

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-27

УДК: 616.345/36-006.6-091.8

## ОСОБЛИВОСТІ ТРАНСКРИПЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕНУ KRAS ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ В КОЛОРЕКТАЛЬНІЙ АДЕНОКАРЦИНОМІ

Туманський В.О., Шишкін М.А.

Запорізький державний медичний університет (вул. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна)

Відповідальний за листування:  
e-mail: Shishkin.stomat@gmail.com

Статтю отримано 28 грудня 2018 р.; прийнято до друку 31 січня 2019 р.

**Анотація.** Колоректальна аденокарцинома (КРА) є наслідком кумуляції численних мутацій. Метою роботи стало дослідження транскрипційної активності гену KRAS на I, II, III, IV стадіях розвитку КРА та аналіз зв'язків між транскрипцією KRAS і Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1. Проведено патогістологічне та молекулярно-генетичне дослідження операційного матеріалу КРА 40 пацієнтів, а також секційного матеріалу 10 фрагментів стінки дистальних відділів товстої кишки. Використано наступні статистичні методи: описативна статистика, критерій  $\chi^2$ , критерій Краскела-Уоліса, коефіцієнт рангової кореляції Спірмена. Встановлено, що КРА характеризується підвищеною транскрипційною активністю KRAS: на I стадії Ме експресії мРНК гена становить 0,42 (0,36; 0,43), на II - 1,31 (1,09; 2,91), на III - 1,75 (1,31; 2,93) і на IV - 2,91 (1,85; 3,50). Виявлено зниження транскрипційної активності гена Ki-67: для I стадії Ме експресії мРНК гена становить 3,20 (2,31; 3,59), для II - 2,92 (1,80; 3,50), для III - 1,27 (1,19; 2,08) і для IV - 0,52 (0,28; 1,04). Стосовно гена TP53 виявлено підвищення транскрипційної активності: для I стадії Ме становить 2,15 (0,82; 2,30), для II - 2,80 (1,32; 4,50), для III - 3,80 (2,32; 6,50), для IV - 7,80 (5,99; 8,92). Також виявлено прямий середньої сили зв'язок між рівнями транскрипційної активності KRAS і TP53. Відзначається зниження транскрипційної активності CDH1: Ме становить 0,88 (0,42; 1,14) для I стадії, 0,48 (0,23; 1,13) для II, 0,15 (0,09; 0,36) для III і 0,08 (0,04; 0,41) для IV стадії. Також виявлено зворотній середньої сили зв'язок між рівнями експресії мРНК генів KRAS і CDH1. Вивчення мРНК гена CTNNB1 на різних стадіях розвитку КРА вказує на відсутність статистично значущої різниці: Ме становить 2,88 (2,38; 5,38) для I стадії, 3,83 (2,59; 5,99) для II, 2,02 (1,38; 6,95) для III і 2,27 (1,23; 2,93) для IV стадії. Таким чином, транскрипційна активність гену KRAS зростає у послідовності від I до IV стадії розвитку КРА, впливаючи на апоптоз і адгезивні властивості ракових клітин.

**Ключові слова:** колоректальний рак, K-RAS ген, Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1.

### Вступ

Згідно сучасних уявлень колоректальна аденокарцинома (КРА) є наслідком кумуляції численних мутацій та епігенетичних аномалій [2]. Ген KRAS з високою вірогідністю залучається до кишкового канцерогенезу, адже його мутації виявляються в 30-68% КРА [1]. KRAS кодує RAS-протеїн, що є малою ГТФ-азою, яка активується у відповідь на позаклітинну стимуляцію ростовими факторами, цитокінами, гормонами рецепторів клітинних мембран, забезпечуючи передачу сигналів до клітинних ядер [9]. Найбільш поширений варіант альтерації KRAS в карциномах - це так звані "активуючі" мутації, що локалізуються в межах 12 і 13 кодонів, та забезпечують стійку активацію сигнальних шляхів, що активуються RAS-протеїном в нормі лише за наявності зовнішньої стимуляції. Серед останніх - PI3K/AKT/mTOR- і MAPK/ERK-сигнальні шляхи, які регулюють роботу генів, відповідальних за диференціювання епітеліоцитів, виживаність клітин, рівні їхньої проліферативної та апоптотичної активності, а також міжклітинні взаємодії та адгезію [6].

