

Сравнительная характеристика транскрипционной активности генов *CDH1*, *CTNNB1* и экспрессии кодируемых ими белков Е-кадгерина, β -катенина в аденокарциноме желудка кишечного типа

В. А. Туманский, Т. А. Христенко

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

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

Патология. – 2017. – Т. 14, № 1(39). – С. 4–11

DOI:
10.14739/2310-1237.2017.1.97490

E-mail:
hristenkoTA@i.ua

Молекулярно-генетические аномалии, которые лежат в основе aberrантной экспрессии Е-кадгерина и β -катенина в злокачественных опухолях, изучены недостаточно.

Цель работы – сравнение уровней экспрессии мРНК генов *CDH1* и *CTNNB1* и экспрессии Е-кадгерина и β -катенина опухолевыми клетками аденокарциномы желудка кишечного типа (АКЖКТ).

Материалы и методы. Проведено молекулярно-генетическое (ПЦР–РВ) и иммуногистохимическое исследование АКЖКТ I, II и III клинических стадий у 30 пациентов 49–86 лет, а также 10 образцов нормальной слизистой оболочки желудка.

Результаты. Аденокарцинома желудка кишечного типа в сравнении со слизистой оболочкой желудка обычного гистологического строения характеризуется сниженными показателями экспрессии мРНК гена *CDH1* [Me=0,14 (0,03; 0,40)], которые коррелируют с низким уровнем экспрессии опухолевыми клетками Е-кадгерина [Me=27,59 УЕОП (23,14; 37,19)], коэффициент корреляции Спирмена=0,73], а также повышенными показателями экспрессии мРНК гена *CTNNB1* [Me=4,32 (2,11; 11,43)], которые коррелируют с высоким уровнем экспрессии опухолевыми клетками β -катенина [Me=116,65 УЕОП (110,34; 151,32), коэффициент корреляции Спирмена=0,94]. Установлена обратная корреляция между показателями уровня экспрессии мРНК гена *CDH1* и снижением степени гистологической дифференцировки опухоли от G₁ до G₃ (коэффициент корреляции γ = -0,44); прямая корреляция между сниженными показателями уровня экспрессии мРНК гена *CDH1* и повышенными показателями уровня экспрессии мРНК гена *CTNNB1* в АКЖКТ I клинической стадии; прямая корреляция между показателями уровней экспрессии Е-кадгерина и β -катенина, а также между показателями уровней экспрессии мРНК гена *CTNNB1* и экспрессии Е-кадгерина в АКЖКТ I–II клинической стадии.

Выводы. Снижение транскрипционной активности гена *CDH1* и уровня экспрессии Е-кадгерина, а также повышение транскрипционной активности гена *CTNNB1* и уровня экспрессии β -катенина опухолевыми клетками АКЖКТ играют важную роль в прогрессии карциномы желудка.

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

Патологія. – 2017. – Т. 14, № 1(39). – С. 4–11

Порівняльна характеристика транскрипційної активності генів *CDH1*, *CTNNB1* та експресії кодованих ними білків Е-кадгерину та β -катеніну в аденокарциномі шлунка кишкового типу

В. О. Туманський, Т. О. Христенко

Молекулярно-генетичні аномалії, що є основою aberrантної експресії Е-кадгерину та β -катеніну у злоякісних пухлинах, усе ще залишаються невивченими.

Мета роботи – порівняння рівнів експресії мРНК генів *CDH1* і *CTNNB1* із рівнями експресії кодованих ними білків Е-кадгерину та β -катеніну в аденокарциномі шлунка кишкового типу (АКШКТ).

Матеріали та методи. Здійснено молекулярно-генетичне (ПЛР–РЧ) та імуногістохімічне дослідження АКШКТ I, II та III клінічних стадій у 30 пацієнтів 49–86 років, а також 10 зразків нормальної слизової оболонки шлунка.

Результати. АКШКТ порівняно з нормальною слизовою оболонкою шлунка характеризується зниженими показниками експресії мРНК гена *CDH1* [Me=0,14 (0,03; 0,40)], що корелюють із низьким рівнем експресії Е-кадгерину пухлинними клітинами [Me=27,59 УЕОП (23,14; 37,19), коефіцієнт кореляції Спірмена=0,73], а також підвищеними показниками експресії мРНК гена *CTNNB1* [Me=4,32 (2,11; 11,43)], що корелюють із високим рівнем експресії β -катеніну пухлинними клітинами [Me=116,65 УЕОП (110,34; 151,32), коефіцієнт кореляції Спірмена=0,94]. Виявлена зворотна кореляція між показниками рівня експресії мРНК гена *CDH1* і зниженням ступеня гістологічного диференціювання пухлини від G₁ до G₃ (коефіцієнт кореляції γ = -0,44); пряма кореляція між зниженими показниками рівня експресії мРНК гена *CDH1* і підвищеними показниками рівня експресії мРНК гена *CTNNB1* в АКШКТ I клінічної стадії; пряма кореляція між показниками рівнів експресії Е-кадгерину та β -катеніну, а також між показниками рівнів експресії мРНК гена *CTNNB1* та експресії Е-кадгерину в АКШКТ I–II клінічних стадій.

Висновки. Зниження транскрипційної активності гена *CDH1* і рівня експресії Е-кадгерину, а також підвищення транскрипційної активності гена *CTNNB1* і рівня експресії β -катеніну пухлинними клітинами АКШКТ відіграють важливу роль у прогресії карциноми шлунка.

