



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ - ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ОБЩА И КЛИНИЧНА ПАТОЛОГИЯ, СЪДЕБНА МЕДИЦИНА И
ДЕОНТОЛОГИЯ**

Д-р Недялка Тодорова Згурова

**СРАВНИТЕЛЕН МОРФОЛОГИЧЕН И
ИМУНОХИСТОХИМИЧЕН АНАЛИЗ НА БЕНИГНИ И
МАЛИГНИ ЕПИТЕЛНИ ТУМОРИ НА ДЕБЕЛОТО ЧЕРВО**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Професионално направление: 7.1. “Медицина”

Научна специалност “Патологоанатомия и цитоплатология”

Научен ръководител:

Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Научен консултант:

Доц. Милка Христова Георгиева, д.б.

Варна 2020 г.

Настоящият дисертационен труд е разработен в Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Факултета по медицина на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.

Дисертационният труд съдържа 138 машинописни страници и е онагледен със 16 таблици и 67 фигури. Списъкът на цитираната литература включва 345 заглавия, от които 6 на кирилица и 339 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрен съвет на Катедрата по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология при Медицински университет ”Професор д-р Параскев Стоянов“ - Варна - Протокол 356/8.04.2020 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на, пред научно жури в състав:

Външни членове:

Проф. д-р Ангел Атанасов Ангелов, д.м.н.

Доц. д-р Екатерина Боянова Софтова, д.м.

Проф. д-р Димитър Петков Сиврев, д.м.

Вътрешни членове:

Доц. д-р Антон Йорданов Тонев, д.м.

Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Резервен външен член:

Проф. д-р Радиана Стефанова Иванов, д.м.н.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Петър Иванов Генов, д.м.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицинския университет "Професор д-р Параскев Стоянов" - Варна и са на разположение в Научния отдел на Медицинския университет "Професор д-р Параскев Стоянов" - Варна.

Съдържание

1. Въведение	6
2. Цел и задачи	7
3. Материал и методи	8
4. Резултати	11
4.1. Клинико-морфологична характеристика на пациентите с несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и КПК	11
4.2. Експресия на протеина APC в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КПК	12
4.3. Експресия на протеина p53 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КПК	16
4.4. Експресия на протеина SMAD4 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КПК	19
4.5. Експресия на протеина MSH2 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КПК	23
4.6. Експресия на протеина BRAF в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КПК	26
5. Дискусия	32
6. Заключение	44
7. Изводи	45
8. Приноси на дисертационния труд	46
9. Статии, свързани с дисертационния труд	47

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

ГИТ - гастроинтестинален тракт

ДНК - Дезоксирибонуклеинова киселина

КРК - колоректален карцином

НСПВС - нестероидни противовъзпалителни средства

ХЕ – хематоксилин-еозин

На латиница

ACF - aberrant crypt foci

APC - adenomatous polyposis coli

CIN - chromosomal instability

CIMP - CpG island methylator phenotype

EGFR - epidermal growth factor receptor

FAP - familial adenomatous polyposis

hMYH - MutY homolog

HNPCC - hereditary non-polyposis colorectal cancer

IBD - Inflammatory bowel disease

LOH - loss of heterozygosity

Mdr1 - multidrug resistance 1

MLH1 - MutL Homolog 1

MMR - Mismatch repair

MSH2 - Mut S Homolog 2

MSH6 - MutS Homolog 6

MSI - Microsatellite instability

MSI-H - Microsatellite instability -High

MSI-L - Microsatellite instability- Low

MSS - Microsatellite stable

SSA/P - sessile serrated adenoma/polyp

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TGF- β RII - *Transforming growth factor, beta receptor II*

TSA - traditional serrated adenoma

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Колоректалният карцином (КПК) възниква в резултат на акумулиране на различни типове на увреждане на генома: нарушения в транскрипцията на гени и епигенетични нарушения. Сред генетичните нарушения най-голямо значение имат двете взаимно изключващите се категории на хромозомна и микросателитна нестабилност.

Хромозомната нестабилност (CIN) се дължи на натрупване на мутации в тумор супресорни гени и протоонкогени, например като: *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *SMAD4*, *DCC*, *KRAS*, *PIK3CA* и др., както и на загуба на хетерозиготност (LOH), която най-често се среща в хромозома 1, 5, 8, 17 и 18 (Pino MS и Chung DC, 2010).

Микросателитната нестабилност (MSI) настъпва поради инактивираща мутация на гени, участващи в репарацията на ДНК - MMR (mismatch repair) - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* и др., което обуславя възникването на мултиплени мутации и делеции.

Епигенетичните нарушения са породени от хиперметилация на промоторните зони на множество гени, известни като CpG острови, с което колоректалният епител придобива метилаторен фенотип. Високата степен на хиперметилация на аберантен промотор предизвиква заглушаване на множество гени, включително на гените, участващи в репарацията на ДНК (Pfeifer G, 2018).

Неотдавна стана известно, че не само аденомите: тубуларни, вилозни и смесени са прекурсорни лезии на КПК, но и редица други лезии като назъбени аденоми, огнища с аберантни крипти и др. имат отношение към колоректалната карциногенеза.

През последните няколко десетилетия се наблюдава една постоянна тенденция към увеличаване честотата на КПК в проксималните отдели на дебелото черво в развитите страни и в дисталните отдели, дистално от флексура коли лиеналис в развиващите се страни. Карциномите в лявата и дясна половина на колона притежават различен профил на генома. Карциномите с десностранна локализация, често показват високо ниво на микросателитна нестабилност, в повечето случаи са асоциирани с мутация в *BRAF* (Kim S et al., 2017), *KRAS* и *APC* гени (Sugai T et al., 2006). Дистално разположените тумори са анеуплоидни, имат често мутации в *p53* и *APC* гени (Sugai T et al., 2006).

Изясняването на геномните и епигеномни нарушения и ролята им на най-ранните етапи на колоректалната карциногенеза е от съществено значение за изработване на ефективни стратегии за превенция и терапия на пациентите с КПК.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е да се проучи имунохистохимичната експресия на тумор супресорните протеини APC, p53, SMAD4, MSH2 и онкопротеина BRAF при бенигнени и малигнени епителни тумори на дебелото черво във връзка с клинично-морфологичните показатели и да се изясни ролята им в туморната инициация и прогресия.

Във връзка с поставената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Да се проучат клинично-морфологичните характеристики на пациентите с несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и КПК.
2. Да се проучи и сравни експресия на протеина APC в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КПК.
3. Да се извърши сравнителен анализ на експресията на протеина p53 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КПК.
4. Да се изследва и сравни експресия на протеина SMAD4 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КПК.
5. Да се анализира експресията на протеина MSH2 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КПК.
6. Да се извърши сравнителна оценка на експресия на протеина BRAF в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КПК.
7. Да се анализира експресията на APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF- протеини във връзка с туморния стадий.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са 69 хирургични и щипкови биопсични материала. Те са разпределени в четири групи:

Първа група – контролна група. Тя включва нетуморна тъкан в съседство на синхронните/метахронни аденоми.

Втора група – несинхронни аденоми. В тази група са включени тридесет пациента с аденоматозни полипи от които 10 тубуларни аденоми, 10 тубуловилозни и 10 вилозни аденоми. При тези пациенти липсват анамнестични данни за други дебелочревни неоплазми.

Трета група – синхронни/метахронни аденоми. Тази група е представена 18 пациента с тъканни проби от синхронни/метахронни аденоми и КРК. Дванадесет от пациентите са със синхронни и 6 са с метахронни аденоматозни полипи. Девет от тях са тубуларни аденоми, 3 са вилозни аденома и 6 са тубуловилозни аденома.

Четвърта група – КРК със синхронни/метахронни аденоми. В тази група са включени 21 КРК. Всички пациенти с КРК са над 18 години. От изследването са изключени пациенти, които имат КРК, асоцииран с IBD. При всички пациенти от тази група е проведено радикално хирургично лечение на първичния тумор на дебелото черво.

Рутинни изследвания

Биопсичният материал включва:

- Щипкови полипектомии и щипкови биопсии от несинхронни и синхронни/метахронни полипи.
- Чревен резектат на КРК.

Изследван е целият материал от полипектомията, включително и крачето. От резектата са изследвани средно по 3-4 тъканни проби с размери 2/2/0,5 см, включващи най-дълбоката туморна инвазия. За хистологично изследване са взети тъканни проби от дисталната и проксимална резекционна линия. Задължително от всеки карцином са изследвани не по-малко от 12 лимфни възли.

Биопсичните материали са фиксирани в 10% неутрален формалин, включени са в парафин с точка на топене 52°C - 54°C. Изготвени са срези с дебелина 5 микрона, които са оцветени с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени.

Използвани критерии за патоморфологична оценка

Критерии за оценка на аденомите

Отчетени са следните показатели: размер, локализация, хистологичен вид, белези на дисплазия.

Аденомите са разпределени в четири групи в зависимост от размерите си: 1 група с размери от 0,1 см до 0,5 см; 2 група от 0,6 см до 1 см; 3 група от 1,1 см до 2 см и 4 група > 2 см (Valarini SBM et al., 2011).

Разпределението на аденомите в зависимост от локализацията е в две категории: дясна и лява половина на колона. В десен колон се включват формации, разположени в цекум, колон асценденс, флексура хепатика, колон транзверзум и флексура лиеналис. Към лявата половина на колона принадлежат формации с локализация в колон десценденс, сигма и ректум (Cienfuegos JA et al., 2018).

Аденомите са разпределени в две категории: високодиференцирани аденоми, когато

аденомите са с лека степен на дисплазия и нискодиференцирани аденоми с умерена и тежка дисплазия.

Критерии за оценка на КРК

При КРК са анализирани следните показатели: локализация, размер на тумора, дълбочина на инвазия, степен на диференциация, присъствие на метастази в лимфни възли и далечни органни метастази.

Разпределението на КРК в зависимост от локализацията е по същите критерии, описани при аденомите.

Размерите на КРК са категоризирани в три категории: първа група с размер на тумора между 2 см и 3 см, втора група между 3,1 см и 4 см и трета група над 4 см.

Степента на диференциация на тумора и стадия са определени според 7- мото преработеното издание на TNM класификацията от 2010 година на базата на хистологичното и образно изследване (Sobin LH и Compton CC, 2010).

Имунохистохимичен метод на изследване

Използван е индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимично оцветяване с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024.

Използвани са следните видове антитела: Anti-APC, кат. № 9276P904E; Anti-BRAF, кат. № #B1010; Anti-SMAD4, кат. №#K1609; Anti-MSH2, кат. № 1498S911A; Anti-p53, кат. № 2103S807H. Антителата са производство на *NeoMarkers* и *Santa Cruz Biotechnology* (таблица 1, 2).

При негативните контроли, вместо първичното антитяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимунен серум.

Таблица 1. Използвани антитела за имунохистохимичното изследване

Антитяло	Разреждане	Каталожен №	Фирма производител
APC mouse Monoclonal Antibody	1:250	9276P904E	NeoMarkers
MSH2 Ab-1 (25D12), mouse Monoclonal Antibody	1:25	1498S911A	NeoMarkers
SMAD4 (B-8) sc-7966,mouse monoclonal IgG1	1:250	#K1609	Santa Cruz Biotechnology
p53 Rabbit Monoclonal Antibody (Clone Y5)	1:250	№ 2103S807H	NeoMarkers
Raf-B (F-7) sc-5284, mouse monoclonal IgG2a	1:250	#B1010	Santa Cruz Biotechnology

Таблица 2. Системи за оцветяване и други реактиви

HRP- DAB System	Оригинална оцветяваща система	DAKO
Mayer's hematoxilin	Counterstaining	DAKO

Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване

- ✓ Срези с дебелина 5 микрона бяха поставени върху силанизирани стъкла (Thermo Polysine).

- ✓ Срезите се депарафинират в низходяща редица от алкохоли: Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин, Ethanol 70% 3 мин., Xylo1 3x10 мин. Измиват се в течаща вода, след което се поставят в дестилирана вода.
- ✓ Антигенно разкриване: чрез предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в РТ контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин. При стайна температура 97°C се поставят в предварително загрят до 65°C буфер с рН 9 (FLEX Target Retrieval Solition, Hishph) и се варят 20 минути на водна баня 95°C и рН 9. След охлаждане пробите бяха промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer20x за 1-5 минути

Имунохистохимичен анализ на изследваните групи

На втората група пациенти с несинхронни аденоми е определено нивото на тъканна експресия на APC и BRAF протеини.

На третата група пациенти със синхронни/метахронни аденоми, на четвърта група пациенти, включващи КРК и на първата група - контролна група е определено нивото на тъканна експресия на следните протеини: APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF.

Определяне експресията на използваните антитела – APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF в аденоматозни полипи и КРК

Оценката на имунохистохимичната експресия е извършена върху поле с най-висока интензивност, като е отчетена на увеличение 400 за всеки отделен случай. Направени са дигитални снимки на всички случаи с помощта на сканиращия апарат – Leica Aperio Scan Scope AT2 device (Aperio Technologies, Vista,CA).

За оценка на имунохистохимичната експресия е използван полуколичествен метод с отчитане на площта в %-ти и интензивността на цитоплазмената и ядрена кафява оцветка.

Процентът на позитивни клетки е оценен в четири категории: 0 категория – от 0 до 5% площ, 1 категория – от 6% до 25% площ, 2 група от 26% до 50%, 3 категория от 51% до 75% и 4 категория >75% площ.

Интензивността е оценена по четиристепенна скала: 0 - липсва, 1 - светложълто до светлокафяво, 2 – кафяво и 3 - тъмнокафяво.

Общ скор - получените резултати от процента на оцветените клетки и интензивността на оцветяване бяха умножени и стойности от 0 до 8 са определени като ниски, а от 9 до 12 се определят като високи (Boungoul VSO et al., 2013).

Статистически методи

- Дескриптивен статистически анализ
- Тест на Стюdent (t-критерий) за две независими извадки
- Дисперсионен анализ (ANOVA)
- Логистичен регресионен анализ

За статистическия анализ на данните е използван специализиран за статистически софтуерен пакет STATISTICA 10.0.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Клинико-морфологична характеристика на пациентите с несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и КРК

Клинико-морфологична характеристика на пациентите с несинхронни аденоми

Средната възраст на пациентите е $64,73 \pm 12,63$ години, като най-младият пациент е на 32 години, а най-възрастният е на 87 години. Шестнадесет (53,33%) от пациентите с несинхронни аденоми са мъже и 14 (46,67%) са жени.

