

УДК 618.11-006.6-079:576.3.088

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АСЦИТНЫХ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ, ВЫЯВЛЯЕМЫЕ ПРИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОМ АНАЛИЗЕ С ПРИВЛЕЧЕНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Т.А. Богущ*, С.А. Калужный, Е.А. Дудко, В.Ю. Кирсанов, А.С. Тюляндина,
Е.А. Богущ, С.А. Тюляндин, М.М. Давыдов

*(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; *e-mail: labmedchem@mail.ru)*

Диссеминация по брюшине и рост опухолевых клеток в асцитической жидкости при рецидиве рака яичников III и IV стадий – трудно поддающийся лечению этап болезни, при котором отмечается устойчивость ко многим противоопухолевым препаратам, применяющимся при терапии солидной формы рака яичников. Для проверки правильности авторской гипотезы о том, что одной из причин этого могут быть отличия молекулярного фенотипа опухолевых клеток при разных формах заболевания, в клетках солидной и асцитной форм рака яичников проведена сравнительная оценка экспрессии и коэкспрессии ряда молекулярных маркеров (иммунофлуоресцентный анализ, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией). Показано, что в отличие от солидной формы, клетки асцитного рака яичников помимо маркера эпителиальных клеток цитокератина презентуют общий лейкоцитарный антиген CD45 и маркер мезенхимальных клеток виментин. Следовательно, наряду с ингибированием анойкиса (специфический механизм смерти эпителиальных клеток в жидкой среде при отсутствии контакта с субстратом), клетки асцитного рака яичников характеризуют: 1) эмбриополез (внутриклеточная миграция лейкоцитов без повреждения опухолевой клетки); 2) фенотип эпителиально-мезенхимального перехода. Таким образом, впервые получены данные о клинически значимых молекулярных отличиях солидного и рецидивного асцитного рака яичников, что открывает возможности для противоопухолевой терапии, которая ранее не использовалась при лечении рака яичников.

Ключевые слова: асцитная и солидная форма рака яичников, опухолевые маркеры, цитокератин, CD45, виментин, проточная цитофлуориметрия.

Асцит является характерным симптомом рака яичников, сопровождающим течение данного заболевания с момента возникновения. Диссеминация по брюшине и рост опухолевых клеток в асцитической жидкости при рецидиве рака яичников III и IV стадий – трудно поддающийся лечению этап болезни, при котором отмечается устойчивость ко многим противоопухолевым препаратам, применяющимся при терапии солидной формы рака яичников. В этом случае недостаточно эффективна и внутрибрюшинная терапия заболевания, хотя безусловный прогресс отмечен в ряде исследований [1]. Поэтому разработка новых, патогенетически обоснованных подходов к терапии асцитных форм рака яичников является важнейшей задачей.

Анализ клинических результатов лечения этого заболевания позволяет предположить, что клетки рецидивного асцитного рака яичников на поздних стадиях заболевания могут иметь молекулярный фенотип, отличный от первичного солидного но-

вообразования. Это открывает возможности для противоопухолевой терапии, которая ранее не использовалась при лечении рака яичников. Если это так, то по молекулярной характеристике клетки солидной и рецидивной асцитной форм рака яичников должны отличаться принципиально не только на количественном уровне экспрессии молекулярных маркеров «больше–меньше», но и качественно – «есть–нет».

В настоящем исследовании для проверки правильности сформулированной гипотезы проведена сравнительная оценка молекулярной характеристики солидной и асцитной форм серозного рака яичников III стадии с использованием иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией.

Материалы и методы

Работа проведена на опухолевых клетках рака яичников, полученных из хирургических

биопсийных образцов и асцитической жидкости при диссеминации процесса по брюшной полости. Суммарно исследованы 14 опухолевых образцов больных серозным раком яичников III стадии. Оценка параметров экспрессии молекулярных маркеров проведена с использованием ранее разработанного количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией [2, 3].

Для получения одноклеточной суспензии хирургические образцы рака яичников, зафиксированные в 4%-м растворе формальдегида, тщательно измельчали и инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин. К измельченному образцу опухоли добавляли раствор фосфатного буфера (рН 7,4), гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе пятикратным движением пестика и фильтровали через фильтры «BD Falcon» («Becton, Dickinson and Company») диаметром 40 мкм. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (рН 7,4).

