

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Златник Е.Ю.¹, Кит О.И.¹, Новикова И.А.¹, Ульянова Е.П.¹, Сагакянц А.Б.¹,
Теплякова М.А.¹, Егоров Г.Ю.¹, Чупанов Г.М.¹, Черникова Е.Н.¹

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

Иерархическая модель развития опухоли предполагает ведущую роль стволовых опухолевых клеток, способных к самоподдержанию и мультипотентной дифференцировке, отводя им исключительную возможность инициировать опухолевый рост как в первичном очаге, так и в метастазах. Целью данной работы явилась оценка частоты и уровня экспрессии маркеров стволовых клеток колоректального рака CD44 и CD133 при различной распространенности процесса на материале больных ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России. Использованы образцы опухолевой ткани колоректального рака и его метастазов 60 больных с различной распространенностью процесса, в которых иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию CD44 и CD133, считающихся маркерами стволовых опухолевых клеток. Выявлены различия их экспрессии при колоректальном раке разной распространенности, а также в первичной опухоли и ее метастазах. Положительная экспрессия CD44 маркера отмечена чаще в неметастазирующих опухолях, чем в опухолях, дающих метастазы в печень. Кроме того, в метастазах отмечена тенденция к снижению данного маркера по сравнению с первичной опухолью. Напротив, CD133 демонстрирует нарастание как частоты выявления, так и уровня экспрессии при увеличении агрессивности опухоли; в метастатической ткани его экспрессия соответствует первичной опухоли, из которой происходит метастазирование. Мы полагаем, что определение экспрессии CD44 и CD133 методом ИГХ можно рассматривать в качестве одного из факторов прогнозирования течения колоректального рака.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, колоректальный рак, ИГХ-маркеры.

THE POSSIBLE ROLE OF CANCER STEM CELLS IN METASTATIC PROCESS OF COLORECTAL CANCER

Zlatnik E.Y.¹, Kit O.I.¹, Novikova I.A.¹, Ulianova E.P.¹, Sagakyants A.B.¹,
Teplyakova M.A.¹, Egorov G.Y.¹, Chupanov G.M.¹, Chernikova E.N.¹

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

The hierarchical model of tumor development assumes the leading role of stem tumor cells capable of self-maintenance and multipotent differentiation, giving them an exceptional opportunity to initiate tumor growth in both the primary focus and metastases. The purpose of this work was to assess to assess the incidence and expression levels of stem markers of colorectal cancer cells CD44 and CD133 for different prevalence of the process on the material of patients from the Rostov Research Institute of Oncology. Samples of tumor tissue of colorectal cancer and its metastases were used in 60 patients with different prevalence of the process, in which the expression of CD44 and CD133, which are considered markers of stem tumor cells, was evaluated by immunohistochemistry. Differences in their expression in colorectal cancer of various abundances, as well as in the primary tumor and its metastases, were revealed. Increased expression of CD44 in non-metastatic tumors was observed more often than in tumors producing metastases to the liver, and in metastases there was a tendency for this marker to decrease compared to the primary tumor. In contrast, CD133 demonstrates an increase in both the detection rate and the expression level with an increase in the aggressiveness of the tumor; in metastatic tissue, its expression corresponds to the primary tumor, from which metastasis occurs. We believe that the determination of the expression of CD44 and CD133 using the IHC method can be considered as one of the factors predicting the course of colorectal cancer.

Keywords: cancer stem cells, colorectal cancer, IHC-markers.

Изучение механизмов и закономерностей метастазирования злокачественных опухолей, несмотря на достаточно длительную историю, представляет собой важную задачу современной медицинской науки, поскольку даже при своевременном и эффективном

излечении первичного очага большинство больных погибает от развивающихся впоследствии метастазов, клетки которых приобретают повышенную агрессивность и резистентность к лекарственным препаратам [1; 2]. При исследовании этих вопросов в последнее время придается большое значение раковым стволовым клеткам (РСК, cancer stem cells - CSC), обладающим некоторыми общими свойствами со стволовыми клетками, по некоторым данным, именно они считаются источником развития и генерализации злокачественного процесса [3]. В норме во многих тканях присутствуют стволовые клетки, обеспечивающие их регенерацию, особенно интенсивную в клетках кишечного эпителия.

