

## Особливості транскрипційної активності генів *CDH1*, *CTNNB1* та експресії кодованих ними молекул Е-кадгерину, β-катеніну на I, II, III, IV стадіях розвитку колоректальної аденокарциноми

М. А. Шишкін, В. О. Туманський

Запорізький державний медичний університет, Україна

**Мета роботи** – аналіз рівнів експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1* і кодованих ними молекул Е-кадгерину, β-катеніну та їхніх зв'язків із рівнем транскрипційної активності гена *KRAS* на I, II, III, IV стадіях (pTNM) розвитку колоректальної аденокарциноми (КРА).

**Матеріали та методи.** Виконали паралельне імуногістохімічне та молекулярно-генетичне, патогістологічне дослідження операційного матеріалу КРА 40 пацієнтів (4 групи спостереження – I, II, III, IV стадії за градацією pTNM, 10 спостережень у кожній групі), а також секційного матеріалу 10 фрагментів стінки дистальних відділів товстої кишки звичайної гістологічної будови (група контролю).

**Результати.** КРА порівняно з незміненою слизовою оболонкою дистальних відділів товстої кишки характеризується зниженою транскрипційною активністю гена *CDH1*. Є тенденція до зниження рівня експресії мРНК гена *CDH1* у групах спостереження – від I до IV стадії розвитку пухлини. КРА характеризується низьким рівнем експресії Е-кадгерину, що також прогресивно знижується в групах спостереження. КРА порівняно з незміненою слизовою оболонкою дистальних відділів товстої кишки характеризується підвищеною транскрипційною активністю гена *CTNNB1* і високим рівнем експресії β-катеніну. Статистично значущу різницю за рівнями експресії мРНК гена *CTNNB1*, β-катеніну у групах спостереження не виявили. Наявні прямі кореляційні зв'язки між рівнями експресії досліджуваних генів і кодованих ними молекул, зворотні кореляції між рівнями експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1*, мРНК гена *KRAS* та експресії Е-кадгерину, а також прямий зв'язок між рівнями експресії мРНК гена *KRAS* та експресії β-катеніну.

**Висновки.** КРА характеризується зниженим рівнем транскрипційної активності гена *CDH1*, який корелює з низьким рівнем експресії Е-кадгерину, а також підвищеним рівнем транскрипційної активності гена *CTNNB1*, що корелює з високим рівнем експресії β-катеніну. При прогресії КРА від I до IV стадії знижується транскрипційна активність гена *CDH1* та експресія кодованого ним Е-кадгерину. Для КРА характерні зворотні кореляції між рівнями експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1*, мРНК гена *KRAS* та експресії Е-кадгерину, а також прямий зв'язок між рівнями експресії мРНК гена *KRAS* та експресії β-катеніну.

**Ключові слова:**  
колоректальний рак, *CDH1*, *CTNNB1*, Е-кадгерин, β-катенін.

**Патологія.** – 2018. – Т. 15, № 2(43). – С. 221–228

**DOI:**  
10.14739/2310-1237.2018.2.141432

**E-mail:**  
shishkin.stomat@gmail.com

## Особенности транскрипционной активности генов *CDH1*, *CTNNB1* и экспрессии кодируемых ими молекул Е-кадгерина, β-катенина на I, II, III, IV стадиях развития колоректальной аденокарциномы

М. А. Шишкин, В. А. Туманский

**Цель работы** – анализ уровней экспрессии мРНК генов *CDH1*, *CTNNB1* и кодируемых ими молекул Е-кадгерина, β-катенина, а также их связей с уровнем транскрипционной активности гена *KRAS* на I, II, III, IV стадиях (pTNM) развития колоректальной аденокарциномы (КРА).

**Материалы и методы.** Проведено параллельное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое, патогистологическое исследование операционного материала КРА 40 пациентов (4 группы наблюдений – I, II, III, IV стадии по градации pTNM, по 10 наблюдений в каждой группе), а также секционного материала 10 фрагментов стенки дистальных отделов толстого кишечника обычной гистологической структуры (группа контроля).

**Результаты.** КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется сниженной транскрипционной активностью гена *CDH1*. Имеет место тенденция к снижению уровня экспрессии мРНК гена *CDH1* в группах наблюдения – от I к IV стадии развития опухоли. КРА характеризуется низким уровнем экспрессии Е-кадгерина, что также прогрессивно снижается в группах наблюдения. Кроме того, КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *CTNNB1* и высоким уровнем экспрессии β-катенина. Статистически значимая разница между уровнями экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, β-катенина в группах наблюдения не установлена. Отмечены прямые корреляционные связи между уровнями экспрессии исследованных генов и кодируемых ими молекул, обратные корреляции между уровнями экспрессии мРНК генов *KRAS* и *CDH1*, мРНК гена *KRAS* и экспрессии Е-кадгерина, а также прямая связь между уровнями экспрессии мРНК гена *KRAS* и экспрессии β-катенина.

**Выводы.** КРА характеризуется сниженным уровнем транскрипционной активности гена *CDH1*, который коррелирует с низким уровнем экспрессии Е-кадгерина, а также повышенным уровнем транскрипционной активности гена *CTNNB1*, который коррелирует с высоким уровнем экспрессии β-катенина. При прогрессии КРА от I к IV стадии снижается транскрипционная активность гена *CDH1* и экспрессия кодируемого им Е-кадгерина. Для КРА характерны обратные корреляции между уровнями экспрессии мРНК генов *KRAS* и *CDH1*, мРНК гена *KRAS* и экспрессии Е-кадгерина, а также прямая связь между уровнями экспрессии мРНК гена *KRAS* и экспрессии β-катенина.

**Ключевые слова:**  
колоректальный рак, *CDH1*, *CTNNB1*, Е-кадгерин, β-катенин.

**Патология.** – 2018. – Т. 15, № 2(43). – С. 221–228

**Key words:**

colorectal cancer,  
CTNNB1 human  
protein,  
CDH1 human  
protein,  
beta catenin,  
E-cadherin.