Було опубліковано чимало робіт, присвячених вивченню ролі та практичного значення KRAS в КРА. У метааналізі E. J. van Helden et al. (2017) показано, що мутації гена KRAS лежать в основі резистентності КРА до таргетних інгібіторів епідермального фактору росту (EGFR) [15]. У роботі J. M. Loree, S. Kopetz (2017) встановлено, що мутації KRAS формують основу неспецифічної хіміо-резистентності КРА за рахунок блокування підконтроль-

них шляхів апоптозу [8]. Знайдено також дослідження, в яких описана залежність між аномальною активністю гена KRAS і рівнем проліферативної активності клітин КРА, ступенем гістологічного диференціювання пухлини, прогнозом для життя пацієнтів [3, 13, 17]. Однак результати цих досліджень носять суперечливий характер, а точні механізми дисрегуляції KRAS і функціонально залежних сигнальних каскадів лишаються не вивченими.

Метою даної роботи стало дослідження транскрипційної активності гену KRAS на I, II, III, IV стадіях розвитку КРА та аналіз зв'язків між транскрипцією цього гену і генів Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1.

### Матеріали та методи

Проведено патогістологічне та молекулярно-генетичне дослідження (ПЛР-РЧ) 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). Операційний і секційний матеріал фіксували в 10% забуференому формаліні та заливали в парафін. Особливості гістологічної будови досліджуваних зразків вивчали в парафінових зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином.

ПЛР-РЧ здійснили в тих самих 40 зразках КРА і 10

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

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>K-RAS</i>	F = AAGACAGAGAGTGGAGGATGC R = TGTCGGATCTCCCTCACCAA	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>CTNNB1</i>	F = CCTGTTCCTGAGGGTATT R = CCATTGTCCACGCTGGATTT	58.4 58.82	66	220/221
<i>CDH1</i>	F = CAGTACAACGACCAACCCA R = ACCCACCTCTAAGGCCATCT	59.89 59.96	63	2060/2061
<i>Actin, beta (Actb)</i>	F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	61.30 61.15	59	78/79

зразках групи контролю, фіксованих у формаліні та зали-  
тих у парафін. Для отримання тотальної РНК виконали  
попередню депарафінізацію тканини у ксилолі та регід-  
ратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%,  
70%). Підготовлені зразки гомогенізували за допомогою  
ступки і товчача, поміщали в пробірки "Ахуген" (США),  
проводили додаткову депарафінізацію, повторну регід-  
ратацію. Тотальну РНК із тканини виділили з викорис-  
танням набору "Trizol RNA Prep 100" ("Ізоген Lab., LTD",  
РФ).

Для зворотної транскрипції та отримання кДНК вико-  
ристали набір ОТ-1 ("Синтол", РФ). Реакційна суміш за-  
гальним обсягом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 прай-  
мера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої H<sub>2</sub>O,  
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-полімерази SynTaq з антитілами, що пригнічували  
активність ферменту, по 0,2 мкл прямого та зворотного  
специфічних праймерів, dNTP - дезоксинуклеозидтри-  
фосфати, 1,45 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш до-  
водили до загального обсягу 25 мкл додаванням деіоні-  
зованої H<sub>2</sub>O. Специфічні пари праймерів (5'-3') для ана-  
лізу досліджуваних і референтного генів дібрані за допо-  
могою програмного забезпечення PrimerBlast та виго-  
товлені фірмою "Thermo Scientific", США (табл. 1).

Ампліфікація складалася з 45-50 циклів та проводи-  
лася за таких умов: денатурація - 95°C, 15 секунд, віджиг  
- 59-61°C, 30-60 секунд, елонгація - 72°C, 30 секунд. В  
якості референс-гену було використано ген Actin, beta  
(Actb). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних  
генів визначали за методом  $\Delta\Delta C_t$ . Статистичний аналіз  
результатів ПЛР проводили за допомогою програмного  
забезпечення CFX Manager™ ("Bio-Rad", США). В експе-

