

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КОЭКСПРЕССИИ ЦИТОКЕРАТИНОВ И МАРКЕРА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВИМЕНТИНА В ТКАНИ СЕРОЗНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Т.А. Богуш¹, А.А. Арефьева^{1,2}, С.А. Калюжный¹, Е.А. Богуш¹,
С.А. Тюляндин¹, Б.Е. Полоцкий¹, М.М. Давыдов¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские Горы, 1

Контакты: Анастасия Алексеевна Арефьева labmedchem@mail.ru

Введение. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — фактор, связанный с метастатическим потенциалом опухолевых клеток. Отличительным признаком данной трансформации является, в частности, экспрессия несвойственного для эпителиальных клеток белка мезенхимальных клеток — виментина. Данные об уровне ЭМП и клинической значимости маркера в прогнозе опухолей различных локализаций, в том числе рака яичников, неоднозначны.

Цель исследования — характеристика ЭМП в ткани рака яичников на основании количественной оценки уровня коэкспрессии эпителиальных цитокератинов и маркера мезенхимальных клеток виментина.

Материалы и методы. Количественная оценка уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина проведена при последовательном (двойном) иммунофлуоресцентном окрашивании клеток, полученных из 58 хирургических образцов серозного рака яичников III стадии, с использованием проточной цитофлуориметрии.

Результаты. В настоящем исследовании разработан и использован оригинальный метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, позволяющий количественно оценить уровень ЭМП по показателю коэкспрессии в эпителиальных клетках цитокератинов и виментина. Эпителиальные клетки, коэкспрессирующие эти маркеры, выявлены в 100 % исследованных опухолей при индивидуальных различиях показателя от 10 до 86 %. Средний уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина в подгруппах с уровнем показателя выше и ниже медианы, равной 42 %, различался значительно и составил соответственно $28,5 \pm 7,5$ и $56,3 \pm 11,8$ % ($p = 0,02$).

Заключение. Серозный рак яичников III стадии представляет молекулярно неоднородную группу злокачественных новообразований с принципиальными отличиями в уровне экспрессии фенотипа ЭМП в опухолях разных больных. В половине случаев заболевание характеризуется высоким метастатическим потенциалом опухолевых клеток. Выявление клеток, коэкспрессирующих цитокератин и виментин, во всех исследованных опухолях указывает на значимость этой молекулярной характеристики в патогенезе рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников, эпителиально-мезенхимальный переход, виментин, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-29-33

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF COEXPRESSION OF CYTOKERATINS AND MESENCHYMAL CELLS MARKER VIMENTIN IN SEROUS OVARIAN CANCER

T.A. Bogush¹, A.A. Arefieva^{1,2}, S.A. Kaliuzhny¹, E.A. Bogush¹, S.A. Tjulandin¹, B.E. Polotsky¹, M.M. Davydov¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a factor related to metastatic potential of tumor cells. The most distinguishing feature of this transformation is expression of protein vimentin, which is not common for epithelial cells. Data of EMT level and clinical significance of the marker is ambiguous in prognosis of tumor different localization including ovarian cancer.

Objective is characterization of EMT in ovarian cancer tissue based on quantitative analysis of co-expression level of epithelial cytokeratins and mesenchymal cells marker vimentin.

Materials and methods. A quantitative assessment of co-expression level of cytokeratins and vimentin was performed by double immunofluorescence staining method (58 surgery specimens of ovarian cancer stage III), associated with flow cytometry.

Results. Double immunofluorescence staining method, developed and used in the current study, was used for quantitative assessment of EMT level based on value of cytokeratin and vimentin co-expression in epithelial cells. Epithelial cells co-expressed these markers, were detected in 100 % tumor investigated with individual value differences from 10 to 86 %. Average co-expression level of cytokeratins and vimentin in subgroups with high and low level value related to median 42 % significantly varied and were $28,5 \pm 7,5$ and $56,3 \pm 11,8$ % ($p = 0,02$) respectively.