Двадесет и три (76,67 %) от аденомите са с размери до 0,5 см. Три (10%) аденома са с размери между 0,6 см и 1 см, три (10 %) аденома са между 1,1 см и 2 см и един (3,33%) аденом е с размери над 2 см. Средните размери на аденомите са $0,5 \pm 0,77$ см. Двадесет и пет (83,33%) от несинхронните аденоми са локализиращи в лявата половина на колона и 5 (16,67%) аденома в дясната му половина.

Десет (33,33%) от несинхронните аденоми са тубуларни, 10 (33,33%) са тубуловилонни и 10 (33,33%) са вилонни аденоми. Двадесет и осем (93,33%) от тях са верифицирани като високодиференцирани, останалите 2 (6,67%) случая като нискодиференцирани аденоми.

Клинико-морфологична характеристика на пациентите със синхронни/метахронни аденоми

Средната възраст на пациентите е $69,28 \pm 13,70$ години. Най-младият пациент е на 31 години, най-възрастният на 88 години. Мъжете със синхронни/метахронни аденоми са 13 (72,22%), а жените със синхронни/метахронни аденоми са 5 (27,78%).

Аденомите с размери между 1,1 см и 2 см са 7 (38,89%) броя и между 0,1 см и 0,5 см са 5 (27,78%) броя. Два (11,11%) аденома са с размери над 2 см и 4 (22,22%) аденома са между 0,6 см и 1 см. Средните размери на аденомите са $2,33 \pm 1,03$ см. В лявата половина на колона са локализиращи 14 (77,78%) от синхронните/метахронни аденоми, а в дясната половина 4 (22,22%) случая.

От синхронните/метахронни аденоми 9 (50%) са тубуларни аденоми, 8 (44,44%) са тубуловилонни аденома и един (5,56%) вилонен аденом. Високодиференцираните аденоми са 13 (72,22%) случая, а останалите 5 (27,78%) аденома са нискодиференцирани.

Клинико-морфологична характеристика на пациентите с КРК

Средната възраст на пациентите е $69,28 \pm 13,70$ години. Най-младият пациент е на 31 години, най-възрастният на 88 години. От изследваните 21 пациента 7 (33,33%) са жени и 14 (66,67%) са мъже.

В 13 (61,91%) случая размерите на тумора са между 2 см и 3 см, един (4,76%) е с размери 4,5 см, а останалите 7 (33,33%) тумора са с размери между 3,1 см и 4 см.

В лявата половина на колона са локализиращи 15 (71,43%) карцинома, а в дясната половина на колона 6 (28,57%) случая. Всички карциноми са с умерена степен на диференциация (G2) (Таблица 3).

Единадесет (52,38%) от КРК са открити в T3 стадии, 6 (28,57%) карцинома в T4 стадий и 4 (19,05%) карцинома в T2 стадий. Метастази в лимфните възли липсват в 13 (61,90%) случая и в 15 (71,43%) случая липсват органни метастази.

Таблица 3. Клинико-морфологична характеристика на пациентите с КРК

Показател		Брой пациенти (n=21)	Процент %
Пол	Жени	7	33,33
	Мъже	14	66,67
Размер	2-3 см	13	61,91
	3,1-4 см	7	33,33
	>4 см	1	4,76
Локализация	Дясна половина на колон	6	28,57
	Лява половина на колон	15	71,43
Степен на диференциация	Умеренодиференцирани	21	100,00
Т- стадий	T1	0	0,00
	T2	4	19,05
	T3	11	52,38
	T4	6	28,57
N- стадий	N0 липсват метастази	13	61,90
	N1 присъстват метастази	8	38,10
M- стадий	M0 липсват метастази	15	71,43
	M1 присъстват метастази	6	28,57

При пациентите с КРК липсва статистически значима разлика между възрастта и пола, между възрастта и локализация на тумора, между локализацията и размера на тумора ($p > 0,05$). Права корелационна зависимост се установява между размерите на тумора и възрастта на пациентите ($p < 0,05$). С увеличаване на възрастта на пациента се увеличава размера на тумора. Т- стадия на тумора корелира със статуса на лимфните възли. С увеличаване на инвазията в стената на дебелото черво се увеличава риска от поява на метастази в лимфните възли и органни метастази ($p < 0,05$).

4.2. Експресия на протеина APC в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КРК

Експресия на протеина APC в контролната група

Интензивност на експресия на протеина APC в контролната група

APC протеинът се експресира в цитоплазмата на епителните клетки на лигавицата на дебелото черво. При 3 (16,67%) случая липсва експресия на APC. При 15 (83,33%) случая има експресия, като в 2 (13,33%) случая тя е ниска, в 10 (66,67%) случая е умерена и в 3 (17,65%) случая реакцията е интензивна.

Средната стойност на експресия на протеина APC в контролната група е $1,72 \pm 0,96$.

Процент на експресия на протеина APC в контролната група

Според площта на експресия на протеина APC в контролната група разпределението е както следва: липсва в 4 (22,22%) случая и присъства в 14 случая (77,78%), като в 4 (28,57%) случая е в диапазона 6%-25%, при 5 (35,71%) случая е между 26%-50%, при един (7,14%) случай е между 51%-75% и при 4 (28,57%) случая площта е над 75%.

Средната стойност на площта на експресия на протеина APC в контролната група е $34,72 \pm 30,01$.

Общ скор на експресия на протеина APC в контролната група

Според общия скор в 16 (88,89%) случая, експресията на протеина APC е ниска и в 2 (11,11%) случая тя е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на антиялото е $4,17 \pm 3,75$.

Експресия на протеина APC в туморната тъкан при несинхронните аденоми

Интензивност на експресия на протеина APC в туморната тъкан при несинхронните аденоми

APC протеинът се експресира в цитоплазмата и ядрата на епителните клетки на аденомите. При 13 (43.33%) аденома липсва експресия на антиялото, докато в 17 (56.67%) аденома тя е интензивна. Умерена експресия се установи в 6 (35.29%) случая и интензивна в 11 (64.71%) случая.

Липсва статистически значима разлика в експресията на протеина между различните хистологични типове аденоми и клиничко-морфологичните параметри ($p > 0,05$).

Процент на експресия на протеина APC в туморната тъкан на несинхронните аденоми

В 15 несинхронни аденоми липсва експресия на протеина APC. В останалите 15 случая експресията се разпределя съответно: в 4 (26.67%) случая тя е между 6% и 25%; в 3 (20%) случая е между 26% и 50%, в 5 (33.33%) случая е между 51% и 75% и в 3 (20%) случая е повече от 75% (фиг. 1).



Фигура 1. Разпределение на несинхронните аденоми според процент на експресия на анти-APC антиялото (0 – липсва; 1 - 6% - 25%; 2 - 26% - 50%; 3 - 51% - 75%; 4 >75%).

Средният процент на експресията на антиялото е $26,83 \pm 33,30$

Липсва статистически значима разлика в процента на експресия на APC между различните хистологични видове аденоми и клинично-морфологичните показатели ($p>0,05$).

Общ скор на експресия на протеина APC в несинхронните аденоми

Според общия скор при 23 (76,67%) случая експресията на протеина APC е ниска, докато при останалите 7 (23,33%) случая е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на протеина APC е $3,4\pm 4,24$. Липсва статистически значима разлика между общия скор на експресия на протеина и клинично-морфологичните показатели ($p>0,05$).

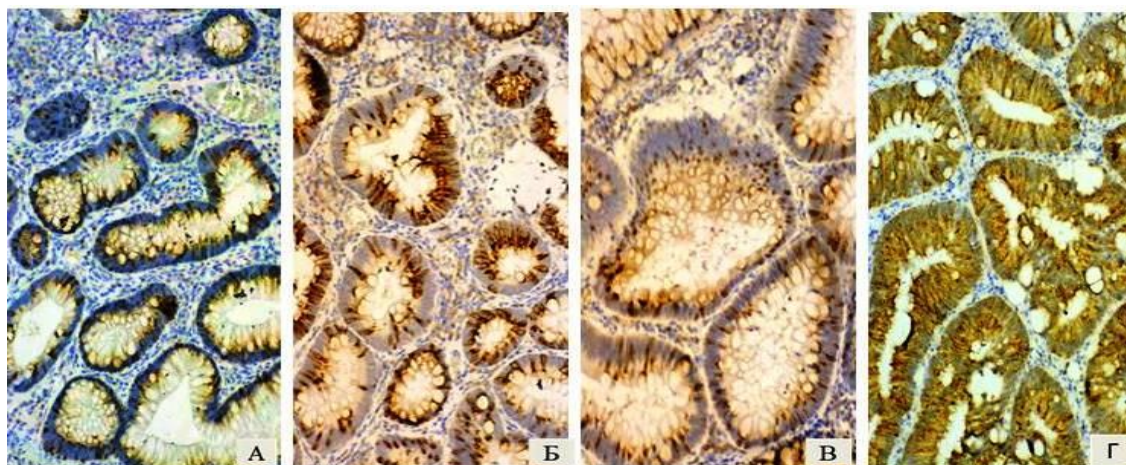
Експресия на протеина APC в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми

Интензивност на експресия на протеина APC в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

В туморната тъкан на 14 аденома се установява експресия на антитялото, като в 4 (28,57%) от тях, тя е интензивна, при 9 (64,29%) случая е умерена и при един (7,14%) аденом е ниска. При 4 (22,22%) аденома липсва експресия на протеина. Средната стойност на интензивност на експресия на протеина е $5,39\pm 4,56$. Липсва статистически значима разлика между интензивност на експресия на протеина APC и клинично-морфологичните показатели: размер, локализация, хистологичен вид и степен на диференциация ($p>0,05$).

Процент на експресия на протеина APC в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

На фигура 2 е представен процентът на експресия на протеина APC в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми. Експресия на протеинът присъства в туморната тъкан на 14 (77,78%) аденома, като в 4 (28,57%) случая тя е между 6% и 25%, при един (7,14%) е между 26% и 50%, при един (7,14%) е между 51% и 75% и в 8 (57,14%) случая експресията е над 75%. При 4 (22,22%) случая липсва експресия на антитялото.



Фигура 2. Процент на експресия на протеина APC при синхронните/метахронни аденоми. А. Площ 6 %-25% (степен 1). Б. Площ 26%-50% (степен 2). В. Площ 51%- 75% (степен 3). Г. Площ >75% (степен 4). Имунохистохимия x200.

Средната стойност на процент на експресия на протеина APC е $55\pm 45,86$. Липсва статистически значима разлика между процента на експресия на протеина при синхронните/метахронните аденоми и клинично-морфологичните параметри: размер,

локализация и хистологичен вид на аденома ($p>0,05$). Такава зависимост има между площта на експресия и степента на диференциация ($p<0,05$). По-висока е експресия на антитялото при високодиференцираните спрямо нискодиференцираните аденоми.

Общ скор на експресия на протеина APC в синхронните/метахронни аденоми

Според общия скор при 4 (22,22%) случая експресията на протеина APC е висока, докато при останалите 14 (77,78%) случая е ниска. Средната стойност на общият скор на експресия на протеина в туморната тъкан е $5,39\pm 4,56$. Експресията на антитялото на базата на общия скор не показва статистически значима разлика със степента на диференциация на аденомите ($p>0,05$). Общият скор на експресия на APC е свързан сигнификантно със следните клинично-морфологични показатели: размер, локализация и хистологичен вид на аденома ($p<0,05$). Високите стойности на общия скор се срещат при аденоми с по-големи размери, вилозна компонентна и локализиращи в дясната половина на колона.

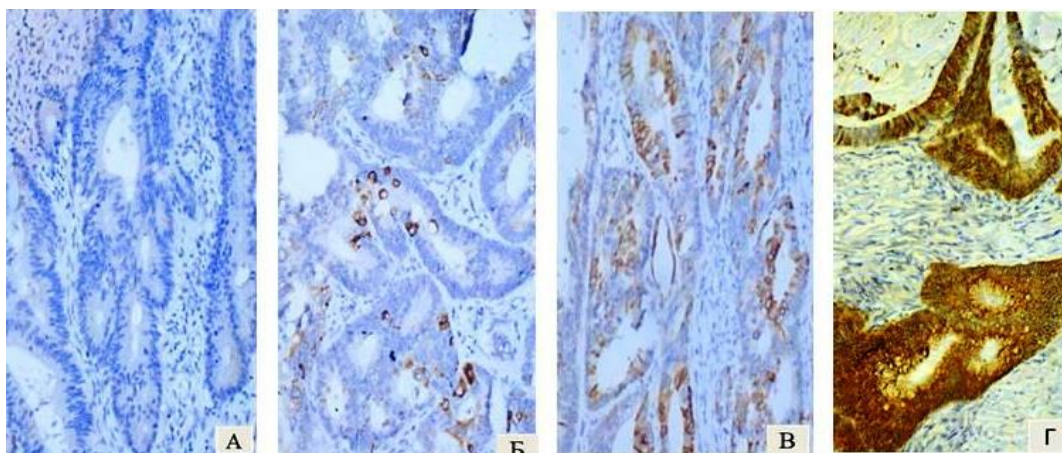
Експресия на протеина APC в туморната тъкан на КРК

Интензивност на експресия на протеина APC при КРК

При 9 (42,86%) от КРК липсва експресия на протеина APC. В останалите 12 (57,14%) КРК има експресия, като в един (8,33%) случай тя е ниска, в 7 (58,33%) случая тя е умерена и в 4 (33,33%) случая тя е интензивна. Средната стойност на интензивност на експресия на протеина е $1,29\pm 1,23$. Липсва статистически значима разлика между интензивността на експресия на протеина APC и клинично-морфологичните показатели: пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий ($p>0,05$). Ние установихме обратнопропорционална зависимост, чрез логистичен регресионен анализ, между интензивност на експресия на протеина APC и метастазите в лимфни възли ($p<0,05$). Ниската експресия на антитялото повишава риска от метастази в лимфни възли.

Процент на експресия на протеина APC в туморната тъкан на КРК

В туморната тъкан на 10 (47,62%) КРК липсва експресия на протеина APC. В 11 (52,38%) КРК има експресия на протеина в туморната тъкан, като в 4 (36,36%) случая експресията е между 6% и 25%, при 1 (9,09%) случай е между 50% и 75% и в 6 (54,55%) случая има над 75%. Данните са представени на фигура 3.



Фигура 3. Процент на експресия на протеина APC при КРК. А. Липсва реакция (степен 0). Б. Площ 6%- 25% (степен 1). В. Площ 51%- 75% (степен 3). Г. Площ >75% (степен 4).
Имунохистохимия А, Б, В x200, Г x400.

Средната процентна стойност на експресия на протеина APC е $26,83 \pm 33,30$.

