

І.С. Шпонька¹,
І.К. Хархаліс²,
О.В. Пославська^{1*}

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ОНКОПРОТЕЇНУ p53, EGFR У КОЛОРЕКТАЛЬНИХ КАРЦИНОМАХ З РІЗНОЮ ПРОЛІФЕРАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ

Дніпровський державний медичний університет¹
вул. Володимира Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна
Ужгородський національний університет²
пл. Народна, 3, Ужгород, 88000, Україна
Dnipro State Medical University¹
Volodymyra Vernadskoho str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine
Uzhhorod National University²
Narodna sq., 3, Uzhhorod, 88000, Ukraine
*e-mail: alexandra.poslavskaya@gmail.com

Цитування: *Медичні перспективи*. 2023. Т. 28, № 1. С. 4-12

Cited: *Medicni perspektivi*. 2023;28(1):4-12

Ключові слова: колоректальна карцинома, цифрова морфометрія, p53, EGFR, Ki-67
Key words: colorectal carcinoma, digital morphometry, p53, EGFR, Ki-67

Реферат. Дослідження експресії онкопротеїну p53, EGFR у колоректальних карциномах з різною проліферативною активністю. Шпонька І.С., Хархаліс І.К., Пославська О.В. Колоректальний рак, за оцінками International Agency for Research on Cancer, був і залишається актуальною проблемою у всьому світі. У 2020 році в Україні морфологічна верифікація нових випадків раку ободової і прямої кишки була проведена на досить високому рівні (83,2% та 89,5% відповідно), але, незважаючи на це, специфічне лікування охопило лише 69,4% і 74,5% відповідних хворих, через що близько третини пацієнтів (30,8% хворих на рак ободової кишки і 25,0% хворих на рак прямої кишки) не прожило й року з моменту його виявлення у 2020 році. Метою дослідження було оцінити прогностичну значущість експресії маркерів p53 та EGFR залежно від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином. У роботі було досліджено клініко-анатомічний матеріал КРК 37 пацієнтів (15 жінок і 22 чоловіків). Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27-82 роки, середній вік становив 61,43±14,90 року. Для імуногістохімічного дослідження використовували антитіла до Ki-67, p53, EGFR та систему візуалізації UltraVision Quanto, (LabVision). Цифрова морфометрія проводилась на платформі Fiji з розрахунком відсотків p53 та Ki-67-позитивних інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio. Розподіл варіантів експресії p53 – дикий тип (0<p53 <10%) або мутантний (надекспресія ≥10% або повністю негативні зразки) не показав достовірну різницю в жодній групі (всі p>0,05), незважаючи на те, що серед чоловіків мутантних експресій p53 виявилось значно більше, ніж серед жінок – 72,72% (16 з 22) проти 53,33% (8 з 15); і всі пацієнти до 50 років мали мутантний тип експресії p53 – 9 з 9 (100%), тоді як кількість таких спостережень після 50 років уже зменшилась приблизно до половини – 15 з 28 (53,57%). Розподіл варіантів експресії EGFR показав достовірну різницю в підгрупах за grade (p<0,05) та в підгрупах з різним проліферативним потенціалом за Ki-67 (p<0,05).

Abstract. Study of the expression of oncoprotein p53, EGFR in colorectal carcinomas with different proliferative activity. Shponka I.S., Kharkhalis I.K., Poslavska O.V. Colorectal cancer, according to the International Agency for Research on Cancer, was and remains an urgent problem worldwide. In 2020, in Ukraine, morphological verification of new cases of colon and rectal cancer was carried out at a high level (83.2% and 89.5%, respectively), but despite this, specific treatment covered only 69.4% and 74.5% of eligible patients, that is why about a third of patients (30.8% of colon cancer patients and 25.0% of rectal cancer patients) did not live even a year from the moment of its detection in 2020. The aim of the study was to evaluate the prognostic significance of the expression of p53 and EGFR markers depending on the clinical, morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas. The clinical and anatomical material of 37 patients (15 women and 22 men) was studied in the work. The age of the patients ranged from 27 to 82 years; the average age was 61.43±14.90 years. Antibodies to Ki-67, p53, EGFR and the UltraVision Quanto visualization system (LabVision) were used for immunohistochemical research. Digital morphometry was performed in the Fiji platform with the calculation of percentages of p53 and Ki-67-positive intranuclear reactions with the ImmunoRatio plugin. The distribution of p53 expression variants - wild type (0<p53 <10%) or "mutant" (overexpression ≥10% or completely negative samples) showed no significant difference in any group (all p>0.05), despite that among men, mutant expression of p53 was significantly higher than among

women – 72.72% (16 out of 22) versus 53.33% (8 out of 15), and all patients under the age of 50 years had a mutant type of p53 expression 9 out of 9 (100%), while the number of such observations after 50 years already decreased to about half – 15 out of 28 (53.57%). The distribution of EGFR expression variants showed a significant difference in subgroups according to grade ($p < 0.05$) and in subgroups with different proliferative potential according to Ki-67 ($p < 0.05$).

