

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПЕРВИЧНОМ С РАЗЛИЧНОЙ СТАДИЕЙ И ГЛУБИНОЙ ИНВАЗИИ И РЕЦИДИВНОМ РАКЕ ВУЛЬВЫ

Вереникина Е.В., Абдуллаева Н.М., Златник Е.Ю., Ульянова Е.П., Быкадорова О.В., Лысенко И.Б., Максимова Н.А.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: uljanova_elenal@lenta.ru

Цель: оценка экспрессии маркеров ОСК CD133 и ALDH1 при первичном раке вульвы с различными стадиями и глубиной инвазии опухоли, а также при рецидивном раке вульвы. Материалом для исследования явились парафиновые блоки опухолей 56 больных с верифицированным диагнозом плоскоклеточного рака вульвы; у 20 из них выявлена I стадия, у 26 – II стадия, у 10 – рецидив заболевания; проводили ИГХ-исследование с моноклональными мышиными антителами к ALDH1, поликлональными кроличьими антителами к CD133 и системой визуализации HRP-DB. Статистическую обработку выполняли с помощью программы STATISTICA 13.0. Результаты показывают разнонаправленность экспрессии маркеров: ALDH1 был лучше экспрессирован при более низкой инвазии и при первичных опухолях I стадии по сравнению с рецидивными, а экспрессия CD133 была выше при более распространенных и агрессивных опухолях, т.е. первичных с более глубокой инвазией, а также при рецидивных. Оба исследованных маркера могут служить факторами прогноза: ALDH1 – положительного, CD133 – негативного, однако принадлежность их к ОСК при раке вульвы, особенно ALDH1, остается под вопросом.

Ключевые слова: рак вульвы, стволовые опухолевые клетки, ALDH1, CD133, прогноз.

CANCER STEM CELLS' MARKERS EXPRESSION IN PRIMARY WITH DIFFERENT STAGE AND DEPTH OF INVASION AND RECURRENT VULVAR CARCINOMA

Verenikina E.V., Abdullaeva N.M., Zlatnik E.Yu., Ulianova E.P., Bykadorova O.V., Lysenko I.B., Maksimova N.A.

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: uljanova_elenal@lenta.ru

Our aim was to evaluate expression of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 in primary with different stage and depth of invasion and recurrent vulvar squamous cell carcinoma. Material for the research was represented by paraffin-embedded blocks of tumors of 56 verified vulvar squamous cell carcinoma patients; in 20 of them I stage was diagnosed, in 26 – II stage, 10 had relapses; they were studied by immunohistochemistry staining using murine monoclonal antibodies to ALDH1, polyclonal rabbit antibodies to CD133 and Reveal Polyvalent HRP-DB Detection System. Statistics analysis was performed by program STATISTICA 13.0. Our results showed divergent expression of the markers in different tumors: ALDH1 was better expressed in tumors with lower invasion and in primary tumors of the I stage compared to recurrent ones while the CD133 expression was higher in more advanced and aggressive tumors, i.e. in primary ones with deeper invasion and in recurrent ones. We conclude that both studied markers might be used as prognostic factors: ALDH1 as a positive and CD133 as a negative one. However, the question remains if ALDH1 may be regarded as CSC marker in vulvar cancer.

Keywords: vulvar carcinoma, cancer stem cells, ALDH1, CD133, prognosis.

Хотя рак вульвы и считается довольно редкой опухолью, его эффективное лечение составляет проблему для онкогинекологов в связи как с пожилым возрастом многих больных, так и со слабой чувствительностью опухоли к химиолучевой терапии [1]. При рассмотрении причин развития и прогрессирования заболевания в фокусе внимания авторов обычно оказываются инфицирование ВПЧ, способствующее развитию такого предракового заболевания, как ВИН, и генетические изменения, например TP53-мутации [2, 3]. В настоящее время интенсивно исследуется роль опухолевых стволовых клеток (ОСК) в прогрессии

различных опухолей, формировании их химио- и радиорезистентности. ОСК выявлены при многих злокачественных новообразованиях, включая рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, меланому, рак легких, рак молочной железы [4, 5].