Conclusions. *Serous ovarian cancer is molecular heterogeneous group with principal differences in level of EMT tumor phenotype between various patients. In half of the cases the disease is characterized by high metastatic potential of tumor cells. Co-expression of cytokeratins and vimentin in all the tumors investigated is evidenced clinical significance of this molecular characteristic in ovarian cancer pathogenesis.*

Key words: *ovarian cancer, epithelial-mesenchymal transition, vimentin, flow cytometry*

Введение

В патогенез эпителиальных солидных опухолей различных локализаций, в том числе серозного рака яичников, вовлечен процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в результате которого эпителиальные клетки утрачивают присущие им свойства (межклеточную адгезию и апикально-базальную полярность) и приобретают особенности мезенхимальных клеток (веретеновидную форму, подвижность) [1]. Данная трансформация является фактором, связанным с метастатическим потенциалом опухолевых клеток и повышающим, таким образом, агрессивность течения заболевания. Отличительные признаки ЭМП — утрата специфических для эпителиальных клеток белков и появление неспецифического маркера — белка виментина, экспрессия которого характерна для тканей, происходящих из мезенхимных клеток.

В настоящее время процесс ЭМП в ткани рака яичников хорошо изучен на культурах клеток *in vitro*. В публикациях последних лет показано, что такая трансформация выявляется также и в опухолевой ткани больных раком яичников [2, 3]. Однако данные о прогностической значимости уровня ЭМП в опухоли, в частности при использовании в качестве маркера показателей экспрессии специфического мезенхимального белка виментина, в настоящее время неоднозначны. В ряде работ обнаружена корреляция с клинически значимыми параметрами, характеризующими агрессивность течения болезни [4, 5], в других исследованиях такая зависимость не выявлена [6].

С учетом неопределенности в оценке клинической значимости уровня ЭМП и в выборе его оптимального маркера в настоящем исследовании проведена оценка этой важнейшей характеристики ткани рака яичников на основании количественного показателя уровня коэкспрессии мезенхимального белка виментина в клетках, экспрессирующих эпителиальные цитокератины.

Материалы и методы

Работа проведена на клетках первичного серозного рака яичников III стадии, полученных из хирургических биопсийных образцов опухоли 58 больных. Возраст пациенток составил 34–72 ($54,0 \pm 9,1$) года.

Проведен количественный иммунофлуоресцентный анализ, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией, с использованием разработанной ранее методики [7]. Одноклеточные суспензии клеток рака яичников инкубировали последовательно с моноклональными антителами к цитокератинам 5, 6, 8, 17 и 19 (клон MNF116), затем 1 ч с антителами к виментину (клон SP20) в конечном разведении 1:200 для каждого из антител, далее в течение 1,5 ч с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями DyLight488 (ab96 899) и DyLight650 (ab96 899) в конечном разведении 1:120 и 1:1000 соответственно. Для исключения из анализа клеточных обломков и эритроцитов после окрашивания вторичными антителами клетки инкубировали с красителем ДНК Hoechst 33 258 в течение 15 мин в концентрации 1,2 мкг/мл.

Уровень коэкспрессии виментина и цитокератинов определяли как отношение (%) количества клеток, коэкспрессирующих оба маркера, к общему количеству опухолевых клеток, экспрессирующих цитокератины. Высокий и низкий уровни коэкспрессии маркеров оценивали относительно (соответственно выше и ниже) медианы показателя, рассчитанного для всей группы исследованных образцов опухолей.

Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Количество окрашенных клеток рассчитывали в программе FlowJo 10.0 с помощью метода Колмогорова–Смирнова. Точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции визуализировали с применением программы WinMDI 2.9. Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Оценку статистической значимости различий между 2 выборками выполняли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни, нормальность распределения — с использованием критерия Шапиро–Уилка.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования был разработан методический подход, который позволил провести оценку уровня ЭМП по количеству эпителиальных клеток с экспрессией специфических цитокератинов, коэкспрессирующих мезенхимальный маркер вимен-