Колоректальний рак, за оцінками International Agency for Research on Cancer, був і залишається актуальною проблемою у всьому світі. На 2020 рік колоректальна карцинома (КРК) зустрічалась в 1,88 мільйона нових випадків і 915 880 смертей, що посіло 3 місце для чоловіків за показником захворюваності і 2 місце за показником смертності, а також 3 місце для жінок за обома показниками серед усіх злоякісних пухлин [1]. Рівень захворюваності на рак товстої кишки показав найвищі показники в Європі, Австралії/Новій Зеландії та Північній Америці, при цьому Угорщина та Норвегія посідали перші місця серед чоловіків та жінок відповідно. Показники захворюваності на рак прямої кишки мали подібний регіональний розподіл у Європі, але показники Східної Азії перевищили показники Австралії/Нової Зеландії та Північної Америки, при цьому Португалія та Латвія посідали перші місця серед чоловіків та жінок відповідно. Цікавим є той факт, що рівні захворюваності та смертності на рак товстої і прямої кишки є найнижчими в більшості регіонів Африки та в Південно-Центральній Азії [2, 3, 4].

Національний канцер-реєстр України на 2020 рік за показником захворюваності на рак ободової і прямої кишки для чоловіків визначає 5 й 7 місце, але за показником смертності – 3 й 5 місце. Для жінок за показником захворюваності – 5 й 8 місце та за показником смертності – 3 й 6 місце відповідно, що демонструє трохи кращі позиції порівняно із загальноєвропейськими даними [5]. Також треба зазначити, що морфологічна верифікація нових випадків раку ободової і прямої кишки у 2020 році в Україні була проведена на досить високому рівні (83,2% та 89,5% відповідно), але, незважаючи на це, специфічне лікування охопило лише 69,4% й 74,5% відповідних хворих. Можливо, саме через це близько третини пацієнтів (30,8% хворих на рак ободової кишки й 25,0% хворих на рак прямої кишки) не прожило і року з моменту виявлення КРК у 2020 році [5].

Аналіз розподілу нових випадків на 100 тис. населення за областями України визначив регіони поширення раку ободової кишки в Харківській (31,2), Кіровоградській (26,1) і Запорізькій (24,5) областях; раку прямої кишки – у Сумській (25,4), Полтавській (23,9) і Чернігівській (23,8) областях [5]. Аналіз випадків смертності на 100 тис. населення за областями України показав

подібність у розподілі регіонів порівняно з показником захворюваності: для раку ободової кишки найвищі показники також були в Харківській (19,4), Запорізькій (14,8) і Кіровоградській (14,6) областях; для раку прямої кишки – в Полтавській (15,2) Сумській (13,9) і Херсонській (12,8) областях [5].

Широке дослідження біології колоректального раку виявило безліч молекулярних маркерів, які надають прогностичну інформацію [6-11]. Але якщо стосовно індексу проліферації за Ki-67 немає сумнівів щодо його прогностичного значення [8-9], то останні дослідження ролі ген-супресора p53 і маркера до рецепторів епідермального фактора росту EGFR продемонстрували досить суперечливі дані. Мутантний статус p53 був пов'язаний як з покращеним прогнозом, так і зі зниженим виживанням [10-13]. У кількох звітах EGFR асоціювали зі скороченням тривалості виживання та наявністю метастазів у лімфатичні вузли, але в багатьох дослідженнях не було виявлено зв'язку з несприятливими прогностичними параметрами [14-15]. У контексті нових терапевтичних стратегій із застосуванням терапії, спрямованої на блокування EGFR, хоча він залишається і суперечливим прогностичним фактором, зв'язок надекспресії EGFR зі стадією КРК може відігравати вирішальну роль у прийнятті рішення про початок ад'ювантного лікування [16-17].

Метою дослідження було оцінити прогностичну значущість експресії маркерів p53 та EGFR залежно від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі досліджено клініко-анатомічний матеріал КРК 37 пацієнтів (15 жінок і 22 чоловіків), що був отриманий під час операцій (правобічна геміколектомія, резекція сигмоподібної кишки, операція Гартмана, резекція поперечно-ободової кишки, резекція клубової кишки); усі вони проходили лікування в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 до 2021 р. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27-82 роки, середній вік становив $61,43 \pm 14,90$ року. Дослідження схвалено комісією з біоетики ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (витяг з протоколу засідання № 7/16 від 30 вересня 2020 р.) та

проведено згідно з письмовою згодою учасників і відповідно до принципів біоетики, викладених у Гельсінській декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людей» та «Загальній декларації про біоетику та права людини (ЮНЕСКО)».

За гістологічною будовою всі спостереження були представлені колоректальною карциномою помірного (31 випадок) та низького (6 випадків) ступеня диференціювання. Гістопатологічні підтипи включали: аденокарциному (АК) NOS 19 випадків, зубчасту АК 7 випадків, мікропапілярну АК 3 випадки, медулярну АК 3 випадки, муцинозну АК 2 випадки, перснеподібноклітинну АК 2 випадки та 1 АК типу like-adenoma.

