

I.K. Хархаліс<sup>1</sup>  
I.C. Шпонька<sup>2</sup>  
O.B. Пославська<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ужгородський національний  
університет, Ужгород

<sup>2</sup> Дніпровський державний ме-  
дичний університет, Дніпро

Надійшла: 24.10.2022

Прийнята: 15.12.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.32-40>

УДК: 616-006.04-076-097.3-079.4

## ОЦІНКА ЕКСПРЕСІЇ МАРКЕРІВ $\beta$ - САТЕНІН ТА CYCLIN D1 В ЗАЛЕЖ- НОСТІ ВІД КЛІНІКО- МОРФОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КОЛОРЕКТАЛЬНИХ КАРЦИНОМ

Kharkhalis I.K. , Shponka I.S. , Poslavskaya O.V.  ✉ Evaluation of the expression of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas.

Uzhhorod National University, Uzhhorod, Dnipro State Medical University, Dnipro, Ukraine.

**ABSTRACT. Background.** Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy in the world and the fourth most common cause of death from all cancers. The progression of neoplasia in the large intestine depends on a sequence of genetic errors that eventually lead to the appearance of malignant tumors. The earliest known mutation in this progression is the inactivation of the polyposis coli adenomatous tumor suppressor gene. It is important to identify molecular prognostic markers for prognosis, which will help in choosing a therapeutic course of strategy and further improving the survival of patients with CRC. Much attention has been paid to the involvement of cyclin D1 in tumor development and progression. **The aim** of the study was to evaluate the prognostic significance of the expression of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas. **Methods.** In the work, the clinical and anatomical material of CRC of 37 patients (15 women and 22 men) who were treated in the 2nd surgical department of the ME "Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital named after I.I. Mechnikova", Dnipro, Ukraine, in the period from 2019 to 2021. The age of the patients ranged from 27 to 82 years, the average age was  $61.43 \pm 14.90$  years. Primary monoclonal antibodies to Ki-67 (sp6, 1:250),  $\beta$ -catenin (Beta Catenin – 1, clone EP35, RTU), cyclin D1 (clone EP12, RTU) and the UltraVision Quanto imaging system, (LabVision) were used for immunohistochemical research. The photographed fields of view were processed in the Fiji platform with the calculation of the percentages of Ki-67 and cyclin D1 positive intranuclear reactions with the ImmunoRatio plugin. **Results.** The distribution of variants of typical (membrane) and aberrant (cytoplasmic or cytoplasmic-nuclear) expression of the  $\beta$ -catenin marker demonstrated a significant difference in subgroups of colorectal carcinomas G2 / G3 according to the degree of differentiation ( $p < 0.05$ ), in subgroups with / without metastases ( $p < 0.05$ ) and in subgroups of carcinomas with different proliferative activity ( $p < 0.05$ ). Aberrant (nuclear-cytoplasmic, nuclear dot-like and cytoplasmic with empty nuclei) expression of cyclin D1 in colorectal carcinomas was found much less often (8 out of 37; 21.62%) compared to the  $\beta$ -catenin marker, where atypical reactions accounted for more than half of all cases (24 out of 37; 64.86%). A statistically significant difference in the distribution of aberrant expressions of cyclin D1 was shown in subgroups with different localization (right-sided / left-sided) ( $p < 0.05$ ) and in subgroups with different proliferative activity according to Ki-67 ( $p < 0.05$ ). The highest percentage of high expression of cyclin D1 was demonstrated by right-sided colorectal carcinomas ( $p < 0.05$ ), carcinomas with a moderate degree of G2 differentiation ( $p < 0.05$ ), the subgroup without metastases ( $p < 0.05$ ) and cases of carcinomas with Ki-67 expression  $> 25\%$  ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** colorectal carcinoma, digital morphometry,  $\beta$ -catenin, cyclin D1, Ki-67.


### Citation:

Kharkhalis IK, Shponka IS, Poslavskaya OV. [Evaluation of the expression of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 markers depending on the clinical and morphological characteristics and proliferative activity of colorectal carcinomas]. Morphologia. 2022;16(4):32-40. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.4.32-40>

 Kharkhalis I.K. 0000-0001-9487-4785

 Shponka I.S. 0000-0002-7561-6489

 Poslavskaya O.V. 0000-0002-3133-8413

✉ alexandra.poslavskaya@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

## Вступ

Колоректальний рак (КРР) є третім за частотою серед злоякісних новоутворень у світі і четвертим за частотою серед причин смерті від всіх онкологічних захворювань [1-3]. Національний канцер-реєстр України в 2020 році на 100 тис. населення за областями України визначив регіони найбільшого поширення раку ободової кишки в Харківській (31,2), Кіровоградській (26,1) і Запорізькій (24,5) областях; та раку прямої кишки – в Сумській (25,4), Полтавській (23,9) і Чернігівській (23,8) областях. Аналіз випадків смертності на 100 тис. населення за областями України показав для раку ободової кишки найвищі показники були в Харківській (19,4), Запорізькій (14,8) і Кіровоградській (14,6); та для раку прямої кишки – в Полтавській (15,2) Сумській (13,9) і Херсонській (12,8) областях [4].