**Pathologia**

2018; 15 (2), 221–228

## Features of *CDH1*, *CTNNB1* genes transcriptional activity and expression levels of E-cadherin, $\beta$ -catenin proteins coded by these genes on the I, II, III, IV stages of colorectal adenocarcinoma development

M. A. Shyshkin, V. O. Tumanskyi

**Aim** – analysis of *CDH1* and *CTNNB1* genes mRNA expression levels and expression levels of E-cadherin,  $\beta$ -catenin proteins coded by these genes, and also their correlations with *KRAS* gene transcriptional activity level on the I, II, III, IV stages (pTNM) of colorectal adenocarcinoma (CRA) development.

**Materials and methods.** Parallel immunohistochemical and molecular-genetic, pathohistological studies of operational material of CRA from 40 patients (4 study groups – I, II, III, IV stages according to pTNM classification – 10 cases in each group) with diagnosis of colorectal adenocarcinoma, and sectional material of 10 fragments of distal colonic wall with normal histological structure were conducted.

**Results.** In comparison with unchanged mucosa of distal colon CRA is characterized by the decreased *CDH1* gene transcriptional activity. There is the tendency to reducing of *CDH1* gene mRNA expression in the study groups – from the I to the IV stages of the tumor development. CRA is characterized by the low E-cadherin expression level, which also has the tendency to reducing in the study groups. Moreover, in comparison with unchanged mucosa of distal colon CRA is characterized by the increased *CTNNB1* gene transcriptional activity and the high  $\beta$ -catenin expression level. There aren't statistically significant differences between the *CTNNB1* gene mRNA,  $\beta$ -catenin expression levels in the study groups. There are direct correlations between the expression levels of the studied genes and the molecules, coded by these genes, and also reverse correlations between the *KRAS* and *CDH1* genes mRNA expression levels, the *KRAS* gene mRNA expression level and the E-cadherin expression level, direct correlation between the *KRAS* gene mRNA expression level and the  $\beta$ -catenin expression level.

**Conclusions.** CRA is characterized by the decreased *CDH1* gene transcriptional activity that correlates with the low E-cadherin expression level, and by the increased *CTNNB1* gene transcriptional activity that correlates with the high  $\beta$ -catenin expression level. The *CDH1* gene transcriptional activity and the expression level of E-cadherin, which is coded by this gene, decrease during the CRA progression from the I to the IV stages. CRA is characterized by reverse correlations between the *KRAS* and *CDH1* genes mRNA expression levels, the *KRAS* gene mRNA expression level and the E-cadherin expression level, direct correlation between the *KRAS* gene mRNA expression level and the  $\beta$ -catenin expression level.

Життєдіяльність соматичної клітини можлива лише за умов функціонування регуляторних механізмів, що контролюють процеси росту, диференціювання, міжклітинних взаємодій, програмованої загибелі тощо. За сучасними уявленнями, колоректальна аденокарцинома (КРА) є наслідком кумуляції численних мутацій та епігенетичних аномалій, що дають змогу клітинам уникати регуляторних впливів. Вочевидь, саме акумуляція молекулярно-генетичних порушень у клоні клітини призводить до трансформації умовно «нормальних» епітеліоцитів у ракові клітини [1].

Е-кадгерин кодується геном *CDH1*, є кальцій-залежним трансмембранним глікопротеїном, що локалізується на базолатеральних поверхнях епітеліоцитів і забезпечує формування та функціонування адгезивних міжклітинних контактів. Молекула Е-кадгерину складається з цитоплазматичного, трансмембранного і екстрацелюлярного доменів. Цитоплазматичний домен взаємодіє з молекулами катенінів, зокрема з  $\beta$ -катеніном, формуючи зв'язки з цитоскелетом. Трансмембранний домен забезпечує передачу сигналів ззовні, а екстрацелюлярний безпосередньо забезпечує адгезивні зв'язки, а також зв'язування молекул кальцію, що потрібне для просторової організації молекули Е-кадгерину [2]. Відомо, що дисрегуляція *CDH1* і його білкового продукту є однією з ключових ланок канцерогенезу, формує основу для епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) [3]. У низці експериментальних робіт показано, як зниження експресії *CDH1* асоціюється з активацією міграції пухлинних клітин КРА та реалізацією їхніх інвазивних властивостей [4,5].

$\beta$ -катенін кодується геном *CTNNB1*, є представником сімейства катенінів і має дві основні функції:

підтримання міжклітинної адгезії та регуляція транскрипції Wnt-таргетних генів. Входячи до складу кадгерин-катенінового комплексу,  $\beta$ -катенін забезпечує зв'язок між Е-кадгеріном та  $\alpha$ -катеніном, який безпосередньо контактує з актиновим цитоскелетом. Відомо, що аномалії структури та функції кадгерин-катенінового комплексу є основою порушення адгезивних властивостей епітеліоцитів. Функціонуючи як фактор транскрипції (за умови ON-state Wnt/ $\beta$ -катенінового сигнального шляху),  $\beta$ -катенін накопичується у клітинних ядрах і активує транскрипцію Wnt-таргетних генів, що відповідають за регуляцію проліферації, апоптозу й виживаності епітеліоцитів, а також їхніх адгезивних властивостей і рухливості [6,7]. Аномалії експресії *CTNNB1* та пов'язані з ними порушення функціонування сигнальних каскадів за умов канцерогенезу стали темою численних досліджень. Однак відомості фахової літератури щодо особливостей експресії гена *CTNNB1* та кодованого ним  $\beta$ -катеніну в КРА суттєво варіюють, а питання щодо точних механізмів взаємодії залучених сигнальних молекул залишаються невирішеними [7–9].

*KRAS* є ще одним геном, порушення функції якого з високою ймовірністю залучається до кишкового канцерогенезу. За даними фахової літератури, молекулярно-генетичні аномалії *KRAS* трапляються в 30–68 % КРА [10]. Добре відома роль *KRAS*-залежної сигналізації в регуляції клітинної проліферації, росту, виживаності, реалізації інвазивних і метастатичних властивостей трансформованих клітин, що здійснюється за допомогою MAPK- і PI3K/AKT-сигнальних каскадів [11]. За даними E. Lemieux et al. (2015), є зв'язок між патологічною активністю *KRAS* і функціонуванням

Wnt/ $\beta$ -катенінового сигнального шляху в КРА [12]. Але дослідження з уточнення зв'язків між експресією ключових компонентів кадгерин-катенінового комплексу й активністю *KRAS* поки не здійснили.