Серед них з локалізацією у висхідній частині ободової кишки 5 випадків, у печінковому куті 9 випадків, у поперечно-ободовій кишці 6 випадків, у селезінковому куті 1 випадок, у ректосигмоїдному сполученні 5 випадків, у сигмоподібній кишці 10 випадків та в прямій кишці 1 випадок. Таким чином, усі спостереження КРК розподілились на правобічні КРК (20 випадків) і лівобічні КРК (17 спостережень). Також увесь матеріал був розподілений на дві групи залежно від наявності метастазів: без метастазів 30 КРК та з метастазами – 7 спостережень (6 – у лімфатичних вузлах черевної порожнини й 1 – у печінці).

Морфологічний метод дослідження. Зразки пухлин КРК, фіксованих у формаліні й залиті парафіном, були взяті з архіву КЗ «Дніпровське обласне патологоанатомічне бюро». Парафінові зрізи 4-5 мкм були отримані на мікромомі Місгом НМ-340 і зафарбовані за стандартною методикою гематоксиліном й еозинном (Г-Е) [18]. За внутрішній контроль приймали нормальну тканину товстої кишки, що зустрічалась у скельцях на межі з пухлинною тканиною. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопа ZEISS "Primo Star" (об'єктиви $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$)

Імуногістохімічний метод дослідження. Парафінові зрізи наносили на адгезивні предметні скельця SuperFrost Plus. Після депарафінізації, регідратації, температурного демаскування антигенів та пригнічення активності ендогенної пероксидази проводили інкубацію зрізів з первинними антитілами у вологих камерах при температурі 23-25⁰С протягом 30 хвилин. Використовувалися первинні моноклональні антитіла до Ki-67 (sp6, 1:250), p53 (sp1, RTU), EGFR (sp1, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision) у вологих камерах близько 30 хвилин при кімнатній температурі. Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду (ДАБ) (Quanto, LabVision)

під контролем мікроскопа протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявленням у вигляді коричневого забарвлення, далі додатково зафарбовували гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини. Подальша дегідратація і включення в бальзам здійснювалися згідно зі стандартними методиками [19].

Для цифрової морфометрії використовувалась камера мікроскопа Zeiss Primo Star – AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору були збережені у форматі .jpg й оброблені на платформі Fiji з розрахунком відсотків p53 та Ki-67-позитивних інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio (рис. 1) [20, 21].

За рекомендаціями Melling N. et al. (2016), для статистичного аналізу результати фарбування маркером Ki-67 були розподілені на три групи (слабка, помірна, висока) за відсотком Ki-67-позитивних пухлинних клітин: низький Ki-67: 0%-10%; помірний Ki-67: від 10% до 25%; високий Ki-67: 25% і більше [7].

Фарбування p53 оцінювалось як надекспресія, якщо пофарбовано було 10% або більше ядер злужкісних клітин; більше 0 але менше ніж 10% забарвлених ядер оцінювались як дикий тип фарбування; окремо відзначались випадки з повністю негативними реакціями, за рекомендаціями Nakayama M. et al. (2019) [10].

Експресія EGFR оцінювалась за напівкількісною шкалою score таким чином: ступінь 0, немає позитивних клітин; 1 ступінь, 1-25% мічених пухлинних клітин; 2 клас, 25-50% мічених пухлинних клітин; 3 ступінь, >50% позитивних пухлинних клітин. Інтенсивність забарвлення EGFR від світло-бежевого до темно-коричневого оцінювали візуально як ознаку пухлинної клітини мембрани, цитоплазми або обох і було оцінено як 0 (негативна), 1 (слабка), 2 (помірна) або 3 (сильна). Score в діапазоні від 0 до 9 було отримано шляхом множення ступеня за % мічених мембран клітин на інтенсивність забарвлення. Score EGFR <6 вважали низьким, а ≥ 6 відповідно високим, за рекомендаціями Nigro C.L. et al. (2016) [14].

Статистичний аналіз даних проводили в програмному середовищі R version 3.4.1 (2017-06-30) – "Single Candle" Copyright (C) 2017; The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit), що поширюється безкоштовно за ліцензією GNU General Public License.

Встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводили за допомогою точного тесту Фішера. Відмінність між підгрупами вважали достовірною при $p < 0,05$ [22].