Прогресування неоплазії в товстому кишечнику залежить від послідовності генетичних помилок, які зрештою призводять до виникнення злоякісних пухлин. Найпершою відомою мутацією в цьому прогресуванні є інактивація аденоматозного гена супресора пухлини polyposis coli (APC). В літературі описані мутації в APC на самих ранніх стадіях дисплазії, які називаються аберантними вогнищами, і переважна більшість усіх пухлин, що виникають у товстій кишці, містять мутації в цьому гені [5-8].

Патогенез формування інвазивної форми КРР з аденоми багатоетапний процес, протягом якого відбуваються послідовні молекулярні зміни. До 80% спорадичних пухлин ободової кишки мають класичну аденома-карциному послідовність, що починається з мутації APC. В аденомі обидві копії гену APC інактивовані і не виконують свою ключову функцію з негативної регуляції  $\beta$ -catenin, який в свою чергу переміщується у ядро і активує транскрипцію генів MYC і cyclin D1, які сприяють проліферації, диференціації та підвищенню виживання клітин колоректального епітелію [7-13].

Важливо визначити молекулярні прогностичні маркери для прогнозу, який допоможе у виборі терапевтичного курсу стратегії та подальшого покращення виживаності пацієнтів із КРР. Багато уваги приділено участі cyclin D1 при розвитку та прогресуванні пухлини. Cyclin D1 вважається онкогеном, який може регулювати прогресування від G1 фази клітинного циклу до S фази. Як відомо нам, здатність cyclin D1 керувати клітинним циклом вперед може блокуватися cyclin-D1-залежною кіназою (CDK) інгібітори, такі як p27 і p21. Як ключові регулятори G1 етапу прогресування в клітинному циклі, cyclin D1 підрозуміється, що він відіграє ключову роль у процесі канцерогенезу та прогресування раку [10-11]. Відомо, що експресія cyclin D1 посилюється в різних типах пухлин і зустрічається в одній третині або більше колоректального раку [12-13].

Багато досліджень досліджували чи може надмірна експресія cyclin D1 бути прогностичним фактором для виживання пацієнтів з КРР. Однак результати досліджень є непереконливими та в літературі не досягнуто консенсусу.

**Метою** дослідження було оцінити прогностичну значущість експресії маркерів  $\beta$ -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.

## Матеріали та методи

В 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); всі вони проходили лікування в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27 – 82 років, середній вік склав  $61,43 \pm 14,90$  років. Дослідження схвалено комісією з біоетики ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (витяг з протоколу засідання №7/16 від 30 вересня 2020 р.).

За гістологічною будовою всі спостереження були представлені колоректальною карциномою (КРК) 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, муцинозна АК 2 випадки, перстнеподібноклітинна АК 2 випадки та 1 АК типу like-adenoma.

Із 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 у прямій кишці 1 випадок. Таким чином всі спостереження КРК розділились на правобічні КРК (20 випадків) і лівобічні КРК – 17 спостережень. Також весь матеріал був розподілений на дві групи в залежності від наявності метастазів: без метастазів 30 КРК, та з метастазами – 7 спостережень (6 – у лімфатичних вузлах черевної порожнини і 1 – в печінці).

**Морфологічний метод дослідження.** Зразки пухлин КРК фіксованих у формаліні і залиті парафіном були взяті з архіву КЗ «Дніпровського обласного патологоанатомічного бюро». Парафінові зрізи 4-5мм були отримані на мікромомі Microm HM-340 і забарвлених за стандартною методикою гематоксиліном й еозином (Г-Е). Два патологоанатома незалежно один від одного перевіряли скельця на точність діагнозу та наявність артефактів. За внутрішній контроль прий-

мали нормальну тканину товстої кишки, що зустрічалась в скельцях на границі з пухлинною тканиною. Мікроскопія проводилась за допомогою світлового мікроскопу 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 – 25°C на протязі 30 хвилин. Використовувалися первинні антитіла до Ki-67 (sp6, 1:250),  $\beta$ -catenin (Beta Catenin – 1, клон EP35, RTU), cyclin D1 (клон EP12, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, (LabVision) у вологих камерах біля 30 хвилин при кімнатній температурі. Для ідентифікації реакції наносився розчин хромогену 3-діамінобензидин тетрахлориду під контролем мікроскопу протягом від 20 секунд до 3 хвилин, з проявом у вигляді коричневого забарвлення, далі додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра протягом 1-3 хвилини. Наступна дегідратація і включення у бальзам здійснювалися згідно стандартної методики.