В настоящее время существуют три основные теории биологического происхождения ОСК: 1) из стволовых клеток, приобретающих мутации, необходимые для развития злокачественного фенотипа; 2) из клеток-предшественников, обладающих частичной способностью к самообновлению с высокой вероятностью онкогенной трансформации; 3) из дифференцированных клеток путем дедифференцировки. При этом в клетках активируются сигнальные пути TGF- β , Wnt, Hedgehog (Hh), β -катенин, Notch, NF κ B и STAT3 и происходит изменение их фенотипа.

Фенотипический маркер ОСК CD133 является мембраносвязанным гликопротеином и участвует в процессах дифференцировки и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в пролиферации клеток через Wnt-сигнальный путь и связан с неблагоприятным прогнозом при КРР, глиобластоме, гепатоцеллюлярной карциноме и ряде других опухолей [4]. Еще одним маркером ОСК считается альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1), которая индуцирует ЭМП в опухолевых клетках, что способствует их проникновению через базальную мембрану в лимфатическую и кровеносную системы, а следовательно, метастазированию. В литературе приводятся сведения об экспрессии этого маркера, в частности при плоскоклеточных раках: орофарингеальном [6] и раке пищевода [7]. Совместное изучение экспрессии CD133 и ALDH1 проводилось при раке молочной железы [8], легкого, меланоме, колоректальном раке, раке поджелудочной железы, шейки матки, при этом отмечены их параллельные изменения в зависимости от химиорезистентности или чувствительности, инвазии, метастазирования опухоли, выживаемости больных [9, 10]. Подобные исследования при раке вульвы немногочисленны и противоречивы [6, 11].

Цель исследования: оценить экспрессию маркеров ОСК CD133 и ALDH1 при первичном раке вульвы с различными стадиями и глубиной инвазии опухоли, а также при рецидивном раке вульвы.

Материалы и методы исследования. Для исследования был взят операционный материал 56 больных раком вульвы I–II стадий и с рецидивами, находившихся на лечении в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» МЗ РФ. Возраст больных составлял от 29 до 84 лет, в среднем 52 года. У 20 больных диагностирована I стадия заболевания, у 26 больных – II стадия, 10 имели рецидивы. Кроме того, больные были распределены по глубине инвазии опухоли: 0–4 мм – 20 больных, 4,1–8 мм – 20 больных, выше 8 мм – 16 больных. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на срезах с парафиновых блоков первичной опухоли, предназначенных для стандартного

морфологического исследования. Для ИГХ-исследования применяли протокол, опубликованный ранее [12]. Использовали моноклональные мышинные антитела к ALDH1 (клон В-5, Santa Cruz Biotechnology) в разведении 1:1800 и поликлональные кроличьи антитела к CD133 (клон AF5120, Affinity Biosciences) в разведении 1:400. Депарафинизацию и дегидратацию парафиновых срезов выполняли по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-Link Thermo согласно протоколу; окрашивали в автоматическом режиме на иммуноавтостейнере Thermo Scientific 480S. Визуализацию иммуногистохимической реакции выполняли с использованием системы детекции UltraVision Quanto Detection System HRP (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), срезы докрашивали гематоксилином Карazzi. Оценивали процентное содержание и интенсивность окрашивания: 0, 1+ слабое, 2+ умеренное, 3+ сильное. Экспрессию белков ALDH1 и CD133 определяли как положительную, когда окрашивание было выявлено в более 10% (cut-off) опухолевых клеток с интенсивностью 2+ и 3+. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали с применением светового микроскопа «AxioLab.A1» (Германия) при увеличении объектива x200, x400. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 13,0 (StatSoftInc., США). Для оценки нормальности распределения использовали W-критерий Шапиро–Уилка. Сравнение групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U-критерий). Статистически значимыми считали различия при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные результаты представлены в таблицах 1–4 и на рисунках 1, 2. В результате проведенного ИГХ-исследования первичной опухолевой ткани вульвы было выявлено, что максимальное количество клеток, окрашенных маркером ALDH1 (40%), встречалось у пациентов с II стадией заболевания, минимальное (1%) – у рецидивных больных. Примеры положительной экспрессии с разной интенсивностью окраски и ее отсутствием показаны на рисунке 1.

