

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ РАКА ЖЕЛУДКА

Сагакянц А.Б.¹, Франциянц Е.М.¹, Златник Е.Ю.¹, Геворкян Ю.А.¹, Солдаткина Н.В.¹, Бондаренко Е.С.¹, Самойленко Н.С.¹, Ульянова Е.П.¹, Шульгина О.Г.¹, Дашков А.В.¹, Каймакчи Д.О.¹, Егоров Г.Ю.¹, Гречкин Ф.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: asagak@rambler.ru

Рак желудка, несмотря на невысокий уровень по частоте заболеваемости, в структуре смертности занимает второе место, что указывает на позднюю диагностику в сочетании с агрессивным течением заболевания и высокую вероятность метастазирования. В последнее время особую роль в патогенезе и метастазировании опухоли отводят раковым или опухолевым стволовым клеткам, ответственным за устойчивость к химио- и радиотерапии и обуславливающим прогрессию опухоли. Для многих форм рака выявлены соответствующие опухолевые клетки со свойствами стволовых, однако отсутствие однозначных маркеров, позволяющих идентифицировать этот тип клеток, затрудняет достижение единого представления об их роли в процессах прогрессии, метастазирования опухоли. Целью работы являлось исследование CD44+, CD133+ - ОСК в сочетании с CD45 при не метастатической и метастатической форме рака желудка с использованием метода проточной цитофлуориметрии в ткани опухоли, перифокальной зоне, сальнике и брюшине. В результате проведенной работы показано, что степень экспрессии выбранных молекул имела характерные отличия у больных раком желудка, различных его форм, что может быть использовано в дальнейшем для объяснения результатов проводимого лечения.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, рак желудка, метастатический рак.

EXPRESSION OF MARKERS OF TUMOR STEM CELLS IN DIFFERENT FORMS OF GASTRIC CANCER

Sagakyants A.B.¹, Franziyantz E.M.¹, Zlatnik E.Yu.¹, Gevorkyan Y.A.¹, Soldatkina N.V.¹, Bondarenko E.S.¹, Samoilenko N.S.¹, Ulyanova E.P.¹, Shulgina O.G.¹, Dashkov A.V.¹, Kaymakchi D.O.¹, Egorov G.Yu.¹, Grechkin F.N.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: asagak@rambler.ru

Gastric cancer, despite a low incidence rate, occupies the second place in the structure of mortality, indicating late diagnosis combined with an aggressive course of the disease and a high probability of metastasis. Recently, a special role in the pathogenesis and metastasis of the tumor is assigned to cancer or tumor stem cells responsible for resistance to chemo-and radiotherapy and causing tumor progression. For many forms of cancer, the corresponding tumor cells with stem properties have been identified, but the absence of unambiguous markers to identify this type of cells makes it difficult to achieve a common understanding of their role in the progression and metastasis of the tumor. The aim of the work was to study CD44 +, CD133 + - CSC in combination with CD45 in non-metastatic and metastatic forms of gastric cancer using flow cytometry in tumor tissue, perifocal zone, epiploon and peritoneum. As a result of this work, it was shown that the degree of expression of the selected molecules had characteristic differences in patients with gastric cancer, its various forms, which can be used further to explain the results of the treatment.

Keywords: cancer stem cells, stomach cancer, metastatic cancer.

Вне зависимости от того, что заболеваемость раком желудка в России не находится на высоком уровне, в структуре смертности от злокачественных новообразований он занимает 2 место. Это свидетельствует о поздней диагностике рака желудка и агрессивном течении заболевания [1]. Процессы прогрессирования заболевания, вероятность метастазирования и развитие устойчивости к применяемой терапии определяются особенностями экспрессии

определенных генов, изменением фенотипа опухолевых клеток, что сопровождается закономерными метаболическими, морфологическими и иммунологическими их изменениями [2; 3]. Кроме того, указанные свойства опухолей определяются наличием особой субпопуляции клеток – опухолевыми, раковыми стволовыми клетками (ОСК, РСК). Показано, что маркеры, выявленные на раковых стволовых клетках, представлены и на определенных типах соматических клеток организма человека, на эмбриональных и мезенхимальных стволовых клетках [4]. Несмотря на то что данные клетки достаточно трудно идентифицировать, число работ, посвященных изучению биологических и клинических особенностей ОСК при различных формах онкологических заболеваний, неуклонно растет [5].