Для цифрової морфометрії використовувалась камера мікроскопу Zeiss Primo Star - AxioCam ERC 5s з ліцензованим програмним забезпеченням ZEN 2 blue edition. Сфотографовані поля зору були збережені в форматі .jpg і оброблені в платформи Fiji з розрахунком відсотків Ki-67 та cyclin D1 позитивних інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio [14-16].

За рекомендаціями Amani Kazem із співавт. (2014), оцінка  $\beta$ -catenin ґрунтувалась на розподілі  $\beta$ -catenin всередині клітини: мембрана експресія (0-1), цитоплазма (0-1) і ядра (0-2). Показник розраховувався шляхом додавання балів: сума ядерних балів (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = відсутність експресії), оцінка цитоплазми (+2 = позитивна експресія; +1 = слабка експресія; 0 = відсутність експресії) та оцінка мембрани (0 = позитивна експресія на мембрані; +1 = негативна мембранна експресія). Таким чином, «типова експресія» характеризувалась загальним балом 0, що відображала лише фарбування клітинної мембрани, подібне до фарбування нормальної слизової оболонки товстої кишки, «аберантна експресія» показувала бали з 1 до загальної оцінки 5 (5 для пухлин із сильним ядерним фарбуванням (+2), дифузним фарбуванням цитоплазми (+2) і втратою клітинної мембрани (+1)) [9].

За рекомендаціями Abdulkader Mohammed Albasri. із співавт. (2019) інтерпретація ядерного фарбування відсотку cyclin D1 за напівкількісною шкалою: 0, менше 5%; 1, 5-25%; 2, 26-50%; 3, 51-75%; 4 - понад 75%. Фарбування від 0 до 1, було оцінено як слабка експресія, від 2 до 4 –

як висока [7].

За рекомендаціями Melling N. із співавт. (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: з 10% до 25%; висока Ki-67: 25% і більше [17].

*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 проводилось за допомогою точного тесту Фішера, відмінність в розподілі вважали достовірною при  $p < 0,05$ . Дані в таблицях представлені як  $M \pm SD$  (середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення).

### Результати та їх обговорення

Дослідження особливостей експресії маркера  $\beta$ -catenin виявило типовий варіант експресії – виключно мембрана експресія ( $n=13$ ), подібна до нормальної експресії в тканині внутрішнього контролю (рис. 1 А), і аберантний варіант експресії ( $n=24$ ), що включав цитоплазматичний (рис. 1 Б) та цитоплазматично-ядерний варіанти (рис. 1 В, Г).

Серед чоловіків аберантна експресія  $\beta$ -catenin зустрічалась в 59,09% (13 з 22) випадків, порівняно з жінками, де цитоплазматично-ядерних варіантів виявилось більше 73,33% (11 з 15). За віком (до 50, 50-75 та більше 75 років) розподіл виявився рівномірний 66,67%, 63,63% та 66,67% відповідно, тож статистично достовірної різниці знайдено не було ( $p > 0,05$ ). Як і між правобічними та лівобічними КРК (65,00% та 64,70%,  $p > 0,05$ ). Серед різних гістологічних варіантів абсолютну більшість (100%) аберантних експресій  $\beta$ -catenin продемонстрували мікропапілярні аденокарциноми (АК) (3 з 3), муцинозні АК (2 з 2) та АК like-adenoma (1 з 1). Взагалі всі гістологічні варіанти КРК показали переважання аберантних експресій  $\beta$ -catenin, крім медулярної АК (1 з 3, 33,33%).

Серед КРК з різним ступенем диференціювання більшість аберантних експресій  $\beta$ -catenin було виявлено в карциномах G2 (21 з 31, 67,74%), в той час як серед карцином G3 таких випадків була половина (3 з 6, 50,00%). Але треба зазначити, що найбільша різниця відчувалась в підгрупах з різною проліферативною активністю (до 10%, 10-25% та більше 25%), де найбільша кількість варіантів з цитоплазматично-ядерною експресією  $\beta$ -catenin показали проліферативну активність вище 25% (40,00%, 57,89%, 84,61%) ( $p < 0,05$ ). Дані розподілу варіантів експресії  $\beta$ -catenin занесені в таблицю 1.