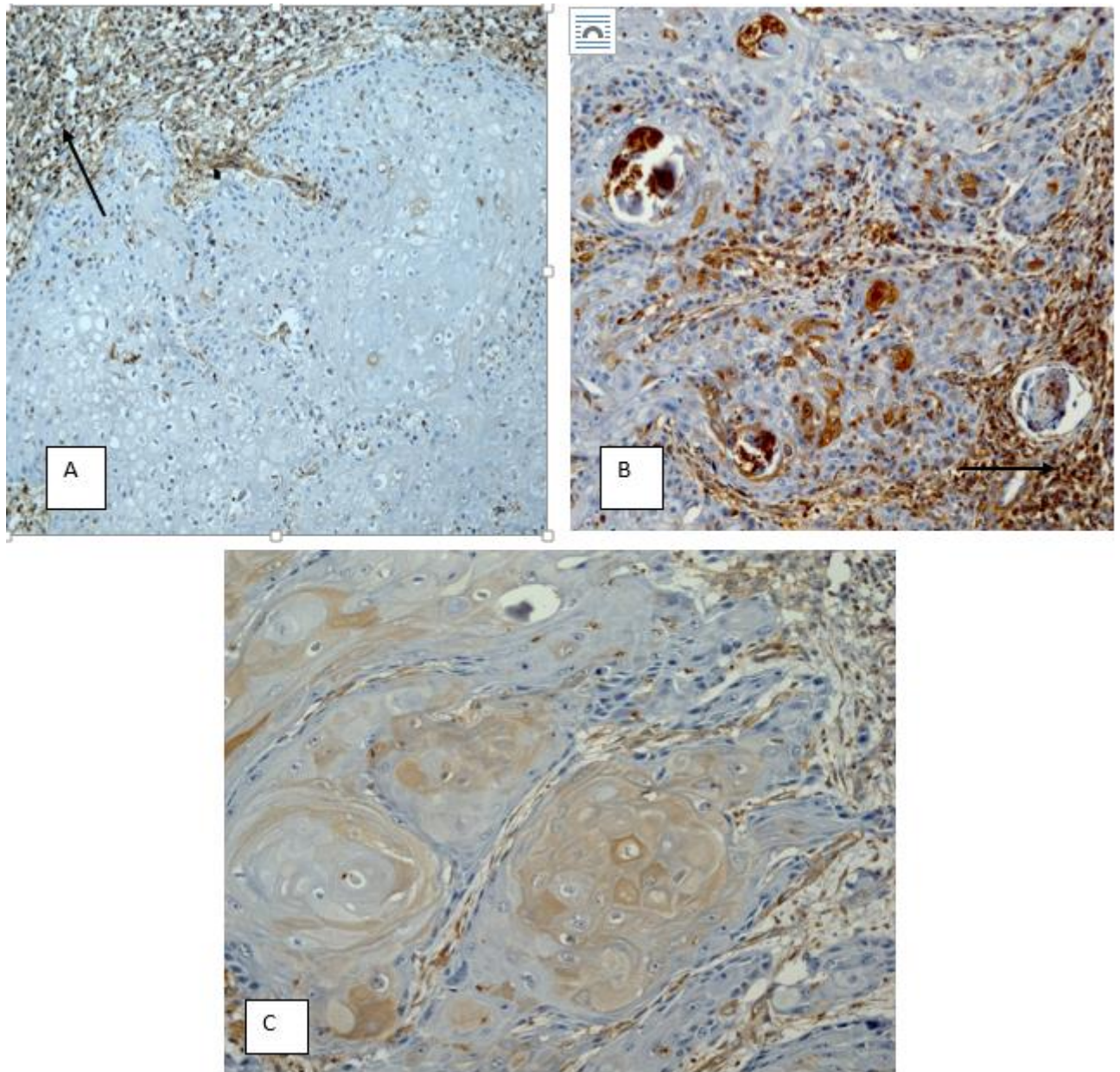


Рис. 1. Экспрессия ALDH1 в опухолевых клетках. А – отсутствие экспрессии в опухолевых клетках. x200. В – высокая степень интенсивности окрашивания – 3+. x200. Стрелкой отмечены клетки стромы с положительной экспрессией маркера. С – низкая степень интенсивности окрашивания – 1+. x200