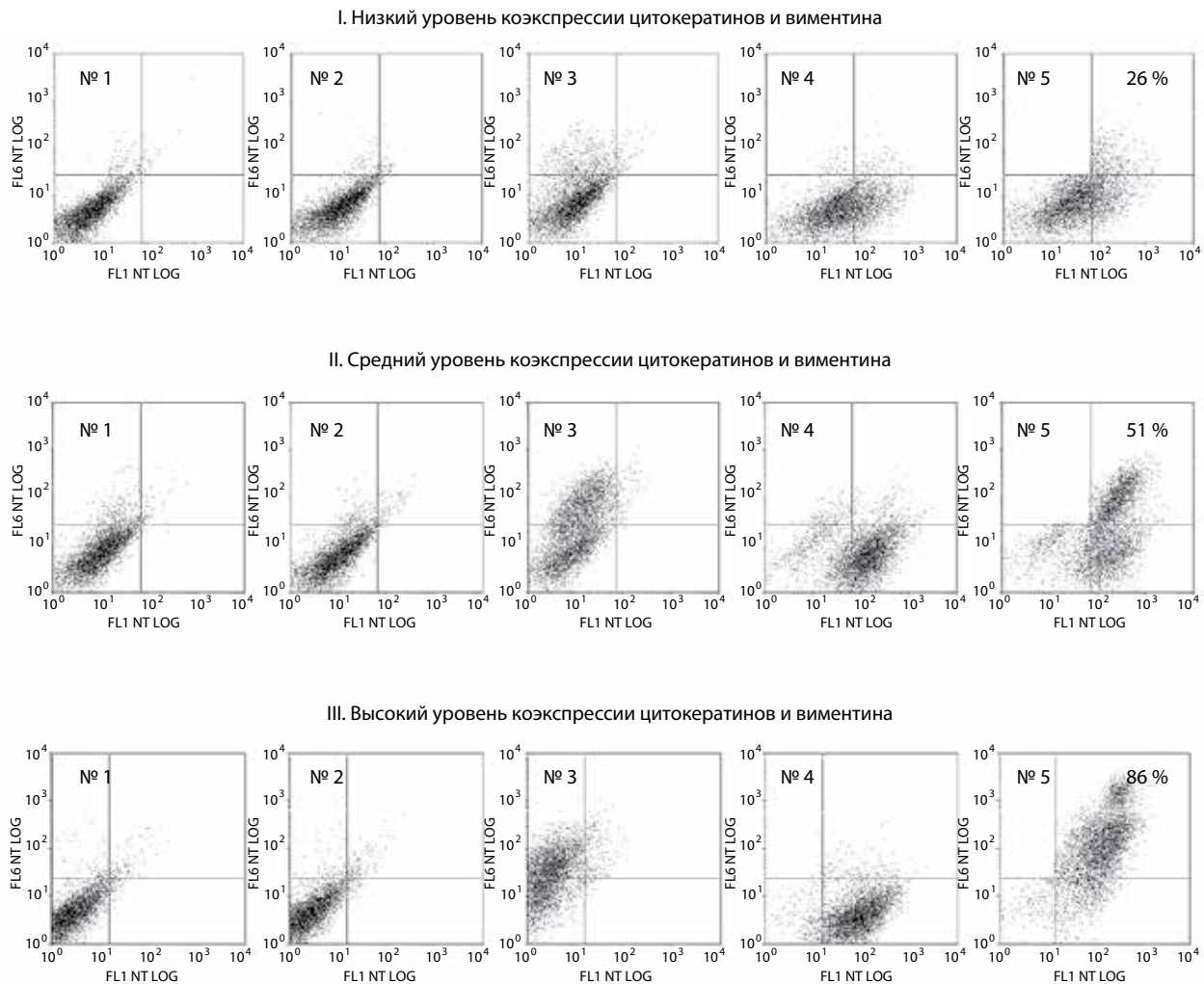


Рис. 1. Результаты последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к виментину и цитокератинам (двойное флуоресцентное окрашивание). По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в канале FL-1 для цитокератинов. По оси ординат — интенсивность флуоресценции в канале FL-6 для виментина. Представлены точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: № 1 — автофлуоресценция (левый нижний квадрант); № 2 — инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (левый нижний квадрант); № 3 — клетки, экспрессирующие виментин (левый верхний квадрант); № 4 — клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант); № 5 — клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант) и коэкспрессирующие цитокератины и виментин (правый верхний квадрант)