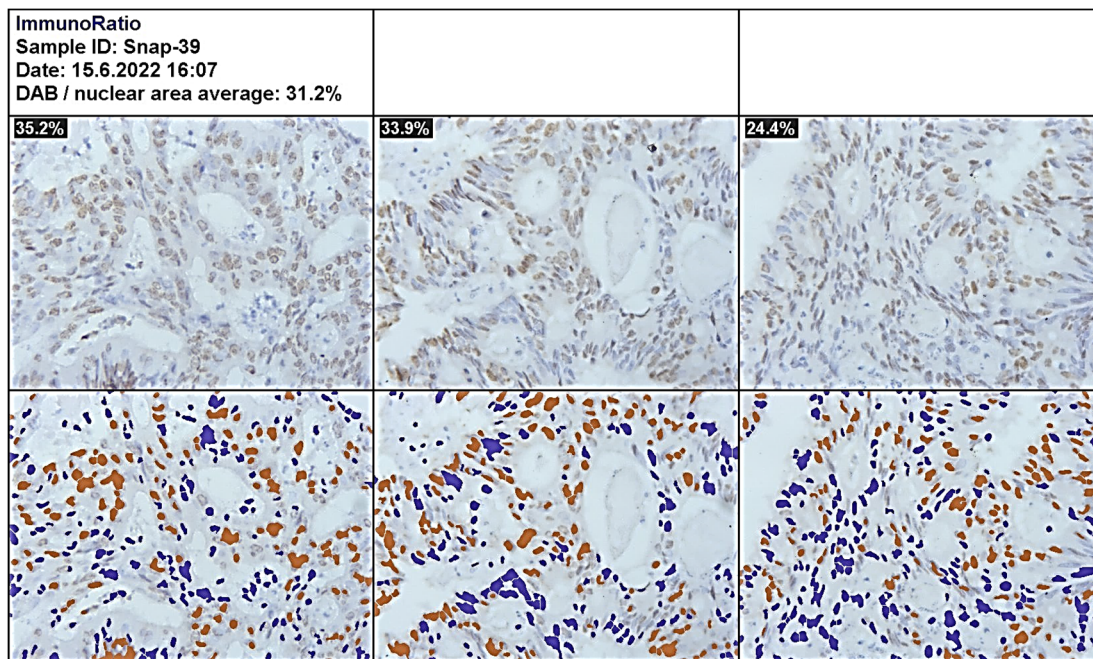


Рис. 1. Автоматичне вимірювання інтрануклеарної експресії p53 в платформі Fiji:
Plugins>ImmunoRatio>nuclear area average

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження особливостей експресії маркера p53 виявило три варіанти експресії: 1 – дикий тип, більше 0 але менше 10%, подібний до нормальної експресії p53 в тканині внутрішнього контролю, $n_{(1)}=13$; 2 – надекспресія p53, більше 10%, $n_{(2)}=12$;

3 – повністю негативна експресія p53, $n_{(3)}=12$ (рис. 2). Значення експресії p53 коливались від 0 до 90,6%. Для статистичної обробки групу 2 та групу 3 об'єднали як мутантну експресію p53 в КРК, що приблизно у два рази перевищило кількість диких типів експресії p53.

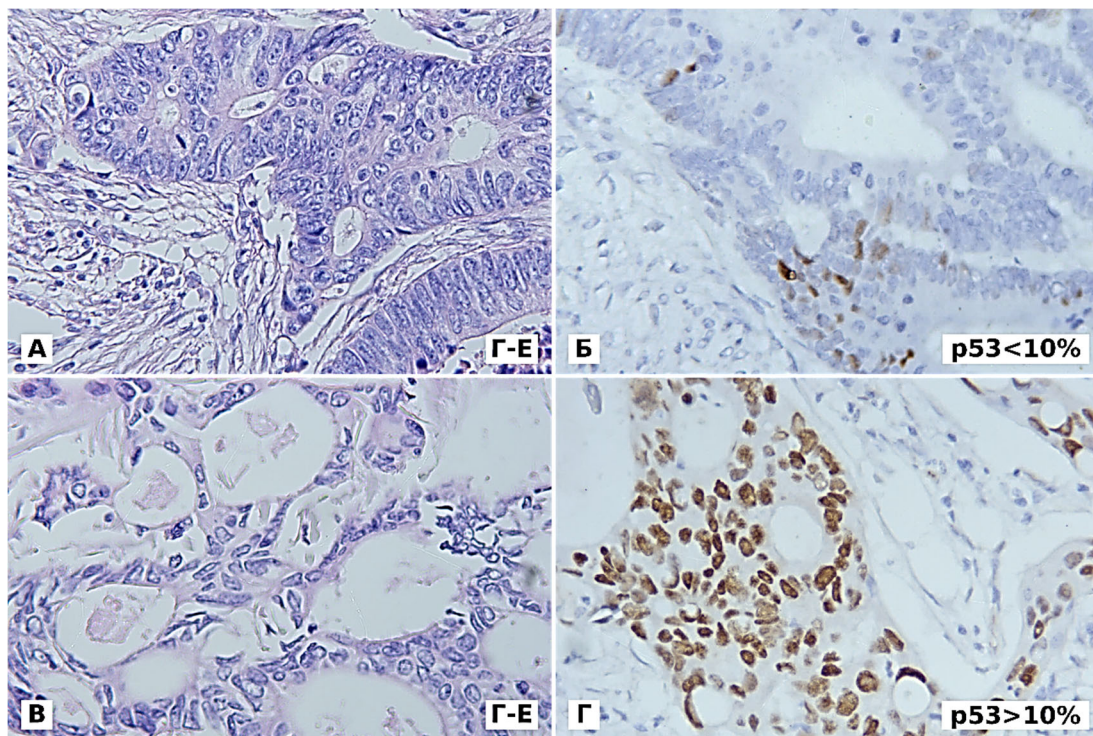


Рис. 2. А-Б. Аденокарцинома NOS ободової кишки. А. Г-Е (зб. $\times 400$). Б. Інтрануклеарна експресія p53 на рівні 3,2% (дикий тип), ІГХ з гематоксиліном Майєра (зб. $\times 400$). В-Г. Аденокарцинома NOS ректосигми. В. Г-Е (зб. $\times 400$). Г. Інтрануклеарна експресія p53 на рівні 90,6%, ІГХ з гематоксиліном Майєра (зб. $\times 400$)

