

А. В. Євсєєв, О. М. Камишний

Зміни транскрипційної активності генів регулятора клітинного циклу *CDK1* і клітинної проліферації *ki67* в інвазивній і неінвазивній протоковій аденокарциномі підшлункової залози

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: підшлункова залоза, полімеразна ланцюгова реакція, карцинома, проліферація.

Мета роботи – визначення рівнів експресії мРНК *CDK1* і *ki67* у протоковій аденокарциномі підшлункової залози.

Матеріали та методи. Дослідження здійснили на 20 зразках тканини пухлини підшлункової залози, що взяті під час патоморфологічного дослідження операційного матеріалу. Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використали ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) та набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США). З використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі визначили рівні транскрипційної активності генів *CDK1* і *Ki67* у клітинах інвазивної та неінвазивної протокової аденокарциноми підшлункової залози.

Результати. Визначили, що у тканині протокового раку відбувається підвищення рівнів вмісту мРНК досліджуваних генів. При цьому спостерігали значне підвищення рівня мРНК *ki67* (від 14,26 до 251,97 раза) та підвищення рівня мРНК *CDK1* (від 0,26 до 10,73 раза) порівняно з нормальною тканиною залози.

Висновки. Кореляційний аналіз показав, що між зростанням транскрипційної активності генів регулятора клітинного циклу *CDK1* і клітинної проліферації *ki67* є сильний прямий зв'язок (коефіцієнт кореляції Пірсона $r=+0,70$), тобто підвищення рівня мРНК *CDK1* супроводжується вірогідним зростанням рівня мРНК *ki67*, що призводить до підвищення індексу клітинної проліферації пухлини. Показана односпрямована динаміка зростання транскрипційної активності обох досліджуваних генів (*ki67* зростав у 54,40±23,82 раза в неінвазивній та у 159,24±66,25 раза в інвазивній карциномі; *CDK1* зростав у 2,10±1,47 раза та 4,16±4,04 раза відповідно) із сильним кореляційним зв'язком між цими показниками (коефіцієнт кореляції Пірсона $r=+0,74$ та $+0,75$ відповідно). Інвазивна панкреатична карцинома порівняно з аденокарциномою без інвазії характеризується вищим зростанням рівнів мРНК обох генів, однак вірогідною ця різниця є тільки для гена клітинної проліферації *ki67*.

Изменения транскрипционной активности генов регулятора клеточного цикла *CDK1* и клеточной пролиферации *ki67* в инвазивной и неинвазивной протоковой аденокарциноме поджелудочной железы

А. В. Евсеев, А. М. Камышный

Цель работы – определение уровней экспрессии мРНК *CDK1* и *ki67* в протоковой аденокарциноме поджелудочной железы.

Материалы и методы. Исследование проведено на 20 образцах ткани опухоли поджелудочной железы, взятых при патоморфологическом исследовании операционного материала. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) и набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США). В работе с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени определены уровни экспрессии генов *CDK1* и *ki67* в клетках инвазивной и неинвазивной протоковой аденокарциномы поджелудочной железы.

Результаты. В результате исследования установлено, что в ткани протокового рака происходит повышение уровня содержания мРНК исследуемых генов. При этом наблюдалось значительное повышение уровня мРНК *ki67* (от 14,26 до 251,97 раза) и повышение уровня мРНК *CDK1* (от 0,26 до 10,73 раза) по сравнению с нормальной тканью железы.

Выводы. Корреляционный анализ показал, что между ростом транскрипционной активности генов регулятора клеточного цикла *CDK1* и клеточной пролиферации *ki67* существует сильная прямая связь (коэффициент корреляции Пирсона $r=+0,70$), то есть повышение уровня мРНК *CDK1* сопровождается достоверным ростом уровня мРНК *ki67*, что приводит к повышению индекса клеточной пролиферации опухоли. Показана однонаправленная динамика возрастания транскрипционной активности обоих исследуемых генов (*ki67* возрастал в 54,40±23,82 раза в неинвазивной и в 159,24±66,25 раза в инвазивной карциноме; *CDK1* возрастал в 2,10±1,47 раза и 4,16±4,04 раза соответственно) с сильной корреляционной связью между этими показателями (коэффициент корреляции Пирсона $r=+0,74$ и $+0,75$ соответственно). Инвазивная панкреатическая карцинома в сравнении с аденокарциномой без инвазии характеризуется более значительным возрастанием уровней мРНК обоих генов, однако достоверной эта разница является только для гена клеточной пролиферации *ki67*.