римент було включено негативні контролю: без додаван-  
ня кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК  
матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в син-  
тезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індиві-  
дуальних зразках у трьох повторях.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за  
допомогою персонального комп'ютера, із використан-  
ням програми "Statistica® for Windows 6.0" (StatSoft Inc.,  
ліцензія № AXXR712D833214FAN5). Розраховували меді-  
ану (Me), нижній та верхній квартилі (Q1; Q3); значимість  
різниці між частотою аналізованих ознак перевіряли за  
допомогою критерію  $\chi^2$ ; порівняння проводили з викорис-  
танням непараметричного критерію Краскела-Уоліса;  
вивчення зв'язків між досліджуваними параметрами про-  
водили з використанням коефіцієнту рангової кореляції  
Спірмена. Результати вважали статистично значущими  
на рівні 95% ( $p < 0,05$ ).

### Результати. Обговорення

KPA в порівнянні з незміненою слизовою оболонкою  
дистальних відділів товстого кишечника характеризуєть-  
ся підвищеною транскрипційною активністю гену *K-RAS*:  
випадки підвищення рівня експресії мРНК гену склада-  
ють 87,5% від загального числа спостережень, зустріча-  
ються достовірно частіше випадків зниження рівня експ-  
ресії мРНК гену ( $p < 0,05$ ), а медіана відносного нормалі-  
зованого співвідношення (Me) рівня експресії мРНК гену  
*K-RAS* в KPA становить 1,66 (1,19; 2,91). Має місце тен-  
денція до зростання транскрипційної активності *K-RAS* у  
групах дослідження - від I до IV стадій KPA (рис. 1). На I  
стадії KPA Me експресії мРНК гену *K-RAS* становить 0,42  
(0,36; 0,43), на II стадії - 1,31 (1,09; 2,91), на III стадії - 1,75  
(1,31; 2,93) і на IV стадії - 2,91 (1,85; 3,50).

За даними літератури саме "активуючі" мутації *KRAS*  
спричиняють зростання транскрипційної активності гену.  
Зазвичай це точкові мутації в межах 12 і 13 кодонів - транс-  
версії G-A і / або G-T, що призводять до синтезу ГТФ-ази з  
аномальною активністю [6]. В експериментальній роботі  
А.Т. Boutin et al. було показано зростання активності гену  
*KRAS* в послідовності "аденома - карцинома". За дани-  
ми цих дослідників аномальна активність *KRAS*, що ви-

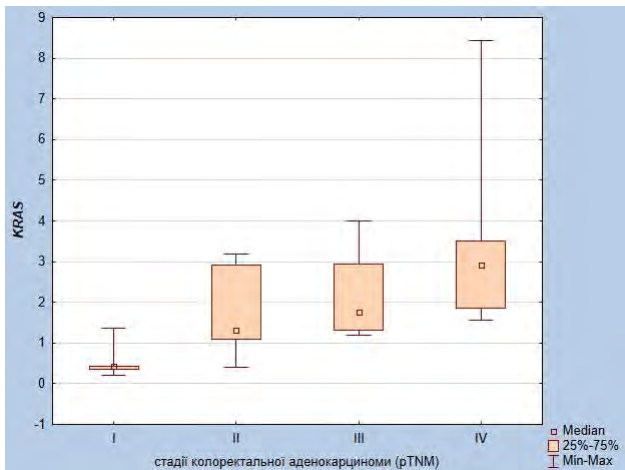


Рис. 1. Відносна нормалізована експресія мРНК гена *K-RAS* в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.

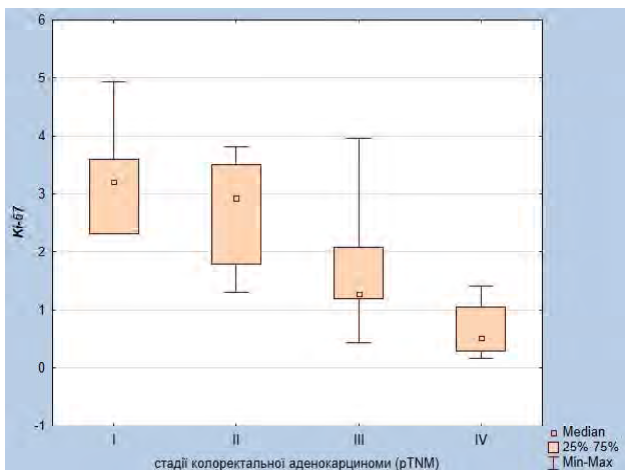


Рис. 2. Відносна нормалізована експресія мРНК гена *Ki-67* в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.

