

Молекулярно-иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы

М. А. Шишкин

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Цель работы – изучить особенности транскрипционной активности гена *K-RAS*, а также экспрессии мРНК генов *Ki-67* и *TP53* в сравнении с уровнями иммуногистохимической экспрессии кодируемых ими белков *Ki-67*, *p53* и каспазы-3 в колоректальной аденокарциноме (КРА) при прогрессии от I к IV стадии.

Материалы и методы. Проведено параллельное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое, патогистологическое исследование операционного материала КРА 40 пациентов (4 группы наблюдений – I, II, III, IV стадии болезни 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 повышенной транскрипционной активностью гена *K-RAS* и гена *Ki-67*. По мере прогрессирования КРА от I к IV стадии имеет место возрастание транскрипционной активности гена *K-RAS* и снижение транскрипционной активности гена *Ki-67* в группах наблюдений. Опухолевые клетки КРА характеризуются средним уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации *Ki-67*, при этом установлена обратная корреляция между показателем уровня экспрессии *Ki-67* и показателем глубины инвазии pT опухоли. КРА характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *TP53* с тенденцией к увеличению при прогрессии от I к IV стадии развития, которая коррелирует с повышенной транскрипционной активностью гена *K-RAS*. КРА также характеризуется средним уровнем экспрессии онкопротеина *p53* и низким уровнем экспрессии маркера апоптотической дегенерации каспазы-3 при наличии обратной корреляции между повышенным уровнем транскрипционной активности гена *K-RAS* и низким уровнем апоптоза опухолевых клеток КРА.

Выводы. В ходе прогрессии КРА от I к IV стадии возрастает транскрипционная активность генов *K-RAS* и *TP53*, снижается транскрипционная активность гена *Ki-67*. Имеет место обратная корреляционная взаимосвязь между уровнем транскрипционной активности генов *K-RAS* и *TP53* и уровнем апоптоза опухолевых клеток КРА. Снижение уровня пролиферативной активности опухолевых клеток КРА, наблюдаемое при прогрессии опухоли от I к IV стадии, вероятнее всего, опосредуется вовлечением путей сигнализации, не связанных с RAS-протеином.

Ключевые слова:

колоректальный рак, иммуногистохимия, *K-RAS* ген.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 49–56

DOI: 10.14739/2310-1237.2018.1.129447

E-mail: Shishkin.stomat@gmail.com

Молекулярно-імуногістохімічна характеристика проліферації та апоптозу пухлинних клітин колоректальної аденокарциноми

М. А. Шишкін

Мета роботи – вивчити особливості транскрипційної активності гена *K-RAS*, а також експресії мРНК генів *Ki-67* і *TP53* у зіставленні з рівнями імуногістохімічної експресії кодованих ними білків *Ki-67*, *p53* та каспази-3 в колоректальній аденокарциномі (КРА) при прогресуванні від I до IV стадії.

Матеріали та методи. Виконали паралельне імуногістохімічне та молекулярно-генетичне, патогістологічне дослідження операційного матеріалу КРА 40 пацієнтів (4 групи спостереження – I, II, III, IV стадії хвороби 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 незмінною слизовою оболонкою дистальних відділів товстої кишки характеризується підвищеною транскрипційною активністю гена *K-RAS* і гена *Ki-67*. З прогресуванням КРА від I до IV стадії виявили зростання транскрипційної активності гена *K-RAS* і зниження транскрипційної активності гена *Ki-67* у групах спостереження. Пухлинні клітини КРА характеризуються середнім рівнем експресії маркера клітинної проліферації *Ki-67*, при цьому встановлена зворотна кореляція між показником рівня експресії *Ki-67* та показником глибини інвазії pT пухлини. КРА характеризується підвищеною транскрипційною активністю гена *TP53* з тенденцією до збільшення за умов прогресування від I до IV стадії розвитку, що корелює з підвищеною транскрипційною активністю гена *K-RAS*. КРА також характеризується середнім рівнем експресії онкопротеїну *p53* та низьким рівнем експресії маркера апоптотичної дегенерації каспази-3 за наявності зворотної кореляції між підвищеним рівнем транскрипційної активності гена *K-RAS* і низьким рівнем апоптозу пухлинних клітин КРА.

Висновки. За умови прогресування КРА від I до IV стадії зростає транскрипційна активність генів *K-RAS* і *TP53*, знижується транскрипційна активність гена *Ki-67*. Визначили зворотний кореляційний взаємозв'язок між рівнем транскрипційної активності генів *K-RAS*, *TP53* та рівнем апоптозу пухлинних клітин КРА. Зниження рівня проліферативної активності пухлинних клітин КРА, що спостерігають під час прогресії пухлини від I до IV стадії, ймовірно, опосередковується залученням сигнальних шляхів, що не пов'язані з RAS-протеїном.

Ключові слова:

колоректальний рак, імуногістохімія, *K-RAS* ген.

Патология. – 2018. – Т. 15, № 1(42). – С. 49–56

Key words:
colorectal cancer,
immunohisto-
chemistry,
K-RAS gene.

Pathologia
2018; 15 (1), 49–56

Molecular-immunohistochemical characteristics of proliferation and apoptosis of tumor cells in colorectal adenocarcinoma

M. A. Shyshkin

Aim – to study the features of *K-RAS* transcriptional activity gene, *Ki-67* and *TP53* mRNA genes expression levels in comparison with the immunohistochemical expression levels of Ki-67, p53 proteins and caspase-3 encoded by them in colorectal adenocarcinoma (CRA) with its progression from the I to the IV stage.