Comparative characteristics of the transcriptional activity of *CDH1*, *CTNNB1* genes and the expression levels of E-cadherin, β -catenin proteins, coded by these genes, in intestinal-type gastric adenocarcinoma

V. A. Tumanskiy, T. A. Khrystenko

Molecular genetics abnormalities, underlying aberrant expression of E-cadherin and β -catenin in malignant tumors, are still unclear.

Aim: to compare the mRNA expression levels of *CDH1* and *CTNNB1* genes and the immunohistochemical expression levels of E-cadherin and β -catenin proteins in intestinal-type gastric adenocarcinoma.

Materials and methods. The molecular genetic (real-time PCR) and immunohistochemical studies of the intestinal-type gastric adenocarcinoma (30 patients; I, II and III clinical stages were included) and of the normal stomach mucosa (10 samples) were conducted.

Results. In comparison with the normal stomach mucosa, the intestinal-type gastric adenocarcinoma differs by the reduced transcriptional activity of the *CDH1* gene [Me of relative normalized ratio of mRNA expression level is 0.14 (0.03; 0.40)], which correlates with the low expression level of E-cadherin in cancer cells [Me is 27,59 CUOD (23,14; 37,19), Spearman's correlation coefficient = 0,73], and also by the heightened transcriptional activity of the *CTNNB1* gene [Me of relative normalized ratio of mRNA expression level is 4.32 (2.11; 11.43)], which correlates with the high expression level of β -catenin in cancer cells [Me is 116.65 CUOD (110.34; 151.32), Spearman's correlation coefficient = 0,94]. There is a reverse correlation between the *CDH1* mRNA expression level and the degree of histological differentiation of intestinal-type gastric adenocarcinoma (correlation coefficient $\gamma = -0,44$); there is a direct correlation between the *CTNNB1* and *CDH1* mRNA expression levels (only for the I clinical stage cases); there are a direct correlations between the E-cadherin and β -catenin expression levels, and also between the *CTNNB1* mRNA expression level and the E-cadherin expression level (only for the I-II clinical stage cases).

Conclusion. The data indicate that decrease of transcriptional activity of the *CDH1* gene and E-cadherin expression level, and also increase of transcriptional activity of the *CTNNB1* gene and β -catenin expression level in the cancer cells play a critical role in the process of progression of intestinal-type gastric adenocarcinoma.

Key words:

gastric cancer, adenocarcinoma, *CTNNB1* protein human, *CDH1* protein human, beta Catenin, E-Cadherin.

Pathologia

2017; 14 (1), 4–11

Согласно современным представлениям, ключевую роль в поддержании тканевой архитектоники, а также обеспечении межклеточной адгезии играет кадгерин-катениновый комплекс. Изменения в структуре либо функции данного комплекса приводят к утрате адгезионных межклеточных контактов, что, в свою очередь, может стать одним из этапов опухолевой прогрессии [1].

Е-кадгерин (эпителиальный кадгерин) – это трансмембранный гликопротеин, который кодируется геном *CDH1* и является основой кадгерин-катенинового комплекса [2]. Молекула Е-кадгерина включает экстрацеллюлярный и интрацеллюлярный домены: внеклеточный компонент обеспечивает связь между молекулами Е-кадгерина соседних клеток, в то время как внутриклеточный компонент обеспечивает связь молекул Е-кадгерина с молекулами катенина (α -, β -, γ -). Катенины выполняют роль своеобразных «мостиков», связывающих кадгериновые молекулы с актиновым цитоскелетом клетки. Таким образом, интактный кадгерин-катениновый комплекс является основой адгезионных межклеточных контактов, а его нормальное функционирование препятствует реализации инвазивных свойств эпителиоцитов [3]. В целом ряде карцином, включая рак желудка (РЖ), была выявлена aberrantная экспрессия Е-кадгерина. Кроме того, известно, что со снижением степени дифференцировки карциномы снижается и уровень экспрессии Е-кадгерина: утрата адгезионных межклеточных контактов определяет «рассыпной» тип роста низкодифференцированных карцином [1,4].

β -катенин – это протеин, который кодируется геном *CTNNB1* и, помимо участия в поддержании адгезионных межклеточных контактов, функционирует в качестве фактора транскрипции [5]. Свободные молекулы

β -катенина, которые не входят в состав кадгерин-катенинового комплекса, подвергаются протеасомной деградации с участием так называемого «комплекса деструкции» (the β -catenin destruction complex). В случаях, когда посредством Wnt-лиганда клетка получает сигнал к делению, комплекс деструкции блокируется и свободные молекулы β -катенина не подвергаются протеасомной деградации. β -катенин накапливается в цитоплазме и транспортируется в ядро, после чего связывается с комплексом TCF/LEF-1, активируя транскрипцию Wnt-таргетных генов. Как следствие, клетка переходит из фазы G_0 в фазу G_1 с последующей сменой периодов интерфазы [1,5]. Известно, что в карциномах, включая РЖ, выявляются аномальные паттерны экспрессии β -катенина: ядерная экспрессия, цитоплазматическая гиперэкспрессия, утрата мембранной экспрессии. Аберрантная экспрессия β -катенина признана неблагоприятным прогностическим фактором для больных РЖ ввиду наличия тесной взаимосвязи между активностью Wnt/ β -катенинового сигнального пути, уровнем экспрессии β -катенина, а также индексом пролиферации опухолевых клеток [4,5].