Ключевые слова: поджелудочная железа, полимеразная цепная реакция, карцинома, пролиферация.

Патология. – 2016. – № 2 (37). – С. 88–91

Changes in the transcriptional activity of cell cycle regulator *CDK1* and cell proliferation *ki67* genes in invasive and non-invasive pancreatic ductal adenocarcinoma

A. V. Evseyev, A. M. Kamyshnyi

The aim of this work was to determine the levels of mRNA expression of *CDK1* and *ki67* in pancreatic ductal adenocarcinoma.

Materials and methods. The study was conducted on 20 samples of pancreatic tumor tissue taken at pathomorphological examination of the operational material. To determine the level of investigated genes expression a thermal cycler CFX96™ Real-Time PCR Detection

Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", USA) reagent kit and Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, USA) were used. In work using the real time polymerase chain reaction, gene expression levels of *CDK1* and *ki67* in noninvasive and invasive ductal pancreatic adenocarcinoma cells were identified.

Results. As a result of the study it was found that in ductal carcinoma tissue there is an increase of mRNA levels of the studied genes. Thus there was a significant increase in *ki67* mRNA level (from 14.26 to 251.97 times) and increased *CDK1* mRNA (from 0.26 to 10.73 times) as compared to normal pancreatic tissue.

Conclusion. Correlation analysis showed that between the growth of the transcriptional activity of cell cycle regulator *CDK1* and cell proliferation *ki67* genes there is a strong direct correlation (Pearson's correlation coefficient $r=+0.70$), that is, increase of the level of *CDK1* mRNA is accompanied by the significant increase in levels of *ki67* mRNA, resulting in the enhance of tumor cell proliferation index. Unidirectional dynamics of increasing transcriptional activity of both genes was shown (*ki67* increased by 54.40 ± 23.82 times in non-invasive and 159.24 ± 66.25 times in invasive carcinoma; *CDK1* increased by 2.10 ± 1.47 and 4.16 ± 4.04 times, respectively) with a strong correlation between these two indicators (Pearson's coefficient $r=+0.74$ and $+0.75$, respectively). Invasive pancreatic carcinoma as compared to adenocarcinoma without invasion is characterized by the significant increase in the mRNA levels of both genes, however, this difference is valid only for the cell proliferation *ki67* gene.

Key words: Pancreas, Polymerase Chain Reaction, Carcinoma, Proliferation.

Pathologia 2016; № 2 (37): 88–91

Протокова аденокарцинома (ПА) є найчастішою формою злоякісних пухлин підшлункової залози (ПЗ). Унаслідок пізньої діагностики п'ятирічна виживаність після оперативного втручання становить лише 10 %, а середня після радикального хірургічного лікування – 8–45 % [8]. У зв'язку з цим актуальним залишається пошук сучасних альтернативних методів ранньої біопсійної діагностики на предінвазивному етапі та індивідуального прогнозування перебігу ПА ПЗ.

Сучасним напрямом патоморфологічної діагностики є імуногістохімічна (ІГХ) ідентифікація в пухлині прогностичних маркерів, що забезпечують здатність її клітин до інвазивного росту та до метастазування. У багатьох дослідженнях [1,2,4,7] ІГХ методом встановлено незалежну прогностичну роль рівнів окремих регуляторних і функціональних протеїнів, котрі беруть участь у процесах проліферації пухлинних клітин і виступають як прогностичні чинники. Але транскрипційна активність відповідних генів, які беруть участь у регуляції клітинного циклу та проліферації злоякісних клітин ПА ПЗ, що призводить до прогресії пухлини, натеper вивчена недостатньо.