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 of the disease according to pTNM classification – 10 cases in each group) with diagnosis of colorectal adenocarcinoma, and also 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 increased *K-RAS* gene and *Ki-67* gene activity. As CRA progresses from the I to IV stages, there is an increase in the transcriptional activity of the *K-RAS* gene and a decrease in the transcriptional activity of the *Ki-67* gene in the study groups. The tumor cells are characterized by the medium level of expression of *Ki-67*, which is the marker of cellular proliferation, herewith the reverse correlation between the *Ki-67* expression level and the tumor invasion level is present. CRA is characterized by the increased *TP53* gene transcriptional activity with the tendency to elevation, which happens during the progression of the tumor from the I to the IV stage and correlates with the increased *K-RAS* gene transcriptional activity. CRA is also characterized by the medium p53 expression level and the low level of caspase-3 expression, which is the marker of apoptotic degradation process, which happens in the presence of the reverse correlation between the increased *K-RAS* gene transcriptional activity and the low level of apoptosis of the tumor cells.

Conclusions. The *K-RAS* and *TP53* genes transcriptional activity increases, but the *Ki-67* gene transcriptional activity decreases during the process of CRA progression from the I to the IV stage. The inverse correlation between the level of transcription activity of the *K-RAS*, *TP53* genes and apoptosis of tumor cells of the colorectal adenocarcinoma was determined. The decline of proliferation level of the tumor cells, that is observed during the process of CRA progression from the I to the IV stage, is mediated by the signal pathways, which don't have connection with RAS-protein.

Колоректальний рак (КРР) входить в перелік 10 найбільш розповсюджених форм злоякісних новоутворень, стабільно займаючи лідируючі позиції серед причин смерті чоловіків і жінок в Україні [1]. Розвиток КРР – багатоступінчастий процес, характеризується послідовним накопленням генетических і епігенетических альтерацій. Класическою схемою кишечного канцерогенеза слугують послідовність «аденома – карцинома», в ході котрої спонтанно виникаючі молекулярно-генетическі аномалії опосередкують трансформацію умовно нормальної слизистої оболонки кишечника в аденому, аденому з тяжелою дисплазією і далі в інвазивний рак [2]. Згідно даним спеціалізованої літератури, мутації гена *K-RAS* виявляють в значительном кількості випадків КРР як на ранніх, так і на пізніх стадіях розвитку хвороби. Показатель частоти зустрічальності аномалій гена *K-RAS* в колоректальних аденомах досягає 30 %, для КРР даний показатель становить 30–68 % [3].

Ген *K-RAS* кодує RAS-протеїн – малу ГТФазу, котра активується в відповідь на вплив екстрацелюлярних стимулів, таких як фактори росту, цитокіни, гормони на відповідні рецепторні структури клітинних мембран, забезпечуючи при цьому передачу сигналу до ядерних структур. При цьому білок RAS здатний передавати не тільки активуючі сигнали, але і «вимкнути» ряд сигнальних каскадів шляхом гідролізу гуанозидтрифосфатів (ГТФ) до гуанозиддифосфатів (ГДФ) [4]. Найбільш розповсюджений варіант альтерації гена *K-RAS* в раку – це так звані «активуючі» мутації, котрі затрагивають 12 і 13 кодони і викликають

стійку активацію сигнальних шляхів, для котрих білок RAS в нормі забезпечує передачу сигналів в відповідь на зовнішню стимуляцію. До останніх відносять PI3K/AKT/mTOR- і MAPK/ERK-сигнальні каскади, забезпечуючі регуляцію роботи генів, відповідальних за диференціювання нових клітинних поколінь, виживаність кліток, рівень їх проліферації і апоптозу, міжклітинні взаємодії і адгезію [5].

Хоча точний механізм онкогенного впливу *K-RAS* все ще не ясний, було проведено немало досліджень, присвячених вивченню аномалій даного гена і їх ролі в кишечному канцерогенезі. Так, в мета-аналізі E. J. van Helden et al. (2017) показано, що мутації гена *K-RAS* лежать в основі резистентності КРР до таргетних інгібіторів епідермального фактора росту (EGFR) [6]. В роботі J. M. Loree, S. Kopetz (2017) встановлено, що мутації *K-RAS* формують основу неспецифіческої хіміорезистентності КРР за рахунок блокування підконтрольних шляхів апоптозу [7]. Опубліковані дослідження, в котрих описана залежність між аномальною активністю гена *K-RAS* і рівнем проліферативної активності кліток КРР, ступеню гістологіческої диференціювання опухолі, прогнозом для життя пацієнтів [8–10]. Однак результати цих досліджень несуть протирічливий характер, а точні механізми дисрегуляції роботи гена *K-RAS* і функціонально залежних сигнальних каскадів залишаються до кінця не вивченими.