Серед чоловіків мутантних експресій p53 виявилось значно більше, ніж серед жінок – 72,72% (16 з 22) проти 53,33% (8 з 15). Також треба відзначити, що мутантний тип експресії p53 виявився у всіх пацієнтів до 50 років – 9 з 9 (100%), тоді як кількість таких спостережень після 50 років уже зменшилась приблизно до половини – 15 з 28 (53,57%). Кількість правобічних та лівобічних КРК з мутантними формами експресії p53 розподілилась приблизно однаково – 65% (13 з 20) та 64,70% (11 з 17) відповідно. Серед окремих гістологічних типів

КРК більшість мутантних експресій p53 відзначилась у чотирьох варіантах: перснеподібноклітинних карциномах 100% (2 з 2), зубчастих аденокарциномах 85,7% (6 з 7), мікропапілярних 66,67% (2 з 3) та аденокарциномах NOS 63,16% (12 з 19). Підгрупи КРК за grade та наявністю метастазів мали приблизно однаковий розподіл випадків з диким та мутантним типом експресії p53 і різниці за точним тестом Фішера не показали (всі $p > 0,05$). Дані розподілу варіантів експресії p53 за клініко-морфологічними критеріями представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл варіантів експресії p53 за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Варіант експресії p53	
		0<p53<10%	p53≥10% або 0
Чоловіки	22 (59,46)	6	16
Жінки	15 (40,54)	7	8
p		p>0,05	
Вік (роки) <50	9 (24,32)	0	9
50-75	22 (59,46)	11	11
>75	6 (16,22)	2	4
p		p*	
Правобічні	20 (54,05)	7	13
Лівобічні	17 (45,95)	6	11
p		p>0,05	
AK NOS	19 (51,35)	7	12
Зубчаста АК	7 (18,91)	1	6
Мікропапілярна АК	3 (8,10)	1	2
Медулярна АК	3 (8,10)	2	1
Муциозна АК	2 (5,40)	1	1
Перснеподібна АК	2 (5,40)	0	2
AK like-adenoma	1 (2,70)	1	0
p		p*	
G2	31 (83,78)	11	20
G3	6 (16,22)	2	4
p		p>0,05	
Без метастазів	30 (81,08)	11	19
З метастазами	7 (18,92)	2	5
p		p>0,05	
Ki-67 <10%	5 (13,51)	2	3
10-25%	19 (51,35)	7	12
>25%	13 (35,14)	4	9
p		p>0,05	

Примітки: АК NOS – аденокарцинома неспецифікована; M±SD – середнє±стандартне відхилення; p – встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився за точним тестом Фішера; p* – статистичний аналіз даних не проводився через відсутність зразків у деяких підгрупах, відмінність вважали достовірною при $p < 0,05$.

Аналіз проліферативної активності за Ki-67 також розподілив усі КРК на три підгрупи: 1 – з низьким індексом проліферації, менше 10% позитивних інтрануклеарних реакцій, де значення експресії Ki-67 коливалось у межах 3,4% – 6,5% ($4,96 \pm 1,09$), $n_{(1)}=5$; 2 – з помірним індексом проліферації, більше 10%, але менше 25%, де значення експресії Ki-67 коливалось у межах 10,2% – 22,8% ($17,19 \pm 3,97$), $n_{(2)}=19$; 3 – з високим індексом проліферації, більше 25%, де значення експресії Ki-67 коливалось у межах 29%-76%

($48,96 \pm 18,06$), $n_{(3)}=12$. Для статистичної обробки індекс проліферації КРК був оцінений відносно експресії p53 (табл. 1) та окремо відносно експресії EGFR (табл. 2).

Дослідження особливостей експресії маркера EGFR виявило більше половини зовсім негативних реакцій 22 з 37 (59,46%), інші розподілились на випадки КРК з низькою експресією EGFR (score <6) – 6 з 37 (16,21%) та високою експресією EGFR (score >6) – 9 з 37 (24,32%), що виявилось зовсім рідкісним явищем (рис. 3, табл. 2).

