоційованих із аутофагією, слугує поганим прогностичним фактором, який відображає фундаментальне порушення процесу апоптозу у пухлині та свідчить про її більшу клінічну агресію, та, відповідно, гірший прогноз [25].

Білок p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor-1A, CDKN1A) є важливим учасником регуляції клітинного циклу, а його експресія втрачена у більшості CRC [26]. В нормі його функція полягає у попередженні переходу до S фази мітозу шляхом інгібування активності CDK2, який є необхідним для фосфорилування білка Rb та подальшої E2F-залежною експресії генів, при цьому p21 виступає у якості антагоніста *CyD1* [27]. Крім того, p21 є основною мішенню p53, підвищення експресії якого розвивається як результат ушкодження ДНК та через p21 в нормі призводить до припинення клітинного циклу [28]. Окрім згаданого вище, у контексті p21 особливий інтерес привертає дволанцюгова активна РНК (p21-saRNA-322), здатна, не задіюючи p53, активувати експресією p21 для індукції завершення клітинного циклу, що може незабаром стати однією із терапевтичних альтернатив лікування CRC [29]. Згідно даних досліджень, висока експресія p21 корелює із меншим розміром пухлини, низьким ступенем злоякісності, відсутністю метастазів у регіонарні лімфатичні вузли та відсутністю або ранньою стадією дистантних метастазів [30], що робить p21 потенційним предиктором кращого прогнозу при CRC. При цьому у іншому дослідженні ні прямого, ні зворотного зв'язку p21 із стадією, ступенем диференціювання, залученням у пухлинний процес лімфатичних вузлів та прогнозом для хворого не виявлено [31].

Білок p53 є продуктом гену-супресору TP53, в нормі він зупиняє клітинний цикл у відповідь на пошкодження ДНК клітини. Мутації цього гену є одними з найбільш поширених, їх можна виявити в середньому у 50% злоякісних пухлин [32]. Відповідно до даних літератури, мутації гену p53 не є клінічними предикторами та прогностичними факторами для CRC [33]. В той же час існують дані, що підтверджують наявність чіткої кореляції підвищення експресії p53 та сту-

пенем диференціювання пухлини, глибиною інвазії та лімфогенним метастазуванням [34]. Встановлено, що хворі на CRC проксимальних відділів ободової кишки із підвищеним рівнем p53 демонструють кращий результат від лікування при використанні хірургічного лікування та хіміотерапії [35].

Досить частими мутаціями у клітинах CRC є мутації гену KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene), який є однією з сигнальних молекул внутрішньоклітинного сигнального шляху EGFR. Саме він є мішенню таргетної терапії CRC цетуксимабом, панітумумабом та іншими моноклональними анти-EGFR антитілами, яка, у випадку вищезгаданих мутацій, виявляється не ефективною [36]. Не тільки мутації, але й ампліфікації гену KRAS призводять до втрати ефективності таргетної терапії, хоча зустрічаються вони значно рідше – лише у 0,67% усіх CRC проти 35% для мутацій гену KRAS. Вірогідно, дані зміни геному є взаємовиключними та еквівалентними [37]. Згідно з даними літератури, мутації гену KRAS слугують предикторами гіршого прогнозу у пацієнтів з CRC 1 та 2 стадії [38]. Мутації гену BRAF, які виявляються переважно у низькодиференційованих CRC, також є взаємовиключними до мутації KRAS, і слугують маркером нечутливості до терапії антиепідермальними факторами росту [39, 40]. Також відомо, що не всі види мутацій KRAS є маркерами поганого прогнозу у пацієнтів з CRC [41] і, незважаючи на велику кількість досліджень, достовірних предикторів рецидивування CRC досі не виявлено [42].

Як видно, літературні дані щодо молекуляр-

но-генетичних особливостей CRC часто є не тільки суперечливими, але й діаметрально-протилежними, саме тому для екстраполяції даних світових досліджень існує необхідність у емпіричному дослідженні регіонарних особливостей хворих на CRC.