Разброс количества окрашенных клеток в опухоли у больных с I стадией был незначительным (от 15% до 25%); у больных с II стадией встречались как минимальные (5%), так и максимальные (40%) значения, в большинстве случаев составляя 15–18%; у рецидивных больных также наблюдались низкие и высокие значения экспрессии ALDH1, в большинстве случаев 10–13% (табл. 1).

Уровень экспрессии ALDH1 в опухолях больных с различной стадией первичных опухолей и с рецидивами

Уровень экспрессии %	Группы больных					
	I стадия (n=20)		II стадия (n=26)		Рецидивы (n=10)	
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3
ALDH1	20	10-30	15	5-40	11,5	1-30
p	p=0,189					
			p=0,133			
	*p=0,023					

Примечание: * – отличия показателей статистически значимы между группами больных с I стадией и с рецидивами (p<0,05).

Преобладание у больных с I стадией положительно окрашенных опухолевых клеток антителами к ALDH1 было статистически значимо выше по сравнению с рецидивными больными (в 1,7 раза; p=0,023). Между пациентками с I и II стадиями, со II стадией и рецидивами отличия оказались небольшими (в 1,3 раза) и статистически не значимыми (p>0,05).

При сопоставлении опухолей с различной глубиной инвазии преобладание в опухолях ALDH1+ клеток наблюдалось при ее минимальном значении (от 0 до 4 мм) по сравнению с более глубокой инвазией (табл. 2).

Таблица 2

Уровень экспрессии ALDH1 в опухолях больных с различной глубиной инвазии

Уровень экспрессии %	Глубина инвазии					
	0-4 мм (n=20)		4,1-8 мм (n=20)		>8 мм (n=16)	
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3
ALDH1	20	13-30	10	1-20	15	10-40
p	*p=0,003					
			p=0,460			
	p=0,200					

Примечание: * – отличия показателей статистически значимы между группами больных с глубиной инвазии 0-4 мм и 4,1-8 мм (p<0,05).

Так, выявлено статистически значимое превышение в 2 раза (p=0,003) содержания ALDH1+ клеток в опухолях больных с глубиной инвазии от 0 до 4 мм по сравнению с больными, имеющими глубину инвазии от 4,1 до 8 мм. При сравнении групп больных, имеющих опухоли с другими параметрами глубины инвазии, статистически значимых различий обнаружить не удалось (p>0,05). Таким образом, нами была выявлена более высокая экспрессия ALDH1 в опухолевых клетках больных с минимально выраженным процессом.

В результате проведенного ИГХ-окрашивания антителами к CD133 максимальное количество опухолевых клеток (до 80%) было отмечено в рецидивных опухолях, минимальное

(25%) – в первичных опухолях II стадии. Примеры положительной экспрессии с разной интенсивностью окраски показаны на рисунке 2.