Молекулярно-генетические аномалии, которые лежат в основе aberrantной экспрессии Е-кадгерина и β -катенина в злокачественных опухолях, изучены недостаточно. Утрата локуса гена Е-кадгерина *CDH1* на длинном плече 16 хромосомы (16q22) была обнаружена в 24 % РЖ, в 66 % рака пищевода, в 50 % гепатоцеллюлярного рака и в 50–100 % случаев рака молочной железы [1]. Считается, что мутации гена *CDH1* в РЖ отмечаются в меньшей части случаев РЖ, преимущественно в РЖ диффузного типа [2,3]. Мутации гена β -катенина *CTNNB1* выявляются в 60–70 % случаев колоректальных аденом и в РЖ кишечного

типа [1]. При этом наибольший интерес современных исследователей вызывают сбои в эпигенетических механизмах регуляции генов *CDH1* и *CTNNB1*, включающие гиперметилирование и изменение активности малых не кодирующих РНК (miRNA/miR) [3,6].

Цель работы

Сравнить уровни экспрессии мРНК генов *CDH1* и *CTNNB1* с уровнями экспрессии кодируемых ими белков Е-кадгерина и β -катенина в аденокарциноме желудка кишечного типа разной степени гистологической дифференцировки, а также в I, II и III клинической стадии развития опухоли.

Материалы и методы исследования

Проведено комплексное патоморфологическое исследование аденокарциномы желудка кишечного типа (АКЖКТ) в резецированном желудке 30 пациентов 49–86 лет. На основании действующей классификации TNM (TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed.) [7] с учётом клинической стадии развития рака выделены 3 группы наблюдения: I группа – 10 наблюдений – рак желудка I клинической стадии ($T_1 N_{0-1} M_0$, $T_2 N_0 M_0$), II группа – 10 наблюдений – рак желудка II клинической стадии ($T_1 N_2 M_0$, $T_2 N_1 M_0$, $T_3 N_0 M_0$) и III группа – 10 наблюдений – рак желудка III клинической стадии ($T_2 N_2 M_0$, $T_3 N_{1-2} M_0$, $T_4 N_0 M_0$). Группу контроля составили 10 образцов слизистой оболочки желудка обычной гистологической структуры. В исследованных АКЖКТ высокодифференцированные (G_1) карциномы составили 6,67 %, умеренно дифференцированные (G_2) карциномы – 26,66 %, низкодифференцированные (G_3) аденокарциномы – 66,67 %.

Образцы опухоли фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине и заливали в парафин. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили по стандартной методике [8] с использованием моноклональных антител против Е-кадгерина (Clone NCH-38, DAKO, USA), β -катенина (Clone β -Catenin-1, DAKO, USA), а также системы визуализации EnVisionFLEX с диаминобензидином (DAKO, USA). Уровень экспрессии Е-кадгерина и β -катенина клетками аденокарциномы желудка оценивали методом фотоцифровой морфометрии [9] с использованием программы Image J [10] в условных единицах оптической плотности (УЕОП) и градуировали на 4 уровня: 0–20 УЕОП – негативная реакция, 21–50 УЕОП – низкий уровень экспрессии, 51–100 УЕОП – умеренный уровень экспрессии, более 100 УЕОП – высокий уровень экспрессии.

Молекулярно-генетические исследования проводили в 30 образцах АКЖКТ и в 10 образцах слизистой оболочки желудка 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 проведения повторной депарафинизации и регидратации. Выделение

тотальной РНК проводили с помощью набора «Trizol RNA Prep 100» (Isogen Lab., LTD, Russia).

Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор «ОТ-1» (Syntol, Russia). Реакционная смесь общим объёмом 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 (2,5x) и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °С в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 минут при 92 °С.

Для определения уровня экспрессии мРНК использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», USA) и набор реактивов для проведения ПЦР–РВ в присутствии SYBR Green R-402 (Syntol, Russia). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу SypTaq 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 объёма 25 мкл путём добавления деионизированной H_2O . Специфические пары праймеров (5'–3') для анализа исследуемых и референтного гена были подобраны при помощи программного обеспечения Primer-Blast и изготовлены фирмой Thermo Scientific, USA (табл. 1).

Амплификация состояла из 45–50 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация – 95 °С, 15 секунд; отжиг – 59–61 °С, 30–60 секунд; элонгация – 72 °С, 30 секунд. В качестве референт-гена был 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 были включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Каждая реакция амплификации была выполнена на индивидуальных образцах в трёх повторах.

Статистическую обработку полученных данных проводили в персональном компьютере в программе «Statistica® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., лицензия № AXXR712D833214FAN5). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q_1 , Q_3); сравнение проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, а также непараметрического критерия Краскела–Уоллиса; изучение связей между исследуемыми параметрами проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

В результате молекулярно-генетического исследования установлено, что АКЖКТ в сравнении со слизистой оболочкой желудка обычного гистологического строения отличается пониженной транскрипционной активностью гена Е-кадгерина *CDH1*: медиана относительного нормализованного соотношения уровня экспрессии мРНК гена Е-кадгерина *CDH1* составила

0,14 (0,03; 0,40). При этом выявлены статистически значимые различия между медианами уровня экспрессии мРНК гена *CDH1* в АКЖКТ I, II и III клинической стадии, в которых медиана экспрессии мРНК гена *CDH1* составила 0,12 (0,04; 0,14), 0,48 (0,38; 0,67) и 0,02 (0,01; 0,15), соответственно (рис. 1).