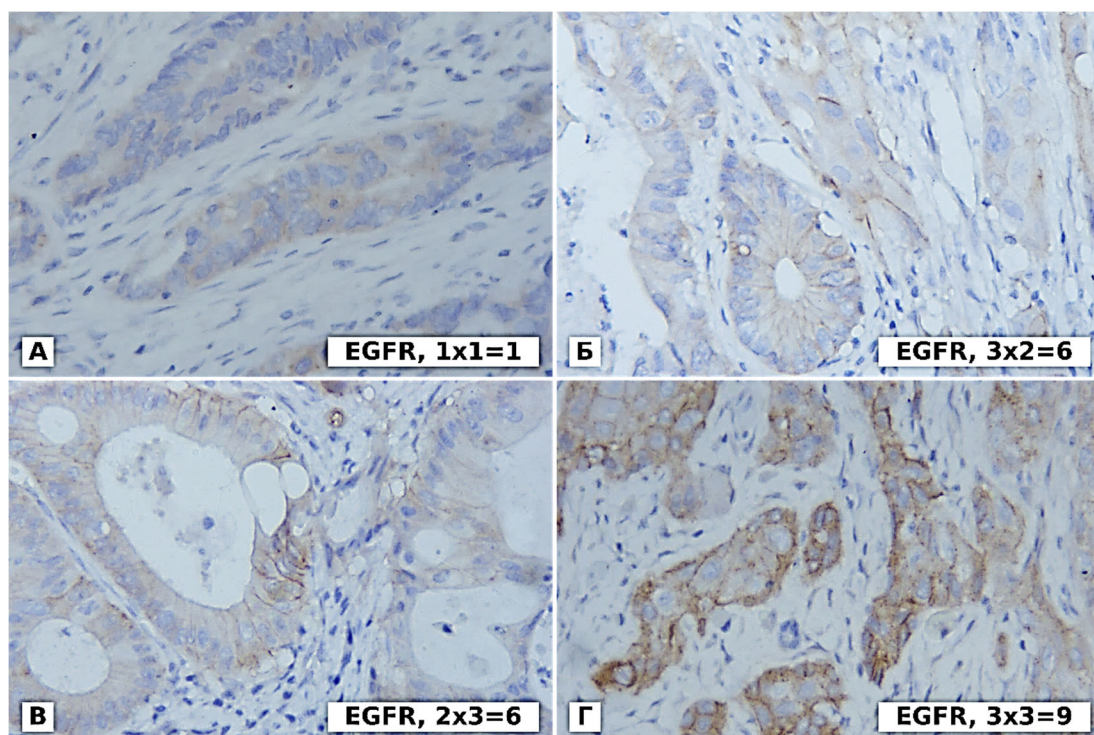


Рис. 3. Варіанти експресії маркера EGFR у колоректальних карциномах, ПХ з гематоксилином Майєра (зб. $\times 400$). А. Score експресії 1: 1-25% мічених мембран пухлинних клітин (1) слабкої інтенсивності (1). Б. Score експресії 6: 25-50% мічених мембран пухлинних клітин (2) високої інтенсивності (3). В. Score експресії 6: >50% мічених мембран пухлинних клітин (3) помірної інтенсивності (2). Г. Score експресії 9: >50% мічених мембран пухлинних клітин (3) високої інтенсивності (3)

З робіт Nakayama M., Oshima M. (2019) та Solé L. et al. (2022) зрозуміло, що мутація TP53 є другою за частотою мутацією при колоректальному раці (першою є мутація APC >80%), крім того, мутації TP53 тісно пов'язані з поганим прогнозом колоректального раку, а саме: в пацієнтів з метастазами КРК частота мутації TP53 зростає до 80% [10, 11]. Результати їх роботи також підтверджують гіпотезу про те, що мутації TP53 відіграють певну роль на пізніх стадіях пухлиногенезу, таких як етап прогресування аденоми до інвазійної аденокарциноми або метастазування у віддалені органи [10, 11]. Але в нашій роботі ми не знайшли достовірної різниці

між підгрупами КРК з метастазами і без (табл. 1; $p > 0,05$). За результатами роботи Li X-L et al. (2015) визначено, що різні типи мутацій p53 відіграють ключову роль у визначенні біологічної поведінки КРК, наприклад, глибини інвазії, місця метастазування та навіть прогнозу для життя пацієнтів; додатково мутації p53 були пов'язані з лімфатичною інвазією при КРК проксимального відділу товстої кишки та демонстрували значну кореляцію як з лімфогенною, так і з гематогенною інвазією в дистальному КРК [12]. Але різниця дистального та проксимального розташування КРК не виявила себе через експресію p53 в нашому дослідженні (табл. 1; $p > 0,05$). Це може

пояснюватись тим, про що свідчить дослідження Lieb M.C. та Hofmann T.G. (2021): при КРК ген TP53 дійсно мутований лише в 43% пухлин, а решта пухлин часто має порушення функціонування p53 через зміни в генах, що кодують білки, які беруть участь у регуляції p53, наприклад, ATM (13%) або ДНК-РКcs (11%) [13].