В разных опухолях ОСК экспрессируют различные маркеры и их комбинации, которые выявляются также на нормальных стволовых клетках или клетках-предшественницах, элементах стромы опухоли или опухолевых клетках, не имеющих свойств стволовых, поэтому, возможно, только часть клеток, выбранных по их экспрессии, является ОСК. К настоящему моменту окончательно не решен вопрос о стабильности фенотипа ОСК в процессе прогрессии опухоли или при переходе из систем *in vivo* к *in vitro*. Кроме того, разные подтипы опухолей одного органа могут иметь ОСК, экспрессирующие разные маркеры [6].

Одним из маркеров раковых стволовых клеток является CD44 - это адгезивный белок, который участвует во взаимодействиях клетка–клетка и клетка–межклеточный матрикс посредством своего лиганда – гиалуроновой кислоты, а также коллагена, ламинина, фибронектина, остеопонтина и некоторых гликозаминогликанов. У CD44+ опухолевых клеток описана более высокая туморогенность (пролиферативный потенциал, способность к формированию колоний), резистентность к лекарственному воздействию, меньшая склонность к апоптозу по сравнению с CD44- клетками [7].

CD44 изолированно или в комбинации с другими маркерами выявляется на ОСК в раке молочной, предстательной и поджелудочной желез, печени, колоректальном раке, опухолях головы и шеи, желудка [8].

CD133 (AC133, проминин-1) впервые был обнаружен X. Yin и соавт. в 1997 г. на гемопоэтических стволовых клетках [9]. Это гликопротеин с пятью трансмембранными доменами молекулярной массой 120 кД, взаимодействующий с холестерином [10], принадлежит к семейству промининов, имеет 3 изоформы: CD133-1, CD133-2, CD133-3. Ген (PROM1) картирован на 4p15.32. Ассоциирован с мембранными выпячиваниями, но функция его точно не известна. Было также показано, что экспрессия антигена CD133 коррелирует с выживаемостью пациентов с аденокарциномой желудка [11]. Кроме того, у пациентов с

колоректальной карциномой комбинация CD133, CD44 и CD166 может успешно идентифицировать пациентов при рецидиве и метастазировании с низким, средним и высоким риском [12].

Для идентификации ОСК при раке желудка чаще всего используют фенотипический маркер CD44⁺, наличие которого с высокой вероятностью может указывать на данный тип клеток. Использование же CD133 при обнаружении РСК при раке желудка отмечается не так часто, и его информативность при данной форме опухолей обсуждается.

Таким образом, к настоящему времени накоплен определенный опыт исследования ОСК при различных солидных опухолях, однако вопросы, связанные с особенностями фенотипической организации и «поведением» данной популяции клеток при ряде заболеваний, в частности при различных формах рака желудка, остаются изучены не полностью.

Цель работы: исследование CD44⁺, CD133⁺ - ОСК в различных тканях при не метастатической и метастатической форме рака желудка с использованием метода проточной цитофлюориметрии.

Материалы и методы

В исследование включено 18 больных раком желудка в возрасте от 30 до 80 лет. Больные давали письменное информированное согласие на проведение исследований, подвергались стандартному в данном случае объему обследований. Пациенты были разделены на две группы:

1 группа – M0, рак желудка без метастазов, 11 человек, степень дифференцировки опухоли – G2, средний возраст 58,9±9,7.