## Мета роботи

Аналіз рівнів експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1* та кодованих ними молекул Е-кадгерину,  $\beta$ -катеніну та їхніх зв'язків із рівнем транскрипційної активності гена *KRAS* на I, II, III, IV стадіях (pTNM) розвитку колоректальної аденокарциноми.

## Матеріали і методи дослідження

Виконали паралельне імуногістохімічне (ІГХ) і молекулярно-генетичне (МГ) дослідження операційного матеріалу КРА 40 пацієнтів. Базуючись на результатах попереднього патоморфологічного дослідження операційного матеріалу та враховуючи чинну класифікацію pTNM [13], виділили 4 групи спостереження, кожна з них налічує 10 випадків: I стадія ( $T_{1-2}N_0M_0$ ), II стадія ( $T_{3-4}N_0M_0$ ), III стадія ( $T_{1-4}N_{1-3}M_0$ ), IV стадія ( $T_{1-4}N_{1-3}M_1$ ). Як групу контролю використали секційний матеріал – 10 фрагментів стінки товстої кишки (дистальні відділи) звичайної гістологічної будови.

Операційний і секційний матеріал фіксували в 10 % забуференому формаліні та заливали в парафін. Особливості гістологічної будови досліджуваних зразків вивчали в парафінових зрізах, що забарвлені гематоксиліном та еозином. ІГХ-дослідження виконали за стандартною методикою, що передбачається виробниками антитіл. Використано моноклональні антитіла проти Е-кадгерину (Clone NCH-38, DAKO, США),  $\beta$ -катеніну (Clone  $\beta$ -Catenin-1, DAKO, США), а також систему візуалізації EnVisionFLEX с діамінобензидином (DAKO, США). Рівні ІГХ-експресії Е-кадгерину та  $\beta$ -катеніну клітинами КРА оцінювали методом фотоцифрової морфометрії [14] з використанням комп'ютерної програми ImageJ [15], вимірювали умовними одиницями оптичної щільності (УООЩ) та градували на 4 рівні: 0–20 УООЩ – негативна ІГХ реакція, 21–50 УООЩ – низький рівень експресії, 51–100 УООЩ – помірний рівень експресії, 101 УООЩ і більше – високий рівень експресії.

Паралельне МГ-дослідження здійснили в тих самих 40 зразках КРА, що сформували групи спостереження, і в 10 зразках групи контролю, фіксованих у формаліні та залитих у парафін. Для отримання тотальної РНК виконали попередню депарафінізацію тканини у ксилолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %). Підготовлені зразки гомогенізували за допомогою ступки і товкачи-

ка, поміщали в пробірки «Ахуген» (США), проводили додаткову депарафінізацію, повторну регідратацію. Тотальну РНК із тканини виділили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («Ізоген Lab., LTD», РФ).

Для зворотної транскрипції та отримання кДНК використали набір ОТ-1 («Синтол», РФ). Реакційна суміш загальним обсягом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої  $H_2O$ , очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотну транскрипцію проводили при 45 °C упродовж 45 хвилин із наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хв при 92 °C.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) та набір реактивів для проведення ПЛР-ПЧ за наявності SYBR Green R-402 («Синтол», РФ). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК-полімеразу SynTaq з антитілами, що пригнічували активність ферменту, по 0,2 мкл прямого та зворотного специфічних праймерів, dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфати, 1,45 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального обсягу 25 мкл додаванням деіонізованої  $H_2O$ . Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референтного генів дібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast та виготовлені фірмою «Thermo Scientific», США (табл. 1).

Ампліфікація складалася з 45–50 циклів і виконана за таких умов: денатурація – 95 °C, 15 секунд, віджиг – 59–61 °C, 30–60 секунд, елонгація – 72 °C, 30 секунд. Як референс-ген використали ген Actin, beta (Actb). Відносну нормалізовану кількість кДНК цільних генів визначили за методом  $\Delta\Delta Ct$ . Статистичний аналіз результатів ПЛР виконали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ («Bio-Rad», США). В експеримент включено негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконали на індивідуальних зразках у трьох повторях.

Дані статистично опрацьовані за допомогою персонального комп'ютера з використанням програми Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., ліцензія № JPZ804I382130ARCN10-J). Розраховували медіану (Me), нижній і верхній квартилі ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ); порівняння виконали з використанням непараметричного критерію Краскела–Уоліса; зв'язки між досліджуваними параметрами вивчили з використанням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена. Результати вважали статистично значущими на рівні 95 % ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 1. Специфічні пари праймерів, що були використані для аналізу досліджуваних і референтного генів

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
1	F = CCTGTTCCCTGAGGGTATT R = CCATTGTCCACGCTGGATTT	58.4 58.82	66	220/221
<i>E-cadherin</i> , ( <i>CDH1</i> )	F = CAGTACAACGACCCCAACCCA R = ACCCACTCTAAGGCCATCT	59.89 59.96	63	2060/2061
<i>Actin, beta</i> ( <i>Actb</i> )	F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	61.30 61.15	59	78/79

## Результати

У результаті МГ-дослідження встановили: КРА порівняно з незміненою слизовою оболонкою дистальної товстої кишки характеризується зниженою транскрипційною активністю гена *CDH1*: значення відносної нормалізованої експресії мРНК гена становить 0,35 (0,09; 0,70). Є тенденція до зниження транскрипційної активності гена *CDH1* у групах спостереження від I до IV стадії КРА за градацією pTNM: відносна нормалізована експресія мРНК гена для I стадії становить 0,88 (0,42; 1,14), для II стадії – 0,48 (0,23; 1,13), для III стадії – 0,15 (0,09; 0,36), для IV стадії – 0,08 (0,04; 0,41) (Краскел–Уоліс,  $p < 0,05$ , рис. 1).