Підсумок

Виявлення молекулярно-генетичних особливостей CRC дає змогу прогнозувати біологічну поведінку пухлини, обирати найбільш адекватне лікування, попереджати набуття пухлиною резистентності та збільшити вірогідність успіху лікування. Величезний об'єм результатів попередніх досліджень виявляється суперечливим, і за цим, безперечно, криються географічні та популяційні особливості CRC, які пов'язані як з екологічними чинниками, характерними для даного регіону, так і з унікальним популяційно-генетичним ландшафтом конкретного регіону, що досліджується. Саме цим продиктована необхідність уточнення та додаткового вивчення молекулярно-генетичного профілю CRC з урахуванням географічних та/або популяційних особливостей.

Перспективи подальших досліджень

Планується продовження дослідження експресії білків LC3B, HIF1 α , p53, p21, CyD1, а також вивчення мутацій генів KRAS та CDKN2A на більшій вибірці пацієнтів Дніпропетровського регіону.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела

References

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr; 66(4): 683-691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26818619.
2. Melnitchouk N, Shabat G, Lu P, Lyu H, Scully R, Leung K, Jarman M, Lukashenko A, Kolesnik OO, Goldberg J, Davids JS, Bleday R. Colorectal Cancer in Ukraine: Regional Disparities and National Trends in Incidence, Management, and Mortality. *J Glob Oncol*. 2018 Oct; 4:1-8. doi: 10.1200/JGO.18.00145. PMID: 30354936; PMCID: PMC6657623.
3. Nevins JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*. 1992 Oct 16; 258(5081):424-9. doi: 10.1126/science.1411535. PMID: 1411535.
4. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 2008 Feb; 14(2):159-69. doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.013. PMID: 18267085.
5. Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR. Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol*. 2005 May; 58(5):509-14. doi: 10.1136/jcp.2004.020347. PMID: 15858123; PMCID: PMC1770669.
6. Ayhan S, Isisag A, Saruc M, Nese N, Demir MA, Kucukmetin NT. The role of pRB, p16 and cyclin D1 in colonic carcinogenesis. *Hepatogastroenterology*. 2010 Mar-Apr; 57(98):251-6. PMID: 20583423.
7. Hult J, Wang C, Li Z, Albanese C, Rao M, Di Vizio D, Shah S, Byers SW, Mahmood R, Augenlicht LH, Russell R, Pestell RG. Cyclin D1 genetic heterozygosity regulates colonic epithelial cell differentiation and tumor number in ApcMin mice.