Цель работы

Изучить особенности транскрипционной активности гена *K-RAS*, а также экспрессии мРНК генов *Ki-67* и

Таблица 1. Специфические пары праймеров, которые были использованы для анализа исследуемых и референтного генов

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>K-RAS</i>	F = AAGACAGAGAGTGGAGGATGC R = TGTCGGATCTCCCTCACAA	59.17 60.25	51	642/643
<i>Ki-67</i>	F = GTGGTTCGACAAGTGGCCTT R = ACAACTCTTCCACTGGGACG	60.82 59.61	51	106/107
<i>TP53</i>	F = CTGGATTGGCAGCCAGACT R = CTCCTCCATGGCAGTGACC	59.70	46	174/175
<i>β-actin (ACTB)</i>	F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	61.30 61.15	59	78/79

TP53 в сравнении с уровнями иммуногистохимической экспрессии кодируемых ими белков *Ki-67*, *p53* и *каспазы-3* в колоректальной аденокарциноме при прогрессии от I к IV стадии.

Материалы и методы исследования

Проведено параллельное иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследование операционного материала колоректальной аденокарциномы (КРА) 40 пациентов. На основании предшествующего патоморфологического исследования операционного материала с учетом действующей классификации pTNM [11] выделили 4 группы, каждая из которых включала по 10 наблюдений: I стадия ($T_{1-2} N_0 M_0$), II стадия ($T_{3-4} N_0 M_0$), III стадия ($T_{1-4} N_{1-3} M_0$) и IV стадия болезни ($T_{1-4} N_{1-3} M_1$). В качестве группы контроля использовали 10 фрагментов стенки дистальных отделов толстого кишечника обычной гистологической структуры (секционный материал).

Операционный и секционный материал фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Гистоархитектонику оценивали в парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, в серийных парафиновых срезах проводили иммуногистохимическое (ИГХ) исследование по стандартной методике, предусмотренной производителями антител. Исследование пролиферативной активности клеток проводили с использованием антител *Mo a-Hu Ki-67 Antigen* (Clone MIB-1, DAKO, Denmark), уровня экспрессии белка *p53* – антител *Mo a-Hu p53 Protein* (Clone DO-7, DAKO, Denmark), уровня апоптоза клеток – антител *Mo a-Hu Caspase Ab-3* (Clone 3CSP03, Thermo Scientific, USA). Для визуализации использована система DAKO EnVision+ System с диаминобензидином (DAKO, Denmark).

Результаты ИГХ-исследования оценивали в микроскопе AxioPlan 2 (Carl Zeiss, Germany), срезы фотографировали цифровой фотокамерой «Canon EOS 1000D» (Japan) в 5 полях зрения при увеличении $\times 200$. Ядерную экспрессию маркеров *Ki-67* и *p53* анализировали в цифровых фотоизображениях соответствующих ИГХ микропрепаратов с использованием пакета Photoshop CC (2014): при наличии в стандартизованном поле зрения менее 25 % иммунопозитивных клеток уровень экспрессии расценивали как низкий, при наличии 25–75 % иммунопозитивных клеток – как средний, при наличии в поле зрения более 75 % иммунопозитивных клеток – как высокий [12]. Экспрессию *каспазы-3* оценивали методом фотоцифровой морфометрии [13] в условных единицах оптической плотности (УЕОП) и градуировали на 4

уровня: негативная реакция – 0–20 УЕОП, низкий уровень экспрессии – 21–50 УЕОП, умеренный – 51–100 УЕОП, высокий уровень – более 100 УЕОП.

Параллельное молекулярно-генетическое исследование проведено в тех же 40 образцах КРА и 10 образцах стенки дистальных отделов толстого кишечника обычной гистологической структуры, фиксированных в формалине и залитых в парафин. Для получения тотальной РНК ткани депарафинировали в ксилоле и регидратировали в этаноле нисходящих концентраций (100 %, 96 %, 70 %). Далее полученные образцы гомогенизировали пестиком в ступке и помещали в пробирки «Ахуген» (USA) для повторной депарафинизации и регидратации. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора «Trizol RNA Prep 100» (Isogen Lab., LTD, RF). Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор «OT-1» (Syntol, RF). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H_2O , очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл реакционной смеси (2,5 x) и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 минут при 9 °C.

Для определения уровня экспрессии мРНК использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», USA) и набор реактивов для проведения ПЦР–PB в присутствии SYBR Green R-402 (Syntol, RF). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу SynTaq с антителами, подавляющими активность фермента, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, dNTP-дезоксинуклеозидтрифосфат, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл путем добавления деионизированной H_2O . Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референтного генов подобраны при помощи программного обеспечения Primer-Blast и изготовлены фирмой Thermo Scientific (USA) (табл. 1).

Амплификация состояла из 45–50 циклов и проведена в таких условиях: денатурация – 95 °C, 15 секунд; отжиг – 59–61 °C, 30–60 секунд; элонгация – 72 °C, 30 секунд. В качестве референт-гена использован ген β -актина (*ACTB* gene). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли методом $\Delta\Delta Ct$. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, USA). В эксперимент включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы

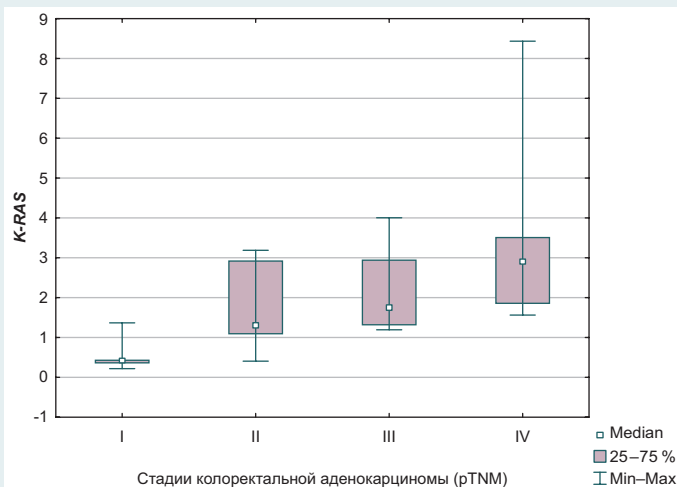


Рис. 1. Экспрессия мРНК гена *K-RAS* в колоректальной аденокарциноме на разных стадиях ее развития.