2 группа – M1, рак желудка с выявленными метастазами в брюшину и большой сальник, 7 человек, степень дифференцировки опухоли – G2, средний возраст 53,4±11,9.

Непосредственно после оперативного вмешательства осуществляли забор следующих образцов: опухоль (ОП), перифокальная зона (ПЗ), сальник (СА), брюшина (БР), которые ex tempore помещались в раствор CellWash и подвергались дезинтеграции с использованием BD Medimachine в течение 30–60 сек. Полученную клеточную взвесь после фильтрования центрифугировали в течение 4 мин. при 1500 об/мин. в центрифуге Eppendorf 5702 R. Осажденные клетки ресуспендировали раствором CellWash.

Фенотипирование клеток осуществляли на проточном цитометре FACSCantoII (BD, USA) после их обработки панелью антител (CD45, CD44, CD133). Аналитические процедуры осуществляли в соответствии с указаниями фирмы - производителя наборов. Результаты определения клеток, имеющих маркеры ОСК (CD44⁺, CD133⁺), выражали в процентах от общего количества лимфоцитов CD45⁺-клеток либо от общего числа CD45⁻-клеток.

Статистическая обработка полученных результатов предполагала расчет средних значений и стандартных отклонений. После проверки характера распределения проводили оценку статистической значимости различий между группами. В случае нормального распределения использовали параметрический критерий Стьюдента, в противном случае – непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Выявлены следующие особенности процентного содержания клеток с маркёрами опухолевых стволовых клеток в группе пациентов с раком желудка без метастатических поражений (M0), представленные на рисунке 1.

В группе M0 при степени дифференцировки опухоли G2 процентное содержание клеток с фенотипом CD45+CD44+ в ткани опухоли и брюшины статистически не отличалось и составило $3,4 \pm 1,4$ и $3,8 \pm 1,6$ соответственно. При этом отмечено увеличение клеток с данным фенотипом в сальнике - $8,4 \pm 4,5$, что больше количества этих клеток в ткани опухоли на 147% (в 2,4 раза), $p=0,002$. В случае ПЗ не удалось определить клетки с данным фенотипом.

Определение клеток с фенотипом CD45-CD44+ позволило выявить следующие закономерности. Наибольшее количество клеток данного фенотипа выявлено в ткани БР – $1,1 \pm 0,5$, что выше значений данного показателя в ОП ($0,65 \pm 0,3$) и СА ($0,3 \pm 0,1$) на 69% (в 1,7 раза) и 267% (3,7 раза) соответственно, $p=0,001$.

Другим маркёром опухолевых стволовых клеток является CD133+. Определение клеток, имеющих фенотип CD45+CD133+, выявило большее процентное число данных клеток в ткани ОП – $2,75 \pm 0,9$. В БР и СА количество данных клеток было ниже значений в ОП соответственно на 60% (2,5 раза) – $1,1 \pm 0,4$, и 93% (13,8 раз) – $0,2 \pm 0,05$, $p=0,02$. В ПЗ клетки с данным фенотипом не определялись (рис. 1).

