

Национальный институт рака, Киев

ЭКСПРЕССИЯ CD44 В АДЕНОКАРЦИНОМАХ ТОЛСТОЙ КИШКИ



А. Н. Грабовой, Т. М. Савчин,
С. А. Антонюк, Т. А. Тарасова

Аденокарциномы толстой кишки проявляют выраженную гетерогенность по экспрессии CD44. Интенсивность экспрессии CD44+ не зависит от грейда опухоли, но зависит от плоидности, а доля клеток в опухоли, экспрессирующих CD44%, зависит от грейда и не зависит от количества ДНК в их ядрах. Производное двух упомянутых показателей (CD44%+) обратно коррелирует с накоплением ДНК в ядрах опухолевых клеток. Полученные значения зависимости являются слабыми, что не позволяет использовать показатели экспрессии CD44 в качестве самостоятельных критериев для уточнения грейда аденокарциномы или прогноза. Наиболее выраженная экспрессия CD44 в клетках аденокарцином с содержанием ДНК от 2с до 4с дает возможность рассматривать их как пул, наиболее насыщенный стволовыми клетками и определяющий развитие опухоли.

ВВЕДЕНИЕ

CD44 является одной из широко распространенных молекул клеточной адгезии и опосредует сцепление клеток с внеклеточным матриксом [24]. Этот гликопротеин участвует во многих клеточных процессах, в том числе росте, выживании, дифференцировке и подвижности [9, 20, 23]. В эпителии толстой кишки CD44 экспрессируется преимущественно в глубине крипт [15]. CD44 супрессирует апоптоз, что может играть критичную роль в развитии опухоли толстой кишки и переходе аденома-рак [24], ассоциируется с агрессивным поведением опухоли [6, 24], связан с опухолевой прогрессией и стадией Dukes' [15]. CD44, как и некоторые другие молекулы адгезии, могут выступать в качестве супрессоров миграции опухолевых клеток [14]. В то же время сплайс-варианты CD44 или CD44 вместе с другими молекулами адгезии, такими как CD26, могут привести к формированию метастатических фенотипов опухолевых клеток [7, 17, 18, 21].

Белок CD44 обратил на себя особое внимание как важнейший маркер стволовых клеток колоректального рака (КРР) [11, 13, 16]. CD44⁺-клетки опухоли способны образовывать колонии *in vivo* и генерировать опухоли при ксенотрансплантации. При этом нокдаун CD44, но не CD133, сильно препятствовал развитию опухоли. Только лишь 100 CD44⁺ клеток КРР, выделенных из опухоли, смогли дать начало очагу опухолевого роста [11]. Была также показана гетерогенность и самих CD44⁺ клеток: CD44⁺/PrPc⁺ клетки КРР, в отличие от CD44⁺/PrPc⁻, имеют высокий потенциал по образованию метастатических очагов в печени [12].

Цель работы — определить особенности экспрессии CD44 среди клеток аденокарцином (АК) толстой кишки разных грейдов и с разным содержанием ДНК в ядрах.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на материале 92 опухолей толстой кишки: полипы и аденомы (В) — 14; АК G1 (G1) — 23; АК G2 (G2) — 46; АК G3 (G3) — 9. Обработка материала была четко стандартизована. Тканевые образцы фиксировали в забуференном 10% формалине (рН 7,4; 24 ч) и заливали в парапласт с использованием гистиопроектора Histos-5 (Milestone, Италия). Из блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме Microm HM325 (Thermo Scientific, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону (рН 1,62; 37 °С; 24 ч) для выявления содержания нуклеиновых кислот [4, 5]. Для каждого случая часть срезов обрабатывали РНКазой (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG, Германия) для экстракции РНК [4]. Иммуногистохимические реакции проводили с моноклональным мышинным антителом против CD44 человека (hCAM Clone 156-3C11, DBS, США) в соответствии с протоколом производителя с использованием системы детекции EnVision™ FLEX (Dako, Дания). Срезы докрашивали гематоксилином Gill.