тин. Примеры точечных диаграмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре представлены на рис. 1. Во всех случаях диаграммы № 1 демонстрируют автофлуоресценцию исследуемых клеток, которая может различаться в разных опухолях (левый нижний квадрант). Диаграммы № 2 показывают изменение исходной автофлуоресценции клеток после их инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем, в результате неспецифических взаимодействий вторичных антител с клетками (левый нижний квадрант). Этот анализ проводят для дальнейшей точной диспозиции областей размещения клеток, специфически окрашенных антителами к виментину (левый верхний квадрант, диаграммы № 3)

или к цитокератинам (правый нижний квадрант, диаграммы № 4). При последовательном окрашивании этими антителами клеток одной и той же клеточной суспензии (двойное флуоресцентное окрашивание, диаграммы № 5) в правом нижнем квадранте по-прежнему локализуются эпителиальные цитокератинположительные клетки, а в верхнем левом — виментинположительные, при этом в правом верхнем квадранте локализуются эпителиальные цитокератинположительные клетки, коэкспрессирующие виментин. Их доля в общем количестве эпителиальных клеток, включенных в анализ, характеризует уровень ЭМП в исследуемой опухоли.

Данные, представленные на рис. 1, демонстрируют примеры опухолей, различающихся по уровню

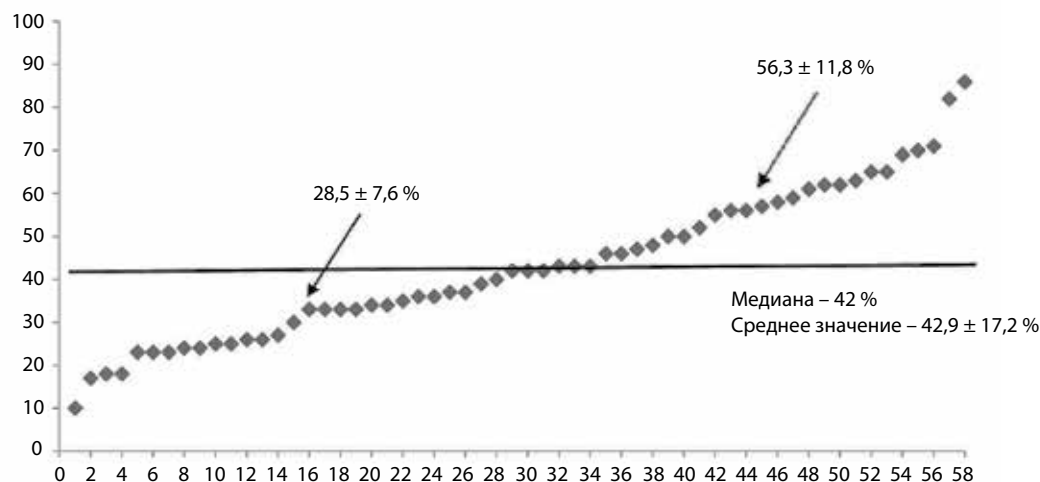


Рис. 2. Уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина в клетках серозного рака яичников. По оси абсцисс — номера образцов опухолей, включенных в анализ, которые ранжированы от минимального до максимального значения уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина (%). По оси ординат — уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина (%). Сплошная горизонтальная линия — медиана показателя; цифры на рисунке — средние значения показателя \pm стандартное отклонение в группах опухолей ниже и выше медианы

ЭМП. Это опухоли с низким (26 %), средним (51 %) и высоким (86 %) уровнями коэкспрессии цитокератинов и виментина.

Результаты анализа точечных диаграмм, полученных при двойном окрашивании антителами к цитокератинам и виментину опухолевых клеток, полученных из 58 образцов рака яичников, представлены на рис. 2. Количественные показатели уровня коэкспрессии маркеров ранжированы от минимального к максимальному значению.