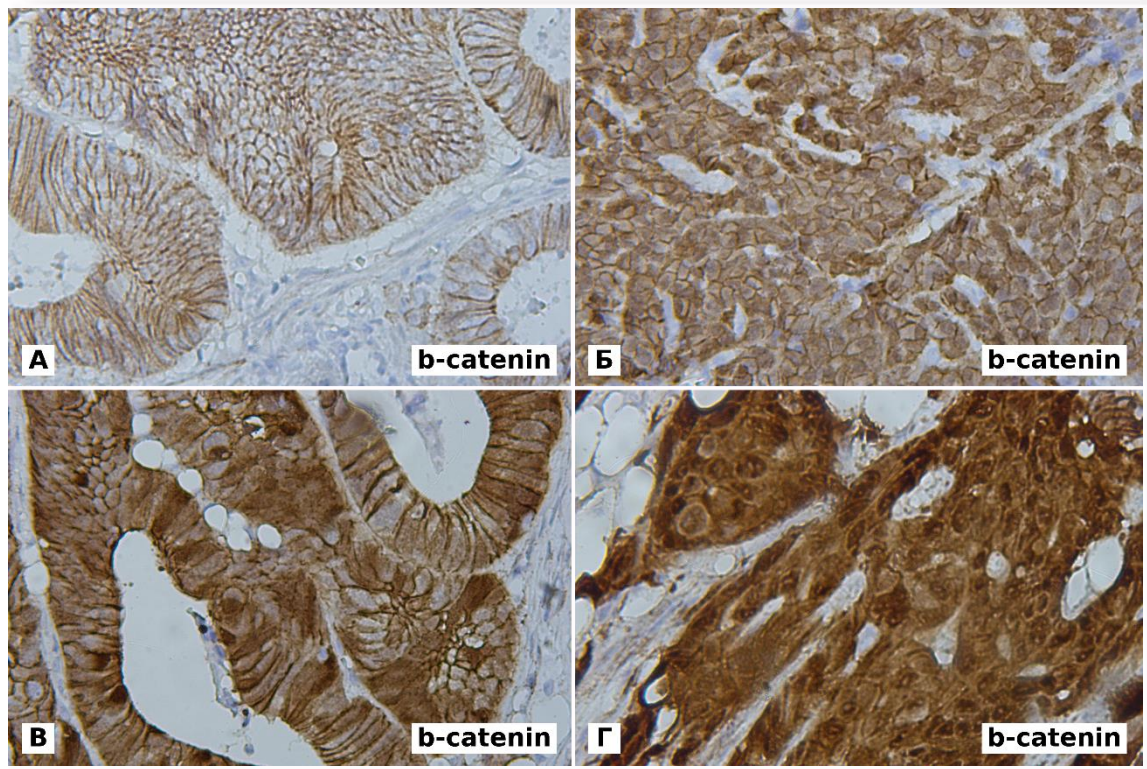


Рис. 1. Варіанти експресії маркера  $\beta$ -catenin, ІГХ дослідження з гематоксилином Майєра ( $\times 400$ ). А. Типове виключно мембранне забарвлення маркера  $\beta$ -catenin, подібне до нормального в непухлинній тканині. Б. Аберантна, цитоплазматична експресія маркера  $\beta$ -catenin. В. Аберантна, мембранно-цитоплазматична експресія з поодинокими забарвленими ядрами. Г. Аберантна, інтенсивна цитоплазматична експресія маркера  $\beta$ -catenin з множиними забарвленими ядрами.

Таблиця 1  
Розподіл варіантів експресії маркера  $\beta$ -catenin за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Варіант експресії $\beta$ -catenin	
		Типова (мембранна)	Аберантна (цитоплазматична, ядерно-цитоплазматична)
Чоловіки	22 (59,46)	9	13
Жінки	15 (40,54)	4	11
p			p>0,05
Вік <50	9 (24,32)	3	6
50-75	22 (59,46)	8	14
>75	6 (16,22)	2	4
p			p>0,05
Правобічні	20 (54,05)	7	13
Лівобічні	17 (45,95)	6	11
p			p>0,05
АК NOS	19 (51,35)	8	11
Зубчаста АК	7 (18,91)	2	5
Мікропапілярна АК	3 (8,10)	0	3
Медулярна АК	3 (8,10)	2	1
Муциозна АК	2 (5,40)	0	2
Перстнеподіб. АК	2 (5,40)	1	1
АК like-adenoma	1 (2,70)	0	1
p			p*

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Варіант експресії $\beta$ -catenin	
		Типова (мембранна)	Аберантна (цитоплазматична, ядерно-цитоплазматична)
G2	31 (83,78)	10	21
G3	6 (16,22)	3	3
P			p<0,05
Без метастазів	30 (81,08)	9	21
З метастазами	7 (18,92)	4	3
P			p<0,05
Ki-67 <10 %	5 (13,51)	3	2
10-25 %	19 (51,35)	8	11
>25 %	13 (35,13)	2	11
P			p<0,05

Примітка: АК NOS – аденокарцинома неспецифікована, M $\pm$ SD – середнє $\pm$ стандартне відхилення, p\* - статистичний аналіз був неможливий через відсутність значень в деяких підгрупах.