в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Каждая реакция амплификации выполнена на индивидуальных образцах, в трех повторах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере в программе Statistica 6.0 (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану, нижний и верхний квартили, полученные данные представляли в виде [Me ($Q_1; Q_2$)]. Сравнение проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (при сравнении 2 групп наблюдений), а также рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса (при сравнении 4 групп наблюдений). Значимость различий между частотой повышения относительной нормализованной экспрессии в группах исследования проверяли с помощью критерия χ^2 . Изучение связей между исследуемыми параметрами проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического исследования установлено, что колоректальная аденокарцинома (КРА) в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *K-RAS*: случаи повышения уровня экспрессии мРНК гена составляют 87,5 % от общего числа наблюдений, отмечены достоверно чаще случаев снижения уровня экспрессии мРНК гена ($p < 0,05$), а уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* в КРА составляет 1,66 (1,19; 2,91). Имеет место тенденция к возрастанию транскрипционной активности гена *K-RAS* в группах исследования от I к IV стадии КРА по градации pTNM (рис. 1).

В I стадии КРА экспрессия мРНК гена *K-RAS* составляет 0,42 (0,36; 0,43), т. е. отмечено снижение транскрипционной активности гена *K-RAS*: сниженный

уровень экспрессии мРНК *K-RAS* имеет место в 80 % КРА I стадии и установлен достоверно чаще случаев повышенного уровня экспрессии мРНК этого гена ($p < 0,05$). Для последующих стадий болезни характерно значимое повышение транскрипционной активности гена *K-RAS*: во II стадии КРА экспрессия мРНК гена *K-RAS* составляет 1,31 (1,09; 2,91), повышенный уровень экспрессии мРНК этого гена установлен в 70 % опухолей II стадии, т. е. достоверно чаще, чем сниженный уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* ($p < 0,05$); на III стадии КРА уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS* составляет 1,75 (1,31; 2,93), повышенный уровень экспрессии мРНК этого гена имеет место в 100 % опухолей; на IV стадии КРА в 100 % опухолей отмечен более высокий уровень экспрессии мРНК гена *K-RAS*, уровень экспрессии мРНК этого гена составляет 2,91 (1,85; 3,50).

На основе данных специализированной литературы, именно «активирующие» мутации гена *K-RAS* служат причиной возрастания его транскрипционной активности. Как правило, это точечные мутации в пределах 12 и 13 кодонов – транзигция G–A и/или трансверсия G–T, которые приводят к синтезу ГТФазы с аномальной активностью [5]. В экспериментальной работе А. Т. Boutin et al. [3] показано возрастание активности гена *K-RAS* в последовательности «аденома – карцинома». По данным этих исследователей, аномальная активность *K-RAS*, проявляющаяся в ходе реализации такой последовательности, в большинстве случаев сопровождается снижением активности генов *APC* и *TP53*, а также избыточной активацией TGF- β -сигнального пути [3]. Эти наблюдения в целом согласуются с нашими результатами, однако не объясняют причину снижения транскрипционной активности гена *K-RAS* на I стадии развития КРА. Кроме того, в ряде работ [8–10] получены спорные данные касательно влияния аномальной активности *K-RAS* на уровни пролиферативной и апоптотической активности опухолевых клеток КРА, что послужило стимулом для изучения уровней транскрипционной активности соответствующих генов, а также ИГХ экспрессии их белковых продуктов.

Мы установили, что КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *Ki-67*: уровень относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 1,80 (1,04; 2,99). Повышенный уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* наблюдают в 80 % КРА, т. е. достоверно чаще случаев сниженной транскрипционной активности гена ($p < 0,05$). Результат сравнительного анализа показателей экспрессии мРНК гена *Ki-67* в последовательности «I – II – III – IV стадии КРА» свидетельствует о наличии тенденции к постепенному снижению транскрипционной активности гена при прогрессии рака (рис. 2).

Примечательно, что повышение транскрипционной активности гена *Ki-67* характеризует лишь I, II и III стадии развития КРА: на I стадии болезни уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 3,20 (2,31; 3,59), случаи повышенного уровня экспрессии мРНК гена – 100 % от числа наблюдений этой стадии; на II

стадии уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 2,92 (1,80; 3,50), случаи повышенного уровня экспрессии мРНК гена – также 100 % от числа наблюдений данной стадии; на III стадии болезни уровень экспрессии мРНК гена *Ki-67* составляет 1,27 (1,19; 2,08), случаи повышенного уровня экспрессии мРНК гена – 90 % от числа наблюдений данной стадии, установлены достоверно чаще случаев сниженного уровня экспрессии мРНК гена ($p < 0,05$).