Мета роботи

Вивчити рівень експресії мРНК *CDK1* і *ki67* у протоковій аденокарциномі підшлункової залози.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 20 зразках тканини пухлини підшлункової залози, що взяті під час патоморфологічного дослідження операційного матеріалу ПА ПЗ. Із них 10 зразків відібрали з патогістологічно верифікованої інвазивної ПА ПЗ; 10 зразків становили випадки карциноми без морфологічно видимої інвазії. Як контроль використали зразки тканини підшлункової залози, що взяті під час автопсії в померлих, котрі при житті не страждали на захворювання органів гепатопанкреатобіліарної системи. Об'єктом дослідження були шматочки пухлинної тканини, які вміщували в 10% нейтральний забуферений формалін. Молекулярно-генетичні дослідження здійснили на вологому архівному матеріалі віком до двох років, залитому у формалін. Виділення тотальної

РНК проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» (Ізоген Lab., LTD, Російська Федерація), що містить Trizol reagent (лізуючий реагент, до складу якого входить денатурувальний агент гуанідинтіоціонат і фенол із рН=4.0) та ExtraGene E (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли згідно з протоколом до набору.

Для проведення зворотної транскрипції та отримання кДНК використовували набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Російська Федерація). 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 2,5x реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотню транскрипцію здійснили при 45 °С протягом 45 хвилин із наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хвилин при 92 °С.

Для визначення рівня експресії генів, що досліджували, використали ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) та набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімераза Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого та зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального обсягу 25 мкл додаванням деіонізованої H_2O . Специфічні пари праймерів (5'–3') для аналізу досліджуваних і референсного генів підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) і виготовлені фірмою Metabion (ФРН) (табл. 1).

Після початкової денатурації протягом 10 хв при 95 °С ампліфікація складалася з 45–50 циклів і здійснювалась за таких умов: денатурація – 95 °С, 15 с, відпал – 59–61 °С, 30–60 с, елонгація – 72 °С, 30 с. Як референс-ген для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів використали ген actin, beta (Actb). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta Ct$. Статистичний аналіз даних ПЛР здійснювали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Таблиця 1

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>CDK1</i>	F: 5'-GACGCGGTTGTTGTAGCTG-3' R: 5'-GGGTATGGTAGATCCCGGCT-3'	59.51	64	117/118
<i>ki67</i>	GTGGTTCGACAAGTGGCCTT ACAACCTCTCCACTGGGACG	60.82 59.61	51	106/107
<i>actin, beta (Actb)</i>	F = CCTTTGCCGATCCGCCG R = GATATCATCATCCATGGTGAGCTGG	61.30 61.15	59	78/79

До експерименту включили негативні контролі: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторях.

Результати та їх обговорення

У підсумку дослідження визначили, що у тканині ПА ПЗ відбувається підвищення рівнів вмісту мРНК генів, що досліджували. При цьому спостерігалось значне підвищення рівня мРНК *ki67* (від 14,26 до 251,97 раза) порівняно з нормальною тканиною ПЗ. Середній показник становив $104,78 \pm 74,2$ раза, $p < 0,05$. Ген *ki67* кодує ядерний білок Ki67, що пов'язаний із процесом клітинної проліферації, та його транскрипція є необхідною для неї. Також описані варіанти транскриптів альтернативного сплайсингу [3]. Значне зростання транскрипційної активності гена *ki67* узгоджується із підвищенням індексу клітинної проліферації, котрий визначається за ІГХ експресією антигена Ki67, що визначили раніше у клітинах ПА ПЗ [1,2].

Білок, який кодується геном *CDK1*, є членом сімейства протеїнкінази Ser/Thr. Цей білок є каталітичною субодиницею висококонсервативного протеїнкіназного комплексу, відомого як фактор просування М-фази (MPF), що має важливе значення для М-фазових переходів клітинного циклу G1/S і G2. Митотичні цикліни стабільно асоціюються з цим білком і функціонують як регуляторні субодиниці. Кіназна активність цього білка контролюється накопиченням і руйнуванням циклінів протягом клітинного циклу. Фосфорилування та дефосфорилування білка *CDK1* також відіграє важливу регуляторну роль у контролі клітинного циклу. У результаті альтернативного сплайсингу знайдені варіанти транскриптів, що кодують різні ізоформи цього гена

[5,6]. У нашому дослідженні визначили зростання рівня мРНК *CDK1* від 0,26 раза до 10,73 раза порівняно з вмістом мРНК цього гена в незмінній тканині ПЗ (середній показник становив $3,2 \pm 3,07$ раза, $p < 0,05$). Підвищення у клітині рівня продукту *CDK1*, що взаємодіє з цикліном В, призводить до переходу клітини із G2-фази мітозу у М-фазу. Кореляційний аналіз показав, що між зростанням транскрипційної активності генів регулятора клітинного циклу *CDK1* і клітинної проліферації *ki67* є сильний прямий зв'язок (коефіцієнт кореляції Пірсона $r = +0,70$, $p < 0,05$), тобто підвищення рівня мРНК *CDK1* супроводжується вірогідним зростанням рівня мРНК *ki67*, що призводить до підвищення індексу клітинної проліферації пухлини.