Асцитическую жидкость центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в фосфатном буферном растворе (рН 7,4) и фиксировали в 4%-м растворе формальдегида. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и доводили фосфатным буферным раствором (рН 7,4) до концентрации 200–400 тыс. клеток в 1 мл.

После получения одноклеточных суспензий клетки инкубировали в течение 1,5 ч с первичными моноклональными антителами, специфичными к CD45 (меченные флуоресцентным красителем APC, клон HI30, «Biolegend», США), к общему цитокератину (клон AE1/AE3, «DAKO», США) или к виментину (клон SP20, «BIOCARE», США) в конечном разведении 1:200 для каждого антитела. Далее в течение 1,5 ч проводили инкубацию с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями DyLight650 (ab98510, «Abcam», Великобритания) или DyLight488 (ab98637, «Abcam», Великобритания) в конечном разведении 1:1000 и 1:120 соответственно. Для выведения из анализа дегриса и эритроцитов после завершения инкубации с вторичными антителами клетки инкубировали в течение 15 мин со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1,2 мкг/мл. Включали в анализ только клетки с окрашенными ядрами, исключая клеточные конгломераты путем дополнительного гейтирования.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре «Navios» («Beckman

Coulter», США). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 405, 488 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей Hoechst 33258 и DyLight488 проводили в каналах FL-9, FL-1 соответственно, а для DyLight650 и APC использовали канал FL-6. Использовали средний показатель скорости подсчета анализируемых клеток; число анализируемых событий составило 5000. Точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре получали с помощью программы WinMDI 2.9, количество специфически флуоресцирующих клеток рассчитывали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8 («FlowJo LLC», США).

Результаты и их обсуждение

Побудительным мотивом для исследования экспрессии в эпителиальных клетках асцитного рака яичников молекулярного маркера лейкоцитов (антигена CD45) [4] явился трудно объяснимый, но многократно воспроизводимый феномен. При попытке выделить из асцитической жидкости «чистую» фракцию клеток рака яичников путем гейтирования и удаления из анализа лейкоцитов сумма клеток, иммунофлуоресцентно окрашенных специфическими антителами к цитокератину [5] и CD45, существенно превышала число клеток, взятых в анализ (таблица). Превышение было значительным и колебалось от 33 до 75%. Ни в одном из случаев сумма эпителиальных опухолевых клеток, экспрессирующих цитокератин, и клеток, окрашенных CD45, по отношению к числу проанализированных клеток не приближалась к 100%.

Для того чтобы оценить, не является ли этот феномен методической погрешностью, аналогичное исследование провели с суспензиями опухолевых клеток, полученных из хирургических биопсийных образцов солидного рака яичников (таблица). Видно, что полученные результаты отличаются от описанных. В 5 из 7 случаев (71%) сумма эпителиальных опухолевых клеток, экспрессирующих цитокератин и CD45 позитивных клеток, была приблизительно равна числу проанализированных клеток, а в 2 из 7 случаев лишь незначительно (на 20 и 25%) превышала 100%.

Таким образом, выявленный феномен превышения суммы клеток, экспрессирующих цитокератин и CD45, над общим числом исследованных клеток не случаен и отражает некую молекулярную особенность эпителиальных клеток рака яичников в асцитической жидкости. Подтверждение этому

Уровень экспрессии цитокератина (ЦК) и CD45 в клетках асцитного рака яичников

Образец для исследования	Номер образца	Уровень экспрессии маркеров (%)*			
		ЦК	CD45	ЦК + CD45	>100%**
Асцитическая жидкость из брюшной полости	1***	81	94	175	75
	2***	68	89	157	57
	3	76	90	166	66
	4	78	97	175	75
	5	60	89	149	49
	6	58	81	139	39
	7	64	69	133	33
Среднее значение показателей		69,3±9,1	87,0±9,4	156,3±16,8	
Хирургический биопсийный образец солидной опухоли	1***	83	8	91	≈
	2***	78	11	89	≈
	3	62	29	91	≈
	4	88	17	105	≈
	5	76	28	104	≈
	6	90	30	120	20
	7	92	33	125	25
Среднее значение показателей		81,2±9,6	22,2±9,3	103,6±13,4	–
Достоверность различий (p) между показателями		0,04	<0,001	0,002	–

*Уровень экспрессии маркеров – количество специфически окрашенных клеток относительно показателя при инкубации с вторичными антителами; **превышение суммы (%) клеток, экспрессирующих цитокератин и CD45, над общим числом исследованных клеток; ***образцы солидной и асцитной опухоли одной и той же пациентки.