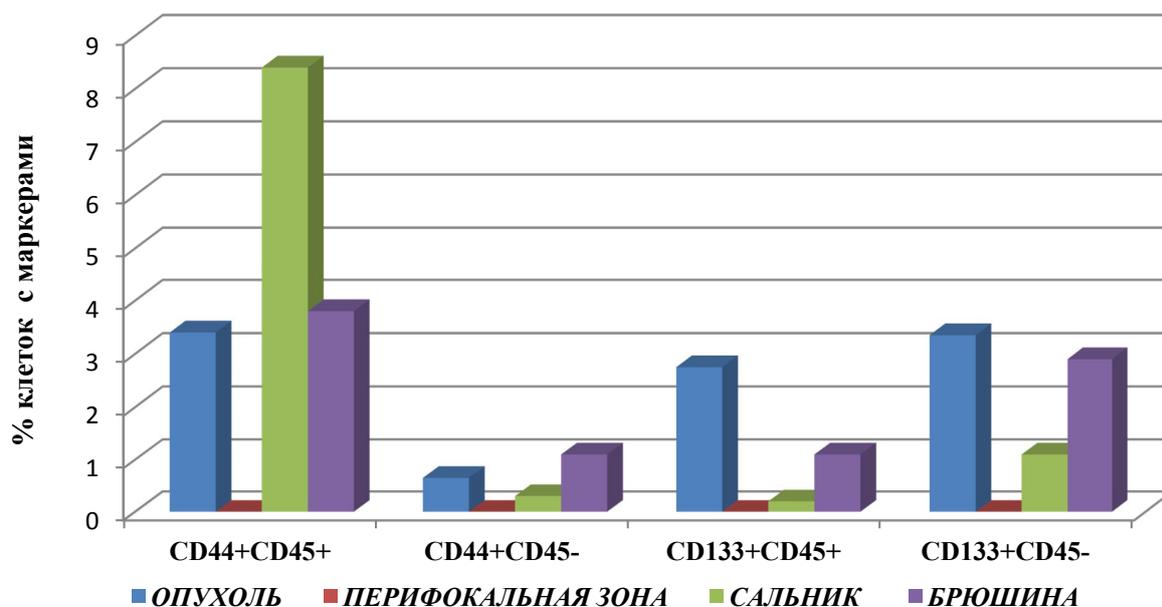


Рис. 1. Процентное содержание клеток с маркерами ОСК в тканях больных раком желудка, группа I (M0) – без метастатических поражений

Следует отметить, что определение процентного содержания клеток с фенотипом CD45-CD133+ имело аналогичные закономерности распределения, однако число данных клеток во всех тканях было выше, чем клеток с фенотипом CD45+CD133+. Максимальное число данных клеток выявлено в ОП – $3,35 \pm 2,7$, затем в БР – $2,9 \pm 1,1$ и в СА – $1,1 \pm 0,4$. Полученные результаты меньше значений в ОП соответственно на 13% (в 1,2 раза) для БР и на 67% (в 3 раза) для СА, $p=0,02$. В ПЗ клеток с данным фенотипом не выявлено.

Таким образом, при раке желудка у пациентов без выявленных метастатических поражений в опухоли наблюдается накопление клеток с фенотипом CD45+CD133+ и CD45-CD133+, превышающее таковое в брюшине и сальнике. Кроме того, процентное содержание клеток с фенотипом CD45+CD44+ было выше в сальнике, а с фенотипом - CD45-CD44+ - в опухоли (рис. 1).

Выявлены следующие особенности процентного содержания клеток с маркерами опухолевых стволовых клеток в группе пациентов с раком желудка, стадия дифференцировки опухоли G2 с метастатическими поражениями (M1), которые представлены на рисунке 2.

Наибольшее процентное содержание клеток с фенотипом CD45+CD44+ у больных раком желудка с метастатическими поражениями выявлено в ткани ОП – $19,8 \pm 4,5$, в то время как в БР – $9,7 \pm 1,5$, с практически одинаковым количеством данных клеток в ПЗ, СА – соответственно $4,4 \pm 1,5$ и $4,2 \pm 1,2$. Полученные значения ниже данного показателя в ОП на 79% (в 4,7 раза), 78% (4,5 раза) и 51% (в 2 раза) для СА, ПЗ и БР соответственно (для всех

результатов $p=0,03$).

Обращает внимание тот факт, что у больных с метастатическими поражениями при РЖ по сравнению с данным показателем у пациентов без метастазов количество клеток с фенотипом CD45+CD44+ в ОП было выше на 482% (в 5,8 раза), в БР – на 155% (в 2,6 раза), а в СА – ниже на 50% (в 2 раза), $p=0,03$. Кроме того, данный тип клеток появляется в ПЗ пациентов группы M1, в то время как у больных M0 они не определялись (рис. 2).