Таким образом, на I, II и III стадиях развития КРА транскрипционная активность гена *Ki-67* значимо выше аналогичного показателя для нормальной слизистой. Однако при прогрессии заболевания, последовательной смене стадий транскрипционная активность *Ki-67* снижается относительно предшествующей стадии развития болезни: экспрессия мРНК гена на II стадии КРА меньше, чем экспрессия мРНК гена на I стадии КРА, а экспрессия мРНК гена *Ki-67* на III стадии КРА меньше экспрессии мРНК гена на II стадии болезни. IV стадия КРА отличается сниженной (относительно неизменной слизистой оболочки, а также относительно предшествующей ей III стадии болезни) транскрипционной активностью гена *Ki-67*: экспрессия мРНК гена *Ki-67* составляет 0,52 (0,28; 1,04), случаи сниженного уровня экспрессии мРНК гена – 90 % от числа наблюдений данной стадии, установлены достоверно чаще случаев повышенной транскрипционной активности гена ($p < 0,05$).

Результаты ИГХ-исследования уровня пролиферативной активности клеток КРА описаны в предыдущей работе [14]. Установлено, что опухолевые клетки КРА характеризуются средним уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации *Ki-67* – 41,20 (36,62; 59,42) %. Также отмечена обратная корреляционная связь средней силы ($r = -0,41$) между показателем уровня экспрессии *Ki-67* опухолевыми клетками и показателем глубины инвазии (pT) КРА, что согласуется с результатами параллельно проведенного молекулярно-генетического исследования. В работе A. Hegazy et al. [15] также установлена обратная корреляционная связь между уровнем пролиферативной активности и глубиной инвазии КРА. Однако вопрос о прогностической ценности определения уровня пролиферации опухолевых клеток КРА остается спорным [16].

В ряде работ описана прямая зависимость между аномальной активностью *K-RAS* в КРА и уровнем пролиферативной активности клеток опухоли [3,8,9]. Результаты выполненного нами корреляционного анализа не показали статистически достоверную связь между уровнями относительной нормализованной экспрессии мРНК генов *K-RAS* и *Ki-67* ($r = -0,19$; $p > 0,05$). Таким образом, снижение уровня пролиферативной активности в ходе прогрессии КРА от I к IV стадии развития, вероятнее всего, опосредуется вовлечением иных путей сигнализации, не связанных с *RAS*-протеином. Опубликованы работы, описывающие механизм угнетения пролиферации раковых клеток КРА за счет регуляторного воздействия отдельных семейств микроРНК [17–19], а также данные, согласно которым снижение пролиферативной активности опухолевых клеток КРА ассоциируется с активацией механизмов, запускающих эпителиально-мезенхимальный переход [20].

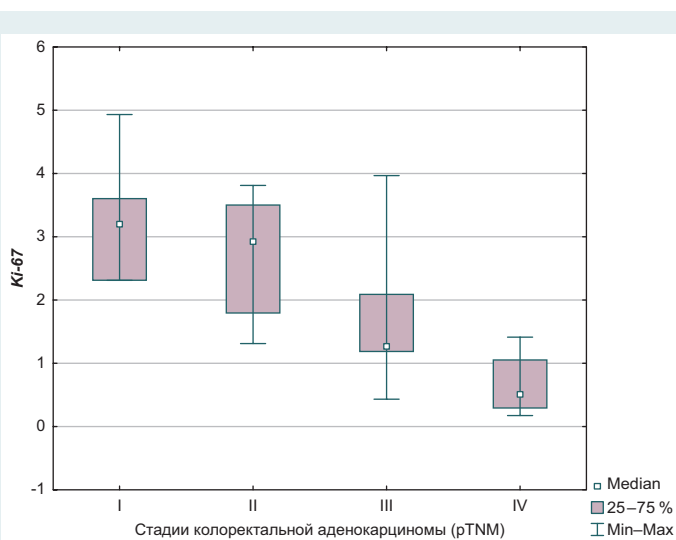


Рис. 2. Экспрессия мРНК гена *Ki-67* в colorectal adenocarcinome на разных стадиях ее развития.

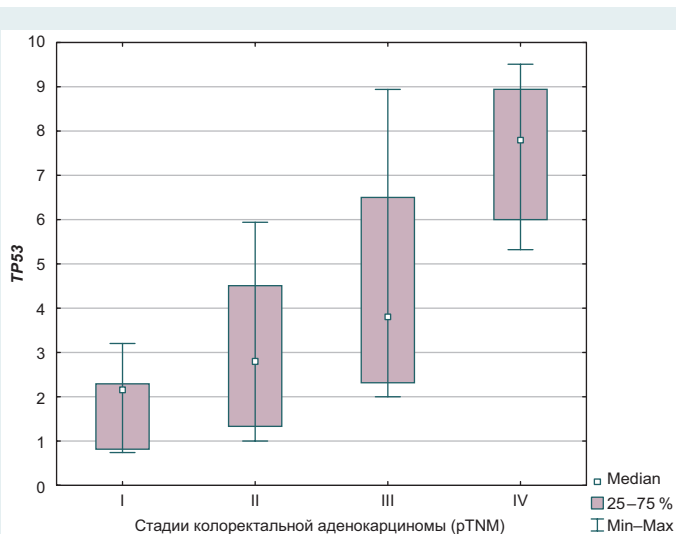


Рис. 3. Экспрессия мРНК гена *TP53* в colorectal adenocarcinome на разных стадиях ее развития.