В настоящее время вероятностная модель развития опухоли, согласно которой каждая раковая клетка может давать начало новой опухоли как в первичном очаге, так и в метастазах, вытесняется иерархической моделью, допускающей наличие указанной способности только у части клеток со свойствами РСК. Данная популяция клеток отличается от остальных малигнизированных клеток способностью к неограниченному самообновлению, к воссозданию всего разнообразия трансформированных клеток «материнской» опухоли, результатом чего является иерархично организованная клеточная популяция [4]. РСК характеризуются также целым рядом особенностей фенотипической организации.

Исследование этой особой популяции РСК предполагает решение ряда сложных проблем, связанных с небольшим числом данных клеток, отсутствием однозначных идентификационных характеристик, на фоне повышенной генетической и фенотипической нестабильности, являющихся основой обратимых переходов в другие популяции клеток. Следует отметить, что именно РСК сейчас рассматриваются как причина устойчивости опухолей к радио- и химиотерапии, возникновения рецидивов и метастазов. Поэтому изучение РСК может принципиально изменить подходы к лечению онкологических пациентов, в частности КРР.

В литературе приводится ряд иммунофенотипических характеристик РСК различных опухолей, однако принадлежность маркеров к рассматриваемому типу клеток нередко является спорной в силу неоднозначности их функции. Кроме того, более полную картину может дать не один маркер, а их совокупность; не исключена также гетерогенность РСК, даже внутри одной ткани.

Одним из маркеров РСК ряда солидных опухолей считается CD44 (рака молочной железы, поджелудочной железы, опухолей головы и шеи и др.) [5]. Данная молекула, являясь адгезивным белком, определяет межклеточные взаимодействия, контакты клетки с элементами экстрацеллюлярного матрикса. CD44 участвует в процессах рециркуляции и активации лимфоцитов, играет определенную роль в таких процессах, как миелопоэз,

лимфопоз, ангиогенез. В клетке могут существовать множественные изоформы CD44: стандартная изоформа CD44s, а также несколько вариантов CD44v, из которых лучше изучена CD44v6. Тканевая организация, особенности микроокружения клетки, активность онкогенных сигнальных путей (например, Ras-МАРК) влияют на образование соответствующего типа CD44, хотя механизмы воздействия указанных факторов на выбор образуемой изоформы данной молекулы до конца не выяснены [6].

Во внеклеточном пространстве лигандами CD44, помимо гиалуроновой кислоты, являются: коллаген, ламинин, фибронектин, остеопонтин и некоторые гликозаминогликаны. Показаны антиапоптотические и прометастатические эффекты активации CD44. Влияя на интенсивность деградации гиалуроновой кислоты и определяя расположение на мембране матрикс-модифицирующих ферментов, CD44 может участвовать в моделировании опухолевого микроокружения, а расщепление самого CD44, которое отмечалось в ткани опухоли, способствовало увеличению миграционной активности клеток.

Показано, что комплекс лиганд-CD44 вовлечен в регуляцию эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клетках РМЖ, рака головы и шеи, яичников; взаимодействуя с рецепторами факторов роста (EGFR- и HER2), изменяет активность ряда транскрипционных факторов и их комплексов с дальнейшей экспрессией генов, определяющих стволовость, торможение апоптоза и лекарственную устойчивость [6].

Следствием указанных особенностей РСК, у CD44+ опухолевых клеток описана более высокая способность к образованию опухолей, устойчивость к лекарственному воздействию, меньшая склонность к апоптозу по сравнению с CD44- клетками [7]. Однако роль CD44 в прогрессии опухоли и образовании метастазов при КРР неоднозначна [8].

Еще одним поверхностным маркером, используемым для идентификации РСК, является CD133 (AC133, проминин-1), особенностями структурной организации которого является наличие пяти трансмембранных доменов, обуславливающих взаимодействие с холестерином плазматических мембран. Эта структура ассоциирована с мембранными выпячиваниями, но функция её точно не известна [6]. Определяются три изоформы данного гликопротеина.