Необходимо отметить, что эпителиальные клетки, коэкспрессирующие цитокератины и виментин, выявлены во всех исследованных образцах опухолей, однако по индивидуальным показателям уровня коэкспрессии маркеров опухоли различались значительно — от 10 до 86 %. Этот факт подтверждается рассчитанным коэффициентом вариации показателя, который равен 40 % (выборка рассматривается как неоднородная, если коэффициент вариации ≥ 33 %). При анализе результатов с помощью критерия Шапиро–Уилка продемонстрировано, что распределение показателей уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина, т.е. уровня ЭМП, в исследованной когорте опухолей соответствовало нормальному, при этом медиана значений показателя составила 42 % (горизонтальная сплошная линия на рис. 2). Среднее значение уровня ЭМП ожидалось близким и составило $42,9 \pm 17,2$ %.

Согласно современным представлениям в клинических исследованиях низкий и высокий уровни экспрессии того или иного молекулярного маркера определяют относительно медианы показателя. В данном случае границей явилась медиана уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина, равная

42 %. Индивидуальные различия показателя внутри подгрупп ниже и выше медианы были существенными: от 10 до 42 % и от 42 до 86 % соответственно. Средний уровень коэкспрессии маркеров в этих подгруппах различался значительно (в 2 раза) и составил соответственно $28,5 \pm 7,5$ и $56,3 \pm 11,8$ % ($p = 0,02$). Иными словами, серозный рак яичников представляет молекулярно неоднородную группу злокачественных новообразований с принципиальными отличиями фенотипа метастатического потенциала опухолей у разных больных.

Заключение

При использовании разработанного авторами иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, который позволяет проведение количественной оценки коэкспрессии мезенхимального белка виментина в эпителиальных клетках, экспрессирующих цитокератины, получены следующие результаты.

Фенотип ЭМП обнаружен во всех исследованных образцах рака яичников, при этом его уровень различался значительно, варьировал от 10 (близко к значению чувствительности метода) до 86 %.

Согласно выявленному показателю медианы уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина высокий (≥ 42 %) уровень ЭМП отмечен в 52 % исследованных случаев рака яичников. Другими словами, в половине случаев в III стадии заболевания серозный рак яичников характеризуется высоким метастатическим потенциалом. Более того, тот факт, что клетки, коэкспрессирующие цитокератины и виментин, были обнаружены во всех исследованных образцах опухолей, указывает на патогенетическую

значимость этой характеристики серозного рака яичника.

С учетом проспективного характера проведенного исследования считаем чрезвычайно важным выполнение дальнейшего анализа корреляции выявленных количественных показателей ЭМП

с продолжительностью безрецидивного течения рака яичников после завершения 1-й линии стандартной химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов. Всем пациенткам, которые вошли в настоящее исследование, проведено такое лечение.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 15-04-06 991-а, 16-34-01 049-мол-а).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kenda Suster N., Smrkolj S., Virant-Klun I. Putative stem cells and epithelial-mesenchymal transition revealed in sections of ovarian tumor in patients with serous ovarian carcinoma using immunohistochemistry for vimentin and pluripotency-related markers. *J Ovarian Res* 2017;10(1):11. DOI: 10.1186/s13048-017-0306-7. PMID: 28231820.
2. Despierre E., Vergote I., Anderson R. et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) pathway biomarkers in the randomized phase III trial of Erlotinib versus observation in ovarian cancer patients with No evidence of disease progression after first-line platinum-based chemotherapy. *Target Oncol* 2015;10(4):583–96. DOI: 10.1007/s11523-015-0369-6. PMID: 26004768.
3. Li X., Yang J., Wang X. et al. Role of TWIST2, E-cadherin and Vimentin in epithelial ovarian carcinogenesis and prognosis and their interaction in cancer progression. *Eur J Gynaecol Oncol* 2016;37(1):100–8. PMID: 27048119.
4. Davidson B., Holth A., Hellesylt E. et al. The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Hum Pathol* 2015;46(1):1–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.004. PMID: 25455994.
5. Wu D.I., Liu L., Ren C. et al. Epithelial-mesenchymal interconversions and the regulatory function of the ZEB family during the development and progression of ovarian cancer. *Oncol Lett* 2016;11(2):1463–8. PMID: 26893761.
6. Vos M.C., Hollemans E., Ezendam N. et al. MMP-14 and CD44 in Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2016;9(1):53. DOI: 10.1186/s13048-016-0262-7. PMID: 27590006.
7. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета* 2011;52(4):305–12.