В результате молекулярно-генетического исследования установлено, что КРА в сравнении с неизменной слизистой оболочкой дистальных отделов толстого кишечника у 100 % больных характеризуется повышенной транскрипционной активностью гена *TP53*: уровень относительной нормализованной экспрессии мРНК этого гена составляет 3,50 (2,30; 6,50). По мере прогрессирования КРА от I к IV стадии имеет место четкая тенденция к повышению транскрипционной активности гена *TP53* (рис. 3).

Повышение транскрипционной активности гена *TP53* характеризует все стадии развития КРА: в I стадии болезни уровень относительной нормализованной экспрессии мРНК гена составляет 2,15 (0,82; 2,30), во II стадии – 2,80 (1,32; 4,50), в III стадии – 3,80 (2,32; 6,50), в IV стадии заболевания – 7,80 (5,99; 8,92).

Результаты ИГХ-исследования уровня экспрессии онкопротеина p53 клетками КРА описаны в предыдущей работе [14]. Установлено, что опухолевые клетки КРА характеризуются средним уровнем экспрессии p53 – 39,67 (15,69; 83,75) %. Также установлена средней силы корреляционная связь ($r = 0,36$) между степенью гистологической дифференцировки (G) КРА и экспрессией опухолевыми клетками онкопротеина p53. Данные современной научной литературы по этому вопросу носят противоречивый характер: опубликованы работы [15,21], результаты которых согласуются с полученными нами данными, а также исследования, результаты которых свидетельствуют об отсутствии корреляции между степенью гистологической дифференцировки КРР и экспрессией p53 клетками опухоли [22].

Проведенный нами корреляционный анализ показал статистически достоверную прямую средней силы связь между уровнями транскрипционной активности генов *K-RAS* и *TP53* ($r = 0,43$; $p < 0,05$). L. Du et al. [23] предложили использовать гены *K-RAS* и *TP53* в качестве биомаркеров, позволяющих дифференцировать диспластические изменения и ранние стадии развития карциномы, развивающейся на фоне хронических воспалительных заболеваний толстой кишки, однако вопрос о функциональной взаимосвязи между этими генами не был раскрыт в этой работе. Прямая взаимосвязь между функциональной активностью генов *K-RAS* и *TP53* находит обоснование в современных представлениях о функционировании PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути, активация которого опосредуется RAS-протеином. Известно [10], что экспрессия мутантного гена *TP53* регулируется рядом факторов транскрипции, среди которых E2F и FOXO3a. Последние, в свою очередь, служат мишенями для фосфорилирования киназой AKT – одним из ключевых звеньев упомянутого сигнального каскада [10]. В исследовании A. T. Boutin et al. [3] получены обратные данные, согласно которым аномальная активность *K-RAS* в последовательности «аденома – карцинома» реализуется на фоне снижения экспрессии *TP53*. Однако авторы [3] привязывают эти изменения к аномальной активности TGF- β -сигнального пути, который не является подчиненным RAS-протеину.

Ген *TP53* известен как «страж генома»: белок p53 (продукт гена *TP53*) при возникновении каких-либо повреждений структуры ДНК останавливает клеточный цикл и обеспечивает запуск репаративных процессов, а при невозможности репарации p53 запускает апоптотический каскад гибели клетки с дефектным геномом [21]. Относительно высокие уровни экспрессии *TP53* и его белкового продукта в карциномах обусловлены экспрессией мутантного гена *TP53* и, соответственно, мутантного онкопротеина p53. На основании данных специализированной литературы, онкопротеин p53 не способен к запуску апоптоза, а в отдельных случаях может оказывать обратное воздействие, блокируя передачу сигналов по соответствующим сигнальным каскадам [15].

ИГХ-исследование экспрессии маркера апоптотической деградации каспазы-3 клетками КРА показало, что опухолевые клетки КРА характеризует низкий

уровень апоптоза: при фотоцифровой морфометрии уровень экспрессии каспазы-3 составил 28,72 (15,64; 76,71) УЕОП. Установлена прямая средней силы корреляционная связь ($r = 0,42$) между уровнем экспрессии онкопротеина p53 и уровнем экспрессии каспазы-3 клетками КРА, что согласуется с приведенными выше данными научной литературы касательно эффекта обратного воздействия мутантного протеина p53. По данным С. М. Pfeffer, A. Т. К. Singh (2018), этот эффект может быть обусловлен блокировкой активации инициаторных каспаз -8 и -10, что, в свою очередь, обуславливает блокировку активации эффекторных каспаз, к числу которых относят и каспазу-3 [24]. Проведенный в данной работе корреляционный анализ показал наличие статистически достоверной обратной корреляции средней силы ($r = -0,44$, $p < 0,05$) между повышенным уровнем транскрипционной активности гена *K-RAS* и низким уровнем апоптоза опухолевых клеток КРА. Таким образом, полученные данные указывают на наличие функциональной взаимосвязи между генами *K-RAS*, *TP53* и уровнем апоптоза в КРА. Возрастающая транскрипционная активность генов *K-RAS* и *TP53*, очевидно, обуславливает снижение уровня апоптоза раковых клеток КРА.

Выводы

1. При прогрессии колоректальной аденокарциномы от I к IV стадии в градации pTNM в опухоли возрастает транскрипционная активность генов *K-RAS* и *TP53*, а также снижается транскрипционная активность гена *Ki-67*.
2. Имеет место обратная корреляционная взаимосвязь между уровнем транскрипционной активности генов *K-RAS* и *TP53* и уровнем апоптоза опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы.
3. Снижение уровня пролиферативной активности опухолевых клеток колоректальной аденокарциномы, наблюдаемое при прогрессии опухоли от I к IV стадии, вероятнее всего, опосредуется вовлечением путей сигнализации, не связанных с RAS-протеином.