продемонстрировано при иммунофлуоресцентном окрашивании опухолевых клеток, полученных из биопсийного хирургического образца солидной опухоли и из асцитической жидкости (после рецидива болезни) одной и той же пациентки (таблица, образцы 1 и 2). В случае солидной опухоли сумма клеток, экспрессирующих цитокератин и CD45, составила приблизительно 100% (91 и 89%), а в асцитных клетках – 157 и 175% соответственно.

Последнее наблюдение однозначно указывает на то, что при рецидиве рака яичников молекулярная характеристика опухолевых клеток в асцитической жидкости по сравнению с солидным узлом изменяется. Полученные результаты позволили предположить, что это может быть презентация лейкоцитарного антигена CD45 на эпителиальных клетках, экспрессирующих специфический антиген цитокератин. Для проверки этой гипотезы была проведена окраска клеток асцитного рака яичников последовательно двумя специфическими антителами: сначала – к CD45, а затем – к цитокератину (далее – двойная метка). Данные, представленные на рис. 1, демонстрируют точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре. Анализ автофлуоресценции интактных клеток (рис. 1, А, левый нижний квадрант) проведен для точной дис-

позиции областей размещения клеток, окрашенных CD45 или цитокератином, а также при последовательном окрашивании одной и той же клеточной суспензии антителами к CD45, а затем – к цитокератину. На рис. 1, Б (правый верхний квадрант) видна популяция клеток, выявляемая при таком двойном окрашивании. Это клетки, несущие метку вторичных антител, конъюгированных с разными флуорохромами, специфическими по отношению к CD45 или цитокератину. Часть клеток (левый верхний квадрант) несет на себе метку только CD45, и незначительное число клеток остаются неокрашенными (автофлуоресценция, левый нижний квадрант). Клетки, окрашенные только цитокератином (правый нижний квадрант), в исследованной популяции асцитных клеток не определяются.

Таким образом, при диссеминации рака яичников по брюшине в асцитической жидкости рецидивного рака яичников выявляются эпителиальные опухолевые клетки (цитокератин-положительные), несущие лейкоцитарный антиген CD45. Поскольку при двойном окрашивании антителами к CD45 и к цитокератину не выявляются клетки, окрашенные только цитокератином, есть все основания считать, что при рецидиве рака яичников III стадии в асцитической жидкости все опухолевые клетки презентуют на своей поверхности лейкоцитарный антиген CD45.

Побудительным мотивом для выполнения следующего раздела работы послужили данные о том, что процесс метастазирования эпителиальных опухолей ассоциирован с так называемым эпителиально-мезенхимальным переходом, маркером которого является экспрессия в клетках белка виментина [6, 7]. В полной мере это относится и к раку яичников: выявление в солидном опухолевом узле клеток, экспрессирующих виментин, свидетельствует о высоком метастатическом потенциале новообразования [8]. Мы предположили, что поскольку при III и IV стадиях рака яичников после диссеминации рака яичников по брюшине «выход» опухолевых клеток в брюшную полость может рассматриваться как вторичное метастазирование («метастазирование из метастазов»), все или большая часть опухолевых клеток в асцитической жидкости должны экспрессировать виментин.

Для проверки правильности этого предположения проведена иммунофлуоресцентная последовательная окраска клеток рака яичников, полученных из асцитической жидкости, специфическими антителами к цитокератину и виментину. В предварительных экспериментах при раздельном окрашивании клеток этими антителами было показано, что как и в случае параллельного окрашивания цитокератином и CD45, сумма цитокератин- и виментин-позитивных клеток превышает общее число исследованных клеток (данные не приведены). Это наблюдение объективизировано при двойном окрашивании клеток антителами к цитокератину и виментину.