Варіанти експресії cyclin D1 також відрізнялись розподілом на типову експресію (ядерну) (рис. 2 А), що зустрічалась у внутрішньому контролі слизової кишківника (n=29), та аберантну

(ядерно-цитоплазматичну, ядерну dot like та цитоплазматичну з порожніми ядрами) (рис. 2 Б-Г), що мала місце тільки в тканині пухлин (n=8).

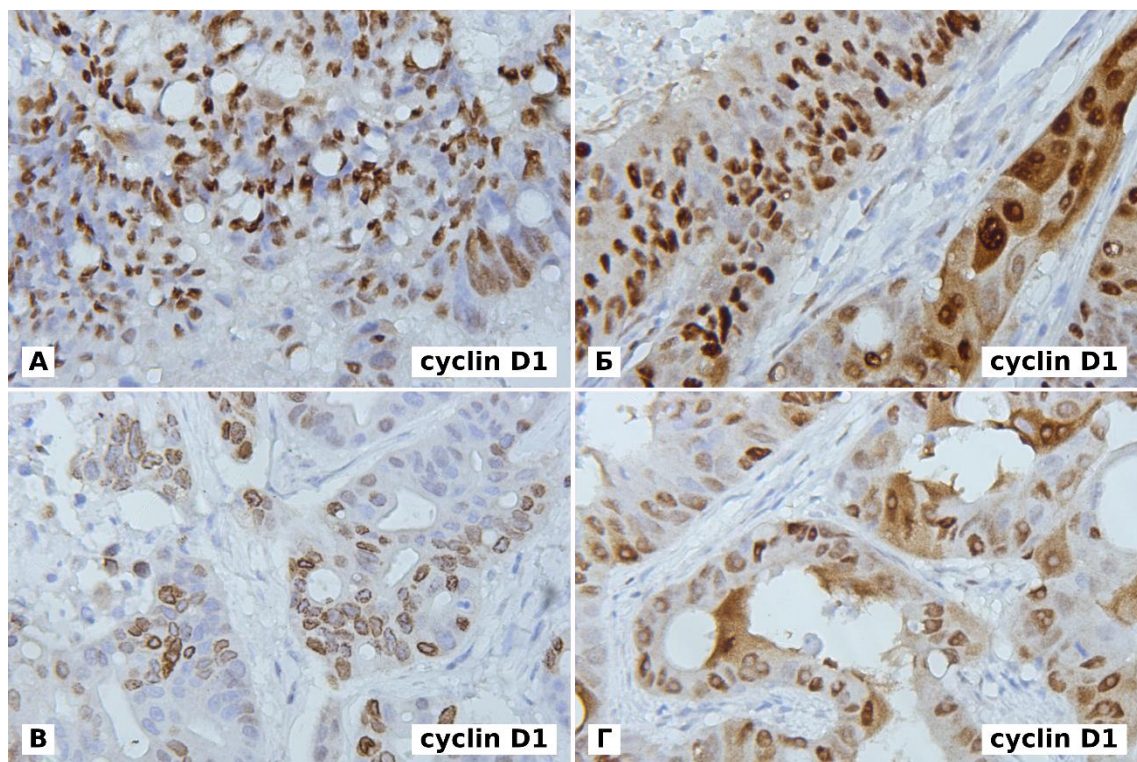


Рис. 2. Варіанти експресії маркера cyclin D1, ІГХ дослідження з гематоксином Майєра ( $\times 400$ ). А. Типова – виключно ядерна експресія cyclin D1, подібна до внутрішнього контролю. Б. Аберантна ядерно-цитоплазматична експресія cyclin D1. В. Аберантна навколяядерна dot like експресія cyclin D1 у вигляді гранулярного накопичення хромогену. Г. Аберантна цитоплазматична експресія cyclin D1 з порожніми ядрами.

Але треба зазначити, що на відміну від маркера  $\beta$ -catenin, де нетипові реакції мали більшість відсотків (24 з 37; 64,86%), для cyclin D1 аберан-

тні реакції склали всього (8 з 37; 21,62%). Тому оцінка сили експресії cyclin D1 нами була врахована ще й за відсотком забарвлених клітин:  $\leq$

25% - низька експресія (low) та >26% - висока експресія (high). Цікавим виявився факт розподілу всіх випадків КРК за цим критерієм практич-

но навпіл 18 зразків low (48,65%) та 19 зразків high (51,35%) Результати розподілу експресії sucln D1 були занесені в таблицю 2.