Препараты изучали и фотографировали при помощи микроскопа Nikon Eclipse 80i с камерой DS-5SMc/L2 при стандартизованных условиях, а изображения (×400, 1280×960 пикселей RGB) обрабатывали с использованием системы анализа ImageJ 1,46. На изображениях препаратов, окрашенных галлоцианин-хромовыми квасцами, в 30 клетках каждой опухоли определяли площадь сечения ядра, интегральную оптическую плотность ядра и рассчитывали содержание в нем ДНК (nuclear DNA — NDNA). При определении последнего в качестве единицы использовали содержание ДНК в ядрах лимфоцитов (2с) стромы опухоли [1].

Ключевые слова: аденокарцинома толстой кишки, CD44.

По среднему NDNA клеток опухоли были разделены на три ранга: D — <1,2, D+ — 1,2–2,5 и T+ — >2,5. Клетки опухоли разделяли на морфофункциональные ранги с условно нормальными ядрами (Nn) и на такие, ядра которых находились в состоянии пикноза (Np) или лизиса хроматина (NI). Оценку проводили по критерию средней оптической плотности, площади сечения ядра и содержанию в нем ДНК по оригинальной методике [3].

Экспрессию CD44 оценивали на 5 цифровых изображениях каждой опухоли. Определяли процент меченых опухолевых клеток (CD44%), а также интенсивность экспрессии (CD44+): мембранная частичная — 1+, мембранная полная — 2+, мембранная полная и цитоплазматическая — 3+. Рассчитывали средние значения для каждой опухоли и вычисляли интегральный коэффициент экспрессии (CD44%+) как произведение значений CD44% · CD44+.

Статистический анализ проводили в среде IBM SPSS Statistics 22. Коэффициент корреляции Пирсона использовали для анализа взаимосвязей. Для сравнения групп применяли Н-критерий Краскела — Уоллиса, U-критерий Манна — Уитни для случайных величин с распределением, отличным от нормального, а также t-критерий Стьюдента для величин с нормальным распределением. Для исследования связи между порядковыми переменными использовались таблицы сопряженности с критерием согласованности Пирсона (χ^2).

При статистическом анализе показателей экспрессии CD44 в АК оказалось, что два случая имеют аномальные значения для своих групп, что приводит к «выбросу данных». Значения их показателей выходили за пределы распределения данной величины для заданной исследуемой группы. Эти случаи (B и АК G3) были исключены из анализа для повышения однородности исследуемой выборки. Таким образом, последующий анализ проведен на 90 образцах опухолей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что экспрессия CD44 в АК и аденомах толстой кишки варьировала в значительных пределах. Так, исследуемые опухоли характеризовались широким диапазоном CD44%, составившим от 2 до 100% со средним значением 46,6±2,8%. CD44+ при этом являлась исключительно положительной: для 20% опухолей она составила 1+, для 46% — 2+ и, соответственно, 3+ — для 34% оставшихся.

Оценка средних значений экспрессии CD44 показала (рис. 1), что относительное количество меченых клеток (CD44%) возрастало в диапазоне от аденом до G2, после чего несколько уменьшалось в G3. Средняя интенсивность экспрессии (CD44+)

достоверно повышалась при переходе от аденом к АК и не имела статистически значимых отличий между АК разных грейдов. Интегральный показатель экспрессии CD44%+ возрастал в диапазоне аденом — G2. Это происходило на фоне некоторого снижения содержания ДНК в клетках АК [1] и увеличения относительного количества опухолевых клеток с условно нормальными ядрами [3].

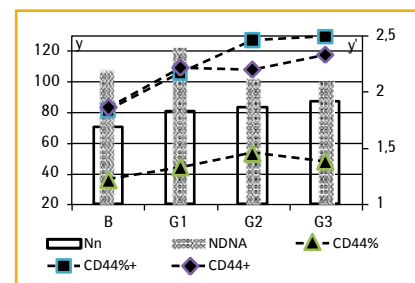


Рис. 1. Средние значения CD44% (%; ось y), CD44+ (у.е. (+), ось y'), CD44%+ (у.е., ось y), NDNA (у.е., ось y') и Nn (%; ось y) для аденом (B) и АК толстой кишки разной степени дифференцировки (G)

Среднее NDNA опухолей варьировало в пределах от 0,8 до 5,2 у.е., а его среднее значение для всей выборки составило 2,1±0,1 у.е. Последнее свидетельствует о том, что для большинства опухолей нашей выборки присуща хромосомная нестабильность, являющаяся наиболее распространенным механизмом развития АК [8, 10]. При разделении опухолей на ранги по содержанию ДНК наиболее многочисленной оказалась D+, 50 (56%), T+ включила 26 (29%) случаев, и только 14 (15%) изученных АК можно было отнести в ранг с содержанием ДНК, приближенным к диплоидному (ранг D).