Благодарность

Автор выражает благодарность профессору А. М. Камышному и сотрудникам ПЦР-лаборатории научного медико-лабораторного центра Запорожского государственного медицинского университета, с участием которых выполнены молекулярно-генетические исследования.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках госбюджетной НИР «Ранне молекулярно-генетичне та імуногістохімічне прогнозування схильності до прогресування раку легенів та органів травлення» (0117U002580) 2017–2019, которая финансируется МЗ Украины.

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of Interest: author has no conflict of interest to declare.

Сведения об авторе:

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

Відомості про автора:

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

Information about author:

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

Надійшла до редакції / Received: 26.03.2018

Після доопрацювання / Revised: 03.04.2018

Прийнято до друку / Accepted: 06.04.2018

Список литературы

- [1] Рак в Україні, 2015–2016 / З.П. Федоренко Л.О. Гулак, Ю.Й. Михайлович та ін. // Бюлетень національного канцер-реєстру України. – 2017. – №18. – 127 с.
- [2] Arvelo F. Biology of colorectal cancer / F. Arvelo, F. Sojo, C. Cotte // *Ecancermedalscience*. – 2015. – Vol. 9. – P. 520–534.
- [3] 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.
- [4] K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas / N. Margetis, M. Kouloukoussa, K. Pavlou, et al. // *In vivo*. – 2017. – Vol. 31. – №4. – P. 527–542.
- [5] Prognostic value of KRAS codon 13 gene mutation for overall survival in colorectal cancer: Direct and indirect comparison meta-analysis / M.S. Kwak, J.M. Cha, J.Y. Yoon, et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – Vol. 96. – №35. – P. E7882.
- [6] Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis / E.J. van Helden, C.W. Menke-van der Houven van Oordt, M.W. Heymans, et al. // *Cancer metastasis reviews*. – 2017. – Vol. 36. – №2. – P. 395–406.
- [7] Loree J.M. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer / J.M. Loree, S. Kopetz // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2017. – Vol. 9. – №8. – P. 551–564.
- [8] Xiuli L. KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis / L. Xiuli, M. Jakubowski, J.L. Hunt // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2015. – Vol. 135. – №2. – P. 245–252.
- [9] Coulson R. Molecular Profiling in Resectable Colorectal Liver Metastases: The Role of KRAS Mutation Status in Assessing Prognosis in the Preoperative Setting / R. Coulson // *Journal of the advanced practitioner of oncology*. – 2015. – Vol. 6. – №5. – P. 470–474.
- [10] Temraz S. Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers / S. Temraz, D. Mukherji, A. Shamseddine // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – №19. – P. 22976–22988.
- [11] 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 pp.
- [12] Uhlén M. The Human Protein Atlas [Електронний ресурс] / M. Uhlén. – 2015. – Режим доступу: <http://www.proteinatlas.org>.
- [13] Патент 99314 Україна: МПК (2015) 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Спосіб фотоцифрової морфометрії імуногістохімічних препаратів / В.О. Туманський, А.В. Євсєєв, І.С. Коваленко, М.Д. Зубко; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.05.15 // Бюлетень. – 2015. – №10. – 8 с.
- [14] Шишкін М.А. Сравнительная иммуногистохимическая характеристика пролиферации и апоптоза колоректальной аденокарциномы / М.А. Шишкін // Патология. – 2016. – №3 (38). – С. 65–72.
- [15] Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study) / A. Hegazy, S.A. Daoud, W.S. Ibrahim, et al. // *Academic Journal of Cancer Research*. – 2014. – Vol. 7. – №3. – P. 168–172.
- [16] High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer / N. Melling, C.M. Kowitz, R. Simon, et al. // *Journal of Clinical Pathology*. – 2016. – №69. – P. 209–214.
- [17] Xiao R. miRNA-144 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells through GSPT1 / R. Xiao, C. Li, B. Chai // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2015. – Vol. 74. – P. 138–144.
- [18] miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A / Y. Yin, B. Zhang, W. Wang, et al. // *Clinical cancer research*. – 2014. – Vol. 20. – №23. – P. 6187–6199.
- [19] MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer / J. Thomas, M. Ohtsuka, M. Pichler, H. Ling // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – №12. – P. 28063–28076.

- [20] Long noncoding RNA VIM-AS1 promotes colorectal cancer progression and metastasis by inducing EMT / H. Rezanejad Bardaji, M.H. Asadi, M.M. Yaghoobi // *European Journal of Cell Biology*. – 2018. – Vol. 7. – P. 1035–1048.
- [21] p53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation / X. Li, J. Zhou, Z. Chen, W. Chang // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – №21(1). – P. 81–93.
- [22] A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis / Y. Wang, X.S. Wu, J. He, et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – №22. – P. 32854–32865.
- [23] KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: a meta-analysis / L. Du, J.J. Kim, J. Shen, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – №13. – P. 22175–22186.
- [24] Pfeiffer C.M. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy / C.M. Pfeiffer, A.T.K. Singh // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – №2. – P. 448–454.