Экспрессия CD133 снижается при увеличении степени дифференцировки клеток, что позволяет идентифицировать РСК. CD133 определяется на ряде клеток, не связанных с опухолевым ростом: в гемопоэтических и нейрональных стволовых клетках, клетках-предшественницах, в эмбриональных эпителиях [6].

В эксперименте L. Ricci-Vitiani et al. (2007) продемонстрировали, что CD133+ раковые клетки, введенные иммунодефицитным мышам, формировали опухоли, а CD133- нет [9]. Низкая пролиферативная активность CD133+ клеток КРР способствует их высокой химио- и

радиорезистентности [10], вследствие чего его экспрессия CD133 обратно коррелирует с выживаемостью пациентов, получавших 5-фторпиримидины [11].

К настоящему времени, таким образом, накоплен определенный опыт изучения особенностей фенотипической характеристики РСК, но уровень экспрессии этих молекул при различной распространенности процесса не изучен в полной мере.

Целью данной работы явилась оценка частоты и уровня экспрессии маркеров стволовых клеток колоректального рака CD44 и CD133 при различной распространенности процесса на материале больных ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России.

Материалы и методы исследования

При проведении работы были исследованы образцы опухолевой ткани КРР 60 больных: 31 женщины и 29 мужчин в возрасте от 37 до 78 лет. Первая группа обследованных включала 30 больных без отдаленного метастазирования: T2-4N0M0 (n=21), T3-4N1M0 (n=9). Вторая группа – 30 пациентов с метастазами в печень: T3-4aN0M1 (n=8) и T3-4aN1-2M1 (n=22). По гистологическому строению все опухоли были аденокарциномами.

В работе использован иммуногистохимический метод определения экспрессии CD44 и CD133 на опухолевых клетках, с использованием мышиных моноклональных антител к CD44 клона 156-3C11 (ThermoScientific) в разведении 1:100 и поликлональных кроличьих антител к CD133 (MyBioSource) в разведении 1:200 с использованием автостейнера Thermo Scientific 480S. Экспрессия белка CD44 имеет мембранную локализацию и определялась как положительная, когда окрашивание было выявлено в 10% (cut-off) и более всех опухолевых клеток. Белок CD133 также имеет мембранную локализацию; его экспрессию считали положительной, когда окрашивание было выявлено в более 5% всей опухоли. Кроме того, характеризовали интенсивность окрашивания клеточной мембраны: 0, 1+ слабое, 2+ умеренное, 3+ сильное окрашивание. При наличии интенсивности окрашивания 2+ и 3+ случай рассматривался как позитивный.

Оценку достоверности отличий результатов исследования осуществляли с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoftInc., США) с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования представлены на рисунках 1-3. Позитивная экспрессия CD44 на опухолевых клетках при отсутствии метастазов в печень и при их наличии выявлена в 40% (12 из 30) и 30% (9 из 30) опухолей, в то время как для CD133 эти показатели составили 60% (18 из 30) и 83,3% (25 из 30) соответственно (рис. 1).

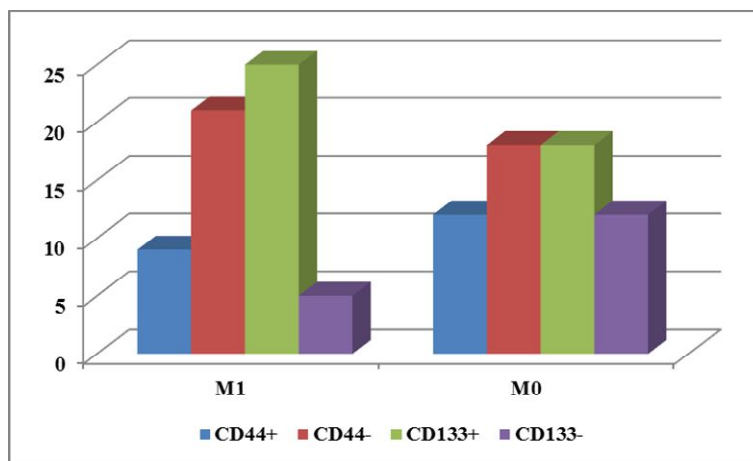


Рис. 1. Доля опухолей с позитивной и негативной экспрессией маркеров РСК при наличии и отсутствии отдаленных метастазов

Как видно из рисунка 1, при метастазирующем и при неметастазирующем КРР среди первичных опухолей преобладают экспрессирующие CD133, но не CD44; различие особенно наглядно проявляется в опухолях с метастазами в печень.