- Mol Cell Biol. 2004 Sep; 24(17):7598-611. doi: 10.1128/MCB.24.17.7598-7611.2004. Erratum in: Mol Cell Biol. 2005 Jan;25(1):523. PMID: 15314168; PMCID: PMC507010. Hulit J, et al.
8. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol.* 2004 Sep 23; 4:22. doi: 10.1186/1471-230X-4-22. PMID: 15385053; PMCID: PMC524166.
9. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K, Baba Y, Toyoda S, Chen L, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS. A cohort study of cyclin D1 expression and prognosis in 602 colon cancer cases. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 1; 15(13):4431-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3330. Epub 2009 Jun 23. PMID: 19549773; PMCID: PMC2921858.
10. Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 15; 12(4):1184-91. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1864. PMID: 16489072.
11. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21; 93(4):266-76. doi: 10.1093/jnci/93.4.266. PMID: 11181773.
12. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Dec; 8(12):967-75. doi: 10.1038/nrc2540. Epub 2008 Nov 6. PMID: 18987634; PMCID: PMC3140692.
13. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec;12(12):5447-54. doi: 10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992. PMID: 1448077; PMCID: PMC360482.
14. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007 Apr; 11(4):335-47. doi: 10.1016/j.ccr.2007.02.006. PMID: 17418410; PMCID: PMC3145406.
15. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007 Nov 1; 21(21):2747-61. doi: 10.1101/gad.1602907. PMID: 17974916; PMCID: PMC2045129.
16. Peng JK, Shen SQ, Wang J, Jiang HW, Wang YQ. Hypoxia-inducible factor 1- α promotes colon cell proliferation and migration by upregulating AMPK-related protein kinase 5 under hypoxic conditions. *Oncol Lett.* 2018 Mar; 15(3):3639-3645. doi: 10.3892/ol.2018.7748. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29467884; PMCID: PMC5796283.
17. Nicolini A, Carpi A, Tarro G. Biomolecular markers of breast cancer. *Front Biosci.* 2006 May 1; 11:1818-43. doi: 10.2741/1926. PMID: 16368559.
18. Han JS, Cao D, Molberg KH, Sarode VR, Rao R, Sutton LM, Peng Y. Hormone receptor status rather than HER2 status is significantly associated with increased Ki-67 and p53 expression in triple-negative breast carcinomas, and high expression of Ki-67 but not p53 is significantly associated with axillary nodal metastasis in triple-negative and high-grade non-triple-negative breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2011 Feb; 135(2):230-7. doi: 10.1309/AJCP9DV3EVZUATFV. PMID: 21228363.
19. Yang Y, Li J, Jin L, Wang D, Zhang J, Wang J, Zhao X, Wu G, Yao H, Zhang Z. Independent Correlation Between Ki67 Index and Circulating Tumor Cells in the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2017 Aug;37(8):4693-4700. doi: 10.21873/anticancer.11874. PMID: 28739773.
20. Lopez G, Boggio F, Ferrero S, Fusco N, Del Gobbo A. Molecular and Immunohistochemical Markers with Prognostic and Predictive Significance in Liver Metastases from Colorectal Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 3; 19(10):3014. doi: 10.3390/ijms19103014. PMID: 30282914; PMCID: PMC6213422.
21. Dawson H, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Economou M, Hammer C, Muller DE, Lugli A, Zlobec I. The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology.* 2014 Mar; 64(4):577-84. doi: 10.1111/his.12294. Epub 2013 Dec 28. PMID: 24111856.
22. Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol.* 2011 Jun;64(6):498-503. doi: 10.1136/jcp.2010.087213. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21415057.
23. Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Jahantigh M, Charkhat Gorgich E A. Immunohistochemical Expression of Ki67 and HER2 in Colorectal Cancer Compared to Adenomatous and Normal Samples. *Int J Cancer Manag.* 2017 ; 10(11):e12252. doi: 10.5812/ijcm.12252.
24. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S, Li T. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Apr 1; 8(4):3882-91. PMID: 26097572; PMCID: PMC4466959.
25. Choi JH, Cho YS, Ko YH, Hong SU, Park JH, Lee MA. Absence of autophagy-related proteins expression is associated with poor prognosis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterology Research and Practice.* 2014; 2014:179586. DOI: 10.1155/2014/179586.
26. Ogino S, Nosho K, Shima K, Baba Y, Irahara N, Kirkner GJ, Hazra A, De Vivo I, Giovan-

- nucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS. p21 expression in colon cancer and modifying effects of patient age and body mass index on prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Sep; 18(9):2513-21. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0451. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19723919; PMCID: PMC2758547.
27. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21-negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996 Nov; 213(2):138-49. doi: 10.3181/00379727-213-44046. PMID: 8931660.
28. Garner E, Raj K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle.* 2008 Feb 1; 7(3):277-82. doi: 10.4161/cc.7.3.5328. Epub 2007 Nov 18. PMID: 18235223.
29. Wang LL, Guo HH, Zhan Y, Feng CL, Huang S, Han YX, Zheng WS, Jiang JD. Specific up-regulation of p21 by a small active RNA sequence suppresses human colorectal cancer growth. *Oncotarget.* 2017 Apr 11; 8(15):25055-25065. doi: 10.18632/oncotarget.15918. PMID: 28445988; PMCID: PMC5421909.
30. Salem A, Elfeky M, Nawar N, Alattar A, Elekiabi O, Elaidy M. Prognostic Value of Combined Cox-2, Cyclin D1 and P21 Expression in Colorectal Cancer (CRC) Patients: An Immunohistochemical Study. *Open Journal of Pathology.* 2018, 8(3), 106-121.
31. Al-Maghrabi J, Al-Ahwal M, Buhmeida A, Syrjänen K, Sibyani A, Emam E, Ghanim A, Al-Qahtani M. Expression of cell cycle regulators p21 and p27 as predictors of disease outcome in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2012 Jun; 43(2):279-87. doi: 10.1007/s12029-011-9292-y. PMID: 21637966.
32. Soussi T. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res.* 2000 Apr 1; 60(7):1777-88. PMID: 10766157.
33. McGregor MJ, Fadhil W, Wharton R, Yanagisawa Y, Presz M, Pritchard A, Womack C, Dutton S, Kerr RS, Kerr DJ, Johnstone EC, Ilyas M. Aberrant P53 expression lacks prognostic or predictive significance in colorectal cancer: results from the VICTOR trial. *Anticancer Res.* 2015 Mar;35(3):1641-5. PMID: 25750322.
34. El-Guindy, Dina M, Mwafy, Shorouk E. Prognostic value of CD74 and p53 expression in colorectal cancer. *Egypt J of Path.* 2017 Dec; 37(2): 374-380. doi: 10.1097/01.XEJ.0000527755.42637.94
35. Nikolouzakis TK, Vassilopoulou L, Fragkiadaki P, Mariolis Sapsakos T, Papadakis GZ, Spandidos DA, Tsatsakis AM and Tsiaoussis J. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncol Rep* 39: 2455-2472, 2018.
36. Kullivan KM, Kozuch PS. Impact of KRAS Mutations on Management of Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int.* 2011; 2011:219309
37. Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C, Dimartino V, Hobor S, Jacobs B, Ercolani C, Lamba S, Scala E, Veronese S, Laurent-Puig P, Siena S, Tejpar S, Mottolese M, Punt CJ, Gambacorta M, Bardelli A, Di Nicolantonio F. KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int J Cancer.* 2013 Sep 1; 133(5):1259-65. doi: 10.1002/ijc.28106. Epub 2013 Mar 16. PMID: 23404247.
38. Dinu D, Dobre M, Panaitescu E, Bîrlă R, Iosif C, Hoara P, Caragui A, Boeriu M, Constantinoiu S, Ardeleanu C. Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study. *J Med Life.* 2014 Oct-Dec; 7(4):581-7. PMID: 25713627; PMCID: PMC4316144.
39. Peluso G, Incollingo P, Calogero A, Tammaro V, Rupealta N, Chiacchio G, Sandoval Sotelo ML, Minieri G, Pisani A, Riccio E, Sabbatini M, Bracale UM, Dodaro CA, Carlomagno N. Current Tissue Molecular Markers in Colorectal Cancer: A Literature Review. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:2605628. doi: 10.1155/2017/2605628. Epub 2017 Oct 29. PMID: 29214162; PMCID: PMC5682052.
40. Ducreux M, Chamseddine A, Laurent-Puig P, Smolenschi C, Hollebecque A, Dartigues P, Sammallin E, Boige V, Malka D, Gelli M. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2019 Jun 18; 11:1758835919856494. doi: 10.1177/1758835919856494. PMID: 31244912; PMCID: PMC6582307.
41. Li W, Liu Y, Cai S, Yang C, Lin Z, Zhou L, Liu L, Cheng X, Zeng W. Not all mutations of KRAS predict poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019 Mar 1; 12(3):957-967. PMID: 31933906; PMCID: PMC6945179.
42. Peluso G, Incollingo P, Calogero A, Tammaro V, Rupealta N, Chiacchio G, Sandoval Sotelo ML, Minieri G, Pisani A, Riccio E, Sabbatini M, Bracale UM, Dodaro CA, Carlomagno N. Current Tissue Molecular Markers in Colorectal Cancer: A Literature Review. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:2605628. doi: 10.1155/2017/2605628. Epub 2017 Oct 29. PMID: 29214162; PMCID: PMC5682052.