Таблиця 2  
Розподіл варіантів та відсотку експресії маркера sucln D1 за клініко-морфологічними характеристиками колоректальних карцином

Клініко-морфологічна характеристика КРК	n (%) n=37	Тип експресії sucln D1		Експресія sucln D1 у %	
		Типова (n)	Аберантна (n-c, n+dot like)	≤ 25% (low)	> 26% (high)
Чоловіки	22 (59,46)	17	5	10	12
Жінки	15 (40,54)	12	3	8	7
p		p>0,05		p>0,05	
Вік <50	9 (24,32)	7	2	4	5
50-75	22 (59,46)	18	4	11	11
>75	6 (16,22)	4	2	3	3
p		p>0,05		p>0,05	
Правобічні	20 (54,05)	14	6	8	12
Лівобічні	17 (45,95)	15	2	10	7
P		p<0,05		p<0,05	
АК NOS	19 (51,35)	15	4	11	8
Зубчаста АК	7 (18,91)	6	1	5	2
Мікропапілярна АК	3 (8,10)	1	2	1	2
Медулярна АК	3 (8,10)	3	0	0	3
Муциозна АК	2 (5,40)	2	0	1	1
Перстнеподіб. АК	2 (5,40)	1	1	0	2
АК like-adenoma	1 (2,70)	1	0	0	1
p		p*		p*	
G2	31 (83,78)	24	7	17	14
G3	6 (16,22)	5	1	1	5
p		p>0,05		p<0,05	
Без метастазів	30 (81,08)	23	7	13	17
З метастазами	7 (18,92)	6	1	5	2
P		p>0,05		p<0,05	
Ki-67 <10 %	5 (13,51)	5	0	3	2
10-25 %	19 (51,35)	16	3	10	9
>25 %	13 (35,13)	8	5	5	8
P		p**<0,05		p<0,05	

Примітка: АК NOS – аденокарцинома неспецифікована, M±SD – середнє±стандартне відхилення, m-мембранна, c-цитоплазматична, n-нуклеарна (ядерна), p\* - статистичний аналіз був неможливий через відсутність значень в деяких підгрупах, p\*\* - статистичний аналіз був проведений між підгрупами (Ki-67 10 %-25 %) та (Ki-67 >25 %).

У підгрупі чоловіків кількість аберантних експресій sucln D1 (5 з 22; 22,7%) виявилась невисокою і майже однаковою з підгрупою жінок (3 з 15; 20,00%) (p>0,05), але кількість high випадків склала більше половини (12 з 22; 54,54%) у чоловіків, порівняно з (7 з 15; 46,67%) у жінок (p>0,05).

В підгрупах за віком (<50; 50-75; >75) найбільший відсоток аберантних реакцій sucln D1 припав на вік >75 років (2 з 6; 33,33%), а найбільший відсоток high експресій навпаки у наймолодших пацієнтів <50 років (5 з 9; 55,55%), але достовірної різниці за точним тестом Фішера знайдено не було (p>0,05), (табл. 2).

Правобічні КРК відзначились в 2 рази більшим відсотком аберантних реакцій sucln D1, порівняно з лівобічними КРК (6 з 20; 30,30% проти 2 з 17; 11,76%) (p<0,05), а також більшою кількістю high експресій sucln D1 (12 з 20; 60,00% проти 7 з 17; 41,17%) (p<0,05).

Серед різних гістологічних типів КРК найбільша кількість аберантних реакцій sucln D1 виявилась в мікропапілярних АК (2 з 3; 66,67%), перстнеподібноклітинних АК (1 з 2; 50,00%) та АК NOS (4 з 19; 21,05%). Натомість жодної аберантної експресії не було знайдено в медулярних АК, муциозних АК та АК like adenoma.

Розподіл гістологічних типів КРК за відсот-

ком забарвлених клітин маркером *suclin D1* виявився геть іншим. Найбільший відсоток *high* експресії *suclin D1* продемонстрували медулярні АК (3 з 3; 100%), перстенеподібноклітинні АК (2 з 2; 100%) та АК like adenoma (1 з 1, 100%). І треба зазначити, що всі гістологічні типи КРК мали зразки з *high* експресією *suclin D1* в більшій чи меншій пропорції (табл. 2).

Для Grade підгруп КРК статистично достовірну різницю було знайдено в порівнянні G3 та G2 тільки за кількістю *high* експресії *suclin D1* (5 з 6; 83,33% проти 14 з 31; 45,16% відповідно) ( $p < 0,05$ ), тоді як за розподілом відсотку аберантних експресій *suclin D1* різниці майже не було (1 з 6; 16,66%) для G3 проти (7 з 31; 22,58%) для G2, ( $p > 0,05$ ).

Підгрупи КРК з метастазами і без відзначились більшим відсотком аберантних та *high* експресій *suclin D1* в карциномах без метастазів (7 з 30; 23,33% проти 1 з 7; 14,28%) та (17 з 30; 56,67% проти 2 з 7; 28,57%) відповідно, але статистично достовірної різниці була знайдена тільки в розподілі за відсотком *high* експресій *suclin D1* ( $p < 0,05$ ).