Таблиця 2. Кореляційні зв'язки між рівнями відносно нормалізованої експресії мРНК генів *KRAS*, *Ki-67*, *TP53*, *CDH1*, *CTNNB1*.

	<i>KRAS</i>	<i>Ki-67</i>	<i>TP53</i>	<i>CDH1</i>	<i>CTNNB1</i>
<i>KRAS</i>	1,00	-0,19	0,43*	-0,41*	0,20
<i>Ki-67</i>	-0,19	1,00	0,20	-0,31	0,15
<i>TP53</i>	0,43*	0,20	1,00	-0,18	0,15
<i>CDH1</i>	-0,41*	-0,31	-0,18	1,00	-0,01
<i>CTNNB1</i>	0,20	0,15	0,15	-0,01	1,00

Примітка. \* - статистично достовірний кореляційний зв'язок ( $p < 0,05$ ).

являється в ході зазначеної послідовності, в більшості випадків супроводжується зниженням активності генів *APC* і *TP53*, а також надмірної активацією TGF- $\beta$ -сигнального шляху [1]. Крім того, в ряді робіт були отримані суперечливі дані про вплив аномальної активності *KRAS* на рівні проліферації та апоптозу пухлинних клітин КРА [3, 13, 17], що стало приводом для вивчення транскрипційної активності відповідних генів.

Встановлено, що КРА в порівнянні з незміненою слизовою оболонкою характеризується підвищеною транскрипційною активністю *Ki-67*: Ме експресії мРНК гена становить 1,80 (1,04; 2,99). Підвищений рівень експресії мРНК гена *Ki-67* спостерігається в 80% КРА, що достовірно частіше випадків зниженої транскрипційної активності гена ( $p < 0,05$ ). При цьому, результат порівняльного аналізу показників медіани експресії мРНК гена *Ki-67* в послідовності "I-II-III-IV стадії КРА" свідчить про наявність тенденції до зниження транскрипційної активності *Ki-67* за умов прогресії раку (рис. 2). Для I стадії хвороби Ме експресії мРНК гена *Ki-67* становить 3,20 (2,31; 3,59), для II стадії - 2,92 (1,80; 3,50), для III стадії - 1,27 (1,19; 2,08) і для IV стадії - 0,52 (0,28; 1,04).

У літературі було знайдено інформацію щодо прямої залежності між аномальною активністю *KRAS* в КРА і рівнем проліферативної активності клітин пухлини [3, 17]. Проведений кореляційний аналіз дозволив виключити статистично достовірний зв'язок між рівнями відносно нормалізованої експресії мРНК генів *KRAS* і *Ki-67* ( $r = -0,19$ ,  $p > 0,05$ ; табл. 2). Таким чином, зниження рівня проліферативної активності в ході прогресії КРА від I до IV стадій її розвитку, найімовірніше, опосередковується залученням інших шляхів сигналізації, не пов'язаних з RAS-протеїном. Було знайдено публікації, в яких наведено механізм пригнічення проліферації ракових клітин КРА за рахунок регуляторного впливу окремих сімейств мікроРНК [14, 16, 18], а також дані, згідно з якими зниження проліферативної активності пухлинних клітин КРА асоціюється з активацією механізмів, що запускають епітеліально-мезенхімальну трансформацію [12].

Встановлено, що КРА в порівнянні з незміненою слизовою оболонкою дистальних відділів товстого кишечника у 100% хворих характеризується підвищеною транскрипційною активністю *TP53*: Ме експресії мРНК гена становить 3,50 (2,30; 6,50). При прогресуванні від I до IV стадії КРА має місце чітка тенденція до підвищення транскрипційної активності *TP53*: для I стадії хвороби Ме становить 2,15 (0,82; 2,30), для II стадії - 2,80 (1,32; 4,50), для III стадії - 3,80 (2,32; 6,50), для IV стадії - 7,80 (5,99; 8,92) (рис. 3).