Порівнюючи показники рівня мРНК *CDK1* та *ki67* окремо у випадках інвазивної та неінвазивної ПА ПЗ, отримали результати (рис. 1).

Інвазивна ПА ПЗ характеризується вірогідно вищим середнім рівнем мРНК обох досліджуваних генів порівняно з карциномою без інвазії (рис. 1). Так, показники підвищення рівня мРНК *ki67* у неінвазивній та інвазивній ПА ПЗ становили $54,40 \pm 23,82$ раза та $159,24 \pm 66,25$ раза порівняно з нормальною тканиною ПЗ відповідно ($p < 0,05$). Рівень транскрипційної активності гена *CDK1* зростав порівняно з контролем у $2,10 \pm 1,47$ раза та $4,16 \pm 4,04$ раза у неінвазивній та інвазивній ПА ПЗ відповідно, однак цей показник статистично не є вірогідним ($p = 0,37$). Кореляційний зв'язок між рівнями мРНК обох досліджуваних генів в обох групах визначений як прямий сильний (коефіцієнт Пірсона $r = +0,74$ у групі неінвазивної ПА ПЗ та $r = +0,75$ у групі інвазивної ПА ПЗ). Отже, незалежно від наявності чи відсутності інвазивного росту пухлини спостерігається односпрямована динаміка зростання транскрипційної активності досліджуваних генів різного ступеня виразності.

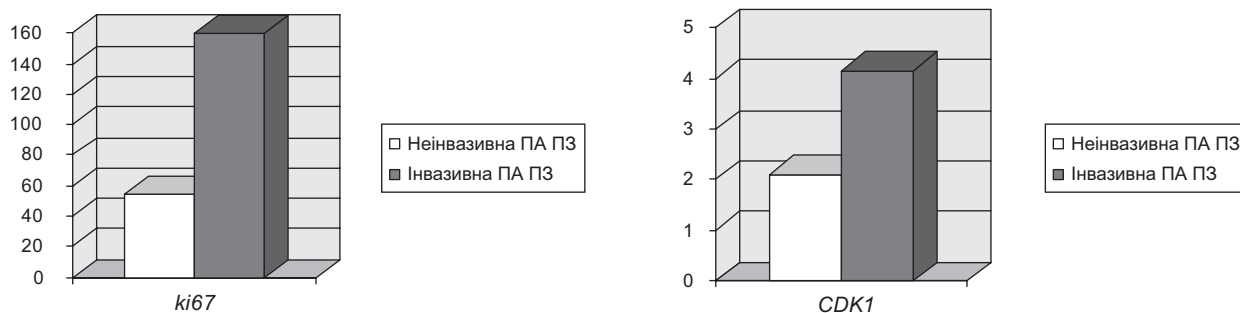


Рис. 1. Зростання рівнів транскрипційної активності генів *ki67* і *CDK1* у неінвазивній та інвазивній протоковій аденокарциномі підшлункової залози (в рази).

Висновки

1. Дослідження показало односпрямовану динаміку зростання у клітинах протокової аденокарциноми підшлункової залози транскрипційної активності генів регулятора клітинного циклу *CDK1* і клітинної проліферації *ki67* із сильним кореляційним зв'язком між цими показниками. Значне підвищення вмісту мРНК гена *ki67* призводить до підвищення індексу клітинної проліферації пухлинних клітин.