Липсва статистически значима разлика между процента на експресия на APC и клинично-патологичните показатели ($p > 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ, ние установихме статистически значима разлика между площта на експресия на протеина и метастазите в лимфни възли ($p < 0,05$). Наблюдава се обратнопропорционална зависимост, ниската процентна експресия на антицялото повишава риска от метастази в лимфни възли. Тази зависимост е с достоверност 71,43%

Общ скор на експресия на протеина APC в КРК

Според общия скор, експресията на протеина в 18 (85,71%) случая е ниска, а при останалите 3 (14,29%) е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на антицялото е $3,62 \pm 4,40$. Липсва статистически значима разлика между експресия на протеина APC и клинично-патологичните показатели: пол, размер на тумора, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$). Обратна зависимост се установява между общия скор на протеина APC и възрастта на пациентите с КРК ($p < 0,05$). Експресията на протеина в тумора се понижава с увеличаване на възрастта на пациентите и тази разлика е статистически значима.

Сравнителна оценка на интензитета и площта на експресия на протеина APC между контролната група, туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КРК

Липсва статистически значима разлика в интензивността на експресия на антицялото между всички изследвани групи ($p > 0,05$).

Статистически значима разлика се установи между площта на експресия на протеина APC между несинхронните аденоми и синхронните/метахронни аденоми ($p < 0,05$) и между синхронните/метахронни аденоми и КРК ($p < 0,05$).

Площта на експресия на протеина APC не се различава между останалите групи: контролна група и несинхронни аденоми; контролна група и синхронните/метахронни аденоми; контролна група и КРК и несинхронни аденоми и КРК ($p > 0,05$).

Липсва статистически значима разлика на общия скор на APC експресия и всички групи ($p > 0,05$).

4.3. Експресия на протеина p53 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК

Експресия на протеина p53 в контролната група

Интензивност на експресия на протеина p53 в контролната група

Експресията на анти-p53 антицялото се представя с ядрено оцветяване в епителни клетки на дебелото черво. При 15 (83,33%) случая липсва експресия на антицялото, в останалите 3 (16,67%) случая тя е ниска по интензитет. Средната стойност на интензивност на експресията на протеина p53 в контролната група е ниска ($0,17 \pm 0,38$).

Процент на експресия на протеина p53 в контролната група

Липсва позитивна експресия на p53 в контролната група

Общ скор на експресия на протеина p53 в контролната група

Общият скор на експресия на протеина е 0.

Експресия на протеина p53 в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми

Интензивност на експресия на протеина p53 в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

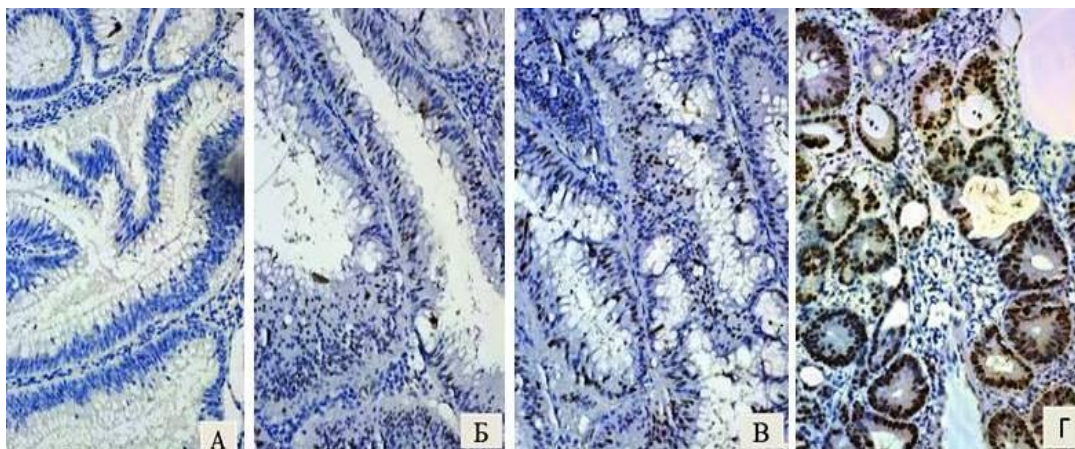
В 7 аденома има експресия на протеина p53, в 5 (71,43%) случая тя е интензивна, при 2 (28,57%) е умерена. При 11 аденома липсва експресия на протеина. Средната стойност на интензивност на експресията на анти-p53 антитяло е $1,06 \pm 1,39$.

Статистически значима разлика се установи между интензивност на експресия на протеина p53 и клиничко-морфологични характеристики: размер, локализация и хистологичен вид на аденомите ($p < 0,05$). Интензивността на експресия на протеина p53 е по-висока при аденоми с по-големи размери, вилозна компонента и локализация в дясната половина на колона.

Процент на експресия на протеина p53 в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

Експресия на p53 се установи при 7 аденома, от тях в 4 (57,14%) случая експресията е в диапазона между 6% и 25%, в 2 (28,57%) случая е между 26% и 50% и в един случай (14,29%) е над 75%. Тя е по-изразена в зоните на дисплазия. В 11 (61,11%) аденома не се установява позитивност (фиг. 4).

Средната стойност на процента на експресия на протеина p53 е $12,5 \pm 24,87$.



Фигура 4. Процент на експресия на протеина p53 при синхронните/метахронни аденоми. А. Липсва реакция (степен 0). Б. Площ 6 - 25% (степен 1). В. Площ 26%-50% (степен 2). Г. Площ >75% (степен 4). Иммунохистохимия
А, Б, В x200, Г x100.

По-висок е процентът на експресия на протеина при по-големи размери на аденомите, при десностранна локализация, вилозна компонента и ниска степен на диференциация ($p < 0,05$).

Общ скор на експресия на протеина p53 в синхронните/метахронни аденоми

Изследвайки общия скор на експресия, при 17 аденома (94,44%) тя е ниска и при един (5,56%) случай е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на антитялото в туморната тъкан е $1,83 \pm 3,04$. Има статистически значима разлика между общия скор и клиничко-морфологичните показатели: размер, локализация и хистологичен вид на аденома. По-високи стойности на общия скор са характерни за аденоми с по-големи размери, вилозна

компонента и десностранна локализация ($p < 0,05$). Липсва статистически значима разлика между общия скор на експресия на антитялото и степента на диференциация ($p > 0,05$).

Експресия на протеина p53 в туморната тъкан на КРК

Интензивност на експресия на протеина p53 при КРК

В 14 (66,67%) КРК има експресия на протеина p53, от тях 12 (85,71%) случая са с висока интензивност на реакцията, при два (14,29%) случая тя е умерена. При 7 (33,33%) случая липсва експресия на протеина.

Средната стойност на интензивност на експресия на антитялото е $1,76 \pm 1,45$.

Не се установява статистически значима разлика между интензивност на експресия на протеина и клинично-морфологичните параметри: пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ не се установи зависимост между интензивност на експресия на антитялото и NM стадий ($p > 0,05$).

Процент на експресия на протеина p53 в туморната тъкан на КРК

В туморната тъкан на 13 КРК има експресия на протеина. В 9 (69,23%) от КРК тя е над 75%, при 2 (15,38%) случая е между 51% и 75%, при 2 (15,38%) случая между 26% и 50%. При 8 случая липсва експресия на антитялото (фиг. 5).



Фигура 5. Разпределение на КРК според процент на експресия анти-p53 антитяло (0 – липсва; 1 между 6% и 25%; 2 между 26% и 50%; 3 между 51% и 75%; 4 > 75%).

Средната стойност на процент на експресия на протеина p53 е $48,10 \pm 41,46$.

Липсва статистически значима разлика между процента на експресия на p53 и клинично-морфологични показатели: пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ не се установи зависимост между площта на експресия на антитялото и NM стадий ($p > 0,05$).

Общ скор на експресия на протеина p53 в КРК

Според общия скор на експресия на протеина, при 12 (57,14%) случая експресията е ниска, а останалите 9 (42,86%) случая са с висока експресия. Средната стойност на общия скор е $6,19 \pm 5,19$. Не се установява статистически значима разлика между общия скор и

изследваните клиничко-морфологичните параметри ($p>0,05$).

Сравнителна оценка на интензитета и площта на експресия на протеина p53 между контролната група, туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК

По-висока е интензивността и площта на експресия на протеина p53 при двете групи: синхронните/метахронни аденоми и КРК в сравнение с контролната група и тази разлика е статистически значима ($p<0,05$).

Липсва статистически значима разлика между интензивността на експресия на протеина p53 при синхронните/метахронни аденоми в сравнение с КРК ($p>0,05$).

По-висок е процентът на експресия на протеина p53 при КРК спрямо синхронните/метахронни аденоми и тази разлика е статистически значима ($p<0,05$).

По-висок е общият скор на експресия на протеина p53 на КРК спрямо двете групи: контролна и синхронни/метахронни аденоми ($p<0,05$).

Липсва статистически значима разлика между общия скор при контролната група и синхронните/метахронни аденоми ($p>0,05$).

4.4. Експресия на протеина SMAD4 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК

Експресия на протеина SMAD4 в контролната група

Интензивност на експресия на протеина SMAD4 в контролната група

Анти-SMAD4 антитялото се експресира в ядрото и цитоплазмата на епителни клетки на нетуморната лигавица и в стромните клетки. В 2 (11,11%) случая липсва експресия на антитялото, в останалите 16 (88,89%) случая разпределението е: 10 аденома с ниска интензивност на експресия и по три случая с умерена и интензивна експресия.

Средната стойност на експресия на протеина SMAD4 в контролната група е $1,38\pm 0,89$.

Процент на експресия на протеина SMAD4 в контролната група

Седем (38,89%) на брой са аденомите, които са оценени като негативни, като в два от тях липсва експресия, а в останалите 5 аденома площта на експресията е под 5%. При останалите 11 (61,11%) случая, експресията се разпределя, както следва: в 4 (36,36%) случая тя е между 6% и 25%, в 3 (27,27%) случая е между 26% и 50%, в един (9,09%) случай е между 51% и 75% и в 3 (27,27%) случая е повече от 75% (фиг. 6).



Фигура 6. Процент на експресия на анти-SMAD4 антитялото в контролната група (0 – липсва; 1 - 6% - 25%; 2 - 26% - 50%; 3 - 51% - 75%; 4 >75%).

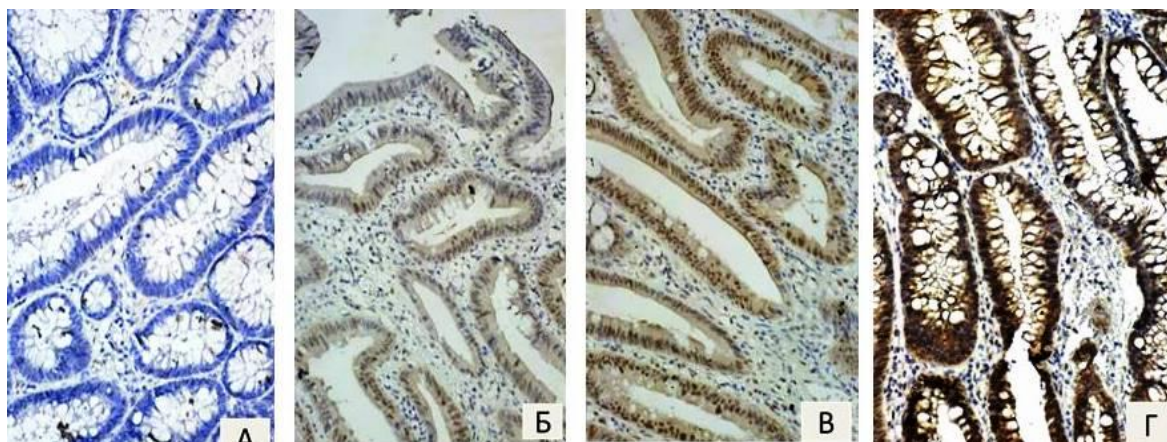
Общ скор на експресия на протеина SMAD4 в контролната група

Според общия скор в 16 (88,89%) случая експресията е ниска, а в 2 (11,11%) случая е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на протеина е $3 \pm 3,39$.

Експресия на протеина SMAD4 в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми

Интензивност на експресия на протеина SMAD4 в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

В 10 (55,56%) случая има експресия на протеина SMAD4, в 6 (60%) случая експресията е интензивна, при 2 (20%) случая тя е умерена и при други 2 (20%) случая е ниска. При 8 (44,44%) случая липсва експресия на антитялото (фиг. 7).



Фигура 7. Интензивност на експресия на протеина SMAD4 при синхронните/метахронни аденоми. А. Липсва реакция (степен 0). Б. Ниска интензивност (степен 1). В. Умерена интензивност (степен 2). Г. Интензивна реакция (степен 3). Имунохистохимия x200.

Средната стойност на интензивност на експресията на анти-SMAD4 антитялото е $1,00 \pm 1,28$.

Статистически значима разлика има между интензивност на експресия на протеина и параметрите: размер, локализация и хистологичен вид аденом ($p < 0,05$). Високата експресия на SMAD4 се открива при аденоми с по-големи размери, локализирани в дясната половина на колона и при вилозна компонента. Липсва статистическа зависимост със степен на диференциация ($p > 0,05$)

Процент на експресия на протеина SMAD4 в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

Броят на аденомите, при които липсва експресия на протеина са 8 (44,44%) случая. В останалите 10 (55,56%) аденома има експресия на протеина SMAD4, като в 7 (70%) случая тя е над 75%, при един (10%) случай е между 26%-50%, при 2 (20%) тя е в диапазон между 6%-25%. Средната стойност на процент на експресия на протеина SMAD4 е $39,72 \pm 44,67$.

Липсва статистически значима разлика между процента на експресия на антитялото и клинично-морфологични показатели: размер, локализация, хистологичен вид на аденома и степен на диференциация ($p > 0,05$).