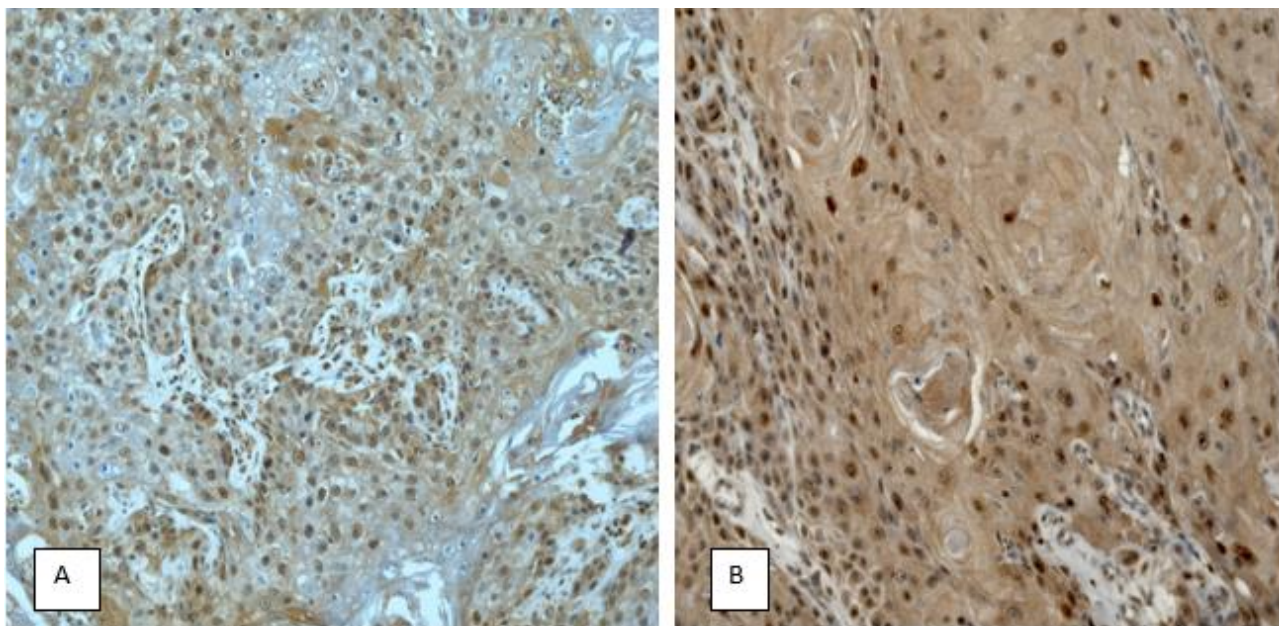


Рис. 2. Экспрессия CD 133 в опухолевых клетках. А – умеренная степень интенсивности окрашивания – 2+. x200. В – высокая степень интенсивности окрашивания – 3+. x200

Разброс количества окрашенных клеток в опухоли у больных с I стадией был небольшим (40–45%); у больных с II стадией, как и при окрашивании антителами к ALDH1, встречались как низкие (25%), так и высокие (до 75%) значения, в большинстве случаев составляя 45–60%; в рецидивных опухолях наблюдалось достаточно однородное распределение клеток, но с высокими значениями (65–80%) (табл. 3).

Таблица 3

Уровень экспрессии CD133 в опухолях больных с различной стадией первичных опухолей и с рецидивами

Уровень экспрессии %	Группы больных					
	I стадия (n=20)		II стадия (n=26)		Рецидивы (n=10)	
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3
CD133	45	35–60	60	25–70	72,5	55–80
p	p=0,126					
					**p=0,042	
	*p=0,012					

Примечание: * – отличия показателей статистически значимы между группами больных с I стадией и с рецидивами (p<0,05), ** – отличия показателей статистически значимы между группами больных с II стадией и с рецидивами (p<0,05) .

Выявлено статистически значимое преобладание экспрессии CD133 в опухолях у рецидивных больных: в 1,6 раза (p=0,012) по сравнению с больными, имеющими первичные

опухоли I стадии, и в 1,2 раза ($p=0,042$) по сравнению с больными с II стадией, тогда как между опухолями пациенток с I и II стадиями различия оказались статистически не значимы ($p=0,126$).

При сравнении экспрессии CD133 в опухолях больных с разной глубиной инвазии отмечена тенденция к повышению количества опухолевых клеток, окрашенных антителами к CD133, по мере ее нарастания (табл. 4).