References

- [1] Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Yu. Y., Horokh, Ye. L., Ryzhov, A. U., Sumkina, O. V., & Kutsenko, L. B. (2017). Rak v Ukraini, 2015–2016 [Cancer in Ukraine, 2015–2016]. *Biuletyn natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy*, 18. [in Ukrainian].
- [2] Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015) Biology of colorectal cancer. *Ecancermedalscience*, 9, 520–534. doi: 10.3332/ecancer.2015.520.
- [3] 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.
- [4] Margetis, N., Kouloukoussa, M., Pavlou, K., Vrakas, S., & Mariolis-Sapsakos, T. (2017) K-ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. *In vivo*, 31(4), 527–542. doi: 10.21873/invivo.11091.
- [5] Kwak, M. S., Cha, J. M., Yoon, J. Y., Jeon, J. W., Shin, H. P., Chang, H. J., et al. (2017) Prognostic value of KRAS codon 13 gene mutation for overall survival in colorectal cancer: Direct and indirect comparison meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96(35), E7882. doi: 10.1097/MD.0000000000007882.
- [6] van Helden, E. J., Menke-van der Houven van Oordt, C. W., Heymans, M. W., Ket, J. C. F., & Verheul, H. M. W. (2017) Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer metastasis reviews*, 36(2), 395–406. doi: 10.1007/s10555-017-9668-y.
- [7] Loree, J. M., & Kopetz, S. (2017) Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9(8), 551–564. doi: 10.1177/175883401714997.
- [8] Xiuli, L., Jakubowski, M., & Hunt, J. L. (2015) KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 135(2), 245–252. doi: 10.1309/AJCP7FO2VAXIVSTP.
- [9] Coulson, R. (2015) Molecular Profiling in Resectable Colorectal Liver Metastases: The Role of KRAS Mutation Status in Assessing Prognosis in the Preoperative Setting. *Journal of the advanced practitioner of oncology*, 6(5), 470–474.
- [10] Temraz, S., Mukherji, D., & Shamseddine, A. (2015) Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated Colorectal Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(19), 22976–22988. doi: 10.3390/ijms160922976.
- [11] Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009) *International Union Against Cancer (UICC): TNM Classification of Malignant Tumours*. New York: Wiley-Blackwell.
- [12] Uhlén, M. (2015) The Human Protein Atlas. Retrieved from: <http://www.proteinatlas.org>.
- [13] Tumanyskyi, V. O., Yevsieiev, A. V., Kovalenko, I. S., & Zubko, M. D. (patentee) (2015) Patent 99314 Ukraine, MPK 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 Sposib fototsyvrovoi morfometrii imunohistokhimichnykh preparativ [Patent of Ukraine 99314, IPC 2015.01 G01N 21/00 G06K 9/00 The technique of digital morphometry of immunohistochemical slides]. *Biuletyn*, 10. [in Ukrainian].
- [14] Shyshkin, M. A. (2016) Sravnitel'naya immunogistokhimicheskaya kharakteristika proliferacii i apoptoza kolorektal'noj adenokarcinomy [Comparative immunohistochemical study of proliferation and apoptosis in colorectal adenocarcinoma]. *Patologiya*, 3(38), 65–72. [in Russian]. doi: 10.14739/2310-1237.2016.3.87497.
- [15] Hegazy, A., Daoud, S. A., Ibrahim, W. S., El-Atrebi, K., Saker, M., & Abdel-Wahab, N. (2014) Role of Ki-67, P53 and Bcl-2 in Advanced Colorectal Carcinoma (Histopathological and Immunohistochemical Study). *Academic Journal of Cancer Research*, 7(3), 168–72. doi: 10.5829/idosi.ajcr.2014.7.3.1111.
- [16] Melling, N., Kowitz, C. M., Simon, R., Bokemeyer, C., Terracciano, L., Sauter, G., et al (2016). High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 69, 209–14. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202985.

- [17] Xiao, R., Li, C., & Chai, B. (2015) miRNA-144 suppresses proliferation and migration of colorectal cancer cells through GSPT1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 138–144. doi: 10.1016/j.biopha.2015.08.006.
- [18] Yin, Y., Zhang, B., Wang, W., Fei, B., Quan, C., Zhang, J., et al. (2014) miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by down-regulating RAB22A. *Clinical cancer research*, 20(23), 6187–6199. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1030.
- [19] Thomas, J., Ohtsuka, M., Pichler, M., & Ling, H. (2015) MicroRNAs: Clinical Relevance in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28063–28076. doi: 10.3390/ijms161226080.
- [20] Rezanejad Bardaji, H., Asadi, M. H., & Yaghoobi, M. M. (2018) Long noncoding RNA VIM-AS1 promotes colorectal cancer progression and metastasis by inducing EMT. *European Journal of Cell Biology*, 7, 1035–1048. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.04.004.
- [21] Li, X., Zhou, J., Chen, Z., & Chang, W. (2015). p53 mutations in colorectal cancer – molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, 21(1), 84–93. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.84.
- [22] Wang, Y., Wu, X. S., He, J., Ma, T., Lei, W., & Shen, Z. Y. (2016) A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Oncotarget*, 7(22), 32854–32865. doi: 10.18632/oncotarget.9056.
- [23] Du, L., Kim, J. J., Shen, J., Chen, B., & Dai, N. (2017) KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(13), 22175–22186. doi: 10.18632/oncotarget.14549.
- [24] Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018) Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448–454. doi: 10.3390/ijms19020448.