Наибольшее количество клеток с фенотипом CD45-CD44+ у больных с метастазами отмечается в СА и ПЗ, соответственно $3,3\pm 1,4$ и $0,9\pm 0,05$, что превышает в 11 раз показатель у пациентов без метастазов (для СА). В ОП и БР данный тип клеток не выявлен при наличии метастазов, в то время как без них они определялись.

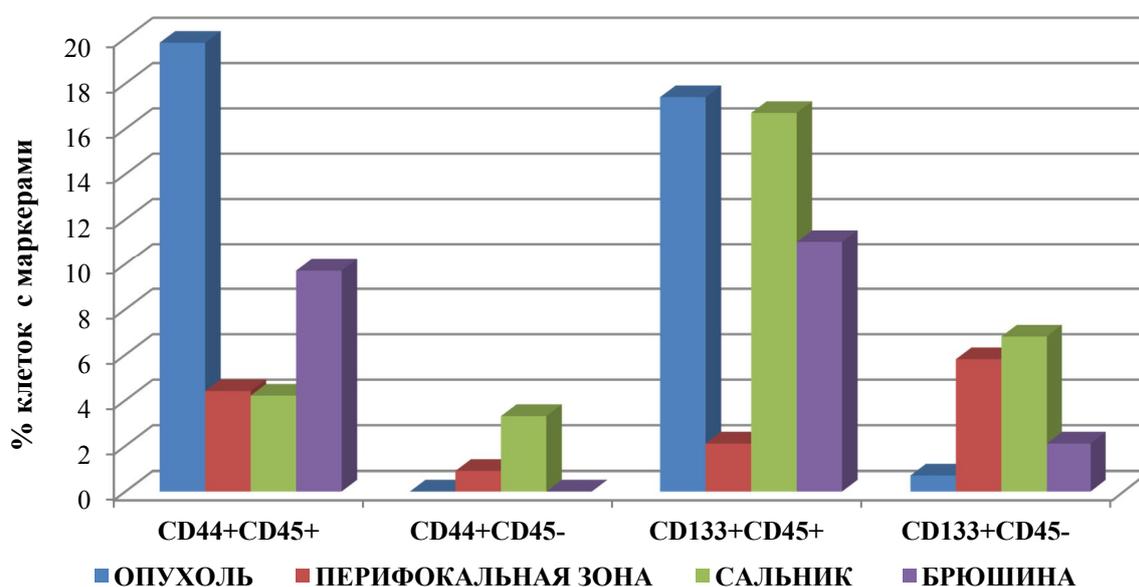


Рис. 2. Процентное содержание клеток с маркерами ОСК в тканях больных раком желудка, группа 2 (M1) – с метастатическими поражениями

При определении другого, менее часто используемого для идентификации ОСК РЖ маркера CD133, выявлены следующие особенности при наличии метастатических поражений.

Количество клеток с фенотипом CD45+CD133+ было максимальным в ОП и СА, соответственно $17,4\pm 2,5$ и $16,7\pm 2,1$, что выше значений у пациентов группы M0 в 6,3 и в 84 раза, т.е. максимальный прирост данных клеток выявлен в СА. В ПЗ у больных M1 группы количество было ниже на 37% (в 1,6 раза) по сравнению с значениями в ОП, но превышало значения данного показателя у пациентов без метастатических поражений в 10 раз. Следует отметить, что на фоне метастатических поражений данные клетки обнаруживаются и в ПЗ, чего не наблюдалось у больных РЖ без метастазов. Однако значение данного показателя

было ниже на 88% (в 8,3 раза) количества данных клеток в ОП.