Кореляційний аналіз виявив прямий середньої сили зв'язок між підвищеними рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *TP53* ( $r = 0,43$ ,  $p > 0,05$ ; табл. 2). L. Du et al. (2017) запропонували використовувати *KRAS* і *TP53* в якості біомаркерів, що дозволяють диференціювати диспластичні зміни та ранні стадії розвитку карциноми, яка розвивається на тлі хронічних запальних процесів товстої кишки, однак, питання функціонального взаємозв'язку між цими генами не висвітлено [4]. Взаємозв'язок між функціональною активністю генів *KRAS* і *TP53* знаходить обґрунтування в сучасних уявленнях про функціонування PI3K/AKT/mTOR-сигнального каскаду, активація якого опосередковується RAS-протеїном. Відомо, що експресія мутантного гена *TP53* регулюється низкою чинників транскрипції, серед яких - E2F і FOXO3a. Ос-

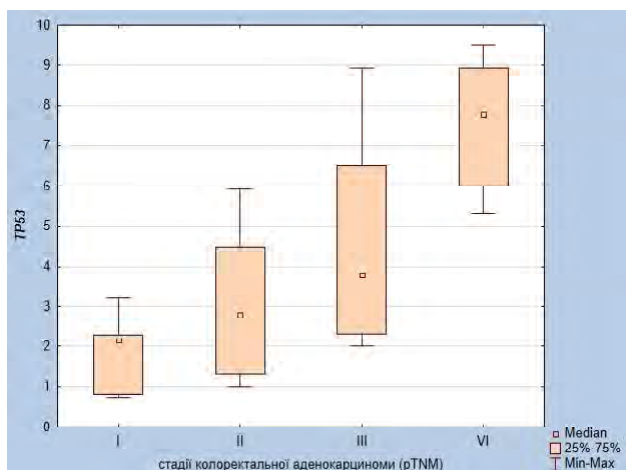


Рис. 3. Відносна нормалізована експресія мРНК гену *TP53* в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.

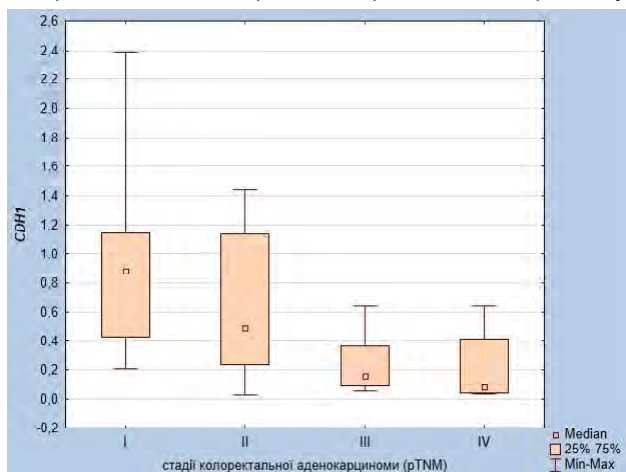


Рис. 4. Відносна нормалізована експресія мРНК гену *CDH1* в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.

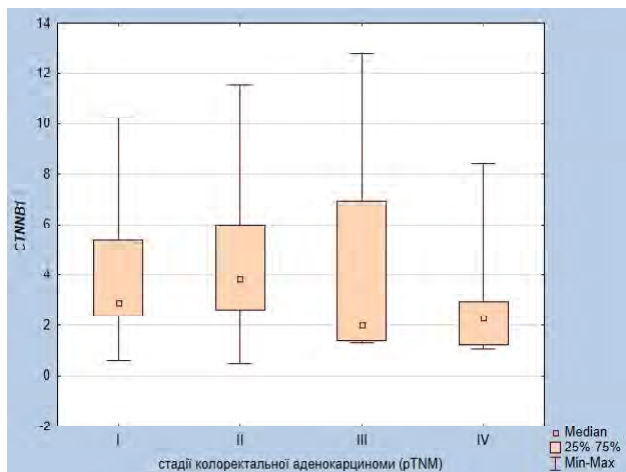


Рис. 5. Відносна нормалізована експресія мРНК гену *CTNNB1* в колоректальній аденокарциномі на різних стадіях її розвитку.