Полученные данные согласуются с результатами проведенного ИГХ исследования (табл. 2), в ходе которого установлено, что АКЖКТ характеризуется низким уровнем мембранно-цитоплазматической экспрессии опухолевыми клетками Е-кадгерина: медиана экспрессии данного маркера составила 27,59 УЕОП (23,14; 37,19). Кроме этого, выявлены статистически значимые различия между медианами уровня экспрессии Е-кадгерина в АКЖКТ I, II и III клинической стадии, в которых медиана экспрессии Е-кадгерина составила 28,03 УЕОП (24,55; 30,42), 41,86 УЕОП (28,26; 52,23) и 22,30 УЕОП (20,68; 25,56) соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что в АКЖКТ транскрипционная активность гена *CDH1* и уровень ИГХ экспрессии кодируемого им Е-кадгерина значительно снижены по сравнению с таковыми в слизистой оболочке желудка обычного строения. Согласно современным литературным данным, ген *CDH1* является опухолевым супрессорным геном, снижение уровня его экспрессии наблюдается в целом ряде злокачественных новообразований, включая РЖ [1–3,11]. Снижение уровня ИГХ экспрессии Е-кадгерина варьирует в широком диапазоне, что связано с неоднородностью исследуемого материала, включающего РЖ кишечного и диффузного типов. При этом авторы сходятся во мнении, что снижение уровня экспрессии Е-кадгерина характерно преимущественно для РЖ диффузного типа [11], в то время как вопрос об экспрессии гена *CDH1* и белка Е-кадгерина в РЖ кишечного типа слабо освещён в научной литературе. Большинство современных авторов связывают значительное снижение уровня экспрессии Е-кадгерина в процессе желудочного канцерогенеза с эпигенетическими аномалиями [3,11]. В частности, гиперметилирование CpG-островков внутри проксимального промотора 50 гена *CDH1* ассоциируется со снижением транскрипционной активности соответствующего гена, следовательно, и со снижением экспрессии молекул Е-кадгерина. В настоящее время данная аномалия признана «классическим» механизмом деактивации Е-кадгерина, работающим в РЖ диффузного типа [3]. Возрастающая активность miR-200 была предложена в качестве альтернативного механизма, регулирующего уровень экспрессии Е-кадгерина. Известно, что представители семейства miR-200 способны регулировать активность ZEB1 and ZEB2 – факторов, подавляющих транскрипцию гена *CDH1* [12,13]. Кроме того, J. Carvalho et al. (2012) установили, что деактивация miR-101 служит механизмом, подавляющим транскрипцию гена *CDH1* в АКЖКТ [14]. Снижение уровня экспрессии Е-кадгерина в клетках РЖ ассоциировано с активацией инвазивного роста, а также процессов клеточной миграции [1,3].

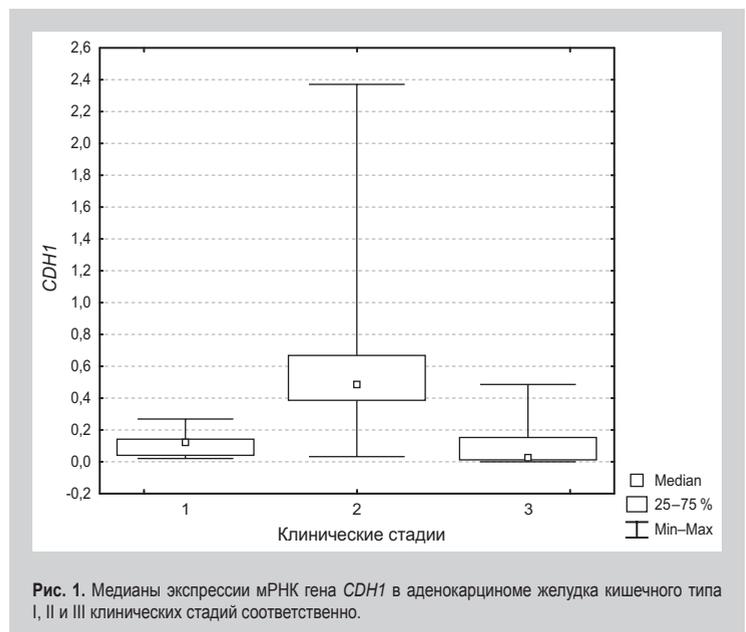
В результате молекулярно-генетического исследования было установлено, что АКЖКТ в сравнении со слизистой оболочкой желудка обычного гистологи-

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

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
E-cadherin (<i>CDH1</i>)	F=CAGTACAACGACCCAACCCA	59.89	63	2060/ 2061
	R=ACCCACCTCTAAGGCCATCT	59.96		
β -catenin (<i>CTNNB1</i>)	F=CCTGTTCCCTGAGGGTATT	58.4	66	220/ 221
	R=CCATTGTCCACGCTGGATT	58.82		
β -actin (<i>ACTB</i>)	F=CCTTTGCCGATCCGCCG	61.30	59	78/79
	R=GATATCATCATCCATGGGTGAGCTGG	61.15		

Таблица 2. Уровни относительной нормализованной экспрессии мРНК генов *CDH1*, *CTNNB1*, а также иммуногистохимической экспрессии кодируемых ими Е-кадгерина и β -катенина

Ген/ кодируемый белок	Медиана уровня экспрессии мРНК генов	Медиана уровня экспрессии кодируемых генами белков в УЕОП
<i>CDH1</i> /Е-кадгерин	0,14 (0,03; 0,40)	27,59 УЕОП (23,14; 37,19)
<i>CTNNB1</i> / β -катенин	4,32 (2,11; 11,43)	116,65 УЕОП (110,34; 151,32)



ческого строения отличается повышенной транскрипционной активностью гена β -катенина *CTNNB1*, о чём свидетельствует повышенный уровень экспрессии опухолевыми клетками мРНК гена β -катенина *CTNNB1* (медиана относительного нормализованного соотношения уровня экспрессии мРНК гена *CTNNB1* клетками АКЖКТ составила 4,32 (2,11; 11,43)) (табл. 2). При этом установлены статистически значимые различия между медианами уровня экспрессии мРНК гена *CTNNB1* в АКЖКТ I, II и III клинической стадии, в которых медиана экспрессии мРНК этого гена составила 3,63 (1,21; 4,36), 2,42 (1,91; 3,20) и 13,80 (7,37; 16,11), соответственно (рис. 2).