В опухолях больных 1-й группы разброс количества CD44+ клеток составлял от единичных до 25% всей площади опухоли (в среднем $9,8 \pm 3,1\%$), во 2-й группе – от единичных до 15% (в среднем $6,6 \pm 2,9\%$); различия статистически недостоверны ($p \geq 0,05$). Для CD133+ клеток соответствующие показатели составили: в группе больных без отдаленного метастазирования от единичных до 15% всей площади опухоли (в среднем $8,6 \pm 3,1\%$), в группе с отдаленными метастазами – от единичных до 25% (в среднем $13,8 \pm 2,4\%$); различия также статистически недостоверны ($p \geq 0,05$).

Хотя статистически значимых различий количества клеток, позитивных по экспрессии маркеров РСК, в зависимости от распространенности процесса и не установлено, следует отметить, что при наличии метастазирования в печень в первичной опухоли нарастает количество CD133+ и снижается количество CD44+ (рис. 2).

Более детальный анализ данных внутри каждой группы подтверждает разнонаправленный характер экспрессии CD44 и CD133: отмечено нарастание как доли CD133+ опухолей, так и экспрессии этого маркера их клетками по мере увеличения распространенности КРР (рис. 3), в частности, регистрируется статистически достоверное повышение количества CD133+ клеток в опухолях T3-4aN1-2M1 по сравнению с T2-4N0M0 ($16,7 \pm 3,4$ против $6,3 \pm 3,6\%$, $p < 0,05$).

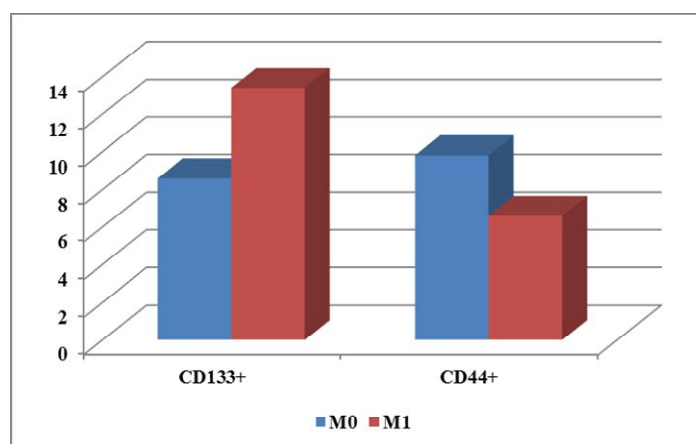


Рис. 2. Экспрессия CD133 и CD44 в опухолях с метастазами и без метастазов.

Ось Y - % позитивно окрашенных клеток

В опухолях, дающих отдаленные метастазы (T3-4aN0M1), CD44 лучше экспрессирован в клетках первичной опухоли, чем метастазов: среди 8 образцов последних наличие экспрессии выше точки cut-off не выявлено. Аналогичная картина наблюдается и в опухолях T3-4aN1-2M1, среди которых экспрессия CD44 найдена в 27,3% образцов опухолей, и только в 9,1% образцов метастатической ткани. Несмотря на немногочисленность образцов исследованных метастатических лимфатических узлов, следует отметить, что в них данный маркер также экспрессируется реже, чем в первичной опухоли. Напротив, для маркера CD133 отмечено возрастание процента позитивно окрашенных опухолевых клеток в метастазах по сравнению с тканью первичной опухоли. Например, среди исследованных образцов T3-4aN1-2M1 опухолей и их метастазов все 22 образца последних (100%) оказались CD133+ и только 9,1% из них были CD44+.