Это дает основание рассматривать последние АК как развивающиеся за счет микросателлитной нестабильности [10]. Аппроксимация зависимости NDNA и экспрессии CD44 в целом для всей выборки опухолей (рис. 2) показала полиномиальную зависимость между этими показателями, однако с крайне низкой ее значимостью (для: CD44% R²=0,15; CD44+ R²=0,15; CD44%+ R²=0,17). Применительно к опухолям разной степени дифференцировки (G) величина достоверности аппроксимации оказалась

Таблица. Результаты корреляционного анализа оценки связей между экспрессией CD44 и содержанием ДНК, относительным содержанием морфофункциональных типов клеток в опухоли

	CD44%	CD44%+	Nn%	NI%	Np%
NDNA (у.е.)	-0,151	-0,200	-0,050	-0,173	0,170
CD44%	-	(-0,214)*	0,171	-0,104	-0,104
CD44%+	-	-	0,174	-0,046	-0,147

*Результаты, полученные на основе статистического бутстреп (p<0,05). NDNA — содержание ДНК в ядрах опухолевых клеток; CD44% — процент меченых клеток; CD44%+ — интегральный коэффициент экспрессии; Nn%, NI%, Np% — процент опухолевых клеток с условно нормальными ядрами, ядрами в состоянии пикноза или лизиса хроматина соответственно.

значительно выше (NDNA/CD44%+; максимальные значения для: B R²=0,73, G1 R²=0,46, G2 R²=0,18, G3 R²=0,7). Это дает основание утверждать, что между NDNA и экспрессией CD44 отсутствует прямая зависимость. Введение же в систему анализа грейда указывает на тенденцию и возможную связь экспрессии CD44 с уровнем анаплазии. Примечательно, что максимальные значения кривой тренда как для аппроксимации NDNA/CD44%+ в целом для выборки, так и для отдельных грейдов находится в диапазоне значения NDNA 1,5–2,0 (см. рис. 2).

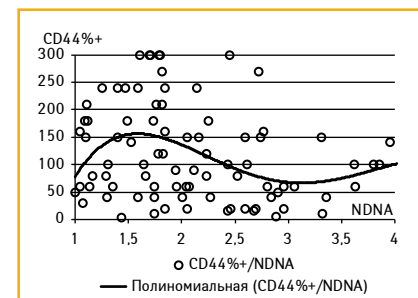


Рис. 2. Аппроксимация зависимости экспрессии CD44%+ (у.е.) и NDNA (у.е.) в целом для всей выборки опухолей (АК, аденомы). о — эмпирические данные; — линия тренда

Проведенный корреляционный анализ для общей оценки связей между экспрессией CD44 и NDNA в целом также показал отсутствие значимых результатов (таблица). Однако для CD44%+ и NDNA отмечена корреляция с коэффициентом r=-0,2, приближающаяся к статистически значимой (p=0,059). Дополнительно использованный в этом случае метод статистического бутстреп позволил получить значимый результат, демонстрирующий наличие обратной связи между CD44%+ и NDNA (r=-0,214, p=0,044). Данный факт подтверждается результатами, полученными при исследовании связи между интенсивностью экспрессии (CD44+) и рангом опухоли по содержанию ДНК. Так, при росте последнего интенсивность экспрессии снижается ($\chi^2=10,72$; p=0,0299), причем нелинейно, с наибольшими значениями интенсивности для ранга D+ (рис. 3).