Данные, представленные на рис. 2, демонстрируют точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре. Как и при двойном окрашивании антителами к CD45 и цитокератину (рис. 1, А), оценка автофлуоресценции (рис. 2, А) проведена для точного определения областей размещения клеток, окрашенных цитокератином, виментином или последовательно двумя этими антителами. При таком анализе выявляется популяция клеток, несущих двойную метку вторичных антител, конъюгированных с разными флуорохромами, специфичными по отношению к виментину или цитокератину (рис. 1, Б, правый верхний квадрант). Визуализируются клетки (левый верхний квадрант), окрашенные только виментином, а клетки, экспрессирующие только цитокератин, в исследованной популяции отсутствуют (правый нижний квадрант). Таким образом, в асцитической жидкости все цитокератин-позитивные опухолевые клетки экспрессируют виментин.

Полученные данные показывают, что при рецидиве заболевания клетки рака яичников в асцитической жидкости экспрессируют молекулярные маркеры, принципиально отличающие их от клеток солидного новообразования. Это экспрессия общего лейкоцитарного антигена CD45 и маркера мезенхимальных клеток виментина во всех опухолевых клетках, несущих на себе эпителиальный маркер цитокератин.

При анализе литературных данных в поисковой системе Pub Med нам удалось найти лишь одно

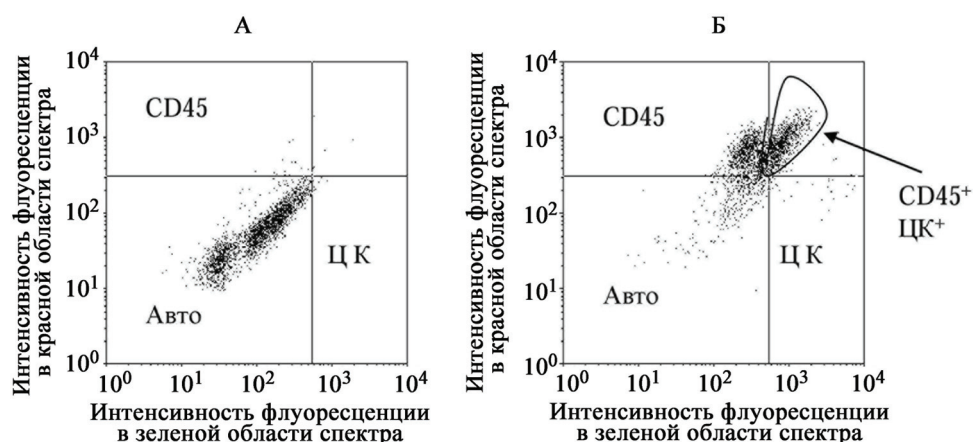


Рис. 1. Результаты последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток асцитного рака яичников специфическими антителами к CD45 и цитокератину. А – области точечной диаграммы распределения клеток асцитного рака яичников в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: нижний правый квадрант – область окрашивания цитокератином (ЦК); верхний левый квадрант – область окрашивания CD45; верхний правый квадрант – область двойного окрашивания цитокератином CD45 и ЦК; левый нижний квадрант – автофлуоресценция (Авто) клеток, включенных в анализ. Б – линией отмечена популяция клеток в области флуоресценции при двойном окрашивании антителами к CD45 и ЦК