танні, в свою чергу, служать мішенями для фосфорилювання кінази АКТ, що є однією з ключових ланок зазначеного сигнального каскаду [13]. У дослідженні А.Т. Boutin

et al. (2017) були отримані зворотні дані, згідно з якими, аномальна активність *KRAS* у послідовності "аденома - карцинома" реалізується на тлі зниження експресії *TP53*. Однак, автори пов'язують ці зміни з аномальною активністю TGF- $\beta$ -сигнального шляху, до функціонування якого RAS-протеїн не залучається [1].

Встановлено також, що КРА у порівнянні з незмінною слизовою оболонкою дистальної товстої кишки характеризується зниженою транскрипційною активністю гену *CDH1*: Ме експресії мРНК гену становить 0,35 (0,09; 0,70). Окрім того, має місце тенденція до зниження транскрипційної активності гену *CDH1* в групах спостереження від I до IV стадії КРА за градацією pTNM: Ме експресії мРНК гену становить 0,88 (0,42; 1,14) для I стадії, 0,48 (0,23; 1,13) для II стадії, 0,15 (0,09; 0,36) для III стадії та 0,08 (0,04; 0,41) для IV стадії ( $p > 0,05$ , рис. 4).

Результати дослідження E. Lemieux et al. (2015) стали приводом для вивчення зв'язків між транскрипційною активністю гену *KRAS*, а також експресією мРНК генів *CDH1*, *CTNNB1* [7]. У цьому дослідженні було виявлено зворотній середньої сили зв'язок між рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК генів *KRAS* і *CDH1* ( $r = -0,41$ ,  $p < 0,05$ ; табл. 2). Виявлений зв'язок між рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *CDH1* знаходить обґрунтування в сучасній літературі. Відомо, що Е-кадгерин (кодується геном *CDH1*) залучається до механізмів міжклітинних взаємодій, оскільки його екстрацелюлярний домен здатен до зв'язування з рецепторами епідермального фактору росту (EGFR). Зв'язується з EGFR, Е-кадгерин перешкоджає приєднанню лігандів до рецепторів, що за умов нормального функціонування передають сигнали на RAS-протеїн [11]. Це може пояснити виявлений нами зворотній зв'язок, адже зниження експресії Е-кадгерину асоціюється зі збільшенням кількості "вільних" рецепторів EGFR, що потребують відповідної (більшої) кількості молекул RAS, забезпеченої відповідним (підвищеним) рівнем транскрипційної активності гену *KRAS*. Окрім того, відомо, що активація гену *KRAS* асоціюється з активацією низки факторів транскрипції, серед яких є Snail. Останній, в свою чергу, відомий своєю здатністю до пригнічення транскрипції гену *CDH1* шляхом гіперметилування його промотору [5]. Цей механізм пояснює зворотній зв'язок між рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *CDH1*.

Встановлено, що КРА характеризується більш ніж в 2 рази підвищеною транскрипційною активністю гену *CTNNB1*: Ме експресії мРНК гену становить 2,63 (1,55; 5,09). Порівняльний аналіз рівнів транскрипційної активності гену *CTNNB1* на різних стадіях розвитку КРА вказує на відсутність статистично значущої різниці: Ме становить 2,88 (2,38; 5,38) для I стадії, 3,83 (2,59; 5,99) для II, 2,02 (1,38; 6,95) для III стадії та 2,27 (1,23; 2,93) для IV стадії ( $p > 0,05$ , рис. 5).

Проведений кореляційний аналіз дозволив виключити статистично достовірний зв'язок між рівнями відносної нормалізованої експресії мРНК генів *KRAS* і