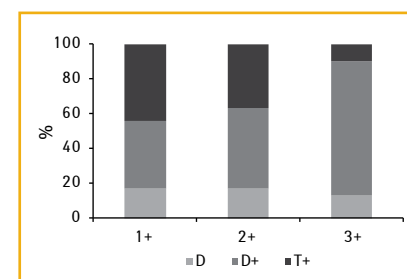


Рис. 3. Соотношение опухолей с разной интенсивностью экспрессии CD44+ в опухолях разных рангов по содержанию ДНК (D — <1,2, D+ — 1,2–2,5, T+ — >2,5 у.е.). Столбики диаграммы представляют относительную часть опухолей каждого ранга для каждого значения CD44+

Оценка NDNA в группах опухолей с различной интенсивностью экспрессии CD44+ показала, что его наименьшее значение характерно для ранга 3+ по сравнению с 1+ (p=0,034) и 2+ (p=0,035) и составляет 1,84±0,09 у.е. (рис. 4). При попарном сравнении рангов по CD44% и CD44%+ прослеживалось отличие опухолей T+ от D+ по уровню экспрессии CD44% (p=0,026), а также по CD44%+ (p=0,006) (рис. 5). Для опухолей D и D+ схожих различий не отмечено (p=0,135 и p=0,102 соответственно).

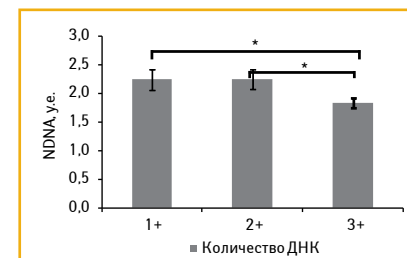


Рис. 4. Зависимость интенсивности экспрессии CD44+ от среднего значения содержания ДНК в ядрах опухолевых клеток. M±m. *p<0,05

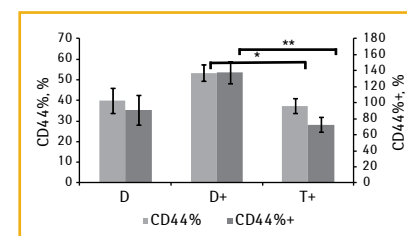


Рис. 5. Значение CD44% и CD44%+ для опухолей разных рангов по среднему содержанию ДНК в ядрах клеток (D — <1,2, D+ — 1,2–2,5, T+ — >2,5). M±m. *p<0,05

Итак, наибольшая частота мечения и интенсивность экспрессии CD44+ характерны для опухолей ранга D+, самые низкие — для ранга T+. Повышение содержания ДНК сопровождается уменьшением экспрессии CD44. Необходимо отметить, что в последнем ранге показатель процента

клеток с пикнотическими ядрами является самым высоким (16,8±4,7%) [3], такой же показатель (16,4±4,8%) характерен для опухоли CD441+, также является самым высоким показателем по сравнению с другими группами (рис. 6).

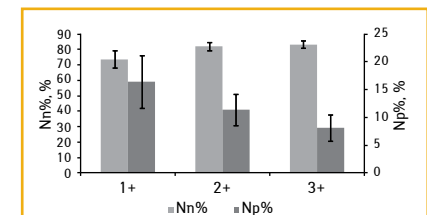


Рис. 6. Представительство морфофункциональных рангов опухолевых клеток в группах с различной интенсивностью экспрессии CD44+. M±m. Nn — клетки с условно нормальными ядрами; Np — клетки с ядрами в состоянии пикноза; NI — клетки с ядрами с лизисом хроматина

Проведенный анализ не выявил статистически значимых отличий интенсивности экспрессии CD44+ между аденомами и АК разных грейдов ($\chi^2=6,69$; p=0,35). Однако обнаружилась некоторая тенденция к повышению уровня CD44+ по мере нарастания анаплазии в опухолях (рис. 7). Сравнение групп с использованием Н-критерия Краскела — Уоллиса показало повышение CD44% по мере снижения уровня дифференцировки новообразования от B до G3 (p=0,024). Причем в диапазоне B–G1–G2 его значимость была определена на уровне p=0,01 (рис. 8). Группа G3, будучи наименее многочисленной, не продемонстрировала статистически значимых результатов.

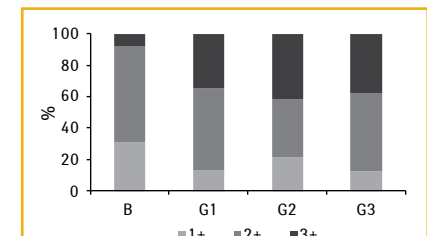


Рис. 7. Интенсивность экспрессии CD44+ в аденомах (B) и аденокарциномах толстой кишки разной степени дифференцировки (G)