Таким образом, нами выявлен оппозитный характер экспрессии двух исследованных маркеров, которые, согласно данным литературы, присущи раковым стволовым клеткам КРР. Полученные нами результаты по экспрессии CD44 согласуются с данными некоторых авторов. В частности, в работе Alaa Afify et al. (2016) отмечается снижение экспрессии CD44 маркера в большинстве метастатических опухолей. Показано, что в 65% случаев метастазов аденокарцином в лимфатические узлы отсутствует экспрессия CD44, в то время как в 92% случаев первичной опухоли она выявляется [12].

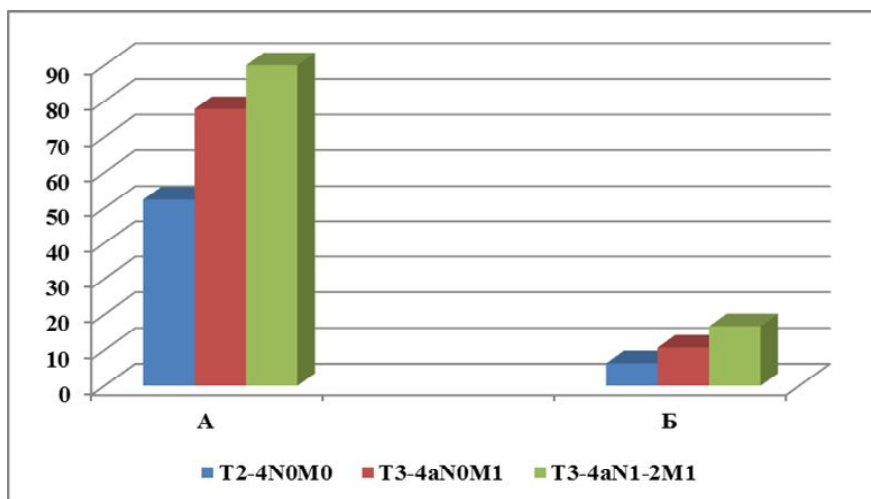


Рис. 3. Экспрессия CD133 в опухолях при наличии и отсутствии отдаленных метастазов. Ось Y - % А – % опухолей с позитивной экспрессией CD133; Б – % CD133+ опухолевых клеток в опухоли

Снижение экспрессии CD44 на клетках метастатического очага, вероятнее всего, обуславливается протеолизом проксимальной области молекулы металлопротеиназой I типа, и, как следствие, приводит к потере адгезивных свойств опухолевых клеток с усилением их миграции, повышением их метастатического потенциала. Picco N. et al. (2016) предполагают, что экспрессия CD44 может меняться при метастазировании в зависимости от микроокружения [13], хотя при изучении экспрессии этого маркера в первичных опухолях и метастазах рака молочной железы не нашли различий [14].

В целом же данные литературы о роли исследованных маркеров в инициации и метастазировании КРР разноречивы, что может обуславливаться различными методическими подходами авторов. Как и при изучении других процессов, результаты, полученные в культурах, в эксперименте и на клиническом материале могут не совпадать, однако они оказались неоднозначными и при использовании сходных моделей.

Так, одними авторами при проведении культуральных исследований показано, что опухоль-иницирующими клетками КРР являются CD133+CD44+. Другими авторами в опытах на культурах клеток и на иммунодефицитных мышьях установлено, что как CD133+, так и CD133- клетки могут быть опухоль-иницирующими, при этом они указывают на то, что более агрессивными являются метастатические CD133-, экспрессирующие CD44 [15].

Напротив, Ricci-Vitiani L. et al. (2007) показали, что недифференцированные CD133+, в отличие от CD133- клеток КРР могут образовывать долгоживущие сфероиды, что является признаком CSC, сохраняя при этом свою антигенную структуру [15].

По данным ряда исследователей, в опухолях больных была выявлена более высокая экспрессия CD44s и CD44v6 в первичных опухолях по сравнению с их метастазами, причем

она возрастала с увеличением G и инвазивности первичной опухоли, а продолжительность жизни больных с CD44s+ метастазами была ниже, чем при CD44s- [16].