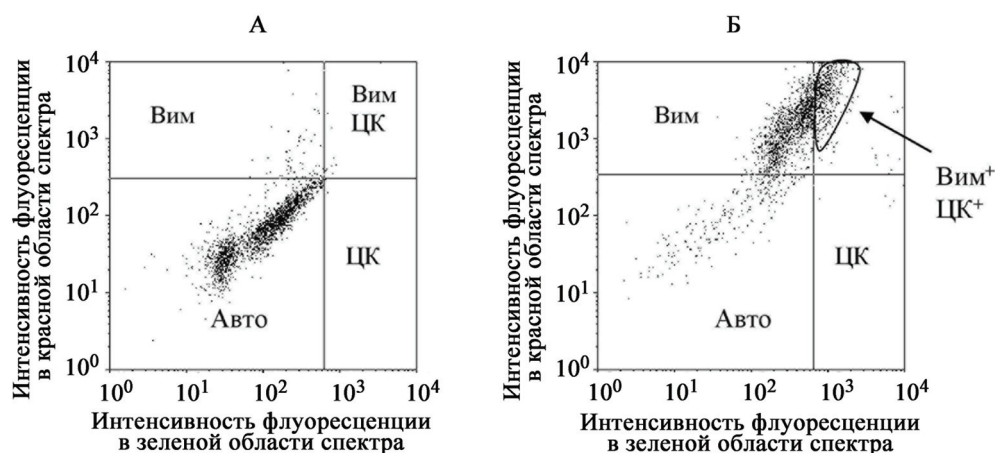


Рис. 2. Результаты последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток асцитного рака яичников специфическими антителами к виментину и цитокератину. А – области точечной диаграммы распределения клеток асцитного рака яичников в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: нижний правый квадрант – область окрашивания цитокератином (ЦК); верхний левый квадрант – область окрашивания виментином (Вим) CD45; верхний правый квадрант – область двойного окрашивания Вим и ЦК; левый нижний квадрант – автофлуоресценция (Авто) клеток, включенных в анализ. Б – линией отмечена популяция клеток в области флуоресценции при двойном окрашивании антителами к Вим и ЦК

сообщение 2013 г., в котором при иммуноцитохимическом исследовании асцитических жидкостей четырех пациенток с раком яичников описано слияние опухолевых клеток и лейкоцитов [9].

В нашем исследовании феномен слияния клеток подтвержден и охарактеризован количественно. Показано, что лейкоцитарный антиген CD45 несут все клетки рецидивного асцитного рака яичников. Более того, оказалось, что все опухолевые клетки, презентирющие CD45, экспрессируют виментин – маркер мезенхимальных клеток, т.е. находятся в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода.

Иными словами, клетки рецидивного асцитного рака яичников, не утрачивая специфического маркера эпителиальных клеток цитокератина, презентируют несвойственные антигены – CD45 и виментин. Это объясняет выявленное нами превышение суммы цитокератин и CD45 презентирующих клеток, а также суммы цитокератин и виментин позитивных клеток относительно общего числа исследованных клеток. Таким образом, получено объяснение феномена, которое явилось побудительным мотивом для проведения настоящего исследования.

При обсуждении возможной клинической значимости представленных результатов хотелось бы высказать следующие соображения. В работе впервые получены данные, свидетельствующие о том, что все клетки рецидивного асцитного рака яичников III стадии по сравнению с солидной формой приобретают, наряду с ингибированием апоптоза (специфический механизм смерти эпи-

телиальных клеток в жидкой среде при отсутствии контакта с субстратом и соседними клетками), ряд важнейших отличительных молекулярных характеристик: 1) эмпериполез (внутриклеточная миграция лейкоцитов в опухолевую клетку); 2) фенотип эпителиально-мезенхимального перехода.

Важно, что эти различия выявляются не только в группах сравнения «солидный узел» и «асцитическая жидкость» у разных больных, но и внутри одной пациентки (в настоящем исследовании описаны два таких наблюдения).