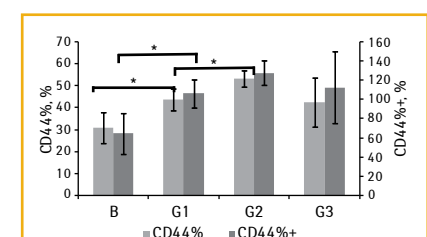


Рис. 8. CD44% и CD44%+ в аденомах (B) и АК толстой кишки разной степени дифференцировки (G). M±m. *p<0,05

Таким образом, проведенные исследования показали, что АК являются весьма гетерогенными по экспрессии CD44. Вместе с тем выявлено, что интенсивность экспрессии CD44+ не зависит от грейда опухоли, но зависит от плоидности. И наоборот, доля клеток, экспрессирующих CD44%, в опухоли зависит от грейда и не зависит от количества ДНК в их ядрах. Производное двух упомянутых показателей (CD44%+) обратно коррелирует с накоплением ДНК. Полученные значения зависимостей являются слабыми, что не позволяет использовать показатели экспрессии CD44 в качестве самостоятельных критериев для уточнения грейда АК или прогноза.

Выявленные зависимости между экспрессией CD44 и грейдом опухоли или содержанием ДНК в ядрах ее клеток, прежде всего, могут отражать процессы клональной эволюции [19, 22] в АК, характер которой зависит от патогенетического механизма развития опухоли [8, 10]. Так, нарастание в опухолях части клеток, экспрессирующих CD44, по мере снижения их дифференцировки совпадает с сужением их клеточного спектра по содержанию ДНК в ядрах [1]. Это можно рассматривать как результат элиминации из АК нежизнеспособных клеточных элементов и постепенного увеличения в их составе пула клеток с сохраненными системами жизнеобеспечения. Последнее утверждение основывается на данных об увеличении в АК типов клеток с ядрами, активными по морфофункциональным признакам [3].

Следует также отметить, что наибольшая экспрессия CD44 зафиксирована среди клеток АК, содержание ДНК в ядрах которых приближается к 4с. Последнее можно расценивать преимущественно как синтезирующие ДНК во время митотического цикла, что совпадает с данными о наибольшей митотической активности в этом сегменте спектра клеток АК [2]. Все это позволяет полагать, что к пулу клеток с содержанием ДНК от 2с до 4с и экспрессирующих CD44 принадлежат клетки, определяющие основной потенциал развития АК и рассматриваемые как стволовые [16].

ВЫВОДЫ

АК толстой кишки проявляют выраженную гетерогенность по экспрессии CD44. Интенсивность экспрессии CD44+ не зависит от грейда опухоли, но зависит от плоидности, а доля клеток в опухоли, экспрессирующих CD44%, зависит от грейда и не зависит от количества ДНК в их ядрах. Производное двух упомянутых показателей (CD44%+) обратно коррелирует с накоплением ДНК в ядрах опухолевых клеток. Полученные значения зависимостей являются слабыми, что

не дозволяє використовувати показателі експресії CD44 в якості самостійних критеріїв для уточнення грейда АК або прогноза.

Найбільш виражена експресія CD44 в клітках АК з вмістом ДНК від 2с до 4с дає можливість розглядати їх як пул, найбільш насичений стволовими клітками і визначає розвиток пухлини.

СПИСОК ІСПОЛЬЗОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Грабовий О.М., Антонюк С.А., Воробей Є.А. (2013) Вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки. Український морфологічний альманах, 11(1): 73–76.
2. Грабовий О.М., Антонюк С.А., Воробей Є.А. (2013) Мітотична активність та вміст нуклеїнових кислот у ядрах клітин епітеліальних пухлин товстої кишки. Патологія, 2(28): 13–16.
3. Грабовий О.М., Антонюк С.А., Сільченко В.П. та ін. (2015) Питомий вміст ДНК у ядрах клітин та клітинна гетерогенність аденокарцином товстої кишки. Патологія, 1(33): 44–47.
4. Лупа Х. (1980) Основы гистохимии (Пер. с нем.). Мир, Москва, 344 с.