Полученные данные согласуются с результатами ИГХ исследования (табл. 2). Установлено, что АКЖКТ характеризуется высоким уровнем мембранно-цитоплазматической экспрессии опухолевыми клетками β -катенина, медиана экспрессии которого составила 116,65 УЕОП (110,34; 151,32). Выявлены также статистически значимые различия между медианами уровня

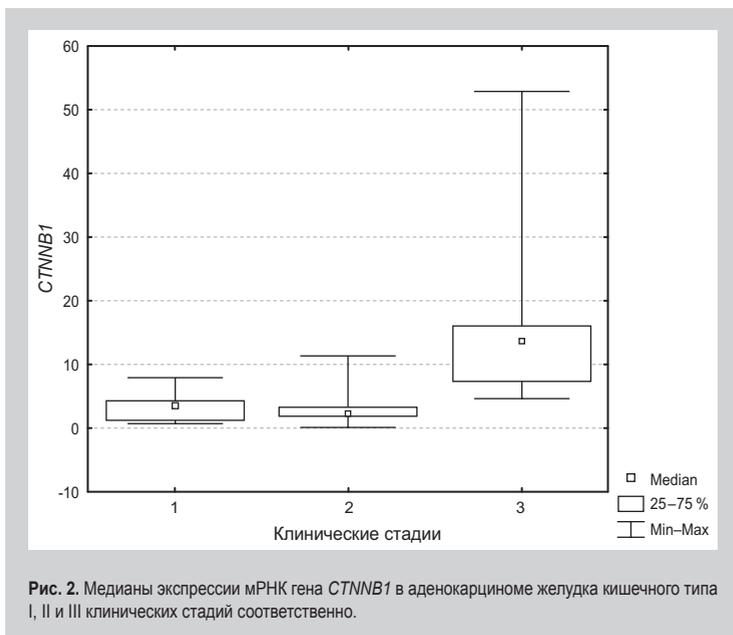


Рис. 2. Медианы экспрессии мРНК гена *CTNNB1* в аденокарциноме желудка кишечного типа I, II и III клинических стадий соответственно.

экспрессии β -катенина в АКЖКТ I, II и III клинической стадии, в которых медиана экспрессии β -катенина составила 114,92 УЕОП (109,57; 118,19), 110,76 УЕОП (108,46; 114,45) и 162,60 УЕОП (132,29; 170,81) соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, нами получены данные о том, что в АКЖКТ повышенная транскрипционная и трансляционная активность гена *CTNNB1* с повышенным уровнем ИГХ экспрессии β -катенина значительно превышают таковые в слизистой оболочке желудка обычного строения. Литературные данные, касающиеся особенностей экспрессии мРНК гена *CTNNB1* и кодируемых им молекул β -катенина в РЖ, варьируют. В ряде исследований отмечено значительное повышение уровня экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, а также иммуногистохимической экспрессии β -катенина в АКЖКТ [1,6,15], что согласуется с полученными нами данными. Вместе с тем были получены данные о том, что для РЖ характерно снижение уровня ИГХ экспрессии β -катенина, при этом авторы отмечают, что данная тенденция характерна преимущественно для диффузной формы РЖ, а в кишечной форме РЖ может иметь место как нормальный, так и повышенный уровень экспрессии данного маркера [4,16]. Повышение уровня иммуногистохимической экспрессии β -катенина в АКЖКТ может быть связано с мутациями гена *CTNNB1*, следствием которых являются структурные изменения NH_2 -терминального домена β -катенина, ассоциированные с утратой Ser33, Ser37 и Tre41 аминокислот. В результате таких изменений не происходит фосфорилирования свободных молекул β -катенина киназой GSK3 β , входящей в состав комплекса деструкции, следовательно, эти молекулы не подвергаются протеасомной деградации и накапливаются в цитоплазме, а затем и в ядре опухолевых клеток [1,17]. Другой возможной причиной повышения уровня транскрипционной активности гена *CTNNB1* и ИГХ экспрессии β -катенина может быть активация Wnt/ β -катенинового сигнального пути, вследствие

которой работа комплекса деструкции блокируется, а молекулы β -катенина, накапливаясь в цитоплазме и клеточном ядре, выполняют функцию активаторов транскрипции Wnt-таргетных генов [16]. Последние, в свою очередь, ответственны за митотическую активность, процессы пролиферации и дифференцировки новых клеточных поколений. В настоящее время известно, что для многих карцином, включая РЖ, колоректальный рак, рак молочной железы, характерна избыточная активность Wnt/ β -катенинового сигнального пути, приводящая к усилению процессов роста и пролиферации опухолевых клеток [6].

В результате корреляционного анализа в АКЖКТ выявлена прямая сильная корреляционная связь между повышенным значением относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CTNNB1* и высоким показателем уровня экспрессии опухолевыми клетками β -катенина: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,94. Имеет место прямая сильная корреляционная связь между повышенной экспрессией мРНК гена *CTNNB1* и высокими показателями уровня экспрессии опухолевыми клетками β -катенина в АКЖКТ I, II и III клинической стадии: коэффициент корреляции Спирмена в АКЖКТ I клинической стадии составил 0,92, в АКЖКТ II клинической стадии – 0,97 и в АКЖКТ III клинической стадии – 0,90.