Таблица 4

Уровень экспрессии CD133 в опухолях больных с различной глубиной инвазии

Уровень экспрессии %	Глубина инвазии					
	0–4 мм (n=20)		4,1–8 мм (n=20)		>8 мм (n=16)	
	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3	Me	Q1–Q3
CD133	47,5	25–65	65	45–65	65	45–80
p	* $p=0,015$					
				p=1,00		
	** $p=0,004$					

Примечание: * – отличия показателей статистически значимы между группами больных с глубиной инвазии 0–4 мм и 4,1–8 мм ($p<0,05$), ** – отличия показателей статистически значимы между группами больных с глубиной инвазии 0–4 мм и >8 мм ($p<0,05$).

Как видно из таблицы 4, выявлено статистически значимое преобладание в 1,4 раза ($p=0,015$) количества CD133+ клеток в опухолях больных с глубиной инвазии от 4,1 до 8 мм и в 1,4 раза ($p=0,004$) с глубиной инвазии более 8 мм по сравнению с больными, имеющими опухоли с минимальной инвазией (0–4 мм). Между опухолями пациенток с глубиной инвазии от 4,1 до 8 мм и более 8 мм статистически значимых различий обнаружить не удалось ($p=1,00$).

Таким образом, маркер CD133 проявил классические свойства маркера ОСК, тогда как значение ALDH1 в качестве такого маркера остается неопределенным. В литературе высказывается предположение о том, что разноречивость значения ALDH1 может быть связана как с особенностями самих опухолей, так и с разными методическими подходами к их исследованию [13]. В том же обзоре, опубликованном в 2020 г., где суммированы многочисленные данные о роли ALDH1 при гинекологических раках, сообщается о единственном исследовании по изучению роли ALDH1 при раке вульвы. Эта работа опубликована в 2014 г. и характеризует ALDH1 как фактор положительного прогноза рака вульвы; по данным авторов, полученных на 154 больных, его экспрессия ассоциируется с более высокой выживаемостью [14], в отличие от ряда других раков, при которых этот маркер описывается как прогностически негативный. При этом, в отличие от полученных нами данных, авторами не было установлено статистически значимых различий между экспрессией ALDH1 и стадией, глубиной инвазии, степенью дифференцировки опухоли, ее инвазией в сосуды и другими клинико-патологическими характеристиками больных, кроме выживаемости больных, которая была выше при исходно высокой экспрессии ALDH1.

Разноречивые данные о прогностической значимости ALDH1 в качестве маркера ОСК, а также то, что его экспрессия связана и с другими клетками (стромальными, неопухолевыми стволовыми и др.), требует дальнейших исследований и дифференцированного подхода к оценке его значимости при различных опухолях. В частности, при раке вульвы его экспрессия играет скорее позитивную прогностическую роль, в отличие от негативной роли CD133, как описанной в литературе, так и полученной нами. В работе Ch. Napolitano и соавт. отмечена корреляция экспрессии маркера CD133 с молодым возрастом больных раком вульвы на момент постановки диагноза, с метастазированием опухоли в лимфатические узлы, с большим размером опухоли, а также с высокой инфильтрацией FOXP3⁺ Т-клетками (Т-regs); при этом не установлено взаимосвязи уровня CD133⁺ клеток с общей и бессобытийной выживаемостью больных, тогда как нами выявлено нарастание экспрессии CD133 при рецидивных опухолях и опухолях с глубокой инвазией, что может служить прогностическим фактором [11].

Заключение. На материале опухолей больных первичным с различной стадией и глубиной инвазии, а также рецидивным раком вульвы показан ряд различий экспрессии ALDH1 и CD133. Эти различия носили разнонаправленный характер: если ALDH1 был лучше экспрессирован при более низкой инвазии и опухолях I стадии по сравнению с рецидивными, то экспрессия CD133 была выше при более распространенных и агрессивных опухолях, т.е. первичных с более глубокой инвазией, а также при рецидивных. Оба исследованных маркера, по-видимому, могут служить факторами прогноза: CD133 – негативного, ALDH1 – положительного, однако принадлежность последнего к ОСК при раке вульвы остается под вопросом.