Шпонька І.С., Бондаренко О.О., Молокова І.О. Молекулярно-генетичні особливості колоректальної карциноми: патоморфологічна демонстрація клінічних випадків та літературний огляд.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Колоректальний рак є одним з найбільш частих злоякісних новоутворень та займає 3 місце за смертністю у всьому світі. За літературними даними для достовірної оцінки

ступеню злоякісності, інвазивності пухлини, вірогідності розвитку метастазів, чутливості до терапії антиепідермальними факторами росту та подальшого прогнозу для пацієнта можуть бути використані такі маркери, як CyD1, HIF1 α , LC3B, p 21, p53 та ампліфікації гену KRAS. **Мета.** Нашою метою було проведення літературного огляду проблематики та розглянення 5 клінічних випадків колоректальних карцином у жителів м. Дніпро для виявлення їх молекулярно-генетичних особливостей. **Методи.** Проведено патоморфологічний аналіз п'яти зразків колоректальної карциноми від пацієнтів що мешкають у м. Дніпрі із застосуванням гістологічних, імуногістохімічних методів, а також методу флуоресцентної гібридизації *in situ*. **Результати.** При дослідженні нами випадків колоректального раку було виявлено підвищення експресії p53, p21, LC3B, незначне підвищення експресії CyD1, HIF1 α та не було виявлено ампліфікацій гену KRAS. **Підсумок.** При проведенні аналізу публікацій, що присвячені молекулярній діагностиці CRC, нами було виявлено велику кількість досліджень, результати яких суперечать один одному, що може бути пояснено як методологією проведення досліджень, так і територіально-популяційними особливостями вибірок, включених до них. Саме тому для ефективної екстраполяції результатів світових досліджень та рекомендацій щодо лікування, існує необхідність у емпіричному виявленні вищезгаданих молекулярно-генетичних особливостей колоректального раку у хворих нашого регіону. Отримані нами емпіричні дані є пілотними, і наразі активне дослідження нами даної проблематики продовжується.

Ключові слова: колоректальна карцинома, CyD1, HIF1 α , LC3B, p21, p53, KRAS ампліфікація, FISH.

Шпонька И.С., Бондаренко А.А., Молокова И.А. Молекулярно-генетические особенности колоректальной карциномы: патоморфологическая демонстрация клинических случаев и литературный обзор.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Колоректальный рак является одним из наиболее частых злокачественных новообразований и занимает 3 место по смертности во всем мире. В соответствии с литературными данными для достоверной оценки степени злокачественности, инвазивности опухоли, вероятности развития метастазов, чувствительности к терапии антиепидермальными факторами роста и дальнейшего прогноза для пациента могут быть использованы такие маркеры, как CyD1, HIF1 α , LC3B, p21 p53 и выявление амплификации гена KRAS. **Цель.** Нашей целью было проведение литературного обзора проблематики и рассмотрение 5 клинических случаев колоректального рака у жителей г. Днепр для выявления их молекулярно-генетических особенностей. **Методы.** Пять образцов колоректального карциномы от пациентов проживающих в г. Днепр было исследовано патоморфологически с применением гистологических, иммуногистохимических методов, а также метода флуоресцентной гибридации *in situ*. **Результаты.** При исследовании нами случаев колоректального рака было выявлено повышение экспрессии p53, p21, LC3B, незначительное повышение экспрессии CyD1, HIF1 α и не было обнаружено амплификаций гена KRAS. **Заключение.** При проведении литературного анализа было найдено большое количество исследований, результаты которых противоречат друг другу, что может быть объяснено как методологией их проведения, так и территориально-популяционными особенностями выборок, включенных в них. Именно поэтому для эффективной экстраполяции результатов мировых исследований и рекомендаций по лечению, существует необходимость в эмпирическом выявлении вышеуказанных молекулярно-генетических особенностей колоректального рака у больных нашего региона. Полученные нами эмпирические данные являются пилотными, и сейчас активное исследование нами данной проблематики продолжается.

Ключевые слова: колоректальная карцинома, CyD1, HIF1 α , LC3B, p21, p53, мутация гена KRAS, амплификация гена KRAS, FISH.