Полученные в нашем исследовании данные отражают тесную ассоциацию между уровнями транскрипционной активности генов *CTNNB1*, *CDH1*, а также уровнями экспрессии кодируемых ими молекул. В АКЖКТ выявлена прямая сильная корреляционная связь между сниженным значением относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CDH1* и низким показателем уровня экспрессии опухолевыми клетками E-кадгерина: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,73. Установлена прямая сильная корреляционная связь между сниженным значением экспрессии мРНК гена *CDH1* и низким показателем уровня экспрессии опухолевыми клетками E-кадгерина в АКЖКТ I, II и III клинической стадии: коэффициент корреляции Спирмена в АКЖКТ I клинической стадии составил 0,95, в АКЖКТ II клинической стадии – 0,92 и в АКЖКТ III клинической стадии – 0,89.

Взаимосвязь между aberrantными уровнями экспрессии E-кадгерина и β -катенина находит обоснование в устоявшихся представлениях о кадгерин-катениновом комплексе и Wnt/ β -катениновом сигнальном пути: снижение уровня экспрессии E-кадгерина влечёт за собой возрастание количества свободных молекул β -катенина в цитоплазме, что, в свою очередь, приводит к аккумуляции молекул β -катенина в ядре с последующей активацией транскрипции Wnt-таргетных генов [1]. Кроме того, L. A. Aparicio et al. (2012) установили, что активация протоонкогенов c-Met и Src, относящихся к Wnt-таргетным генам, влечёт за собой запуск фосфорилирования цитоплазматического домена E-кадгерина с последующей его убиквитин-зависимой деградацией [18]. Таким образом, формируется *circulus vitiosus*: снижение уровня экспрессии E-кадгерина приводит к накоплению β -катенина с последующей активацией Wnt-таргетных генов, которая, в свою очередь, приводит к снижению экспрессии E-кадгерина.

В результате проведенного L. Li-Fu et al. (2014) мета-анализа показано, что снижение уровня экспрессии E-кадгерина и/или аберрантная экспрессия β -катенина в РЖ ассоциируются с ослаблением адгезионных межклеточных контактов, инфильтративным ростом и метастазированием опухолевых клеток [5].

Кроме этого, нами выявлена корреляционная связь между снижением уровня относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CDH1* в АКЖКТ ($Me=0,14$ (0,03; 0,40)) и ухудшением степени гистологической дифференцировки опухоли от G1 до G3. Коэффициент корреляции γ для вышеназванных параметров составил -0,44. В настоящее время известно, что низкий уровень экспрессии E-кадгерина в наибольшей мере характерен для РЖ диффузного типа, а также для низкодифференцированных карцином [1,11]. Ассоциация между утратой молекул E-кадгерина опухолевыми клетками и степенью гистологической дифференцировки РЖ находит отражение в микроскопическом строении низкодифференцированной карциномы, для которой характерны солидные пласты раковых клеток, а также разобщенные опухолевые клетки, утратившие адгезионные связи [4].

В АКЖКТ I и II клинических стадий нами выявлен ряд дополнительных корреляций между транскрипционной активностью генов *CTNNB1* и *CDH1* и уровнем продукции опухолевыми клетками кодируемых ими β -катенина и E-кадгерина. Установлено, что для АКЖКТ I клинической стадии характерна прямая сильная корреляционная связь между показателями относительной нормализованной экспрессии мРНК генов *CTNNB1* и *CDH1* (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,97). Имеет место прямая сильная корреляционная связь между показателями относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CTNNB1* и экспрессии опухолевыми клетками E-кадгерина в АКЖКТ I и II клинической стадии: коэффициент корреляции Спирмена составил 0,92 для обеих исследуемых групп. В АКЖКТ I и II клинической стадии выявлена также прямая сильная корреляционная связь между показателями уровня ИГХ экспрессии β -катенина и E-кадгерина: в АКЖКТ I и II клинических стадий коэффициент корреляции Спирмена составил 0,90 и 0,93 соответственно.

Согласно современным литературным данным, имеется связь между уровнем иммуногистохимической экспрессии E-кадгерина и глубиной инвазии опухоли (T1/T2 vs T3/T4), наличием метастазов в лимфатических узлах, а также отдаленных метастазов [19]. X. B. Xing et al. (2013) установили, что снижение уровня экспрессии E-кадгерина ассоциировано со снижением общей выживаемости больных РЖ [19]. Кроме того, имеется связь между аберрантной экспрессией β -катенина в РЖ и степенью гистологической дифференцировки опухоли, наличием метастазов в лимфатических узлах, а также отдаленных метастазов [5]. Согласно результатам нашего исследования, ассоциация между уровнем экспрессии β -катенина в АКЖКТ и степенью гистологической дифференцировки опухоли не была выявлена, при этом имеются статистически значимые различия между уровнями экспрессии исследованных протеинов в АКЖКТ I, II, III клинических стадий.

Не вызывает сомнений тот факт, что нарушения экспрессии молекул межклеточной адгезии E-кадгерина и β -катенина играют немаловажную роль в прогрессии РЖ. Для АКЖКТ характерны изменения не только уровня экспрессии мРНК генов *CTNNB1* и *CDH1*, но и изменения уровня экспрессии кодируемых ими белков. При этом молекулярно-генетические механизмы дисрегуляции функционирования кадгерин-катенинового комплекса, а также Wnt/ β -катенинового сигнального пути в желудочном канцерогенезе пока ещё не уточнены. Изучение данных механизмов может сыграть решающую роль в совершенствовании подходов к диагностике и прогнозированию течения РЖ.