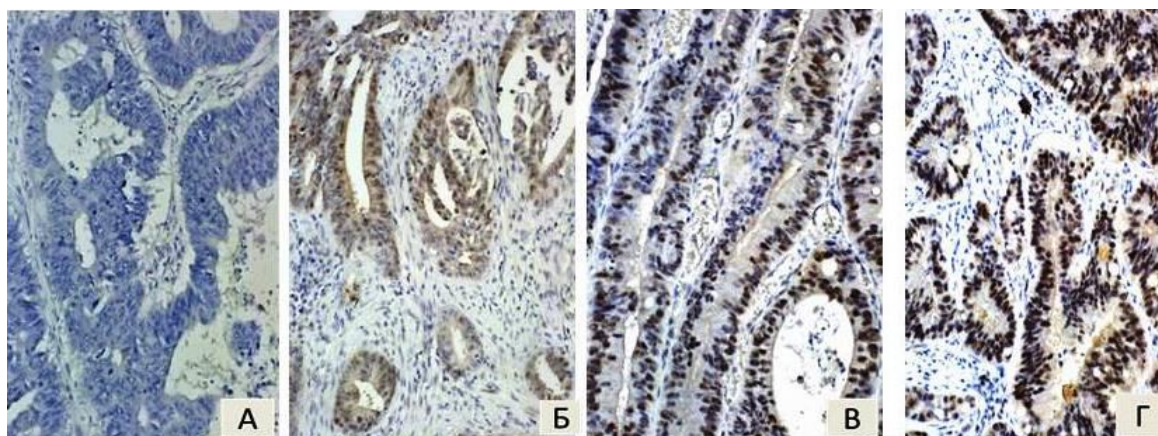
Общ скор на експресия на протеина SMAD4 в синхронните/метахронни аденоми

Въз основа на общия скор на експресията на SMAD4, при 12 (66,67%) аденома тя е ниска и при 6 (33,33%) аденома е висока. Средната стойност на общия скор на експресията на протеина е $4,72 \pm 5,45$. Има статистически значима разлика между общия скор и параметрите: размер, локализация и хистологичен вид на аденома ($p < 0,05$). Високият скор на протеина SMAD4 е характерна за аденоми с по-големи размери, локализирани в дясната половина на колона и наличие на вилозна компонента. Липсва статистически значима разлика със степен на диференциация ($p > 0,05$).

Експресия на протеина SMAD4 в туморната тъкан на КРК

Интензивност на експресия на протеина SMAD4 при КРК

При 11 (57,14%) КРК има експресия на протеина SMAD4, в 4 (33,33%) случая тя е интензивна, при 5 (50%) случая е умерена и 2 (16,67%) КРК са с ниска експресия. При 10 (42,86%) случая липсва позитивна реакция (фиг. 8)



Фигура 8. Интензивност на експресия на протеина SMAD4 при КРК. А. Липсва реакция (степен 0) Б. Ниска интензивност (степен 1). В. Умерена интензивност (степен 2). Г. Интензивна реакция (степен 3). Имунохистохимия x200.

Средната стойност на интензивност на експресия на протеина SMAD4 е $1,14 \pm 1,21$. Липсва статистически значима разлика между интензивност на експресия на SMAD4 и клиничко-морфологични параметри: пол, възраст, размер на туморната формация, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ липсва зависимост между интензивността на експресия на антитялото и NM стадий ($p > 0,05$).

Процент на експресия на протеина SMAD4 в туморната тъкан на КРК

На фигура 9 е представено разпределението на КРК според процент на експресия на протеина SMAD4. В 10 (47,62%) случая липсва експресия, в останалите 11 (52,38%) КРК има експресия на протеина: в 6 (54,55%) случая тя е повече от 75%, при 3 (27,27%) случая е в диапазон между 26%-50% и при 2 (18,18%) случая е между 6%-25%.

В случаите, при които липсва експресия на протеина, един КРК е в Т2 стадий, 6 КРК са в Т3 стадий и 3 случая са в Т4 стадий.



Фигура 9. Разпределение на КРК според процент на експресия анти-SMAD4 антитяло (0 – липсва; 1 - 6% - 25%; 2 – 26% - 50%; 3 - 51% - 75%; 4 - >75%).

Средната стойност на процента на експресия на протеина SMAD4 е $32,86 \pm 40,84$.

Липсва статистически значима разлика между процент на експресия на антитялото и клиничко-морфологични параметри: пол, възраст, размер на туморната формация, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ липсва зависимост между площта на експресия на антитялото и NM стадий ($p > 0,05$).

Общ скор на експресия на протеина SMAD4 при КРК

Според общия скор, експресията на протеина SMAD4 в 18 (85,71%) случая е ниска, а при останалите 3 (14,29%) случая е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на протеина е $3,95 \pm 4,48$. Липсва статистически значима разлика между общия скор на експресия на антитялото и клиничко-патологични показатели: пол, размер на тумора, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$).

Сравнителна оценка на експресията на протеина SMAD4 между контролната група, туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК

Липсва статистически значима разлика между степента на интензивност, площта и общия скор на експресия на протеина SMAD4 между всички изследвани групи: контролна група, синхронните/метахронни аденоми и КРК ($p>0,05$).

4.5. Експресия на протеина MSH2 в контролната група, в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК

Експресия на протеина MSH2 в контролната група

Интензивност на експресия на протеина MSH2 в контролната група

Протеинът MSH2 се експресира в ядрата на епителните клетки на дебелото черво. Преобладават случаите, при които в контролната група не се експресира MSH2 - 11 (61,11%) случая, в останалите 7 случая има експресия на протеина: в 2 (28,57%) случая тя е умерена, в 5 (71,43%) случая тя е ниска. Средната стойност на интензивност на експресията на анти тялото в контролната група е $0,50 \pm 0,69$.

Процент на експресия на протеина MSH2 в контролната група

В 13 (72,22%) от случаите липсва експресия на анти тялото, а в останалите 5 (27,78%) случая експресията варира в диапазон между 6%-25%.

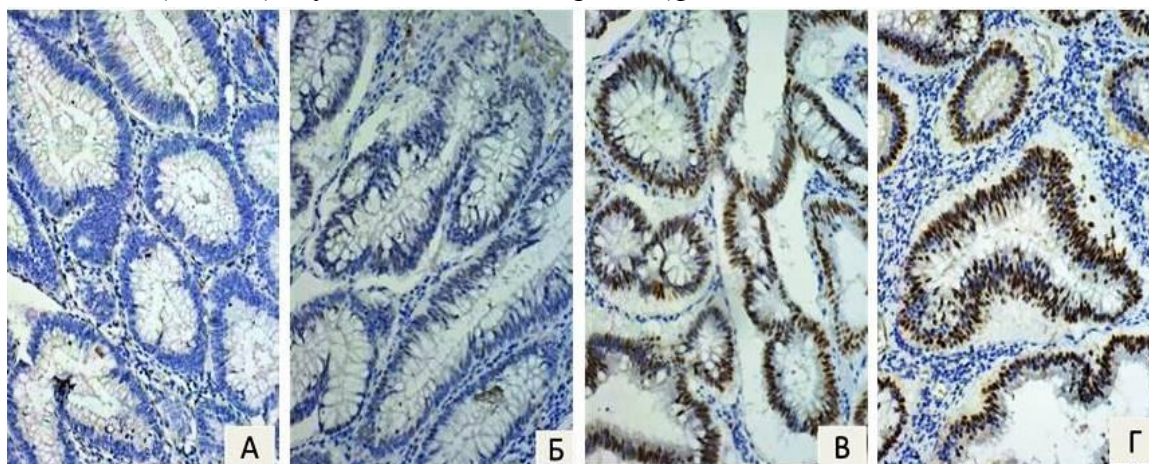
Общ скор на експресия на протеина MSH2 в контролната група

Според общия скор във всички случаи експресията на протеина е ниска. Средната стойност на общия скор е $0,44 \pm 0,68$.

Експресия на протеина MSH2 в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми

Интензивност на експресия на протеина MSH2 в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

Аденомите, които не експресират анти тялото са 9 (50%) на брой. В аденомите, в които има експресия на анти тялото, 2 (22,22%) са с интензивна реакция, при 6 (66,67%) тя е умерена и един (11,11%) случай е с ниска експресия (фиг. 10).



Фигура 10. Интензивност на експресия на протеина MSH2 при синхронните/метахронни аденоми. А. Липсва реакция (степен 0). Б. Ниска степен на интензивност (степен 1). В. Умерена интензивност (степен 2). Г. Интензивна реакция (степен 3). Иммунохистохимия $\times 200$.

Статистически значима разлика се установи между интензивността на експресия на MSH2 и двата показателя: размера и локализацията на аденомите ($p < 0,05\%$).

По-висока интензивност на експресия е характерна за аденоми с по-големи размери и десностранна локализация. При останалите клинично-морфологични показатели не се установява зависимост ($p > 0,05$).

Процент на експресия на протеина MSH2 в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

От общо 18 на брой синхронни/метахронни колоректални аденоми само при два (22,22%) случая процента на експресия на анти тялото е над 75%. При 9 на брой аденоми липсва експресия. На фигура 11 е представено разпределението според процента на експресия на анти тялото.



Фигура 11. Процент на експресия на анти-MSH2 анти тялото в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми (0 – липсва; 1 -6% -25%; 2 - 26% - 50%; 3 - 51% - 75%; 4 >75%).

Средната стойност на процент на експресия на протеина MSH2 е $29,17 \pm 34,57$.

Липсва статистически значима разлика между процента на експресия на протеина и клинично-морфологични показатели: локализация, хистологичен вид и степен на диференциация ($p > 0,05$). Зависимост се наблюдава само спрямо размера на аденоми ($p < 0,05$). По-висок процент на експресия има при аденомите с по-големи размери, спрямо тези с по-малки размери.

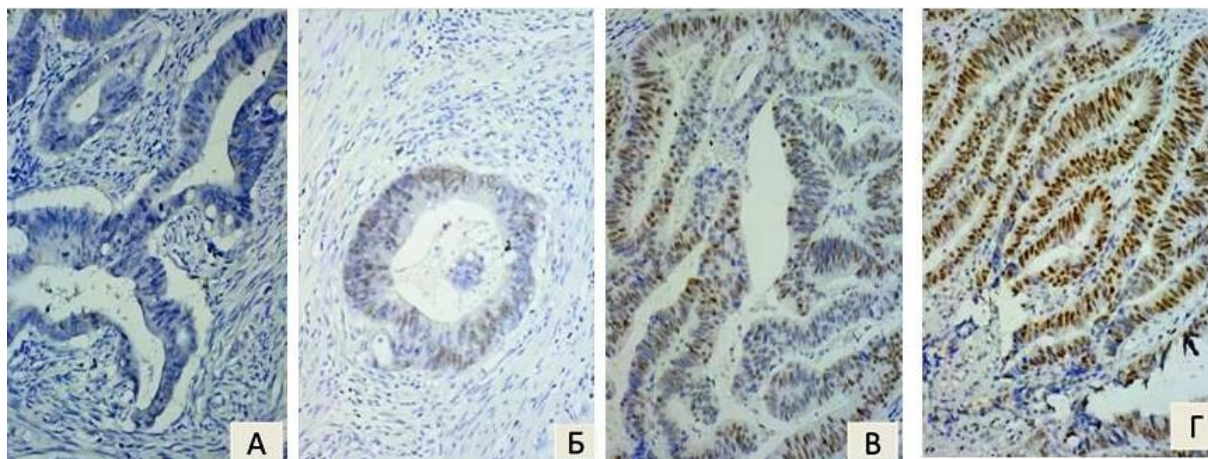
Общ скор на експресия на протеина MSH2 в синхронните/метахронни аденоми

Отчитайки общия скор на експресия на протеина, 16 (88,89%) аденома са с ниска експресия и два (11,11%) случая са с висока. Средната стойност на експресия на анти тялото е $2,94 \pm 3,57$. Има статистически значима разлика между общия скор и размера, локализацията и хистологичен вид на аденома ($p < 0,05$). По-високи стойности на общия скор има при аденомите с по-големи размери, локализирани в дясната половина на колона и наличие на вилозна компонента. Спрямо степента на диференциация липсва статистическа значимост ($p > 0,05$).

Експресия на протеина MSH2 в туморната тъкан на КРК

Интензивност на експресия на протеина MSH2 при КРК

При 15 (71,43%) КРК има експресия на протеина MSH2, при 2 (13,33%) случая тя е интензивна, при 10 (66,67%) случая е умерена и при 3 (20%) КРК е ниска. При 6 (28,57) случая липсва позитивна реакция (фиг. 12).



Фигура 12. Интензивност на експресия на протеина MSH2 при КРК. А. Липсва реакция (степен 0); Б. Ниска степен на интензивност (степен 1); В. Умерена интензивност (степен 2); Г. Интензивна реакция (степен 3). Имунохистохимия x200.

Средната стойност на интензивност на експресията на антитялото е $1,38 \pm 1,00$.

Не се установява статистически значима разлика между интензивност на експресия на протеина MSH2 и клиничко-морфологичните показатели: пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ също не се установява зависимост между експресията на протеина и NM стадий ($p > 0,05$).

Процент на експресия на протеина MSH2 в туморната тъкан на КРК

На фигурата 13 е представено разпределението на КРК според процента на експресия на протеина.



Фигура 13. Разпределение на КРК според процент на експресия анти-MSH2 антитяло (0 – липсва; 1 - 6% - 25%; 3 - 51% - 75%; 4 - >75%).

В 13 (61,90%) КРК има експресия на протеина MSH2, в 5 (38,46%) случая тя е над 75%, при 3 (23,08%) случая е между 51%-75%, при 3 (23,08%) е между 26%-50% и при други 2 (15,38%) случая е между 6%-25%. При 8 (38,10%) КРК липсва експресия. Средната стойност на процент на експресия на протеина е $38,10 \pm 35,20$.

Не се установява статистически значима разлика между процента на експресия на протеина MSH2 и клинично-морфологичните показатели: пол, възраст, размер и TNM стадий ($p > 0,05$). По-висок процент на експресия на антиялото се наблюдава при КРК локализиращи в лявата половина спрямо дясната половина на колона и тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$). На базата на логистичен регресионен анализ не се установява зависимост между експресията на протеина и NM стадий ($p > 0,05$).

Общ скор на експресия на протеина MSH2 в КРК

Според общия скор, в 20 (95,24%) случая експресията е ниска и само при един (4,76%) КРК е висока. Средната стойност на общия скор на експресия на протеина е $3,71 \pm 3,65$. Не се установява статистически значима разлика между общия скор на експресия на протеина и изследваните клинично-морфологичните показатели ($p > 0,05$).

Сравнителна оценка на експресията на протеина MSH2 между контролната група, туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и КРК

По-висока е интензивността и площта на експресията на антиялото при КРК в сравнение с контролната група и тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$).

Между контролна група и синхронни/метахронни аденоми, както и между синхронните/метахронни аденоми и липсва статистически значима разлика ($p > 0,05$).

Липсва статистически значима разлика между отделните групи по отношение на общия скор на експресия на протеина MSH2 ($p > 0,05$).

4.6. Експресия на протеина BRAF в контролната група, в туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КРК

Експресия на BRAF протеин в контролната група

Интензивност на експресия на протеина BRAF в контролната група

BRAF протеинът се експресира в цитоплазмата и ядрото на епителните клетки на дебелото черво. В контролната група на 15 (83,33%) аденома има експресия на BRAF, от тях в 6 (40%) случая тя е интензивна, при 7 (46,67%) е умерена и при 2 (13,33%) е ниска. При 3 аденома липсва експресия. Средната стойност на експресия на антиялото в контролната група е $1,89 \pm 1,08$.