В підгрупах КРК з різною проліферативною активністю за Ki-67 з'ясувалось, що всі випадки карцином з індексом проліферації (ІП) менше 10% зовсім не мали аберантних експресій *suclin D1*, а відсоток випадків КРК з ІП  $> 25\%$  та аберантними експресіями *suclin D1* перевищує кількість таких КРК з ІП 10 %-25 % більше ніж в 2 рази (5 з 13; 38,46% проти 3 з 19; 15,79%) ( $p < 0,05$ ). Розподіл КРК з різним ІП за відсотком *high* експресій *suclin D1* виявив чітку тенденцію взаємного збільшення – відсоток надекспресій маркеру *suclin D1* збільшувався від підгрупи (Ki-67  $< 10\%$ ) до (Ki-67  $> 25\%$ ), а саме: 2 з 5; 40,00%; 9 з 19; 47,37%; 8 з 13; 61,54% відповідно ( $p < 0,05$ ).

## Висновки

1. Розподіл варіантів типової (мембранної) та аберантної (цитоплазматичної або цитоплазматично-ядерної) експресії маркеру  $\beta$ -catenin продемонстрував достовірну різницю в підгрупах колоректальних карцином G2 / G3 за ступенем диференціювання ( $p < 0,05$ ), в підгрупах з / без метастазів ( $p < 0,05$ ) та в підгрупах карцином з різною проліферативною активністю ( $p < 0,05$ ).

2. Аберантні (ядерно-цитоплазматичні, ядерні dot like та цитоплазматичні з порожніми ядрами) експресії *suclin D1* в колоректальних карциномах виявлялись значно рідше (8 з 37; 21,62%) порівняно з маркером  $\beta$ -catenin, де нетипові реакції займали більше половини всіх випадків (24 з 37; 64,86%). Статистично достовірну різницю розподіл аберантних експресій *suclin D1* показав в підгрупах з різною локалізацією (правобічні / лівобічні) ( $p < 0,05$ ) та в підгрупах з різною проліферативною активністю за Ki-67 ( $p < 0,05$ ).

3. Найбільший відсоток *high* експресій *suclin D1* продемонстрували правобічно розташовані колоректальні карциноми ( $p < 0,05$ ), карциноми помірного ступеня диференціювання G2 ( $p < 0,05$ ), підгрупа без метастазів ( $p < 0,05$ ) та випадки карцином з експресією Ki-67  $> 25\%$  ( $p < 0,05$ ).

## Перспективи подальших досліджень

Планується дослідити особливості експресії маркерів CDX-2, EMA та цитокератинів різних груп в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.

## 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. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, et al. Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2017;5(11):4667-4676. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20174914>.

2. Takayama T, Shiozaki H, Doki Y, et al. Aberrant expression and phosphorylation of  $\beta$ -catenin in human colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 1998;77(7):605-613. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.97>.

3. Alexander PG, Matly AAM, Jirapongwattana N, et al. The relationship between the Glasgow Microenvironment Score and markers of epithelial-mesenchymal transition in TNM II-III colorectal cancer. *Human Pathology*. 2022;127:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.05.012>.

4. 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*. 2021;22. Ukrainian. [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_22/](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/).

5. Miyamoto S, Endoh Y, Hasebe T, et al. Nuclear  $\beta$ -catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. *Oncology Reports*. 2004;12(2):245-251. <https://doi.org/10.3892/or.12.2.245>.

6. Herter P, Kuhnen C, Müller K-M, et al. Intracellular distribution of  $\beta$ -catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1999;125:297-304. <https://doi.org/10.1007/s004320050277>.