Выводы

1. Аденокарцинома желудка кишечного типа характеризуется сниженными показателями экспрессии мРНК гена *CDH1* [$Me=0,14$ (0,03; 0,40)], которые коррелируют с низким уровнем мембранно-цитоплазматической экспрессии опухолевыми клетками E-кадгерина [$Me=27,59$ УЕОП (23,14; 37,19), коэффициент корреляции Спирмена=0,73].

2. Для аденокарциномы желудка кишечного типа характерно возрастание транскрипционной активности гена *CTNNB1* [$Me=4,32$ (2,11; 11,43)], которое ассоциировано с высоким уровнем мембранно-цитоплазматической экспрессии опухолевыми клетками β -катенина [$Me=116,65$ УЕОП (110,34; 151,32), коэффициент корреляции Спирмена=0,94].

3. Снижение уровня экспрессии мРНК гена *CDH1* в аденокарциноме желудка кишечного типа ассоциировано с ухудшением степени гистологической дифференцировки опухоли от G1 до G3 (коэффициент корреляции $\gamma=-0,44$).

4. Аденокарциному желудка кишечного типа I клинической стадии отличает наличие прямой сильной корреляционной связи между сниженными показателями относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CDH1* и повышенными показателями относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CTNNB1* (коэффициент корреляции Спирмена=0,97).

5. Аденокарциному желудка кишечного типа I и II клинических стадий отличает наличие прямой сильной корреляционной связи между низким уровнем иммуногистохимической экспрессии E-кадгерина и высоким уровнем иммуногистохимической экспрессии β -катенина (коэффициент корреляции Спирмена=0,90 и 0,93 соответственно), а также наличие прямой сильной корреляционной связи между повышенными показателями относительной нормализованной экспрессии мРНК гена *CTNNB1* и низким уровнем иммуногистохимической экспрессии E-кадгерина (коэффициент корреляции Спирмена=0,92 в обеих исследуемых группах).

Благодарность: авторы выражают благодарность профессору А. М. Камышному и сотрудникам ПЦР-лаборатории учебного медико-лабораторного центра Запорожского государственного медицинского университета, с участием которых выполнены молекулярно-генетические исследования.