У больных группы М1 клетки фенотипом CD45-CD133+ в максимальном количестве определялись в СА, ПЗ и БР, соответственно $6,8 \pm 1,5$, $5,8 \pm 1,8$ и $2,1 \pm 0,3$, в то время как в ОП их число было относительно невелико – $0,7 \pm 0,05$. При этом, как правило, количество данных клеток существенно превышало данный показатель у больных без метастатических поражений в случае СА – в 6 раз (выше на 518%), в ПЗ эти клетки обнаруживались у пациентов с поражениями, в то время как без метастазов они не выявлялись. Однако количество клеток с фенотипом CD45-CD133+ снижалось у пациентов с метастазами в ОП и БР – отмечено снижение данного показателя на 79% (4,8 раза) и 28% (1,4 раза) соответственно, $p=0,02$.

Таким образом, у больных РЖ с метастатическими поражениями по сравнению с пациентами без метастазов (рис. 2):

✓ в ОП – увеличивается количество клеток фенотипа CD45+CD44+ и CD45+CD133+ и уменьшается число клеток CD45-CD44+ и CD45-CD133+;

✓ в ПЗ – отмечается рост числа клеток всех определяемых фенотипов CD45+CD44+ и CD45+CD133+, CD45-CD44+ и CD45-CD133+;

✓ в СА – снижается число клеток с фенотипом CD45+CD44+ и увеличивается число клеток остальных типов: CD45+CD133+, CD45-CD44+ и CD45-CD133+;

✓ в БР – увеличивается число клеток с фенотипом CD45+CD44+ и CD45+CD133+, а количество клеток CD45-CD44+ и CD45-CD133+, напротив, снижается.

Заключение

Проведенное исследование позволило выявить некоторые особенности распределения клеток, имеющих маркёры ОСК в различных тканях у больных раком желудка, что может в дальнейшем быть использовано при оценке особенностей развития и прогрессирования заболевания, эффективности проводимой терапии. Полученные результаты являются основой для дальнейшего научного поиска в отношении наиболее полной характеристики гетерогенной опухолевой популяции при раке желудка, роли отдельных клеток в росте, прогрессии и метастазировании опухоли.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 236 с.
2. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Новикова И.А., Гусарева М.А., Кожушко

М.А. Молекулярно-морфологические эффекты предоперационной лучевой терапии крупным фракционированием дозы при раке прямой кишки// Молекулярная медицина. 2017. Т.15. №2. С. 39-43.

3. Никипелова Е.А., Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Владимировна Л.Ю., Позднякова В.В., Лысенко И.Б., Шевченко А.Н., Демидова А.А. Иммунологические критерии развития отдаленных метастазов рака толстой кишки // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2017. № 3-2 (195-2). С. 96-101.

4. Won-Tae Kim, Chun Jeih Ryu. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep.* 2017; 50(6): 285-298

5. Yanjing Song, Yao Wang, Chuan Tong, Hongqing Xi, Xudong Zhao, Yi Wang, Lin Chen A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. *British Journal of Cancer.* 2017. V. 116. P. 973-989. DOI: 10.1038/bjc.2017.54.

6. Meacham C.E., Morrison S.J. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 2013. № 501. P. 328-337.

7. Wang J.Y., Chang C.C., Chiang C.C., Chen W.M., Hung S.C. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. *J. Cell Biochem.* 2012. V. 113(5). P. 1733-1743.

8. Yeung T.M., Gandhi S.C., Wilding J.L., Muschelb R., Bodmera W.F. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V.107(8). P.3722-3727.

9. Пучинская М.В. Маркеры опухолевых стволовых клеток и их прогностическое значение // Архив патологии. 2016. №2. С. 47-54.

10. Lingala S., Cui Y.Y., Chen X., Ruebner B.H., Qian X.F., Zern M.A., Wu J. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology.* 2010. no.89(1). P.27-35.

11. Zhao P., Li Y., Lu Y. Aberrant expression of CD133 protein correlates with Ki-67 expression and is a prognostic marker in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer.* 2010. no.10. P.218.

12. Horst D., Kriegl L., Engel J., Kirchner T., Jung A. Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2009. no.27. P.844-850.