Процент на експресия на протеина BRAF в контролната група

При 15 (83,33%) случая от контролната група има експресия на BRAF, от които в 3 (20%) случая процентната експресия е над 75%, при 6 (40%) случая е между 51%-75%, 3 (20%) случая е експресията между 26%-50% и 3 случая е между 6%-25%. При три (16,65%) случая липсва експресия на протеина

Общ скор на експресия на протеина BRAF в контролната група

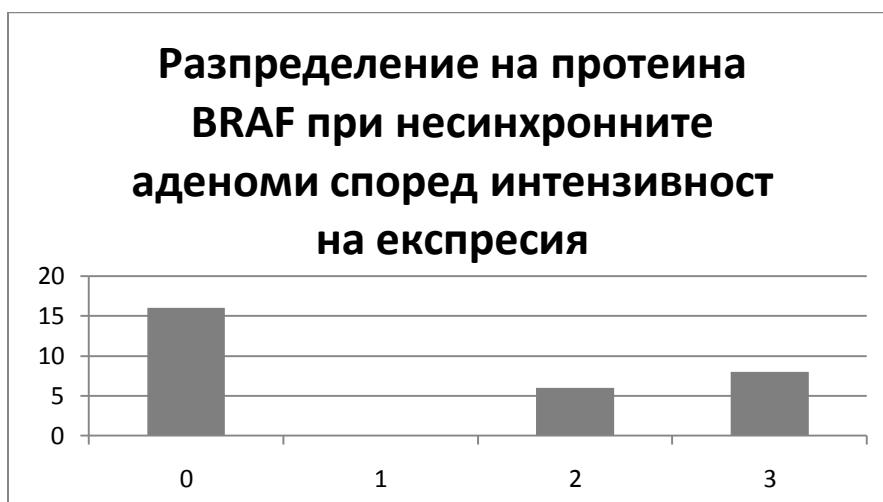
Според общия скор – 12 (66,67%) случая са с ниска експресия на антиялото и 6

(33,33%) са с висока експресия. Средната стойност на общия скор на експресията на протеина е $5,11 \pm 3,86$.

Експресия на протеина BRAF в туморната тъкан при несинхронните аденоми

Интензивност на експресия на протеина BRAF в туморната тъкан при несинхронните аденоми

В 14 (46,67%) аденома има експресия, докато в 16 (53,33%) случая тя липсва (фиг.14).



Фигура 14. Разпределение на несинхронните аденоми според интензивността на експресия на анти-BRAF антитялото (0 – липсва; 1 – ниска; 2 – умерена; 3 – интензивна)

Средната интензивност на експресията на антитялото е $1,20 \pm 1,35$. Липсва статистически значима разлика според интензивността на експресия на антитялото при различните хистологични видове аденоми и между клинично-морфологичните показатели ($p > 0,05$).

Процент на експресия на протеина BRAF в туморната тъкан на несинхронните аденоми

В 14 (46,67%) аденома има експресия на антитялото и в 16 (53,33%) случая липсва експресия (фиг. 15).



Фигура 15. Разпределение на несинхронните аденоми според процент на експресия на

анти- BRAF антитялото (0 – липсва; 1 - 6% - 25%; 2 - 26% - 50%; 3 - 51% - 75%; 4 >75%).

По-висока е експресията на протеина в тубуловилозните спрямо тубуларните аденоми и тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$). Спрямо останалите клинично-морфологични показатели липсва статистически значима разлика ($p > 0,05$).

Общ скор на експресия на протеина BRAF в несинхронните аденоми

При 26 (80%) случая експресията на протеина е ниска, в останалите 4 (20%) случая тя е висока. Средната стойност на общия скор на експресията е $3,27 \pm 4,46$. Липсва статистически значима разлика между общия скор на експресия на антитялото и клинично-морфологичните показатели ($p > 0,05$).

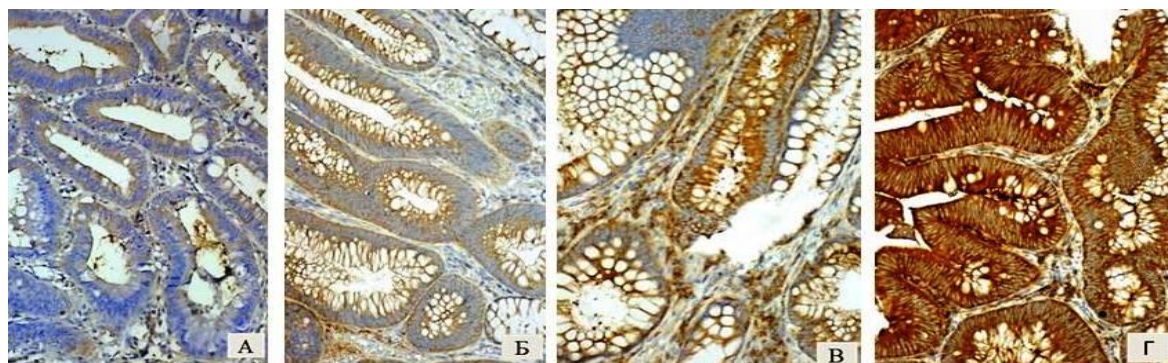
Експресия на протеина BRAF в туморната тъкан при синхронните/метахронни аденоми

Интензивност на експресия на протеина BRAF в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

В 13 (72,22%) аденома има експресия на BRAF, от тях в 5 (38,46%) случая тя е интензивна, при 5 (38,46%) случая е умерена и при 3 (23,08%) случая е ниска. В останалите 5 (27,78%) аденома липсва експресия на антитялото. Средната стойност на интензивност на експресия на протеина е $1,56 \pm 1,19$. Клинично-морфологичните параметри: локализация, хистологичен вид и степен на диференциация не са сигнификантно свързани с интензивността на експресия на BRAF при синхронните/метахронните аденоми ($p > 0,05$). Статистически значима разлика се установи между размера на аденомите и експресията на антитялото ($p < 0,05$). По-висока интензивност на експресия на антитялото е характерна за аденоми с по-големи размери.

Процент на експресия на протеина BRAF в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми

В 13 (72,22%) аденома има експресия на протеина, от тях в 7 (53,85%) аденома процентната експресия е над 75%, при един (7,69%) случай е между 51%-75%, при 3 (23,08%) случая е в диапазон 26%-50% и в два (15,38%) случая е между 6% и 25%. При останалите пет (27,78%) случая липсва експресия на антитялото (Фиг. 16).



Фигура 16. Процент на експресия на протеина BRAF при синхронните/метахронни аденоми. А. Площ 6 - 25% (степен 1); Б. Площ 26%-50% (степен 2); В. Площ 51%- 75% (степен 3); Г. Площ >75% (степен 4). Имунохистохимия x200.

Средната стойност на процент на експресия на протеина е $47,78 \pm 40,81$.

Липсва статистически значима разлика между процента на експресия на анти-BRAF

антитялото при синхронните/метахронните аденоми и изследваните клиничко-морфологични параметри ($p>0,05$).

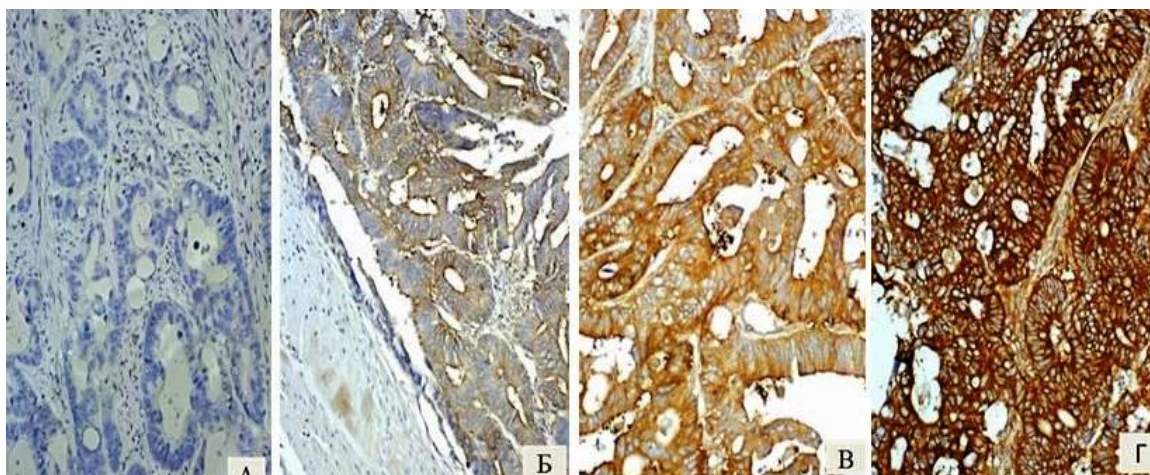
Общ скор на експресия на протеина BRAF в синхронните/метахронни аденоми

Според общия скор на експресия на антитялото, 13 (72,22%) аденома са с ниска експресия и 5 (27,78%) аденома с висока. Средната стойност на общия скор на експресия на протеина е $5,06\pm 4,88$. Липсва статистически значима разлика между общия скор на експресията и клиничко-патологичните параметри: размер ($p>0,05$).

Експресия на протеина BRAF в туморната тъкан на КРК

Интензивност на експресия на протеина BRAF при КРК

В 17 (80,95%) случая има експресия на антитялото, от тях в 10 (58,82%) КРК експресия е интензивна, при 5 (29,41%) е умерена и 2 (11,76%) КРК са с ниска експресия. При 4 (19,05%) случая липсва експресия на протеина (фиг. 17).

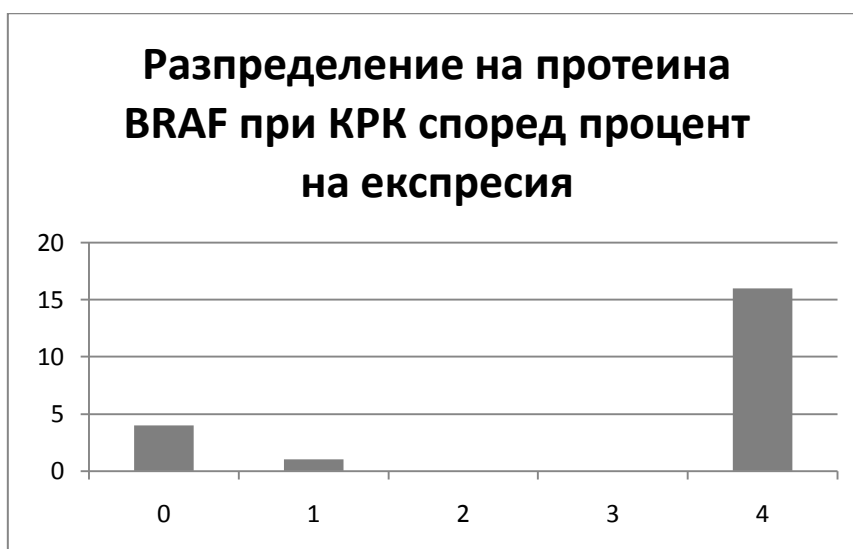


Фигура 17. Интензивност на експресия на протеина BRAF при КРК. А. Липсва реакция (степен 0). Б. Ниска степен на интензивност (степен 1). В. Умерена интензивност (степен 2). Г. Интензивна реакция (степен 3). Имунохистохимия x200.

Средната стойност на интензивност на експресия на протеин е $1,33\pm 1,15$. Липсва статистически значима разлика между интензивността на експресия на протеина BRAF и клиничко-морфологичните показатели: пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий ($p>0,05$).

Процент на експресия на протеина BRAF в туморната тъкан на КРК

В 17 (80,95%) КРК има експресия на BRAF, от тях в 16 (94,12%) КРК процентната експресия е над 75%, при един (5,88%) случай е между 6%-25%. При 4 (19,05%) случая липсва експресия на антитялото (фиг. 18). От 6 КРК в Т4- стадий, 4 са с експресия на протеина $>75\%$, от 11 КРК в Т3- стадий, 8 от тях са с експресия над $>75\%$



Фигура 18. Разпределение на КПК според процент на експресия анти-BRAF антитяло (0 – липсва; 1 - 6% - 25%; 3 - 51% - 75%; 4 - >75%).

Процентната експресия на антитялото е $71,43 \pm 39,44$. Липсва статистически значима разлика между процентната експресия на протеина и клинично-патологични показатели: пол, възраст, размер, локализация и TNM стадий ($p > 0,05$).

Общ скор на експресия на протеина BRAF в КПК

На базата на общия скор почти по равно е разпределението на експресия на протеина, при 11 (52,38%) случая е ниска, а в останалите 10 (47,62%) случая е висока. Средната стойност на експресия на антитялото според общия скор е $7,86 \pm 4,78$. Липсва статистически значима разлика между общия скор на експресия на протеина и клинично-морфологичните показатели ($p > 0,05$).

Сравнителна оценка на експресията на протеина BRAF между контролната група, туморната тъкан на несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и КПК

За BRAF протеина статистически значима разлика се установи само между интензивността, площта и общия скор на експресия между несинхронните аденоми и КПК ($p < 0,05$). При КПК експресията е по-интензивна в сравнение с несинхронните аденоми.

По-висок е процентът на експресия на BRAF при синхронни/метахронни аденоми в сравнение с несинхронните аденоми и разликата е статистически значима ($p < 0,05$).

По-висок е процентът на експресия на протеина при КПК спрямо в контролната група и тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$). В останалите групи: контролна група с несинхронни аденоми, контролна група със синхронни/метахронни аденоми, КПК със синхронни/метахронни аденоми липсва статистически значима разлика ($p > 0,05$).

Експресия на протеина BRAF във връзка с NM стадий на КПК

На базата на логистичен регресионен анализ се установи права корелационна зависимост между интензивността и площта на експресията на протеина BRAF и появата на метастази в лимфните възли ($p < 0,05$). С увеличаване на интензивността и площта на експресия на протеина се увеличава риска от поява на метастази.

Според степента на интензивност чрез логистичния модел може да се прогнозира с точност до 76,19% N стадия на КРК. Прогнозната стойност за присъствие на метастази е с точност 55,56%, а липсата на метастази е с по-голяма точност - 91,67% от случаите

Общият процент на коректно прогнозирани случаи на базата на процента на експресия на протеина BRAF чрез логистичния модел е 71,43%, т.е. моделът е прогнозировал с точност 44.44% присъствието на метастази и липсата им в 91,67% от случаите.

Обратна корелационна зависимост се установи между интензивността и площта на експресията на протеина BRAF протеин и появата на органи метастази ($p < 0,05$). С увеличаване на интензивността и площта на експресия на протеина намалява риска от поява на метастази.

На базата на интензивността на експресия на протеина чрез логистичния модел може да се прогнозира с точност от 85,71% M стадия на КРК. Прогнозната стойност за липсата на метастази е с точност 71,43%, а наличие на метастази е с по-голяма точност - 92,86% от случаите .