Результати МГ-дослідження узгоджуються з результатами паралельно здійсненого ІГХ-дослідження експресії Е-кадгерину в тих самих зразках (табл. 2). Встановлено, що раковим клітинам КРА властивий низький рівень мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину: експресія ІГХ маркера становить 43,74 (31,42; 85,60) УООЩ (рис. 2).

Виявлено тенденцію до зниження рівня експресії Е-кадгерину за умов прогресування пухлини: експресія маркера на I стадії КРА становить 88,09 (60,22; 112,34) УООЩ, на II стадії – 55,70 (41,15; 98,07) УООЩ, на III стадії – 32,58 (30,21; 44,58) УООЩ, на IV стадії – 24,82 (23,02; 40,81) УООЩ (Краскел–Уоліс,  $p < 0,05$ ; рис. 3).

За результатами МГ-дослідження встановлено: КРА порівняно з незміненою слизовою оболонкою дистальної товстої кишки характеризується в понад двічі підвищеною транскрипційною активністю гена *CTNNB1*: відносна нормалізована експресія мРНК гена становить 2,63 (1,55; 5,09). Порівняльний аналіз рівнів транскрипційної активності гена *CTNNB1* на різних стадіях розвитку КРА вказує на відсутність статистично значущої різниці: відносна нормалізована експресія мРНК гена для I стадії становить 2,88 (2,38; 5,38), для II – 3,83 (2,59; 5,99), для III – 2,02 (1,38; 6,95), для IV – 2,27 (1,23; 2,93) (Краскел–Уоліс,  $p < 0,05$ , рис. 4).

Результати МГ-дослідження узгоджуються з результатами паралельно виконаного ІГХ-дослідження експресії  $\beta$ -катеніну (табл. 2). Встановили, що ракові клітини КРА характеризуються високим рівнем мембранно-цитоплазматичної експресії  $\beta$ -катеніну: експресія маркера становить 117,35 (111,69; 120,32) УООЩ (рис. 5).

Порівняльний аналіз рівнів ІГХ експресії  $\beta$ -катеніну на різних стадіях розвитку КРА вказує на відсутність статистично значущої різниці: експресія маркера на I стадії становить 116,73 (112,28; 120,06), на II – 120,23 (116,06; 135,16), на III – 115,85 (110,09; 120,23), на IV – 115,59 (111,11; 120,37) (Краскел–Уоліс,  $p < 0,05$ ; рис. 6).

Кореляційний аналіз виявив низку статистично значущих зв'язків (табл. 3). Так, визначили прямий сильний зв'язок між рівнями транскрипційної активності досліджуваних генів та експресії кодованих ними молекул: між рівнем відносної нормалізованої експресії мРНК гена *CDH1* і рівнем експресії Е-кадгерину в КРА ( $r = 0,90$ ,  $p < 0,05$ ), між рівнем відносної нормалізованої експресії мРНК гена *CTNNB1* і рівнем експресії  $\beta$ -катеніну в КРА ( $r = 0,74$ ,  $p < 0,05$ ).

У цьому дослідженні виявили зворотний середньої сили зв'язок між рівнями відносної нормалізованої

експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1* ( $r = -0,41$ ,  $p < 0,05$ ), відносної нормалізованої експресії мРНК гена *KRAS* та ІГХ експресії Е-кадгерину ( $r = -0,47$ ,  $p < 0,05$ ), а також прямий середньої сили зв'язок між рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК гена *KRAS* та ІГХ експресії  $\beta$ -катеніну ( $r = 0,41$ ,  $p < 0,05$ ).

## Обговорення

Згідно з отриманими даними, тенденція до пригнічення транскрипційної активності гена *CDH1* реалізується під час кишкового канцерогенезу та прогресує від I до IV стадії розвитку КРА. Зниження експресії *CDH1* і, відповідно, кодованого ним Е-кадгерину формує основу порушення адгезивних міжклітинних зв'язків, у результаті чого ракові клітини отримують можливість відокремлюватись одна від одної. Разом з іншими ланками ЕМП здатність до відокремлення є важливим фактором реалізації інвазивних властивостей ракових клітин [3].

За даними фахової літератури, втрата експресії Е-кадгерину за умов кишкового канцерогенезу може бути зумовлена мутаціями, епігенетичними аномаліями, а також активністю ендоцитозу та протеолізу, що зростає [3]. Серед найбільш поширених причин зниження експресії Е-кадгерину у КРА – пригнічення експресії *CDH1* специфічними факторами транскрипції (Snail, Slug тощо), які активуються на початку ЕМП [16], а також посттрансляційна модифікація молекул Е-кадгерину (O-mannosylation тощо) [17]. За даними S. A. Kim et al. (2016), зниження експресії *CDH1* у КРА асоціюється з інвазивною стадією розвитку пухлини, а також з її лімфогенним метастазуванням; дослідники виключили асоціацію зниження експресії цього гена з віддаленим метастазуванням КРА [18]. За даними J. Vriun et al. (2014), зниження мембранно-цитоплазматичної експресії Е-кадгерину у КРА асоціюється зі зниженням 5-річної виживаності пацієнтів (дані аналізу виживаності 903 хворих) [19].