Несмотря на многочисленные сообщения о том, что CD133 присутствует на многих РСК солидных опухолей, включая КРР [16; 17], нам удалось обнаружить экспрессию CD133 лишь в 15,3% проб КРР, причем всего в 11,1% случаев была найдена его гиперэкспрессия, встречающаяся только в умеренно- и высокодифференцированных опухолях. Многие авторы считают гиперэкспрессию CD133 маркером неблагоприятного прогноза [17].

Заключение

Колоректальный рак различной распространенности характеризуется более выраженной положительной экспрессией CD44 маркера в неметастазирующих опухолях, чем в опухолях, дающих метастазы в печень. При этом в метастазах прослеживается тенденция к снижению данного показателя по сравнению с его уровнем в первичной опухоли.

Увеличение агрессивности опухоли сопровождается нарастанием как частоты выявления, так и экспрессии CD133 - в метастатической ткани ее уровень соответствует первичной опухоли, из которой происходит метастазирование.

Мы полагаем, что определение экспрессии CD44 и CD133 иммуногистохимическим методом можно использовать в качестве одного из факторов прогнозирования течения КРР, для чего необходимо установить более четкие количественные критерии, а также провести сравнительный анализ с чувствительностью больных к адъювантной химиотерапии и показателями их общей и бессобытийной выживаемости.

Список литературы

1. 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.
2. Никипелова Е.А., Кит О.И., Шапошников А.В., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Владимирова 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.
3. Puglisi M.A., Tesori V., Lattanzi W., Gasbarrini G.B., Gasbarrini A. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. World J Gastroenterol. 2013. no.19(20). P.2997-3006.
4. Cicalese A., Bonizzi G., Pasi C.E., Faretta M., Ronzoni S., Giulini B., Brisken C.,

Minucci S., P.P. Di Fiore, Pelicci P.G. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell*. 2009. no.138(6). P.1083-1095.

5. 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. no.107(8). P.3722-3727.

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

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. no.113(5). P.1733-1743.

8. Dallas M.R., Liu G, Wei-Chiang Chen, Thomas S.N., Wirtz D., Huso D.L., Konstantopoulos K. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *FASEB J*. 2012. no.26(6). P.2648-2656.

9. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., R. De Maria Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007. Vol. 445. P. 111-115.

10. Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y., Yokoe T., Okugawa Y., Kawamoto A., Yasuda H., Morimoto Y., Fujikawa H., Inoue Y., Miki C., Kusunoki M., Immunohistochemical features of CD133 expression: association with resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep*. 2010. Vol.24. P.345-350.

11. Ong C.W., Kim L.G., Kong H.H., Low L.Y., Iacopetta B., Soong R., Salto-Tellez M. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod. Pathol*. 2010. Vol. 23. P.450-457.

12. Afify A., Durbin-Johnson B., Viridi A., Jess H. The expression of CD44v6 in colon: from normal to malignant. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2016. no.20. P.19-23.

13. Picco N., Gatenby R.A., Anderson A.R.A. Stem Cell Plasticity and Niche Dynamics in Cancer Progression. *IEEE TransBiomedEng*. 2017. no.64(3). P.528-537 DOI: 10.1109/TBME.2016.2607183.

14. Wenzhe Li, Huailei Ma, Jin Zhang, Ling Zhu, Chen Wang, Yanlian Yang Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Scientific Reports*. 2017. no.23;7(1). P.13856. DOI: 10.1038/s41598-017-14364-2.

15. Shmelkov S.V., Butler J.M., Hooper A.T., Hormigo A., Kushner J., Milde T., Clair R.St., Baljevic M., White I., Jin D.K., Chadburn A., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Gale N.W., Thurston G., Yancopoulos G.D., D'Angelica M., Kemeny N., Lyden D., Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133–metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest*. 2008. no.118. P.2111-2120. DOI:10.1172/JCI34401.

16. Huh J.W., Kim H.R., Kim Y.J., Lee J.H., Park Y.S., Cho S.H., Joo J.K. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis. *Pathology International*. 2009. no.59. P.241-246.
17. Kojima M., Ishii G., Atsumi N., Fujii S., Saito N., Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: A clinicopathological study. *Cancer Sci*. 2008. no.99(8). P.1578-1583.