Общият процент на коректно прогнозирани случаи на базата на площ на експресия на анти тялото, чрез логистичния модел е 80,71%, т.е. моделът е прогнозировал с точност 92,85 % присъствието на метастази и липсата им в 57,14 % от случаите

5. ДИСКУСИЯ

APC

APC е тумор супресорен ген, който е изследван предимно при фамилната аденоматозна полипоза (Kinzler KW et al. 1991; Nishisho I et al. 1991; Joslyn G et al. 1991). Той е тумор супресорен ген, който предотвратява неконтролирания клетъчен растеж, взема участие в клетъчния делене и иницира процеса на апоптоза. APC протеинът нормално потиска WNT-сигналния път, който участва в тъканната хомеостаза и клетъчната репарация, чрез участието си в протеазомното деградиране на β -catenin (Георгиева М и Тончева Д, 2011). В нетуморната тъкан, ние установихме, че в повечето от случаите има експресия на протеина, което не противоречи на изследвания на Iwamoto M et al. (2000), които установяват, че експресията на протеина в контролната група е по цялата дължина на криптите, но е най-изразена в чашковидните клетки. Yang K et al. (2008) при експериментален модел при плъхове установяват, че КРК може да се развие дори при липса на мутация на APC. Според авторите, този процес може да бъде свързан с намаляване производството на муцин от чашковидните клетки при остри и хронични възпалителни процеси на дебелото черво. (Burgess AW et al., 2011).

Според площта и интензивността на реакция на APC протеина в около половината от случаите на несинхронните аденоми липсва експресия на антитялото. Получените от нас резултати се различават от Iwamoto M et al. (2000), според които експресия липсва в 29% от случаите, при изследваните от тях 59 аденома.

Ние установихме, че в по-голяма част от аденомите, при които липсва експресия на APC протеина са с размери под 1 см и са верифицирани като високодиференцирани аденоми. Ние считаме, че липсата на експресия на протеина и на анамнестични данни за КРК може да се дължи на високата честота на нуклеотиден полиморфизъм, установен при APC гена с последващо развитие на аденоматозни полипи (Wong et al., 2010).

От друга страна по-високият процент на експресия на APC протеина при несинхронните аденоми в сравнение със синхронните/метахронни аденоми изисква допълнително изследване на тъканната експресия на β -кетанин, който е по-чувствителен маркер за риска от развитие на КРК.

Ние не намерихме статистически значима разлика между хистологичния тип на несинхронните аденоми със степента на интензивност и процент на експресия на APC протеина ($p > 0,05$). Тези резултати не се различават от проучвания на Bortlík M et al. (2004).

От особен интерес в последните години са изследванията при синхронни/метахронни колоректални аденоми с цел анализиране и идентифициране на генетичните изменения, свързани със злокачествена трансформация и проследяване на геномната еволюция (Kim TM et al., 2015). Данните от литературата са противоречиви относно произхода на синхронни/метахронни аденоми и КРК, дали КРК води началото си от мутантен клон още ниво аденом или двете лезии са възникнали независимо една от друга.

Спорен е въпроса относно влиянието на протеина APC върху злокачествена трансформация на синхронни/метахронни аденоми. Получените от нас резултати показват, че в 22,22% от изследваните синхронни/метахронни аденоми липсва експресия на протеина. В останалите случаи, аденомите са с варираща експресия на антитялото. Различната площ на експресия на протеина, най-вероятно е резултат на мутация на един от алелите на APC гена, докато пълна липсва на експресия, т.е. инактивация на гена се наблюдава в 30% от аденомите

(Iwamoto M et al., 2000). Според Bodmer W et al. (1994) загубата на един алел на гена е достатъчен фактор за увеличаване на размерите на аденома чрез доминиращия отрицателен ефект от APC протеинови хомодимери. Злокачествената трансформация започва с т. нар. "втори удар" в клетките на аденома, когато настъпи мутация и на втория алел. Вариращата APC експресия е наблюдавана и от други автори (Bortlik M et al., 2004). Според авторите това се дължи на единична мутация в APC гена във всички клетки, в някои от тях има биалелна инактивация. Според други автори нехомогенната експресия на APC протеина се дължи на едновременна биклонална експанзия.

На базата на вариращата експресия, по площ и интензивност, общия скор е подходящ за оценка на тъканната експресия на APC протеина. Ние установихме ниска експресия на базата на общия скор при несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и в туморната тъкан на КРК, което може да бъде ключов механизъм при възникването на аденоми и за пътя на прогресия от аденом към КРК.

Ние, подобно на Zsuzsanna P et al. (2012), установихме, че липсва статистически значима разлика между интензивността и площта на експресия на протеина и локализация на аденомите в лявата и дясна половина на колона ($p > 0,05$), но се наблюдава по-висока процентна експресия при високодиференцираните в сравнение с нискодиференцираните аденоми, което показва, че APC протеина вероятно блокира преминаването на клетките от G1 към S фаза на клетъчния цикъл (Powell SM et al., 1992).

Спрямо клинично-морфологичния профил, малигненият потенциал на аденомите се определя от размера: >1 см, ниска степен на диференциация и наличие на вилозна компонента (Lieberman DA et al., 2000). Ние, подобно на други поручвания (Bortlik M et al., 2004) не открихме статистически значима разлика между тези показатели и експресия на протеина. Някои автори съобщават за по-висока честота на мутация на APC гена при тубуловилозните и вилозни аденоми и участието му в туморна прогресия (De Benedetti L et al., 1994).

В 47,62% от случаите на КРК, ние не открихме експресия на APC протеина за разлика от синхронните/метахронни аденоми, където експресия липсва само 22,22% и тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$). Iwamoto ML et al. (2000) не откриват APC протеин в 83% от карциномите и в 29% от аденоми. Според нас, тези различия се дължат на по-големия брой пациенти в тяхното проучване. Те изследват APC протеина при 83 случая на КРК, докато ние изследвахме 21 случая. Ние считаме, подобно на Iwamoto ML et al. (2000), че липсата на APC протеина може да се приеме за неблагоприятен прогностичен фактор при аденоматозните полипи и независимо от тяхната морфология се повишава риска за малигнизация.

Ние не установихме статистически значима разлика между експресията на APC протеина при КРК и следните клинично-морфологични показатели: пол, възраст, размер, локализация и Т- и М- стадия ($p > 0,05$). Получените данни са съответствие с резултатите на Lugli A et al. (2007), които подобно на нас не откриват зависимост между пол, възраст, размер, локализация на КРК и експресията на APC протеина. Birnbaum DJ et al. (2012) освен изброените по-горе показатели не установяват зависимост между Т- и М- стадия на КРК и експресията на APC протеина ($p > 0,05$). На базата на обширен метаанализ, включващ 24 изследвания и 2025 пациенти не се открива статистически значима разлика между хиперметилацията на APC протеина, отговаряща за неговата липса и клинично-морфологични показатели (Liang TJ et al., 2017). Според същите автори, APC мутацията е ранно събитие в карциногенезата и може да бъде ранен диагностичен маркер за поява на КРК. В допълнение

те посочват, че APC метилирането не е свързано с общата преживяемост при пациентите. Хиперметилация на APC, която води до загуба на експресия на APC според е нас също е ранно събитие, което настъпва още при синхронните/метахронни аденоми.

Ние установихме обратна корелационна зависимост между експресия на протеина и метастазите в лимфни възли. Чрез логистичен регресионен анализ се доказва, че ниската експресия на APC протеина повишава риска от появата на метастази в регионалните лимфни възли. Тези резултати са в съответствие с тези на Li BQ et al. (2017). Получените резултати трябва да се имат предвид при определяне прогнозата на пациентите с КРК и за определяне на терапевтичния подход.

В заключение може да твърдим, че APC протеин участва не само в ранните фази на колоректалната канцерогенеза, но е и рисков фактор за метастазиране на КРК.

p53

p53 е тумор супресорен ген, който регулира апоптозата и мутациите в гена водят до високата пролиферативна активност на неопластично трансформирани клетки, поради загуба на контрол на апоптозата (Aubrey VJ et al., 2018). Почти пълната липса на експресия на протеина p53 в контролната група и появата му при синхронните/метахронни аденоми и КРК показва, че експресията на p53 протеина отговаря на мутантната му форма и имунохистохимичното изследване е достоверен метод за откриване мутациите на гена (Kaklaminis L et al., 1993).

Получените от нас резултати показват, че експресията на анти тялото определена чрез интензитет на реакцията и общия скор корелира с размера на аденомите, тяхната локализация, вилозната им компонента и степента им на диференциация ($p < 0,05$). Основните морфологични параметри, предиктори за авансиране на аденомите, са техният размер, мултипленост и степента им на диференциация (Iordache S et al., 2006).

Ние установихме, че процентната експресия на протеина p53 е по-висока при аденоми с размери над 1 см, десностранна локализация, присъствие на вилозна компонента и ниска степен на диференциация, в сравнение с аденоми с по-малки размери, локализиращи в лявата половина на колона, липса на вилозна компонента и с добра диференциация. Тези резултати са в съответствие с данните получени от други изследвания, при които също се открива зависимост между експресията на p53 и степента на диференциация на аденомите, по-високата експресия е характерна за нискодиференцираните аденоми (Xi HQ et al., 2017).

При един от изследваните синхронни/метахронни аденоми експресията на p53 е висока, над 75% от площта. Аденомът е с размери 1 см, от тубуларен тип, с ниска степен на диференциация и е локализиран в лявата половина на колона. Пациентът е мъж на 61 години. Тези клинично-морфологични показатели покриват отчасти профила на високо рисковите аденоми, при които се наблюдава интензивна експресия на p53 протеина, размери ≥ 1 см, висока степен на дисплазия и наличие на вилозна компонента (Bond JH. 2000; Di Gregorio C et al., 2014). Според нас, високата експресия на p53 в тубуларните аденоми, показва, че за стратифициране на пациентите с тубуларни аденоми с висок риск от малигнизация към хистологичните критерии трябва да се добавят и молекулярни маркери.

Редица автори считат, че отчитането на експресията на p53 протеина в тубуларните аденоми е задължително условия за определяне риска на аденоматозните полипи от злокачествена трансформация (Yamaguchi A et al., 1994).

Експресията на p53 е с различен интензитет и площ в зоните на умерена и тежка дисплазия, което налага използване на тристепенната скала за степен на диференциация. Според нас тя е по-подходяща отколкото използваната понастоящем двустепенна скала на високо- и нискодиференцирани аденоми, т.к. по този начин се стратифицира риска за малигнизация.

Ние установихме, че експресия на протеина p53 има в повече от половината КРК - 13 (61.9%) случая, като преобладава високата степен на експресия - в 9 (69,24%) случая процентната експресия на протеина е над 75%. Тези резултати не противоречат на резултатите от други проучвания, при които положителна реакция на протеина е установена между 50% и 75% от случаите на КРК (Morán A et al., 2010). Те са в съответствие с данните, че p53 позитивността е между 43% и 86,36% (RambauPF et al., 2008; Qasim B et al., 2012; Ghita C et al., 2012). Според нас, методите на оценка на тъканната експресия на протеина p53 са от съществено значение за несъответствията в получените резултати.

Връзката между експресията на p53 протеина и клинично-морфологичните характеристики на КРК все още не е напълно изяснена (Сао DZ et al., 2017). Получените от нас резултати показват, че интензивността, площта и общия скор на експресия на p53 протеина при КРК, не корелира с никой от изследваните клинично-морфологични показатели като възраст, пол, размер, локализация и TNM стадий на тумора ($p>0,05$).

Ние, подобно на други автори като PraSad GR и Banda S. (2017) не открихме статистически значима разлика между експресия на протеина и пола на пациентите с КРК. Liang JT et al. (2002) установяват зависимост между експресия на p53 и пола на пациентите, по-изразена е експресията в туморната тъкан на пациенти с КРК от мъжки пол, в сравнение с женския пол.

Спорен е въпросът относно връзката между експресията на p53 протеина и възрастта на пациентите с КРК. Според някои автори (Slattery ML et al., 2004) с възрастта експресията на протеина p53 в туморната тъкан на КРК се повишава, а според други липсва подобна зависимост (Jerjees DA et al., 2009; Akshatha C et al., 2016). Ние считаме, че тези различия са свързани с възрастовото разпределение на пациентите. В проучването на Akshatha C et al. (2016) пациентите са разделени в две възрастови групи: под и над 40 години, а при изследването на Jerjees DA et al. (2009) границата на възрастовото разпределение е 55 години.

Статистически значима разлика липсва между p53 протеина и размера на тумора ($p>0,05$), което съответства на резултатите на Asaad NY et al. (2000) и се различава от данните на Demirba S et al. (2006). Според последните автори по-висока процентна експресия на протеина има при тумори над 5 см, докато в нашето проучвания туморните формации са под 5 см.

Ние, подобно на други автори (Contu PC et al., 2006; Sharifi N et al., 2009) не установихме зависимост между тъканната експресия на p53 и локализация на КРК ($p>0,05$). Според Paluszkiewicz P et al. (2004) съществува статистически значима разлика между двата показателя. Те установяват, че акумулацията на протеина p53, в туморните клетки на КРК е свързан с понижена обща преживяемост и е независим прогностичен маркер при КРК локализиращи в лявата половина на колона (Paluszkiewicz P et al., 2004). Диетичният режим, различната експозиция, чувствителност към канцерогенни и половите хормони могат да са фактори, които също участват в колоректалата карциногенеза (Matsuda K et al., 2000).

Връзката между експресията p53 и TNM стадия все още е спорна. Според получените от нас резултати и тези на Adrover E et al. (1999) и PraSad GR и Banda S (2017), липсва

зависимост между двата показателя ($p > 0,05$), а според други изследвания има обратна корелация между експресията на протеина p53 и T- стадия на КРК (Gurzu S et al., 2007). Gurzu S et al. (2007) установяват експресия в 75% от туморите в pT1, 65% при pT2 и 40% при pT3. Според Wang P et al. (2017) p53 е независим и неблагоприятен прогностичен фактор, защото p53 позитивните тумори са асоциирани с по-висока степен на малигненост, авансирал туморен стадий с метастази в лимфните възли и с намалена обща преживяемост. Ние считаме, че различните резултати не са свързани със стадия на заболяването, защото повечето от КРК в настоящото изследване са в T3 и T4 стадий, както и при изследването на Wang P et al. (2017). На базата на получените от нас резултати, ние считаме, че p53 не е прогностичен фактор при КРК.