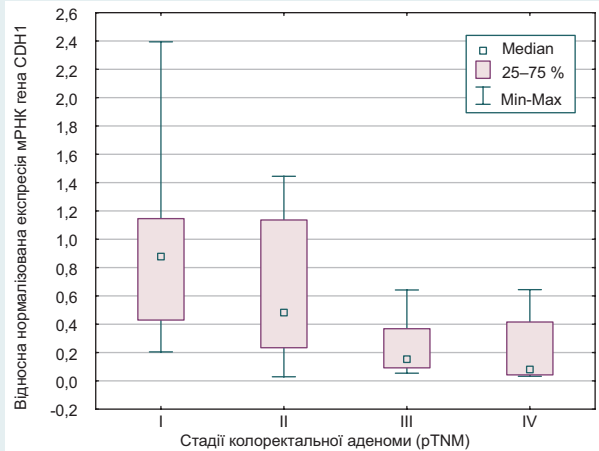
Також виявлено підвищену транскрипційну активність гена *CTNNB1* і підвищений рівень експресії кодованого ним  $\beta$ -катеніну в КРА. Найбільш поширеним варіантом молекулярно-генетичних аномалій, що забезпечують підвищення рівня експресії  $\beta$ -катеніну пухлинними клітинами КРА, є мутації гена *APC*. Це точкові мутації, що призводять до аномалій функціонування так званого «комплексу деструкції». Білок APC входить до складу цього комплексу та за нормальних умов конкурує з молекулами Е-кадгерину за зв'язування з молекулами  $\beta$ -катеніну, а також забезпечує фосфорилювання останніх разом з Axin і GSK3 $\beta$ . Типовим наслідком мутації *APC* є надмірне накопичення  $\beta$ -катеніну в цитоплазмі з наступною активацією Wnt/ $\beta$ -катенінового сигнального каскаду [9]. Такий варіант підвищення експресії  $\beta$ -катеніну не асоційований зі зростанням транскрипційної активності гена *CTNNB1* [7], що встановлено в нашому дослідженні.

У фаховій літературі знайдено суперечливі дані щодо особливостей експресії гена *CTNNB1*, кодованого ним  $\beta$ -катеніну, а також функціонування канонічного Wnt-сигнального шляху за умов прогресії КРА. За даними P. J. Morin et al. (2016), головною

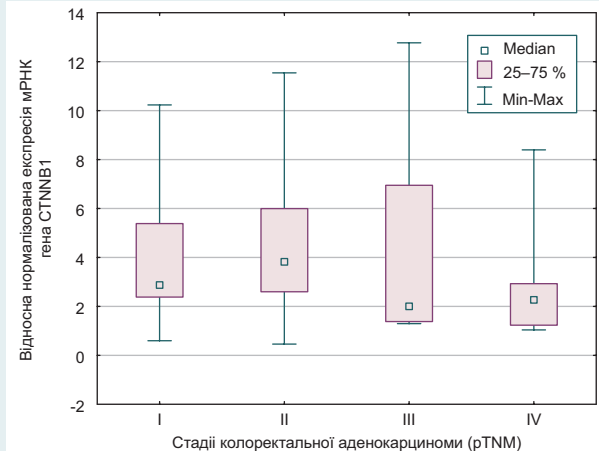


**Таблиця 2.** Рівні відносної нормалізованої експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1*, а також імуногістохімічної експресії кодованих ними молекул E-кадгерину і β-катеніну

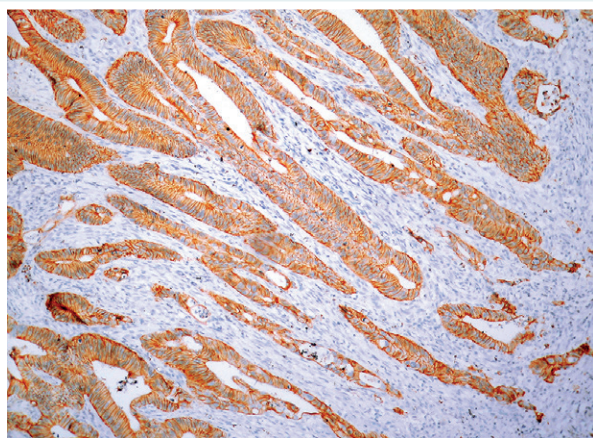
Ген / кодований білок	Відносна нормалізована експресія мРНК гена	Експресія відповідного ІГХ маркера
<i>CDH1</i> / E-кадгерин	0,35 (0,09; 0,70)	43,74 (31,42; 85,60) УООЩ
<i>CTNNB1</i> / β-катенін	2,63 (1,55; 5,09)	117,35 (111,69; 120,32) УООЩ



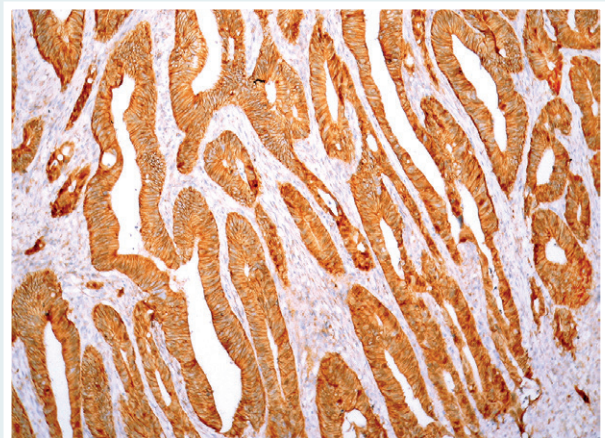
**Рис. 1.** Відносна нормалізована експресія мРНК гена *CDH1* у колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.



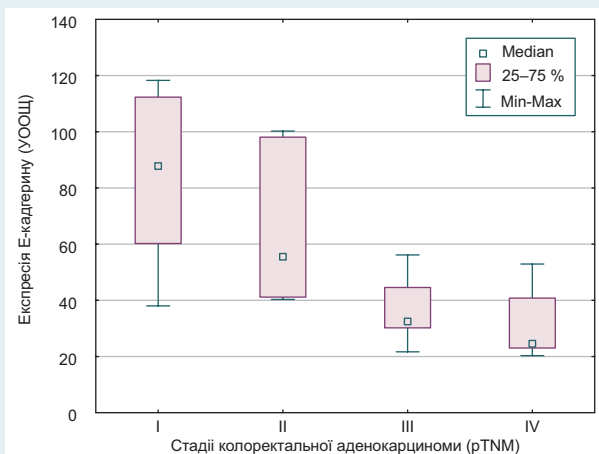
**Рис. 4.** Відносна нормалізована експресія мРНК гена *CTNNB1* у колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.