Список литературы

- [1] Caveolin-1, E-cadherin and β -catenin in Gastric Carcinoma, Precancerous Tissues and Chronic Non-atrophic Gastritis / G. Sun, J. Wu, J. Wu et al. // *Chinese Journal of Cancer Research*. – 2012. – Vol. 24. – P. 23–28.
- [2] Liu X. E-Cadherin and Gastric Cancer: Cause, Consequence, and Applications / X. Liu, K. Chu // *BioMed Research International*. – 2014. – №2014. – P. 89–98.
- [3] E-cadherin dysfunction in gastric cancer – cellular consequences, clinical applications and open questions / P. Carneiro, M.S. Fernandes, J. Figueiredo et al. // *FEBS Letters*. – 2012. – Vol. 586. – Issue 18. – P. 2981–9.
- [4] Clinicopathological significance of E-cadherin, b-catenin and p53 expression in gastric adenocarcinoma / M.R. Zali, O. Moaven, H. Asadzadeh Aghdaei et al. // *Journal of Research in Medical Sciences*. – 2009. – Vol. 14. – P. 239–247.
- [5] Abnormal β -catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis / Li-Fu Li, Zheng-Jie Wei, Hong Sun, Bo Jiang // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20. – P. 12313–12321.
- [6] Expression of the E-cadherin/ β -catenin/tcf-4 pathway in gastric diseases with relation to Helicobacter pylori infection: clinical and pathological implications / X.W. Yu, Q. Xu, Y. Xu et al. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2014. – Vol. 15. – P. 215–220.
- [7] Sobin L.H. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours / L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. – New York : Wiley-Blackwell, 2009. – 50 pp.
- [8] Diagnostic Immunohistochemistry / ed. by D.J. Dabbs. – 3rd ed. – Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010. – 951 pp.
- [9] Патент України на корисну модель № 99314 Україна, МПК (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Спосіб фотодифузійної морфометрії імуногістохімічних препаратів / В.О. Туманський, А.В. Євсєєв, І.С. Коваленко, М.Д. Зубко; заявник та патентовласник Запорізький держ. мед. ун-т. – №10/2014/14 103; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.05.14 // *Бюлетень*. – №10.
- [10] Rasband W.S. National Institutes of Health [Електронний ресурс] / W.S. Rasband, J. Image. – Bethesda, Maryland. – Режим доступу: USA – <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
- [11] Chan A.O. E-cadherin in gastric cancer / A.O. Chan // *World Journal of Gastroenterology*. – 2006. – Vol. 12. – P. 199–203.
- [12] The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 / M. Korpala, E.S. Lee, G. Hu, Y. Kang // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – P. 14910–14914.
- [13] The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 / S.M. Park, A.B. Gaur, E. Lengyel, E.M. Peter // *Genes & Development*. – 2008. – Vol. 22. – P. 894–907.
- [14] Lack of microRNA-101 causes E-cadherin functional deregulation through EZH2 up-regulation in intestinal gastric cancer / J. Carvalho, N.C. van Grieken, P.M. Pereira et al. // *The Journal of Pathology*. – 2012. – Vol. 228. – P. 31–44.
- [15] b-Catenin (CTNNB1) Gene Amplification: A New Mechanism of Protein Overexpression in Cancer / G. Suriano, N. Vrcelj, J. Senz et al. // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2005. – №42. – P. 238–246.
- [16] Expression of E-cadherin and WNT-pathway proteins β -catenin, APC, TCF-4 and surviving in gastric adenocarcinoma: clinical and pathological implication / R.R. Lins, C.T. Oshima, L.A. de Oliveira et al. // *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. – 2016. – №29. – P. 227–231.
- [17] β -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток / А.В. Исаева, А.П. Зима, И.П. Шабалова и др. // *Вестник Российской академии медицинских наук*. – 2015. – Т. 70. – №4. – С. 475–483.
- [18] Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review / L.A. Aparicio, M. Valladares, M. Blanco et al. // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2012. – Vol. 31. – P. 375–386.
- [19] The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: A meta-analysis / X.B. Xing, Y.B. Tang, G. Yuan et al. // *International Journal of Cancer*. – 2013. – №132. – P. 2589–2596.
- [4] Zali, M. R., Moaven, O., Asadzadeh Aghdaei, H., Ghafarzadegan, K., Ahmadi, K. J., Farzadnia, M., et al. (2009) Clinicopathological significance of E-cadherin, b-catenin and p53 expression in gastric adenocarcinoma. *Journal of Research in Medical Sciences*, 14, 239–247.
- [5] Li, L. F., Wei, Z. J., Sun, H., & Jiang, B. (2014) Abnormal β -catenin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(34), 12313–12321. doi: 10.3748/wjg.v20.i34.12313.
- [6] Yu, X. W., Xu, Q., Xu, Y., Gong, Y. H., & Yuan, Y. (2014) Expression of the E-cadherin/ β -catenin/tcf-4 pathway in gastric diseases with relation to Helicobacter pylori infection: clinical and pathological implications. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1), 215–220. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.1.215.
- [7] Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2009) International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours. New York: Wiley-Blackwell.
- [8] Dabbs, D. J. (Ed.) (2010). Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- [9] Tumanskyi, V. O., Yevsieiev, A. V., Kovalenko, I. S., & Zubko, M. D. (patentee) (2015) Patent Ukrainy na korysnu model №9 9314 Ukraina, MPK (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Sposib fototsyfrovoy morfometrii imunohistokhimichnykh preparativ [Ukraine patent for utility model №99314 Ukraine, IPC (2015) G01N 21/00, G06K 9/00. Method of photo digital morphometrical study of immunohistochemical micropreparations]. *Biuletyn*, 10. [in Ukrainian].
- [10] Rasband, W. S. (1997–2016) Image. J. Bethesda, Maryland. Retrieved from: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- [11] Chan, A. O. (2006) E-cadherin in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 12(2), 199–203. doi: 10.3748/wjg.v12.i2.199.
- [12] Korpala, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14910–14914. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
- [13] Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, E. M. (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development*, 22(7), 894–907. doi: 10.1101/gad.1640608.
- [14] Carvalho, J., van Grieken, N. C., Pereira, P. M., Sousa, S., Tijssen, M., Buffart, T. E., et al. (2012) Lack of microRNA-101 causes E-cadherin functional deregulation through EZH2 up-regulation in intestinal gastric cancer. *The Journal of Pathology*, 228(1), 31–44. doi: 10.1002/path.4032.
- [15] Suriano, G., Vrcelj, N., Senz, J., Ferreira, P., Masoudi, H., Cox, K., et al. (2005) b-Catenin (CTNNB1) Gene Amplification: A New Mechanism of Protein Overexpression in Cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 42, 238–46. doi: 10.1002/gcc.20135.
- [16] Lins, R. R., Oshima, C. T., de Oliveira, L. A., Silva, M. S., Mader, A. M., & Waisberg, G. (2016) Expression of E-cadherin and WNT-pathway proteins β -catenin, APC, TCF-4 and surviving in gastric adenocarcinoma: clinical and pathological implication. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 29, 227–231. doi: 10.1590/0102-6720201600040004.
- [17] Isaeva, A.V., Zima, A.P., Shabalova, I.P., Ryazantseva, N.V., Vasil'eva, O.A., Kasoayn, K. T., et al. (2015) β -Катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток [SS-catenin: structure, function and role in malignant transformation of epithelial cells]. *Vestnik Rossijskoi akademii medicinskikh nauk*, 70(4), 475–483. [in Russian].
- [18] Aparicio, L. A., Valladares, M., Blanco, M., Alonso, G., & Figueroa, A. (2012) Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1), 375–386. doi: 10.1007/s10555-012-9348-x.
- [19] Xing, X., Tang, Y. B., Yuan, G., Wang, Y., Wang, J., Yang, Y., & Chen, M. (2013) The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 132, 2589–2596. doi: 10.1002/ijc.27947.

Сведения об авторах:

Туманский В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, проректор по научной работе, Запорожский государственный медицинский университет, заслуженный деятель науки и техники Украины.
Христенко Т. А., аспирант каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

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

Христенко Т. О., аспірант каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Tumanskiy V. A., MD, PhD, DSc, Professor, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Pro-rector for Scientific Work, Zaporizhzhia State Medical University, Honorary Science and Engineering Worker of Ukraine.
Khrystenko T. A., PhD student, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Конфликт интересов: отсутствует.

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

Фінансування: Дослідження виконано в рамках держбюджетної НДР «Раннє молекулярно-генетичне та імуногістохімічне прогнозування схильності до прогресування раку легенів та органів травлення» (0117U002580), 2017–2019, що фінансується МОЗ України.

Funding: The research was carried out within the state budget scientific-research work “Early molecular genetic and immunohistochemical prediction of propensity to progression of lung and digestive cancer” (0117U002580), 2017–2019, funded by the Ministry of Health of Ukraine.

Надійшло до редакції / Received: 15.02.2017

Після доопрацювання / Revised: 17.02.2017

Прийнято до друку / Accepted: 28.02.2017