До того ж мутації TP53 у КРК зазвичай є місенс-мутаціями, які порушують функцію p53 дикого типу (втрата функції) і навіть можуть забезпечувати неоморфні (збільшення функції) дії, такі як сприяння стовбуровій раковій клітині, проліферації клітин, інвазії й метастазування, тим самим сприяючи прогресуванню раку [12, 13].

Таблиця 2

Розподіл варіантів експресії EGFR за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Варіант експресії EGFR	
		score EGFR<6 низький	score EGFR≥6 високий
Чоловіки	22 (59,46)	16	6
Жінки	15 (40,54)	12	3
p			p>0,05
Вік <50	9 (24,32)	8	2
50-75	22 (59,46)	17	5
>75	6 (16,22)	4	2
p			p>0,05
Правобічні	20 (54,05)	17	3
Лівобічні	17 (45,95)	11	6
p			p>0,05
AK NOS	19 (51,35)	16	3
Зубчаста АК	7 (18,91)	6	1
Мікропапілярна АК	3 (8,10)	3	0
Медулярна АК	3 (8,10)	1	2
Муциозна АК	2 (5,40)	1	1
Перстнеподібна АК	2 (5,40)	1	1
AK like-adenoma	1 (2,70)	0	1
p			p*
G2	31 (83,78)	25	6
G3	6 (16,22)	3	3
p			p<0,05
Без метастазів	30 (81,08)	22	8
З метастазами	7 (18,92)	6	1
p			p>0,05
Ki-67 <10 %	5 (13,51)	4	1
10-25 %	19 (51,35)	17	2
>25 %	13 (35,14)	7	6
p			p<0,05
0<p53 <10 %	13 (35,14)	10	3
p53≥10 % або 0	24 (64,86)	18	6
p			p>0,05

Примітки: АК NOS – аденокарцинома неспецифікована; M±SD – середнє±стандартне відхилення; p – встановлення достовірності міжгрупових зв'язків за кількісним розподілом проводився за точним тестом Фішера; p* – статистичний аналіз даних не проводився через відсутність зразків у деяких підгрупах, відмінність вважали достовірною при p<0,05.

Незважаючи на загальні амбітні рішення стосовно анти-EGFR-терапії цетуксимабом і панітумумабом у пацієнтів з КРК, що покращують загальну виживаність, результати досліджень Nigro C.L. et al. (2016) та Martinelli E. et al. (2020) доводять, що рівень відповіді на схеми лікування цетуксимабом у невідібраних групах пацієнтів з КРК зазвичай був нижчим за 30%. Їхні дані підтвердили прогностичну цінність мутацій RAS для резистентності до анти-EGFR-терапії (цетуксимабу та панітумумабу), що призвело до ліцензії на використання цих моноклональних антитіл виключно для лікування пацієнтів з КРК дикого типу RAS [14-15]. У свою чергу, Li Q.-H. et al. (2020) говорять, що статус KRAS/NRAS/BRAF є сильним предиктором ефективності анти-EGFR терапії, де PTEN і TP53 є негативними регуляторами цього шляху як гени-супресори пухлин [17]. Як показала статистика, частота мутацій PTEN у КРК становить ~6%; однак частота мутацій TP53 у КРК досі невідома, як і немає чітких вказівок, які б рекомендували використання генотипу TP53 для скерування вибору схем лікування КРК. У нашій роботі ми хотіли перевірити взаємний зв'язок мутації p53 та надекспресії EGFR, але статистично достовірної різниці не отримали (табл. 2; $p > 0,05$); натомість ми отримали залежність EGFR-експресії від проліферативної активності та grade (табл. 2; $p < 0,05$). Це знаходить підтвердження у висновках роботи Valakarthikeyan J. et al. (2022), а саме, що EGFR-рецептор бере участь у проліферації, виживанні та трансформації пухлинних клітин КРК [16]. TP53 кодує білок p53, який діє не тільки як охоронець геному в нормальних клітинах, але також як інгібітор онкогенів у ракових клітинах. Зміни в PIK3CA можуть призвести до аномальної активації шляху PI3K, тоді як аномалії генів PTEN і TP53 можуть призвести до вивільнення інгібіції клітинного циклу. Остаточним результатом може бути те, що регуляція клітин виходить з-під контролю і відбувається аномальна проліферація клітин. Таким чином, роль зміни експресії p53 в резистентності до анти-EGFR у колоректальних карциномах не можна ігнорувати.