2. Визначено, що інвазивна панкреатична карцинома характеризується вищим зростанням рівнів мРНК обох

генів порівняно з аденокарциномою без інвазії, однак вірогідною ця різниця є тільки для гена клітинної проліферації *ki67*.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні транскрипційної активності генів-регуляторів клітинного циклу, клітинної проліферації та апоптозу у клітинах ПА ПЗ і порівнянні рівнів їхніх мРНК за даними ПЛР із рівнями експресії відповідних білків за даними ІГХ.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Список літератури

1. Євсєєв А.В. Особливості процесів проліферації і апоптозу в інвазивній протоковій аденокарциномі підшлункової залози / А.В. Євсєєв // Морфологія. – 2014. – Т. 8. – №3. – С. 23–26.
2. Туманский В.А. Сравнительная оценка экспрессии ростовых рецепторов семейства ErbB, Ki-67 и E-кадгерина клетками протоковой аденокарциномы поджелудочной железы / В.А. Туманский, А.В. Евсеев // Патология. – 2014. – №3(32). – С. 55–59.
3. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes / S. Cuylen, C. Blaukopf, A.Z. Politi, et al. // *Nature*. – 2016. – Vol. 535(7611). – P. 308–12.
4. Clinical significance of Smac and Ki-67 expression in pancreatic cancer / H.-Y. Hu, H. Liu, J.-W. Zhang, et al. // *Hepato-Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 59. – P. 2640–2643.
5. Cdk1 orders mitotic events through coordination of a chromosome-associated phosphatase switch / J. Qian, M. Beullens, J. Huang, et al. // *Nat Commun*. – 2015. – Vol. 6. – P. 10215.
6. CDK1 Enhances Mitochondrial Bioenergetics for Radiation-Induced DNA Repair / L. Qin, M. Fan, D. Candas, et al. // *Cell Rep*. – 2015. – Vol. 13(10). — P. 2056–63.
7. Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma / Seok Jeong, Don Haeng Lee, Jung Il Lee, et al. // *World J. Gastroenterol*. – 2005. – Vol. 11(43). – P. 6765–6769.
8. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed. / L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind (eds). – Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2010. – 276 p.

References

1. Evseyev, A. V. (2014). Osoblyvosti protsesiv proliferatsii i apoptozu v invazyvniy protokoviy adenokartsynomi pidshlunkovoi zalozy [Features of proliferation and apoptosis of

- invasive pancreatic ductal adenocarcinoma]. *Morfologiya*, 8(3), 23–26.
2. Tumanskiy, V. A., & Evseyev, A. V. (2014). Sravnitel'naya ochenka e'kspressii rostovykh receptorov semeystva ErbB, Ki-67 i E-kadgerina kletkami protokovoy adenokarcinomy podzheludochnoj zhelezy [Comparative estimation of ErbB family growth receptors, Ki-67 and E-cadherin expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cells]. *Pathologia*, 3(32), 55–59. doi: <http://dx.doi.org/10.14739/2310-1237.2014.3.36841>.
3. Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., et al. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), 308–312. doi: 10.1038/nature18610.
4. Hu, H.-Y., Liu, H., Zhang, J.-W., Hu, K., & Lin, Y. (2012). Clinical significance of Smac and Ki-67 expression in pancreatic cancer. *Hepato-Gastroenterology*, 59, 2640–2643. doi: 10.5754/hge12071.
5. Qian, J., Beullens, M., Huang, J., De Munter, S., Lesage, B., & Bollen, M. (2015). Cdk1 orders mitotic events through coordination of a chromosome-associated phosphatase switch. *Nat Commun*, 6, 10215. doi: 10.1038/ncomms10215.
6. Qin, L., Fan, M., Candas, D., Jiang, G., Papadopoulos, S., Tian, L., et al. (2015). CDK1 Enhances Mitochondrial Bioenergetics for Radiation-Induced DNA Repair. *Cell Rep*, 13(10), 2056–2063. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.015.
7. Jeong, S., Lee, D. H., Lee, J. I., Lee, J. W., Kwon, K. S., Kim, P. S., et al. (2005) Expression of Ki-67, p53, and K-ras in chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol*, 11(43), 6765–6769. doi: 10.3748/wjg.v11.i43.6765.
8. Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (eds). TNM Classification of Malignant Tumours. NJ: Wiley-Blackwell.

Відомості про авторів:

Євсєєв А. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологічної анатомії та судової медицини, Запорізький державний медичний університет, E-mail: evseevanton@ukr.net.

Камішний О. М., д-р мед. наук, професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет.

Сведения об авторах:

Евсеев А. В., канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: evseevanton@ukr.net.

Камышный А. М., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Evseyev A. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Pathologic Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: evseevanton@ukr.net.

Kamyshnyi A. M., MD, PhD, DSci, Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University.

Надійшла в редакцію 01.08.2016 р.