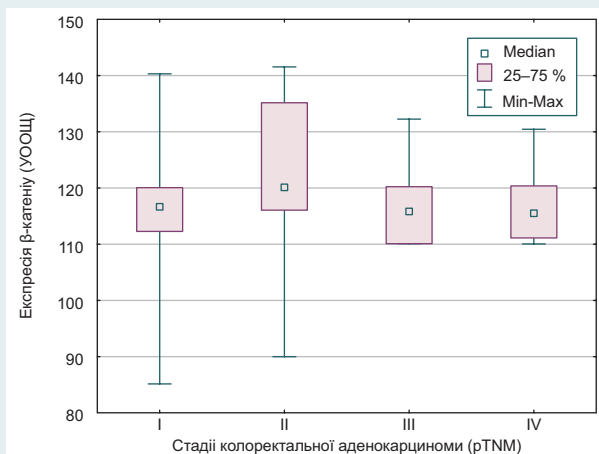
**Рис. 2.** Мембранно-цитоплазматична експресія E-кадгерину в колоректальній аденокарциномі. Мо a-Hu E-cadherin, Clone NCH-38 (DAKO, USA). 36. x400.



**Рис. 5.** Мембранно-цитоплазматична експресія β-катеніну в колоректальній аденокарциномі. Мо a-Hu β-catenin, Clone β-Catenin-1 (DAKO, USA). 36. x400.



**Рис. 3.** Експресія E-кадгерину в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.



**Рис. 6.** Експресія β-катеніну в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.

**Таблиця 3.** Кореляційні зв'язки між рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1*, *KRAS* та імуногістохімічної експресії Е-кадгерину та β-катеніну

	<i>CDH1</i>	Е-кадгерин	<i>CTNNB1</i>	β-катенін	<i>KRAS</i>
<i>CDH1</i>	1,00	0,90*	-0,00	-0,26	-0,41*
Е-кадгерин	0,90*	1,00	0,01	-0,21	-0,47*
<i>CTNNB1</i>	-0,00	0,01	1,00	0,74*	0,20
β-катенін	-0,26	-0,21	0,74*	1,00	0,41*
<i>KRAS</i>	-0,41*	-0,47*	0,20	0,41*	1,00

\*: статистично вірогідний кореляційний зв'язок ( $p < 0,05$ ).

причиною підвищення експресії гена *CTNNB1* є його активуючі мутації. Вчені довели, що мутації генів *CTNNB1* і *APC* є взаємовиключними для КРА. Показано, що мутації гена *APC* зазвичай призводять до порушення нормальної схеми роботи Wnt/β-катенінового каскаду, а мутації *CTNNB1* не асоціюються з порушеннями функцій цього каскаду, при цьому в обох випадках спостерігають накопичення β-катеніну в цитоплазмі, а іноді й у клітинному ядрі [7]. За даними G. M. Bourroul et al. (2016), рівень експресії β-катеніну раковими клітинами КРА прямо корелює зі зниженням показників виживаності хворих [8]. N. Youshida et al. (2015) дослідили випадки КРА, асоційовані зі зниженням експресії гена *CTNNB1* і кодованого ним β-катеніну. У цій роботі показано: випадки КРА, які характеризуються одночасним зниженням рівнів експресії гена *CTNNB1*, β-катеніну та Е-кадгерину, відрізняються значущо гіршим прогнозом виживаності. Дослідники пояснили цей факт можливістю залучення інших сигнальних шляхів (крім канонічного Wnt-сигнального каскаду) до реалізації злякисного потенціалу КРА [9].

Дані, що одержали за допомогою кореляційного аналізу, узгоджуються з усталеними уявленнями щодо процесу біосинтезу білків і з високою ймовірністю включають можливість молекулярно-генетичних аномалій на етапах транскрипції та трансляції Е-кадгерину та β-катеніну у КРА. Результати дослідження E. Lemieux et al. (2015) [12] стали приводом для вивчення зв'язків між транскрипційною активністю гена *KRAS*, а також експресією мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1* і кодованих ними молекул Е-кадгерину та β-катеніну. В попередній роботі [20] вивчили особливості транскрипційної активності гена *KRAS* у пухлинних клітинах КРА: випадки підвищення рівня відносної нормалізованої експресії мРНК гена становлять 87,5 % від загальної кількості спостережень, зазначений показник дорівнює 1,66 (1,19; 2,91). Є тенденція до зростання транскрипційної активності гена *KRAS* у групах спостереження – від I до IV стадії КРА за градацією pTNM. Виявлений зв'язок між рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *CDH1*, а також рівнем ІГХ-експресії Е-кадгерину обґрунтовується в сучасній фаховій літературі. Відомо, що Е-кадгерин залучається до механізмів міжклітинних взаємодій, оскільки його екстрацелюлярний домен здатен до зв'язування з рецепторами епідермального фактора росту (EGFR). Зв'язуючись з EGFR, Е-кадгерин перешкоджає приєднанню лігандів до рецепторів, що за умов нормального функціонування передають сигнали на внутрішньоклітинний білок RAS (кодований геном *KRAS*) [21]. Це може пояснити виявлений нами

зворотний зв'язок, адже зниження експресії Е-кадгерину асоціюється зі збільшенням кількості «вільних» рецепторів EGFR, що потребують відповідної (більшої) кількості молекул RAS, яка забезпечується відповідним (підвищеним) рівнем транскрипційної активності гена *KRAS*. Відомо, що активація гена *KRAS* асоціюється з активацією низки факторів транскрипції, серед них є Snail – відомий своєю здатністю до пригнічення транскрипції гена *CDH1* шляхом гіперметилування його промоторного регіону [16]. Цей механізм пояснює зворотний зв'язок між рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *CDH1*.