Таким образом, впервые получены данные, свидетельствующие о клинически значимых молекулярных отличиях солидного и рецидивного асцитного рака яичников, что открывает возможности для противоопухолевой терапии, которая ранее не использовалась при лечении этого заболевания. Поскольку очевидно, что не только выявленные молекулярные характеристики могут определять различия солидных и асцитных форм рака яичника, чрезвычайно важным представляется дальнейший сравнительный анализ дифференцировочных маркеров эпителиальных и гемопоэтических клеток, а также выявление и оценка частоты экспрессии маркеров стволовых клеток. Кроме того, необходимо получить ответ на вопрос: являются ли выявленные молекулярные особенности характеристикой только рецидивного асцитного рака яичников или это некий общий феномен, ассоциированный со способностью эпителиальных опухолевых клеток к росту в асцитической или плевральной жидкости при диссеминации по брюшине или плевре соответственно?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тюляндина А.С. // Практическая онкология. 2014. Т. 15. № 4. С. 168.
2. Богущ Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А., Жураев Э.Э., Полоцкий Б.Е., Унгуадзе Г.В., Давыдов М.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2011. Т. 52. № 4. С. 305.
3. Богущ Т.А., Тихомиров М.В., Дудко Е.А., Синицина М.Н., Раманускайте Р.Ю., Полоцкий Б.Е., Тюляндин С.А., Давыдов М.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2012. Т. 53. № 3. С. 207.
4. Thomas L.M. // Ann. Rev. Immunol. 1989. Vol.7. P. 339.
5. Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A., Langbein L., Lane E.B., Magin T.M., Maltais L., Omary M.B., Parry D.A., Rogers M.A., Wright M.W. // J. Cell Biol. 2006. Vol. 174. N 2. P. 169.
6. Moreno-Bueno G., Peinado H., Molina P., Olmeda D., Cubillo E., Santos V., Palacios J., Portillo F., Cano A. // Nat Protoc. 2009. Vol. 4. N 11. P. 591.
7. Ye X., Weinberg R.A. // Trends Cell Biol. 2015. Vol. 25. N 11. P. 675.
8. Ahmed N., Abubaker K., Findlay J., Quinn M. // Curr Cancer Drug Targets. 2010. Vol. 10. N 3. P. 268.
9. Ramakrishnan M., Mathur S.R., Mukhopadhyay A. // Cancer Res. 2013. Vol. 73. N 17. P. 5360.

Поступила в редакцию 12.03.16

MOLECULAR PECULIARITIES OF ASCITIC OVARIAN CANCER CELLS REVEALING BY IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY INVOLVING FLOW CYTOMETRY

T.A. Bogush*, S.A. Kaliuzhny, E.A. Dudko, V.Yu. Kirsanov, A.S. Tjulandina, E.A. Bogush, S.A. Tjulandin, M.M. Davydov

(N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation; *e-mail: labmedchem@mail.ru)

Peritoneal dissemination of malignant cells and their proliferation in ascitic fluid in recurrent III и IV stages of ovarian cancer are phase of the disease characterized by resistance to various chemotherapy regimens employed for the solid tumor treatment. Authors supposed that such differences may be due to various molecular phenotypes of solid and recurrent ascitic ovarian cancer forms. For validation of this hypothesis comparative study of expression and co-expression of certain molecular markers was performed on ovarian cancer cells obtained from solid tumors and ascitic fluids by using immunofluorescence assay involving flow cytometry. It was established that ascitic cells unlike cells of solid tumor presented common leucocytic marker CD45 and mesenchymal marker vimentin additionally to epithelial marker cytokeratin. Hence, besides inhibition of anoikis (the specific form of epithelial cell death induced in fluid by the lack of contacts with matrix) ascitic ovarian cancer cells are characterized by (1) emperipolesis (the intracellular migration of leucocytes without damage of cancer cells) and (2) phenotype of epithelial-to-mesenchymal transition. Thus, for the first time it was established that solid and recurrent ascitic ovarian cancer have clinically significant molecular differences and this fact open up new opportunities for ovarian cancer treatment.

Key words: immunofluorescence assay, flow cytometry, ascitic and solid ovarian cancer, CD45, vimentin, cytokeratin.

Сведения об авторах: Богущ Татьяна Анатольевна – зав. лабораторией медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, профессор, докт. биол. наук (labmedchem@mail.ru); Калюжный Сергей Андреевич – мл. науч. сотр. лаборатории медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России (labmedchem@mail.ru); Дудко Евгений Александрович – ст. науч. сотр. лаборатории медицинской химии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, профессор, канд. биол. наук (labmedchem@mail.ru); Кирсанов Владислав Юрьевич – науч. сотр. отделения диагностики опухолей ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Богущ Елена Александровна – ст. науч. сотр. отделения диагностики опухолей ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Тюляндина Александра Сергеевна – науч. сотр. отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, канд. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Тюляндин Сергей Алексеевич – зав. отделением клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, профессор, докт. мед. наук (labmedchem@mail.ru); Давыдов Михаил Михайлович – зав. отделением торакальной онкологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава России, профессор, докт. мед. наук (labmedchem@mail.ru).