Според редица изследвания, позитивната имунохистохимична реакция е отражение на мутация в *p53* гена (Kariteijn E et al., 2001; Zhao D et al., 2005; Huang C et al., 2006). Не винаги липсата на експресия на p53 протеина изключва мутации на ген *p53* (Rambau PF et al., 2008). Akshatha C et al. (2016) установяват, че при 16% от пациентите с КРК и мутация в *p53* гена, имунохистохимично липсва експресия на протеина. Те откриват, че протеин p53 е най-често позитивен при мутация на p53 от мисенс тип, защото стабилността на протеина се повишава, предотвратява се разцепването му и това го прави възможен за имунохистохимично откриване. Липсата на експресия на протеина p53 може да се дължи на мутации от типа на делеция на p53 и в тези случаи молекулярните методи са единствените методи за откриване на съществуващите мутации (Nassierowsken-Guttmejer A et al., 2000; Colomer A et al., 2003). Мисенс мутациите на p53 са най-чести и съответствие между генетичния анализ и имунохистохимичната експресия на протеина се установява в 75% от случаите, докато според други изследвания чувствителността нахвърля 94% (Servomaa K et al., 2000; Kariteijn E et al., 2001). Според нас, вида на p53 мутациите и използваните антители за имунохистохимичен анализ могат да обяснят поне отчасти несъответствията в резултатите между различните изследвания.

Акумулирането на p53 е предиктор за малигнизация на колоректалните аденоми и за участие в аденом карциномната туморна прогресия. В контролната група почти липсва експресия на p53 протеина в ядрата на епителните клетки. Подобни резултати са установени и от други автори, които също не намират експресия на p53 в нормална колоректална тъкан (Kaklamanis L et al., 1993; Kruschewski M et al., 2011). Получените от нас резултати показват, че фонът за поява на синхронни/метахронни аденоми не е асоцииран с нарушения в процеса на апоптоза, регулирана от ген *p53*. Липсата на експресия на протеина p53 в ядрата на нетуморните клетки и появата му при аденомите и по-изразената експресия при КРК показва, че протеин p53 участва в по-късните етапи на КРК. Тези резултати са в съответствие с проучванията на други автори, според които мутациите на p53 са късно събитие в туморогенезата при КРК (Sheikh RA et al., 2003; Ishii T et al., 2011; Qasim B et al., 2012).

Според нас ядрената експресия на p53 в епителните клетки на аденоматозните полипи е предиктивен фактор, който трябва да се има предвид при оценка прогресия на аденомите.

SMAD4

Едно от най-важните събития в колоректалната канцерогенеза е загубата на хетерозиготност върху късото рамо на 18 хромозома – т.е. LOH 18q хромозома, където е

локализиран *SMAD4/DPC4* гена. SMAD4 протеинът е централен медиатор в TGF- β /SMAD4 сигналния път и неговата инактивация се наблюдава в 50% от случаите на дуктален аденокарцином на панкреаса (Ahmed S et al., 2017) и около 30% при тези на КПК (Zhao M et al., 2018). За разлика от панкреаса, където този ген се определя като един от ключовите гени в развитието на аденокарцином на панкреаса, проучванията в колоректалната канцерогенеза са малко на брой и участието на SMAD4 е недостатъчно проучено във връзка с туморната инициация и прогресия (Salovaara R et al., 2002).

В контролната група, в повече от половината случаи (88.89% интензивност и 61,11% по площ) има експресия, но тя изразена в различна степен. SMAD4 протеинът се открива в ядрата и цитоплазмата на епителните клетки на лигавицата на дебелото черво. Според Korchynsky O et al. (1999) при физиологични условия SMAD4 протеина участва в клетъчна диференциация и апоптоза на епителните клетки на криптите. Данните от литературата, показват, че липсата на експресия на протеина съответства на мутация на *SMAD4* гена (Alazzouzi H et al., 2005; Voorneveld PW et al., 2015).

Ние установихме, че експресия на SMAD4 в 45,44%, определена на базата на интензивност и площ липсва при синхронните/метахронни аденоми. Резултатите от контролната група и от синхронните/метахронни аденоми взети заедно показват, че в сравнение с контролната група има редуциране на интензивността на експресия и площта на SMAD4 протеина, но разликата не е статистически значима. Според нас, развитието на аденоматозни полипи, поне отчасти може да е свързано с мутации на *SMAD4* гена, поради отпадане на инхибиторното действие на протеина. A. Maitra et al. (2000) считат, че мутациите в *SMAD4* гена нямат отношение към ранните фази на канцерогенеза. Независимо от намалената експресия на SMAD4 протеина в около половината от синхронните/метахронни аденоми, неговата площ на експресия не корелира с размера на аденомите, локализация, хистологичния вид и степен на диференциация ($p > 0,05$). Липсата на зависимост може да се обясни с хетерогенност на експресията на SMAD4 протеина, която най-вероятно е асоциирана с хетерозиготна мутация (в един от алелите) и появилата се мутация може да участва на по-късен етап на колоректалната канцерогенеза (Xiaoling X et al., 2000; Salovaara R et al., 2002).

Аденомите, при които липсва експресия на SMAD4 са тубуларни и тубуловилонни, като по-голямата част от тях са високодиференцирани и имат размери до 1 см, клинично-морфологични показатели, присъщи предимно за аденоми с нисък малигнен потенциал. Получените от нас резултати показват, че независимо от липсата на инхибиция от страна на SMAD4 протеина, синхронните/метахронни аденоми с подобни параметри трябва да се разглеждат като ниско рискови аденоми.

Статистически значима разлика се установи между интензивността на експресия на SMAD4 протеина и скората му от една страна и клинично-морфологични параметри като размер, локализация и хистологичен вид от друга страна ($p < 0,05$). Висока интензивност и експресия и висок общ скор имат аденомите с големи размери, локализирани в дясната половина на колона, с вилонна компонента. Според нас, експресията на SMAD4 протеина при високо рисковите аденоми, може да означава неефективна инхибиция на протеина.

При 42,86% от КПК при настоящото изследване липсва експресия на SMAD4 протеина, находка, която е в съответствие с данните от други проучвания, при които експресия липсва между 30% и 40% (Voorneveld PW et al., 2015). Ние, подобно на други автори (Zhang B et al., 2014; Isaksson-MettÄvainio M et al., 2006; Jia X et al., 2017) не

установихме статистически значима разлика между експресия на протеина и пола на пациентите ($p>0,05$). Някои автори (Sarshekeh AM et al., 2017) намират, че мутацията на *SMAD4* гена е по-честа при жени, отколкото при мъже.

Статистически значима разлика не се установи между експресията на *SMAD4* протеина и възрастта на пациентите ($p>0,05$), което е в съответствие с резултатите на Sarshekeh AM et al. (2017). При имунохистохимичното изследване на *SMAD4* протеина, Chung Y et al. (2018), които изследват 529 пациенти на възраст между 17 и 87 години също не откриват подобна зависимост. Тези резултати са потвърдени и молекулярно-генетичен анализ на *SMAD4* гена от Sarshekeh AM et al. (2017), които анализират мутационния статус на 734 КРК чрез ДНК секвенатор и отново не откриват зависимост от възрастта на пациентите.

Статистически значима разлика липсва между *SMAD4* протеина и размера на тумора ($p>0,05$), което съответства на резултатите на Sarshekeh AM et al. (2017). Подобни са резултатите, получени от Chung Y et al. (2018) които анализират експресията на *SMAD4* протеина във връзка с размерите на тумора, като разглеждат две категории: под 4,5 см и над 4,5 см.

По отношение на *SMAD4* протеина ние, подобно на други автори (Isaksson-MettÄvainio M et al., 2006;), не установихме статистически значима разлика между локализация на тумора и тъканната експресия на *SMAD4* ($p>0,05$).

Анализите върху *SMAD4* протеина при КРК не откриват никаква статистически значима разлика между интензивността, площта и общия скор на експресия на *SMAD4* протеина и TNM стадий ($p>0,05$). Резултати, получени от нас показват, че с увеличаване на Т стадия се увеличават броят на случаите с КРК, при които липсва експресия на анти тялото, но разликата не е статистически значима. Подобна тенденция е наблюдавана и при проучванията на Vasman et al. (2007), които изследват експресията на *SMAD4* протеина във връзка с Т стадия. Според Maitra et al. (2000) експресията на *SMAD4* протеина във връзката Т стадия намалява съответно с 0%, 8%, 6% и 22% с увеличаване на туморния стадий I до IV при КРК.

Противоречиви са резултати относно прогностичната стойност на експресията на *SMAD4* протеина при КРК за поява на метастази в лимфните възли (Laurent-Puig P et al., 1992; Lanza G et al., 1998; Watanabe T et al., 2001). Ние не установихме статистически значима разлика между експресия на протеина и N- стадия на КРК. Редица изследвания показват, че загубата на *SMAD4* протеина е асоциирана с напреднал стадий на КРК, присъствие на лимфни метастази и неблагоприятна прогноза (Ahn BK et al., 2011; Parageorgis P, et al., 2011; Zhang B et al., 2010). Прилагайки полимеразна верижна реакция (PCR), Ogunbiyi OA et al., (1998) откриват, че алелните загуби в дългото рамо на хромозома 18q при пациенти във II клиничен стадий след проведена химиотерапия повишава риска от рецидив. *SMAD4* протеинът не е предиктор за рецидив след проведената терапия, но селектира пациенти с ранен рецидив (Zhang B et al., 2010; Ahn BK et al., 2011; Parageorgis P, et al., 2011). Липсата на експресия на *SMAD4* протеина е свързана с повишаване на риска от поява на метастази в лимфните възли при пациенти с КРК (Alazzouzi H et al., 2005). Du Y et al. (2014) на базата на метаанализ, стигат до заключението, че загубата на експресия на *SMAD4* протеина е лош прогностичен маркер. Повечето проучвания установяват, че инактивацията на *SMAD4* гена е късно събитие в колоректалната канцерогенеза и загубата на протеина е свързана предимно с прогресията на тумора и с появата на далечни метастази (Miyaki M et al., 1999; Koyama M et al., 1999). Според нас липсата на зависимост между експресията на *SMAD4* протеина и TNM стадия се дължи на малкия брой пациенти с КРК.

MSH2

MMR системата е важен фактор за коригиране на грешки и заличаване на несъответствия при репликация и сдвояване на ДНК молекулата (Iyer R et al., 2006). Мутацията в тези гени води до MSI и развитие на неоплазми в дебело черво, яйчник, панкреас, ендометриум и др. (Brooks-Wilson A et al., 2004). В нормалната лигавица MSH2 се експресира в ядрата на епителните клетки на дебелочревните крипти, резултати наблюдавани и от други автори (Kheirleseid EA et al., 2013; Toon CW et al., 2013; Vakiani E et al., 2015). При наличие на мутация на MSH2, протеинът липсва (Stone JG et al., 2001; Kheirleseid EA et al., 2013). При сравняване на генетичния анализ с имунохистохимичното изследване се открива висок процент на чувствителност (77% - 100%) и специфичност (98% - 100%) (Stone JG et al., 2001; Ruzkiewicz A et al., 2002; Lindor NM et al., 2002).

Данните от литературата показват, че експресията на MSH2 протеина в ядрата на епителните клетки е индикатор за активност на ДНК mismatch repair механизма, а липсата му повишава риска от развитие на колоректални неоплазми, но липсват достатъчно проучвания и доказателства в тази насока (Sidelnikov E et al., 2009).

Тоталната липса на експресия в контролната група в два от случаите, според нас може да се дължи на инактивиране на *MSH2* гена чрез ДНК метилиране (Sidelnikov E et al., 2009), което води до т.н. „дефект на полето” (field defect или field of cancerization) при хистологично нормално дебелочревна лигавица. Освен при хора, подобен дефект на полето е установен при експериментален модел при мишки, при който участва друг представител на MMR гените - *MLH1* (Pussila M et al., 2018). Дефект на полето е участък от видимо запазена архитектурна на лигавицата, но генотипно променена с риск от развитие на доброкачествени и злокачествени неоплазми (Bernstein C et al., 2008).

В половината от случаите, ние не открихме експресия на MSH2 протеина в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми. Липса на експресия на протеина е установена и от други автори (Zsuzsanna P et al., 2012), но честотата е малко по-ниска - 45,7% и тази разлика, според нас се дължи на факта, че в това проучване са включени и хиперпластни полипи. При други проучвания между 3% и 20% от случаите липсва позитивност за MSH2 протеин, но пациентите включени в изследванията са доста повече на брой (Yasugi A et al., 2008; Molaei M et al., 2011; Lee KH et al., 2011).

Сравнявайки трите показателя: процент на експресия, степен на интензивност и общ скор със степен на диференциация, ние не установихме статистически значима разлика. Отчитайки само процентната експресия на MSH2 протеина липсва статистически значима разлика и спрямо локализация и хистологичен вид на синхронните/метахронни аденоми. Тези резултати съвпадат с проучвания на други автори (Molaei M et al., 2011; Rammeh S et al., 2014). Липсата на зависимост потвърждава теорията, че промените в MMR протеина са рядко събитие в развитието на колоректалните аденоми, но все пак високият процент на редуцирана експресия налага необходимост от по-големи проучвания на пациенти (Rammeh S et al., 2014). Това се налага и от факта, че намерихме статистически значима разлика с интензивност и общ скор на експресия на протеина спрямо локализация и размера – по-ниска степен на експресия при левостранна локализация на тумора и размери под 1 см, а при общия скор спрямо и хистологичен вид на аденома. Проучванията в тази област не са напълно изяснени и не може да се изключи ролята му в началните фази на канцерогенеза.

Анализът на тъканната експресия на MSH2 в туморната тъкан на КПК показва, че в

38,10%. от случаите няма позитивна процентна експресия, като интензивността е още по-ниска - 28,57%. Тези резултати не се различават от данните на литературата, според които експресия липсва в 27,23% (Sun Z et al., 2014). Липсата на експресия на протеина показва зависимост от расата и етническата принадлежност, което може да се дължи на различни фактори като хранителен режим, метаболизъм на организма и др. Идентифицирането на епигенетичните промени, факторите на околната среда сред расовите и етническите групи, може да допринесе за разбиране профила на КПК (Carethers JM. 1999) Малко на брой са проучванията, които изследват връзката между MMR гените и спорадичния КПК (Sun Z et al., 2018).