5. Ташке К. (1980) Введение в количественную цито-гистологическую морфологию. (Пер. с рум.). Изд. Акад. Соц. Респ. Румынии, 192 с.
6. Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M. et al. (1990) CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell., 61: 1303–1313.
7. Bankfalvi A., Krassort M., Buchwalow I. et al. (2002) Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and betacatenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. J. Pathol., 198: 343–351.
8. Bardhan K., Liu K. (2013) Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. Cancers, 5(2): 676–713.
9. Cheng C., Sharp P. (2006) Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. Mol. Cell. Biol., 26: 362–370.
10. Coppède F., Lopomo A., Spisni R. et al. (2014) Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. World J. Gastroenterol., 20: 943–956.
11. Dalerba P., Dylla S., Park I. et al. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 104: 10158–10163.
12. Du L., Rao G., Wang H. et al. (2013) CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. Cancer Res., 73(8): 2682–94.
13. Du L., Wang H., He L. et al. (2008) CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. Clin. Cancer Res., 14: 6751–6760.
14. Gao A., Lou W., Dong J. et al. (1997) CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. Cancer Res., 57: 846–849.

15. Gotley D., Fawcett J., Walsh M. et al. (1996) Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. Brit. J. Cancer, 74: 342–351.
16. Hong I., Hong S.W., Chang Y.G. et al. (2015) Expression of the cancer stem cell markers CD44 and CD133 in colorectal cancer: an immunohistochemical staining analysis. Ann. Coloproctol., 31(3): 84–91.
17. Jothy S. (2003) CD44 and its partners in metastasis. Clin. Exp. Metastasis, 20: 195–201.
18. Martin T., Harrison G., Mansel R. et al. (2003) The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. Crit. Rev. Oncol. Hem., 46: 165–86.
19. Murugaesu N., Chew S.K., Swanton C. (2013) Adapting clinical paradigms to the challenges of cancer clonal evolution. Am. J. Pathol., 182(6): 1962–71.
20. Nagano O., Saya H. (2004) Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. Cancer Sci., 95: 930–5.
21. Pang R., Law W., Chu A. et al. (2010) A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. Cell. Stem. Cell., 6: 603–15.
22. Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. Cancer Res., 72(19): 4875–4882.
23. Vigetti D., Viola M., Karousou E. et al. (2008) Hyaluronan-CD44-1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. J. Biol. Chem., 283: 4448–4458.
24. Wielenga V., Van der Neut R., Offerhaus G. et al. (2000) CD44 glycoproteins in colorectal cancer: expression, function, and prognostic value. Adv. Cancer Res., 77: 169–87.

Експресія CD44 в аденокарциномах товстої кишки

О.М. Грабовий, Т.М. Савчин, С.А. Антонюк, Т.О. Тарасова
Національний інститут раку, Київ

Резюме. Аденокарциноми товстої кишки проявляють виражену гетерогенність за експресією CD44. Інтенсивність експресії CD44+ не залежить від грейда пухлини, але залежить від пліодності, а частка клітин у пухлині, що експресують CD44%, залежить від грейда і не залежить від кількості ДНК в їх ядрах. Похідне двох згаданих показників (CD44%+) зворотно корелює з накопиченням ДНК в ядрах пухлинних клітин. Отримані значення залежності є слабкими, що не дозволяє використовувати показники експресії CD44 як самостійні критерії для уточнення грейда аденокарциноми або прогнозу. Найбільш виражена експресія CD44 у клітинах аденокарцином із вмістом ДНК від 2с до 4с дає можливість розглядати їх як пул, який є найбільш насичений стволовими клітинами та визначає розвиток пухлини.

Ключові слова: аденокарцинома товстої кишки, CD44.

CD44 expression in colon adenocarcinoma

O.M. Grabovoy, T.M. Savchyn, S.A. Antoniuk, T.A. Tarasova
National Cancer Institute, Kyiv

Summary. Colon adenocarcinomas show distinct heterogeneity of CD44 expression. The intensity of expression of CD44+ is independent of tumor grade, but depends on the ploidy, fraction of cells in a tumor expressing CD44% depends on the grade and is independent of the amount of DNA in their nuclei. Derivative of said two parameters (CD44%+) is negatively correlated with the accumulation of DNA in the nuclei of tumor cells. Independently values obtained are weak, which makes use of CD44 expression indices as independent criteria for specification colon adenocarcinoma grade or prognosis. The most pronounced expression of CD44 in the adenocarcinomas cells containing DNA from 2c to 4c can be considered as a pool of the most rich with stem cells and determining the development of the tumor.

Key words: colon adenocarcinoma, CD44.