*CTNNB1* ( $r=0,20$ ,  $p>0,05$ ; табл. 2). У фаховій літературі знайдено суперечливі дані щодо особливостей експресії гена *CTNNB1* за умов прогресії КРА. За даними P. J. Morin et al. (2016), головною причиною підвищення експресії гена *CTNNB1* є його активуючі мутації. Показано, що мутації гена APC зазвичай призводять до порушення нормальної схеми роботи Wnt/ $\beta$ -катенінового каскаду, а мутації *CTNNB1* не асоціюються з порушеннями функцій цього каскаду, при цьому в обох випадках спостерігають накопичення  $\beta$ -катеніну в цитоплазмі, а іноді й у клітинному ядрі [10]. N. Youshida et al. (2015) дослідили випадки КРА, асоційовані зі зниженням експресії гена *CTNNB1* і дійшли висновку що випадки КРА, асоційовані зі зниженням рівнів експресії гена *CTNNB1*, а також  $\beta$ -катеніну і E-кадгерину, відрізняються значущо гіршим прогнозом виживаності. Дослідники пояснили цей факт можливістю залучення інших сигнальних шляхів (крім канонічного Wnt-сигнального каскаду) до реалізації злого потенціалу КРА [19].

### Список посилань - References

1. Boutin, A. T., Liao, W. T., Wang, M., Hwang, S. S., Karpinets, T. V., Cheung, H., ... , DePinho, R. A. (2017). Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. *Genes & Development*, 31 (4), 370-382. doi: 10.1101/gad.293449.116.
2. Church, J. (2016). Molecular genetics of colorectal cancer. *Seminars in Colon and Rectal Surgery*, 27 (4), 172-175. doi: 10.1053/j.scrs.2016.04.013.
3. 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. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4803464/>.
4. 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.
5. He, X., Chen, Z., Jia, M., & Zhao, O. (2013). Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PLoS One*, 29, 8(7), e70858. doi: 10.1371/journal.pone.0070858.
6. Kwak, M. S., Cha, J. M., Yoon, J. Y., Jeon, J. W., Shin, H. P., Chang, H. J., ... Lee, J. (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.00000000000007882.
7. 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/ncr.2014.416.
8. 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: 10.1177/1758834017714997.
9. Margetis, N., Kouloukousa, 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/invo.11091.
10. Morin, P. J., Kinzler, K. W., & Sparks, A. B. (2016).  $\beta$ -Catenin

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. Транскрипційна активність гена *KRAS* зростає у послідовності від I до IV стадії розвитку колоректальної аденокарциноми.

2. Колоректальна аденокарцинома характеризується прямим середньої сили кореляційним зв'язком між підвищеними рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *TP53*, що вказує на залучення *KRAS* до дисрегуляції апоптозу ракових клітин.

3. Для колоректальної аденокарциноми характерним є зворотний середньої сили зв'язок між рівнями транскрипційної активності генів *KRAS* і *CDH1*, який свідчить щодо ролі *KRAS* у зміні адгезивних властивостей пухлинних клітин.

Перспективним є подальше молекулярно-генетичне дослідження взаємодій гену *KRAS* з сигнальними каскадами, що залучаються до реалізації злого потенціалу колоректальної карциноми.

- 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.
11. Nakamoto, K., Nagahara, H., Maeda, K., Noda, E., Inoue, T., Yashiro, M., Nishiguchi, Y., Ohira, M., & Hirakawa, K. (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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Yin, Y., Zhang, B., Wang, W., Fei, B., Quan, C., Zhang, J., ... Huang, Z. (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. Yoshida, N., Kinugasa, T., Ohshima, K., Yuge, K., Ohchi, T., Fujino, S., ... Akagi, Y. (2015). Analysis of Wnt and  $\beta$ -catenin

Expression in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 35 (8), 4403-10. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168479>.

#### **ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНА KRAS И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ В КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЕ**