Ние, подобно на други автори не открихме статистически значима разлика между експресия на MSH2 протеина и пола на пациентите ($p>0,05$) при случаите с КПК (Kam G et al. 2001; De Jesus-Monge WE et al. 2010). Подобно на Sun Z et al. (2014) в настоящото проучване липсва зависимост между възрастта на пациента и експресията на протеина ($p>0,05$) (Sun Z et al., 2014). Такава не е установена и между MSH2 протеина и размера на тумора ($p>0,05$), дори при КПК с размери над 6 см, находка наблюдавана и от други автори (De Jesus-Monge WE et al. 2010; Sun Z et al. 2014). Статистически значима разлика се установи между експресията на MSH2 протеина и локализация на тумора ($p<0,05$), като тя е по-редуцирана в дясната половина на колона, находка, установена и от други (Kawakami H et al., 2015; Kumar A et al., 2018). Това може да се дължи на факта, че редуциранта експресия на MMR гените е тясно свързана с MSI-H, която е по-честа при десностранна локализация (Sun Z et al., 2014). КПК с MSI-H са по-малко агресивни и по-добър отговор към адювантна химиотерапия (Kaur G et al., 2011).

Според някои автори, ИХХ изследването на MSH2 може да се използва като скрининг при пациенти с Lynch синдром, когато КПК е локализиран в дясната половина на колона (Chou CL et al., 2010). Hampel et al. (2005) използват ИХХ метод с цел търсене на мутации в главните гени на MMR системата: *MSH1*, *MSH2*, *MSH6* и *PMS2*. Имунохистохимично те изследват 1066 пациента с КПК и откриват MSI в 19,5% от случаите, с честота малко по-малка от тази установена с ДНК секвениране.

Липсва зависимост между експресията на MSH2 и TNM стадий на КПК ($p>0,05$), което съвпада с проучване на Sun Z et al. (2014). Статистически значима разлика е установена между TNM стадия и други MMR гени – *MSH6* и *MLH1* (Zhao L. 2018). Експресията на MSH6 и MLH1 протеини е по-висока в стадии III на КПК спрямо II клиничен стадий по класификацията по DUKE, която е прогностична за преживяемостта на пациентите.

В заключение, ИХХ изследване на MSH2 може да се използва като скрининг за откриване на тумори с MSI и при липса на експресия се препоръчва последващ молекулярен анализ.

BRAF

BRAF принадлежи към RAS-фамилията и е посредник при EGFR сигналния път, който медира MAP киназния път, регулиращ клетъчната пролиферация, миграция и диференциация (Bond CE и Whitehall VLJ, 2018). При спорадичните КПК мутации на *BRAF*

ген се срещат приблизително в около 60% от MSH-H и между 5% и 15% от MSS KPK (Davies H et al., 2002; Samowitz et al., 2005; Clarke CN et al., 2015; Kanik P et al. 2018). При повече от 90% от KPK, мутациите са свързани със заместване на валина с глутамин на позиция 600 (*BRAFV600E*) (Tejpar S et al., 2010). Експресията на BRAF протеина отговаря на мутантната форма на гена и имунохистохимичното изследване е достоверен метод за откриване на мутация с чувствителност и специфичност до 100% (Affolter K et al., 2013).

Колоректалната канцерогенеза е многостъпаловиден процес, който може да се развие по няколко пътя (Spring KJ et al., 2006; Clarke CN et al., 2015). Малигнизирването на класическите аденоми и развитието на KPK е известно като класически път на канцерогенезата, който е асоцииран със загубата на APC и/или p53 туморни супресорни гени. KPK при синдром на Линч се развива поради невъзможност за възстановяване на ДНК уврежданията. Счита се, че BRAF действа главно по пътя на назъбените аденоми и метилиране на CpG острови, които заглушават критични туморни супресорни гени т.н. метилатор фенотип (CIMP) тумори (Clarke CN и Kopetz EC, 2015).

Процентът на експресия на протеина BRAF при настоящото изследване при несинхронните аденоми, синхронните/метахронни аденоми и KPK е съответно: 46,67%, 72,22% и 80,95%. Най-висок е процентът на експресия в контролната група - 83,33%, находка наблюдавана и от други автори (Lasota J et al., 2014; Kwon JH et al., 2018). Според някои автори, високата експресия на протеина в контролната група може да се дължи на кръстосана реакция на анти тялото с други епитопи, без това да е проява на мутация (Affolter K et al., 2013; Lasota J et al., 2014). Според нас, високият процент на експресия в контролната група, би могло да се разглежда като ранно събитие в колоректалната канцерогенеза, което възниква във видимо непроменена колоректална лигавица в съседство на синхронните/метахронни аденоми.

Високата площ на експресия се запазва в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми и KPK, което означава активно участие на BRAF протеина в многостъпаловидния процес на колоректалната канцерогенеза. Изследваните от нас синхронни/метахронни аденоми са от класически тип: тубуларни, тубуловилозни и вилозни, без морфологични белези на назъбените аденоми. Вероятно освен при назъбените аденоми, BRAF протеина участва и при класическия път на колоректална канцерогенеза, т.е. в туморната последователност аденом/карцином.

Процентът на експресия на протеина BRAF при несинхронните аденоми е по-нисък при синхронните/метахронни аденоми и разликата е статистически значима ($p < 0,05$). Според нас, това може да означава, че BRAF протеин участва при формиране на несинхронните аденоми, но ролята на онкопротеина е изразена в по-слаба степен, отколкото при синхронните/метахронни аденоми. От друга страна, площта на експресията на протеина BRAF при несинхронните тубуловилозни спрямо тубуларните аденоми е по-висока и тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$). Малигнизацията на класическите аденоми е по-висока при вилозните в сравнение с тубуларните аденоми (Santos JM et al., 2008), което е в подкрепа на участието на онкопротеина в туморната прогресия.

Връзката между експресията на *BRAF* гена и клинично-морфологичните показатели на аденомите е обект на задълбочени изследвания през последните няколко години. Yi C et al. (2016) анализират чрез полимеразна-верижна реакция, мутационния статус на *BRAF* гена в 123 тубуловилозни и 155 тубуларни аденоми и откриват мутация в гена в 10 тубуловилозни и 8 тубуларни аденома. В редица проучвания се съобщава за ниска до липсваща експресия на

протеина при тубуларните аденоми (Kokenek-Unal TD et al., 2017). Получените от нас резултати, че площта на експресия на BRAF при несинхронните тубуловилозни спрямо тубуларните аденоми е по-висока, което не противоречи на данните от литературата.

Ние установихме, че интензивността на експресия на BRAF протеина при синхронни/метахронни аденоми се повишава с увеличаване размерите на аденомите и разликата е статистически значима ($p > 0,05$). Освен на базата на хистологичния вид, аденомите се разделят на ниско и високо рискови аденоми във връзка с размера на аденомите, техния брой и локализация (Atkin WS et al., 2002; Lieberman DA et al., 2012). Според нас, площта и интензивността на експресия на BRAF протеина поне отчасти допринасят за хистологичния вид и размерите на аденомите и за категоризиране на аденомите в групата на високо рисковите аденомии.

Ролята на мутацията в *BRAF* ген при конвенционалните аденоми и връзката им с КПК е твърде противоречива (Yi C et al., 2016). Повече проучвания сочат, че *BRAF* гена има значение за възникване и развитие аденомите (Nguyen HT и Duong HQ, 2018).

Анализът на тъканната експресия на BRAF в туморната тъкан на КПК показва експресия в 80,95% от случаите. Получените от нас резултати не се различават съществено от данните на литературата, според които експресията на протеина варира между 45% и 66% (Affolter K et al., 2013; Piton N et al., 2015; Kanik P et al. 2018). Други автори отчитат ниски стойности на експресия на антиялото (Capper D et al., 2013 и Day F et al., 2015).

Малко на брой и противоречиви са данните от литературата за експресията на BRAF протеина във връзка с клинично-морфологичните показатели при КПК (Jang MH et al., 2017; Kanik P et al., 2018). Ние не открихме статистически значима разлика между интензивността, площта и общия скор на експресия на протеина и пола на пациентите с КПК ($p > 0,05$), което е в съответствие с резултатите на някои автори Gao XH et al. (2017). Според други автори (Capper D et al., 2013; Day F et al., 2015) експресията на протеина BRAF е по-висока при женския в сравнение с мъжкия пол.

Ние, подобно на Jang MH et al. (2017) не открихме зависимост между експресията на протеина BRAF и възрастта на пациентите с КПК ($p > 0,05$). Според Capper D et al. (2013) експресията на протеина се увеличава пропорционално с възрастта на пациентите.

Липсва статистически значима зависимост между експресията на BRAF протеина и размера на тумора ($p > 0,05$). Получените от нас резултати се различават от Yujie Li и Weier Li (2017), които откриват корелация между експресията на протеина и размера на тумора на базата на проведения от тях метаанализ, включващ две проучвания - първо с 399 пациенти и второ с 4154 пациенти. Според нас, тези разлики най-вероятно се дължи на малкия брой пациенти, включени в настоящето проучване.

Зависимост между локализация на КПК и експресия на BRAF протеина не се установи. Тези резултати са в съответствие с резултатите на Capper D et al. (2013), които също не откриват зависимост между туморната локализация и BRAF протеин. Получените от нас резултати и тези на Capper D et al. (2013) се различават от данните, получени от проучване, включващо 5307 пациенти, според което високата експресия на протеина е асоциирана с локализация на КПК в проксималната част на колона. Според други изследвания, BRAF мутации се срещат по-често при карциноми в дясната половина на дебелото черво, при ниско диференцирани аденокарциноми и муцинозен хистологичен вид карцином (Yokota T et al., 2011). Независимо от локализацията и морфологичната характеристика на КПК, според Zlobec I et al. (2010) високата експресия на BRAF селектира

пациенти нуждаещи се от по-агресивен курс на химиотерапия.

При анализа на връзката между площта на експресия на BRAF протеина, ние, подобно на Kanik P et al. (2018), установихме по-висока процентна експресия на протеина при пациентите с КРК в напреднал стадий на заболяването, включващ Т3 и Т4 стадий спрямо Т2 стадий, независимо че статистически значима разлика не бе установена ($p > 0,05$).

Според Selingmann JF et al. (2017) появата на мутация в *BRAF* ген определя неблагоприятната прогноза при пациентите, независимо от клинично-патологичните характеристики. Данните от литературата показват, че BRAF мутацията освен като прогностичен маркер е и важен биомаркер за определяне на таргетна терапия (Kwon JH et al., 2018). Експресията на протеина е от определящо значение за резистентността на КРК към конвенционалната терапия (Kanik P et al., 2018). Пациенти с BRAF V600E мутации показват по-слаб отговор към таргетната терапия с моноклонално тяло насочено срещу EGFR. Откриването на BRAF мутацията може да има предиктивна роля при избора на лечение на пациенти с метастатичен КРК, подходящи за анти-ERGF терапия (Di Nicolantonio F et al., 2008).

В заключение, BRAF протеин участва в ранните фази на развитие на конвенционалните аденоми и като късно събитие в колоректалнта канцерогенеза свързано с авансиране на туморния процес.

6.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

През последното десетилетие стана известно, че КРК възниква в резултат на акумулиране на генетични и епигенетични промени, които водят до трансформиране на нормалните епителните клетки в туморни клетки. Въвеждането на молекулярни маркери дава възможност да се проследят отделните етапи на многостъпалния процес на колоректалната канцерогенеза, да се анализират молекулярните нарушения и риска от малигнизация на конвенционалните аденоми на базата на туморната експресия на различни тумор супресорни протеини и онкопротеини.

Важен момент при оценка на КРК е не само определянето на TNM стадия, но и анализ на биологичния малигнен потенциал, изразен чрез агресивността на тумора. Имунохистохимичният профил на КРК ще изясни не само биологичното му поведение, но и ще послужи за терапевтичното му повлияване.

7. ИЗВОДИ

1. С редуциране площта на експресия на APC протеина намалява степента на диференциация на синхронните/метахронни аденоми на дебелото черво.
2. Интензивността и общия скор на експресия на APC протеина не се различава между различните хистологични варианти на несинхронните и синхронни/метахронни аденоми на дебелото черво.
3. Висок общ скор на експресия на APC протеина има в туморната тъкан на синхронни/метахронни аденоми с големи размери, десностранна локализация и наличие на вилозна компонента.
4. Ниската площ на експресия на APC протеинът в туморната тъкан на КПК повишава риска от поява на метастази в лимфните възли.
5. Високи нива на интензивност, площ и общ скор на експресия на p53 протеина има в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми с големи размери, десностранна локализация и вилозна компонента.
6. Площта на експресия на протеина p53 в туморната тъкан на КПК се увеличава в сравнение с площта на експресия в туморната тъкан на синхронните/метахронни аденоми.
7. Висока интензивност и общ скор на експресия на SMAD4 протеина се наблюдава при синхронните/метахронни аденоми с големи размери, десностранна локализация и вилозна компонента.
8. Високи нива на интензивност, площ и общ скор на експресия на MSH2 протеина има при синхронни/метахронни аденоми с големи размери. Интензивността и общия скор протеин MSH2 са високи при локализация на аденомите в дясната половина на колона. Общият скор на експресия на MSH2 антитяло е висок при вилозна компонента на аденомите.
9. Най-висока е експресия на протеина BRAF при несинхронните тубуловилозни аденоми.
10. По-висок е процентът на експресия на протеина BRAF при синхронни/метахронни аденоми в сравнение с несинхронните аденоми.
11. При КПК експресията на протеина BRAF е по-интензивна в сравнение с несинхронните аденоми.
12. Високата интензивност и площ на експресия на протеина BRAF увеличава риска от поява на метастази

8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Научни приноси с оригинален характер:

- Осъществена е комплексна и сравнителна клинико-морфологична и имунохистохимична характеристика на пациенти с несинхронни аденоми, синхронни/метахронни аденоми и колоректални карциноми.
- Изяснена е ролята на интензивността, площта и общия скор на имунохистохимичната експресия на APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF протеини с оглед изясняване на връзката им с клинико-морфологичните параметри.
- Създаден е логистичен модел за прогнозиране на вероятността от поява на метастази при пациенти с колоректален карцином.

Научни приноси с практическо-приложен характер:

- Доказана е ролята на ниската експресия на протеина APC и високата на протеина BRAF в туморната тъкан на колоректален карцином за повишаване риска от метастазиране.
- Изяснено е участието на APC, p53, SMAD4, MSH2 и BRAF при високо рисковите аденоми.

9. СТАТИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Недялка Згурова**, Мария Цанева. Експресия на протеин p53 във връзка с клинично-морфологичните показатели при колоректални епителни неоплазми. *Варненски медицински форум*, 7, 2018, № 2, 69-76.

2. **Недялка Згурова**, Мария Цанева. Пътища на колоректална канцерогенеза. *Варненски медицински форум*, 8, 2019, № 1, 36-42.

3. **Zgurova N**, Prodanova K, Tzaneva M, Stefanov J. Prognostic factors for the presence of the methastasis in lymph nodes and organs in Bulgarian patients with colorectal carcinoma. AIP Conference Proceedings, Volume 2048, Issue 1 , p. 020014-1 - 020014-9.