7. Abdulrahman ZA, Ismael AT, Jalal JA, Alnuaimy WMT. Significance of B-catenin Immunohistochemical Expression in Colorectal Carcinoma. *Journal of Kurdistan Board of Medical Specialties*. 2018;4(1):51-56.
8. Yang Li, Jun Wei, Chuanhui Xu, et al. Prognostic Significance of Cyclin D1 Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e94508. doi:10.1371/journal.pone.0094508.
9. Amani Kazem, Khaled El Sayed, Yasser El Kerm. Prognostic significance of COX-2 and b-catenin in colorectal carcinoma. 2014;50:211-220.
10. Albasri AM, Elkablawy MA, Ansari IA, Alhujaily AS. Prognostic Significance of Cyclin D1 Over-expression in Colorectal Cancer: An Experience from Madinah, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(8):2471-2476. doi:10.31557/APJCP.2019.20.8.2471.
11. Li Yang, Xiaoqing Tian, Xiang Chen, et al. Upregulation of Rab31 is associated with poor prognosis and promotes colorectal carcinoma proliferation via the mTOR/p70S6K/Cyclin D1 signalling pathway. *Life Sciences*. 2020;257: 118126. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118126>.
12. Ling Cao, Yulin Liu, Dan Wang, et al. MiR-760 suppresses human colorectal cancer growth by targeting BATF3/AP-1/cyclinD1 signaling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018;37(83):1-14. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0757-8>.
13. Su Y, Shrubsole MJ, Ness RM, et al. Immunohistochemical Expressions of Ki-67, Cyclin D1,  $\beta$ -Catenin, Cyclooxygenase-2, and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Colorectal Adenoma: A Validation Study of Tissue Microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(9):1719-1726. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0946>.
14. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.
15. 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]. *Morphology*. 2015;9(3):122-126. Ukrainian.
16. Poslavska OV. [Determining the linear dimensions and areas of individual morphological objects on photomicrographs using the ImageJ program. *Morphology*]. 2016;10(3):377-381. Ukrainian.
17. Melling N, Kowitz CM, Simon R, et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2016;69:209-214. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202985>.

**Хархаліс І.К., Шпонька І.С., Пославська О.В. Оцінка експресії маркерів  $\beta$ -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином.**

**РЕФЕРАТ. Актуальність.** Колоректальний рак (КРР) є третім за частотою серед злоякісних новоутворень у світі і четвертим за частотою серед причин смерті від всіх онкологічних захворювань. Прогресування неоплазії в товстому кишечнику залежить від послідовності генетичних помилок, які зрештою призводять до виникнення злоякісних пухлин. Найпершою відомою мутацією в цьому прогресуванні є інактивація аденоматозного гена супресора пухлини polyposis coli. Важливо визначити молекулярні прогностичні маркери для прогнозу, який допоможе у виборі терапевтичного курсу стратегії та подальшого покращення виживаності пацієнтів із КРР. Багато уваги приділено участі cyclin D1 при розвитку та прогресуванні пухлини. **Метою** дослідження було оцінити прогностичну значущість експресії маркерів  $\beta$ -catenin та cyclin D1 в залежності від клініко-морфологічних характеристик та проліферативної активності колоректальних карцином. **Методи.** В роботі досліджено клініко-анатомічний матеріал КРК 37 пацієнтів (15 жінок і 22 чоловіків), які проходили лікування в 2 хірургічному відділенні КП «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова» ДОР м. Дніпра в період з 2019 по 2021 рр. Вік пацієнтів коливався в діапазоні 27 – 82 років, середній вік склав  $61,43 \pm 14,90$  років. Для імуногістохімічного дослідження використовувалися первинні моноклональні антитіла до Ki-67 (sp6, 1:250),  $\beta$ -catenin (Beta Catenin – 1, клон EP35, RTU), cyclin D1 (клон EP12, RTU) та система візуалізації UltraVision Quanto, LabVision). Сфотографовані поля зору були оброблені в платформи Fiji з розрахунком відсотків Ki-67 та cyclin D1 позитивних інтрануклеарних реакцій плагіном ImmunoRatio. **Результати та підсумок.** Розподіл варіантів типової (мембранної) та аберантної (цитоплазматичної або цитоплазматично-ядерної) експресії маркеру  $\beta$ -catenin продемонстрував достовірну різницю в підгрупах колоректальних карцином G2 / G3 за ступенем диференціювання ( $p < 0,05$ ), в підгрупах з / без метастазів ( $p < 0,05$ ) та в підгрупах карцином з різною проліферативною активністю ( $p < 0,05$ ). Аберантні (ядерно-цитоплазматичні, ядерні dot like та цитоплазматичні з порожніми ядрами) експресії cyclin D1 в колоректальних карциномах виявлялися значно рідше (8 з 37; 21,62%) порівняно з маркером  $\beta$ -catenin, де нетипові реакції займали більше половини всіх випадків (24 з 37; 64,86%). Статистично достовірну різницю розподіл аберантних експресій cyclin D1 показав в підгрупах з різною локалізацією (правобічні / лівобічні) ( $p < 0,05$ ) та в підгрупах з різною про-



ліферативною активністю за Ki-67 ( $p < 0,05$ ). Найбільший відсоток high експресій cyclin D1 продемонстрували правобічно розташовані колоректальні карциноми ( $p < 0,05$ ), карциноми помірного ступеня диференціювання G2 ( $p < 0,05$ ), підгрупа без метастазів ( $p < 0,05$ ) та випадки карцином з експресією Ki-67  $> 25\%$  ( $p < 0,05$ ).

**Ключові слова:** колоректальна карцинома, цифрова морфометрія,  $\beta$ -catenin, cyclin D1, Ki-67.