Зв'язок між рівнями транскрипційної активності гена *KRAS* та ІГХ експресії β-катеніну обґрунтовано в роботі E. Lemieux et al. (2015) [12]. За даними дослідників, механізм цієї асоціації полягає в тому, що патологічна активація гена *KRAS*, яка реалізується за умов кишкового канцерогенезу та зумовлюється низкою соматичних мутацій, призводить до МЕК-залежного фосфорилування Dvl-молекул (ці молекули забезпечують передачу сигналів з Fz-рецепторів до основного протеїну «комплексу деструкції» Axin, забезпечуючи активацію Wnt/β-катенінового сигнального шляху). Наслідком фосфорилування Dvl-молекул є блок сигналів із Fz-рецепторів, що унеможлиблює активацію канонічного Wnt-каскаду. Отже, навіть за умов стимуляції клітин Wnt-лігандами, надмірне накопичення β-катеніну не відбувається, оскільки «комплекс деструкції» функціонує й забезпечує деградацію молекул β-катеніну [12]. Наведений механізм пояснює результати проведеного нами дослідження: підвищений рівень транскрипційної активності гена *CTNNB1* (зумовлений мутаціями, базуючись на даних фахової літератури) забезпечує високий рівень експресії β-катеніну; спостерігається мембранно-цитоплазматична експресія β-катеніну за відсутності імунозобарвлених ядер, тобто рівень експресії маркера не сягає критичних значень, котрі відповідають транслокації молекул β-катеніну в ядра клітин, що вказує на збереження функції «комплексу деструкції». Отже, провідна роль у прогресії КРА належить зниженню експресії *CDH1* і кодованого ним Е-кадгерину, наслідком яких є втрата адгезивних міжклітинних зв'язків, асоційована та опосередкована аномальною активністю *KRAS*, а Wnt/β-катеніновий сигнальний шлях, вочевидь, не залучається до реалізації механізмів прогресії КРА від I до IV стадії.

## Висновки

1. Колоректальна аденокарцинома характеризується зниженим рівнем транскрипційної активності гена *CDH1* [0,35 (0,09; 0,70)], що корелює ( $r = 0,90$ ) із низьким рівнем експресії Е-кадгерину [43,74 (31,42; 85,60) УООЩ], а також підвищеним рівнем транскрипційної активності гена *CTNNB1* [2,63 (1,55; 5,09)], що корелює ( $r = 0,74$ ) з високим рівнем експресії β-катеніну [117,35 (111,69; 120,32) УООЩ].

2. При прогресії колоректальної аденокарциноми від I до IV стадії за градацією pTNM у пухлинних клітинах зростає транскрипційна активність гена *CDH1* та експресія кодованого ним Е-кадгерину ( $p < 0,05$ ).

3. Для колоректальної аденокарциноми характерні зворотні зв'язки між рівнями експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1* ( $r = -0,41$ ), мРНК гена *KRAS* та експресії E-кадгерину ( $r = -0,47$ ), а також прямий зв'язок між рівнями експресії мРНК гена *KRAS* та експресії  $\beta$ -катеніну ( $r = 0,41$ ).

#### Подяка

Автори висловлюють вдячність проф. О. М. Камишному та співробітникам ПЛР-лабораторії навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету, за участю яких виконано молекулярно-генетичні дослідження.

#### Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Запорізького державного медичного університету «Раннє молекулярно-генетичне та імуногістохімічне прогнозування схильності до прогресування раку легень та органів травлення» № держреєстрації 0117U002580 (2017–2019).

#### Конфлікт інтересів: відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

#### Відомості про авторів:

Шишкін М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Туманський В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, заслужений діяч науки і техніки України.

#### Сведения об авторах:

Шишкин М. А., канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный деятель науки и техники Украины.

#### Information about authors:

Shyshkin M. A., MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Tumanskyi V. O., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Scientist and Engineering Worker of Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 19.07.2018

Після доопрацювання / Revised: 06.08.2018

Прийнято до друку / Accepted: 16.08.2018

#### Список літератури

- Church J. Molecular genetics of colorectal cancer / J. Church // *Seminars in Colon and Rectal Surgery*. – 2016. – Vol. 27. – №4. – P. 172–175.
- E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis / N. Christou, A. Perraud, S. Blondy, et al. // *Oncology Letters*. – 2017. – Vol. 13(6). – P. 4571–4576.
- E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications / S.H.M. Wong, C.M. Fang, L.H. Chuah, et al. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2018. – Vol. 121. – P. 11–22.
- Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis / X. Chen, Y. Wang, H. Xia, et al. // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39(6). – P. 6707–6714.

- Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9 / M.H. Lu, C.C. Huang, M.R. Pan, et al. // *Clinical Cancer Researches*. – 2012. – Vol. 18(23). – P. 6416–6425.
- $\beta$ -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток / А.В. Исаева, А.П. Зима, И.П. Шабалова и др. // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2015. – Т. 70. – №4. – С. 475–483.
- $\beta$ -Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics / P.J. Morin, K.W. Kinzler, A.B. Sparks // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76(19). – P. 5587–5589.
- The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma / G.M. Bourroul, H.J. Fragoso, J.W. Gomes, et al. // *Einstein (San Paulo)*. – 2016. – Vol. 14(2). – P. 135–42.
- Analysis of Wnt and  $\beta$ -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer / N. Yoshida, T. Kinugasa, K. Ohshima, et al. // *Anticancer Research*. – 2015. – Vol. 35(8). – P. 4403–10.
- Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer / A.T. Boutin, W.T. Liao, M. Wang, et al. // *Genes & Development*. – 2017. – Vol. 31(4). – P. 370–382.
- Exploring cancer proliferative signaling pathways / ed. by J.P. Manzi. – Boston: ThermoFisher SCIENTIFIC, 2015. – 75 p.
- Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer / E. Lemieux, S. Cagnol, K. Beaudry, et al. // *Oncogene*. – 2015. – Vol. 34(38). – P. 4914–4927.
- Sobin L.H. International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours / L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. – N. Y.: Wiley-Blackwell, 2009. – 50 p.
- Патент України на корисну модель № 99314 Україна, МПК (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / В.О. Туманський, А.В. Євсєєв, І.С. Коваленко, М.Д. Зубко; заявник та патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. – №U2014 14 103; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.05.1 // *Бюлетень*. – №10.
- Rasband W.S. National Institutes of Health [Электронный ресурс] / W.S. Rasband, J. Image. – Bethesda, Maryland. – Режим доступу: USA – <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis / X. He, Z. Chen, M. Jia, X. Zhao // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(7). – e70858.
- Buda A. E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis / A. Buda, M. Pignatelli // *Cell Communication & Adhesion*. – 2011. – Vol. 18(6). – P. 133–143.
- Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis / S.A. Kim, K. Inamura, M. Yamauchi, et al. // *British Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 114(2). – P. 199–206.
- Prognostic Significance of  $\beta$ -Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series / J. Bruun, M. Kolberg, J.M. Nesland, et al. // *Frontiers in Oncology*. – 2014. – Vol. 4. – P. 118.
- Шишкін М.А. Молекулярно-імуногістохімічна характеристика проліферації і апоптозу опухолевих кліток колоректальної аденокарциноми / М.А. Шишкін // *Патологія*. – 2018. – Т. 15. – №1(42). – С. 49–56.
- Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer / K. Nakamoto, H. Nagahara, K. Maeda, et al. // *Oncology Letters*. – 2013. – Vol. 5(4). – P. 1295–1300.