Список литературы

1. Trietsch M.D., Nooij L.S, Gaarenstroom K.N., Evan M.I. Poelgeest Genetic and epigenetic changes in vulvar squamous cell carcinoma and its precursor lesions: a review of the current literature. *Gynecol Oncol.* 2015. vol. 136. no. 1. P.143-57. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.11.002.
2. Zięba S., Pouwer A.W., Kowalik A., Zalewski K., Rusetska N., Bakuła-Zalewska E., Kopczyński J., Pijnenborg J.M.A., Hullu J.A., Kowalewska M. Somatic Mutation Profiling in Premalignant Lesions of Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. vol. 21. no. 14. P. 4880. DOI: 10.3390/ijms21144880.
3. Cohen P.A., Anderson L., Eva L., Scurry J. Clinical and molecular classification of vulvar squamous pre-cancers. *Int J. Gynecol Cancer.* 2019. vol. 29. no. 4. P. 821-828. DOI: 10.1136/ijgc-2018-000135.
4. Toledo-Guzmán M., Bigoni-Ordóñez G., Hernández M., Ortiz-Sánchez E. Cancer stem cell

impact on clinical oncology. *World J. Stem Cells*. 2018. vol. 10. no. 12. P. 183-195. DOI: 10.4252/wjsc.v10.i12.183.

5. Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А., Геворкян Ю.А., Сагакянц А.Б., Тимошкина Н.Н., Каймакчи О.Ю., Каймакчи Д.О., Толмах Р.Е., Дашков А.В., Колесников В.Е., Милакин А.Г., Полуэктов С.И. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы // *Южно-Российский онкологический журнал*. 2021. № 2 (2). С. 50-56. DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-2-6.

6. Ortiz R.C., Lopes N.M., Amôr N.G., Ponce J.B., Schmerling C.K., Lara V.S., Moyses R.A., Rodini C.O. CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol Med*. 2018. vol. 47. no. 8. P. 740-747. DOI: 10.1111/jop.12734.

7. Yang L., Ren Y., Yu X. ALDH1A1 defines invasive cancer stem-like cells and predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2014. vol. 27. P. 775-783. DOI: 10.1038/modpathol.2013.189.

8. Mansour S.F., Atwa M.M. Clinicopathological Significance of CD133 and ALDH1 Cancer Stem Cell Marker Expression in Invasive Ductal Breast Carcinoma. *Asian Pac J. Cancer Prev*. 2015. vol. 16. P. 7491-7496.

9. Silva I.A., Bai S., McLean K., Yang K., Griffith K., Thomas D., Ginestier C., Johnston C., Kueck A., Reynolds R.K. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Res*. 2011. vol. 71. P. 3991-4001.

10. Roudi R., Korourian A., Shariftabrizi A., Madjd Z. Differential Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1 and CD133 in Various Lung Cancer Subtypes. *Cancer Invest*. 2015. vol. 33. P. 294-302.

11. Napoletano Ch., Bellati F., Ruscito I., Pernice M., Zizzari I.G., Caponnetto S., Tomao F., Frigerio L., Liberati M., Rughetti A., Caserta D., Panici P.B., Nuti M. Immunological and Clinical Impact of Cancer Stem Cells in Vulvar Cancer: Role of CD133/CD24/ABCG2-Expressing Cells. *Anticancer*. 2016. vol. 36. no. 10. P. 5109-5116. DOI: 10.21873/anticancer.11080.

12. Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А., Владимирова Л.Ю., Ульянова Е.П., Комова Е.А., Кечеджиева Э.Э. Экспрессия P53 и Bcl2 при различных подтипах рака молочной железы // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10 (1). С. 85-88.

13. Muralikrishnan V., Hurley T.D., Nephew K.P. Targeting Aldehyde Dehydrogenases to Eliminate Cancer Stem Cells in Gynecologic Malignancies. *Cancers*. 2020. vol. 12. no. 4. P. 961. DOI: 10.3390/cancers12040961.

14. Wu Q., Shi H., Holm R., Li X., Trope C., Nesland J.M., Suo Zh. Aldehyde Dehydrogenase-1 Predicts Favorable Prognosis in Patients with Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research*.