**Туманский В.А., Шишкин М.А.**

**Аннотация.** Колоректальная аденокарцинома (КРА) является следствием кумуляции многочисленных мутаций. Целью работы стало исследование транскрипционной активности гена KRAS на I, II, III, IV стадиях развития КРА и анализ связей между транскрипцией KRAS и Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1. Проведено патогистологическое и молекулярно-генетическое исследование операционного материала КРА 40 пациентов, а также секционного материала 10 фрагментов стенки дистальных отделов толстой кишки. Использованы следующие статистические методы: дескриптивная статистика, критерий  $\chi^2$ , критерий Краскела-Уоллиса, коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Установлено, что КРА характеризуется повышенной транскрипционной активностью KRAS: на I стадии Me экспрессии мРНК гена составляет 0,42 (0,36; 0,43), на II - 1,31 (1,09; 2,91), на III - 1,75 (1,31; 2,93) и на IV - 2,91 (1,85; 3,50). Выявлено снижение транскрипционной активности гена Ki-67: для I стадии Me экспрессии мРНК гена составляет 3,20 (2,31; 3,59), для II - 2,92 (1,80; 3,50), для III - 1,27 (1,19; 2,08) и для IV - 0,52 (0,28; 1,04). Относительно гена TP53 выявлено повышение транскрипционной активности: для I стадии Me составляет 2,15 (0,82; 2,30), для II - 2,80 (1,32; 4,50), для III - 3,80 (2,32; 6,50), для IV - 7,80 (5,99; 8,92). Также выявлена прямая средней силы связь между уровнями транскрипционной активности KRAS и TP53. Отмечается снижение транскрипционной активности CDH1: Me составляет 0,88 (0,42; 1,14) для I стадии, 0,48 (0,23; 1,13) для II, 0,15 (0,09; 0,36) для III и 0,08 (0,04; 0,41) для IV стадии. Также обнаружено обратной средней силы связь между уровнями экспрессии мРНК генов KRAS и CDH1. Изучение мРНК гена CTNNB1 на разных стадиях развития КРА указывает на отсутствие статистически значимой разницы: Me составляет 2,88 (2,38; 5,38) для I стадии, 3,83 (2,59; 5,99) для II, 2,02 (1,38; 6,95) для III и 2,27 (1,23; 2,93) для IV стадии. Таким образом, транскрипционная активность гена KRAS растет в последовательности от I до IV стадии развития КРА, влияя на апоптоз и адгезивные свойства раковых клеток.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, K-RAS ген, Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1.

#### **THE FEATURES OF KRAS GENE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY AND SIGNIFICANCE IN COLORECTAL CANCER**

**Tumanskiy V. A., Shyshkin M. A.**

**Annotation.** Colorectal adenocarcinoma (CRA) is the result of numerous mutations accumulation. The aim of the work was to study KRAS gene transcriptional activity at I, II, III, and IV stages of CRA development and to analyze the correlations between KRAS and Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1 genes transcriptional activity. Pathohistological and molecular-genetic study of surgical material from 40 patients with CRA, as well as sectional material of 10 fragments of the distal colonic wall was conducted. The following statistical methods were used: descriptive statistics,  $\chi^2$  test, Kruskal-Wallis test, Spearman's rank correlation coefficient. It was established that CRA is characterized by increased KRAS transcriptional activity: Me of mRNA expression is 0.42 (0.36; 0.43) at stage I, 1.31 (1.09; 2.91) at stage II, 1.75 (1.31; 2.93) at stage III, and 2.91 (1.85; 3.50) at stage IV. Decreasing of Ki-67 gene transcriptional activity was revealed: Me of mRNA expression is 3.20 (2.31; 3.59) at stage I, 2.92 (1.80; 3.50) at stage II, 1.27 (1.19; 2.08) at stage III, and 0.52 (0.28; 1.04) at stage IV. As about TP53 gene, increasing of transcriptional activity was detected: Me is 2.15 (0.82; 2.30) at stage I, 2.80 (1.32; 4.50) at stage II, 3.80 (2.32; 6.50) at stage III, 7.80 (5.99; 8.92) at stage IV. Also, a direct medium correlation between the KRAS and TP53 transcriptional activity levels was revealed. There is a decreasing of CDH1 transcriptional activity: Me is 0.88 (0.42; 1.14) at stage I, 0.48 (0.23; 1.13) at stage II, 0.15 (0.09; 0.36) at stage III and 0.08 (0.04; 0.41) at stage IV. A reverse medium correlation between KRAS and CDH1 was revealed. The study of CTNNB1 gene mRNA at different stages of CRA indicated the absence of statistically significant difference: Me is 2.88 (2.38; 5.38) at stage I, 3.83 (2.59; 5.99) at stage II, 2.02 (1.38; 6.95) at stage III, and 2.27 (1.23; 2.93) at stage IV. So, KRAS gene transcriptional activity increases from I to IV stages in CRA, affecting apoptosis and adhesive properties of cancer cells.

**Keywords:** colorectal cancer, K-RAS gene, Ki-67, TP53, CDH1, CTNNB1.