#### References

- Church, J. (2016) Molecular genetics of colorectal cancer. *Seminars in Colon and Rectal Surgery*, 27(4), 172–175.
- Christou, N., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M. -O., Battu, S., & Mathonnet, M. (2017) E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncology Letters*, 13(6), 4571–4576. doi: 10.3892/ol.2017.6063.
- Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., ? Ngai, S. C. (2018) E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121, 11–22. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.
- Chen, X., Wang, Y., Xia, H., Wang, Q., Jiang, X., Lin, Z., et al. (2012) Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. *Molecular Biology Reports*, 39(6), 6707–6714. doi: 10.1007/s11033-012-1494-2.
- Lu, M. H., Huang, C. C., Pan, M. R., Chen, H. H., & Hung, W. C. (2012) Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9. *Clinical Cancer Researches*, 18(23), 6416–6425. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0832.



- [6] Isaeva, A. V., Zima, A. P., Shabalova, I. P., Ryazantseva, N. V., Vasil'eva, O. A., Kasoayn, K. T., et al. (2015)  $\beta$ -Catenin: struktura, funkci i rol' v opukholevoj transformacii e'pitelial'nykh kletok [S-catenin: structure, function and role in malignant transformation of epithelial cells]. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskikh nauk*, 70(4), 475–483. [in Russian]. doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1415.
- [7] Morin, P. J., Kinzler, K. W., & Sparks, A. B. (2016)  $\beta$ -Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics. *Cancer Research*, 76(19), 5587–5589. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2387.
- [8] Bourroul, G. M., Fragoso, H. J., Gomes, J. W., Bourroul, V. S., Ohshima, C. T., Gomes, T. S., et al. (2016) The destruction complex of beta-catenin in colorectal carcinoma and colonic adenoma. *Einstein (San Paulo)*, 14(2), 135–42. doi: 10.1590/S1679-45082016AO3678.
- [9] Yoshida, N., Kinugasa, T., Ohshima, K., Yuge, K., Ohchi, T., Fujino, S., et al. (2015) Analysis of Wnt and  $\beta$ -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 35(8), 4403–10.
- [10] Boutin, A. T., Liao, W. T., Wang, M., Hwang S. S., Karpinets, T. V., Cheung, H., et al. (2017) Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes & Development*, 31(4), 370–382. doi: 10.1101/gad.293449.116.
- [11] Manzi, J. P. (Ed.) (2015). *Exploring cancer proliferative signaling pathways*. Boston: ThermoFisher SCIENTIFIC.
- [12] Lemieux, E., Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J., & Rivard, N. (2015) Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene*, 34(38), 4914–4927. doi: 10.1038/onc.2014.416.
- [13] Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009) *International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours*. New York: Wiley-Blackwell.
- [14] Tumanskyi, V. O., Yevsieiev, A. V., Kovalenko, I. S., & Zubko, M. D. (patentee) (2015) Patent Ukrainy na korysnu model №9 9314 Ukraina, MPK (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Sposib fototsyvrovoi morfometrii imunohistokhimichnykh preparativ [Ukraine patent for utility model №99314 Ukraine, IPC (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Method of photo digital morphometrical study of immunohistochemical micro-preparations]. *Biuletyn*, 10. [in Ukrainian].
- [15] Rasband, W. S. (1997–2016) Image. J. Bethesda, Maryland. Retrieved from: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- [16] He, X., Chen, Z., Jia, M., & Zhao, X. (2013) Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PLoS One*, 8(7), e70858. doi: 10.1371/journal.pone.0070858.
- [17] Buda, A., & Pignatelli, M. (2011) E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis. *Cell Communication & Adhesion*, 18(6), 133–143. doi: 10.3109/15419061.2011.636465.
- [18] Kim, S. A., Inamura, K., Yamauchi, M., Nishihara, R., Mima, K., Sukawa, Y., et al. (2016) Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *British Journal of Cancer*, 114(2), 199–206. doi: 10.1038/bjc.2015.347.
- [19] Bruun, J., Kolberg, M., Nesland, J. M., Svindland, A., Nesbakken, A., Lothe, R. A. (2014) Prognostic Significance of  $\beta$ -Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series. *Frontiers in Oncology*, 4, 118–120. doi: 10.3389/fonc.2014.00118.
- [20] Shyshkin, M. A. (2018) Molekulyarno-immunogistokhimicheskaya kharakteristika proliferacii i apoptoza opukholevykh kletok kolorektalnoj adenokarcinomy [Molecular-immunohistochemical characteristics of proliferation and apoptosis of tumor cells in colorectal adenocarcinoma]. *Pathologia*, 15(1), 49–56. [in Russian]. doi: 10.14739/2310-1237.2018.1.129447.
- [21] Nakamoto, K., Nagahara, H., Maeda, K., Noda, E., Inoue, T., Yashiro, M., et al. (2013) Expression of E-cadherin and KRAS mutation may serve as biomarkers of cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer. *Oncology Letters*, 5(4), 1295–1300. doi: 10.3892/ol.2013.1187.