ВИСНОВКИ

1. Розподіл варіантів експресії p53 – дикий тип ($0 < p53 < 10\%$) або мутантний (надекспресія $\geq 10\%$ або повністю негативні зразки) не показав достовірну різницю в жодній групі (всі $p > 0,05$), незважаючи на те, що серед чоловіків мутантних експресій p53 виявилось значно більше, ніж серед жінок – 72,72% (16 з 22) проти 53,33% (8 з 15); і всі пацієнти до 50 років мали мутантний тип експресії p53 – 9 з 9 (100%), тоді як кількість таких спостережень після 50 років уже зменшилась приблизно до половини – 15 з 28 (53,57%).
2. Розподіл варіантів експресії EGFR показав достовірну різницю в підгрупах за grade ($p < 0,05$) та в підгрупах з різним проліферативним потенціалом за Ki-67 ($p < 0,05$).
3. Найбільша кількість мутантних варіантів експресії p53 відмічалась у таких гістологічних типах колоректальних карцином, як персеподібноклітинна карцинома 100% (2 з 2), зубчаста аденокарцинома 85,7% (6 з 7) мікропапілярна карцинома 66,67% (2 з 3) та аденокарцинома NOS 63,16% (12 з 19).
4. Найбільша кількість варіантів експресії EGFR з score > 6 відмічалась у таких гістологічних типах колоректальних карцином, як аденокарцинома like adenoma 100% (1 з 1), персеподібноклітинна карцинома 50% (1 з 2), муциозна аденокарцинома 50% (1 з 2), мікропапілярна карцинома 66,67% (2 з 3) та медулярна карцинома 66,67% (2 з 3).

Внески авторів:

Шпонька І.С. – концептуалізація дослідження, адміністрування проєкту, рецензування та редагування остаточного тексту, консультація в оцінці імуногістохімічних досліджень;

Хархаліс І.К. – відбір даних, аналіз та зіставлення клініко-морфологічних та гістологічних даних, проведення імуногістохімічних досліджень;

Пославська О.В. – проведення цифрової морфометрії, статистична обробка даних, написання робочого варіанту тексту.

Фінансування. Дослідження не має зовнішніх джерел фінансування.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Scientific Reports*. 2020;71(3):209-49. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

2. Heather NM, Ward A, Jenab M, et al. Heterogeneity of Colorectal Cancer Risk Factors by Anatomical Subsite in 10 European Countries: A Multinational Cohort Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(7):1323-31.e6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.07.030>

3. Hofseth LJ, Hebert JR, Chanda A, et al. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020;17:352-64. doi: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0253-4>
4. Graff RE, Möller S, Passarelli MN, et al. Familial Risk and Heritability of Colorectal Cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017;15(8):1256-64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.12.041>
5. Fedorenko ZP, Hulak LO, Mykhailovych YuY, et al. [Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service]. *Bulletin of the National Chancery Register of Ukraine*. [Internet]. 2021 [cited 2022 Nov 20];22. Ukrainian. Available from: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/
6. Zhang Q, Wu J, Bai X, Liang T. Evaluation of Intra-Tumoral Vascularization in Hepatocellular Carcinomas. *Front Med*. 2020;7:584250. doi: <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.584250>
7. Melling N, Kowitz CM, Simon R, et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2016;69:209-14. doi: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202985>
8. Poslavska OV, Shponka IC, Hrytsenko PO. [Characteristics of the colorectal phenotype of carcinomas of unknown primary localization]. *Actual problems of pediatric medicine*. 2018;18(3):111-5. Ukrainian.
9. Luo Z-W, Zhu M-G, Zhang Z-Q, et al. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(123):1-13. doi: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5324-y>
10. Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2019;11(4):267-76. doi: <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>
11. Solé L, Lobo-Jarne T, Álvarez-Villanueva D, et al. p53 wild-type colorectal cancer cells that express a fetal gene signature are associated with metastasis and poor prognosis. *Nat Commun*. 2022;13(2866):1-15. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30382-9>
12. Li X-L, Zhou J, Chen Z-R, Chng W-J. p53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015;21(1):84-93. doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>
13. Lieb MC, Hofmann TG. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2125. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13092125>
14. Nigro CL, Ricci V, Vivenza D, et al. Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. *World J Gastroenterol*. 2016;22(30):6944-54. doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6944>
15. Martinelli E, Ciardiello D, Martini G. Implementing anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy in metastatic colorectal cancer: challenges and future perspectives. *Annals of Oncology*. 2020;31(1):30-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.10.007>
16. Balakarthikeyan J, Mayakrishnan V, Kannappan P, et al. EGFR-Based Targeted Therapy for Colorectal Cancer – Promises and Challenges. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(4):499. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines10040499>
17. Li Q-H, Wang Y-Z, Tu J, et al. Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: mechanisms and potential regimens of drug resistance. *Gastroenterology Report*. 2020;8(3):179-91. doi: <https://doi.org/10.1093/gastro/goaa026>
18. Vareniuk IM, Dzerzhynskiy ME. [Methods of cyto-histological diagnosis: study guide]. Kyiv; 2019. 256 p. Ukrainian.
19. Nguyen T. *Immunohistochemistry: A Technical Guide to Current Practices*. Cambridge: Cambridge University Press; 2022. 272 p.
20. Poslavska OV. [The methodology of using software for the analysis of digital photomicrographs based on the course of pathomorphology in order to improve the professional level of students and scientists]. *Morphologia*. 2015;9(3):122-6. Ukrainian.
21. Poslavska OV. [Determining the linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program]. *Morphologia*. 2016;10(3):377-81. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.3.377-381>
22. Strahova OP, Androsov OI. [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. Lviv; 2021. 164 p. Ukrainian.

Стаття надійшла до редакції
31.10.2022

