

К.С. Титов¹, А.М. Казаков², М.А. Барышникова², А.А. Маркин³

Влияние стволовых клеток опухоли на прогноз при локализованной меланоме кожи

¹ГБУЗ МКНЦ им. Логанова ДЗМ,
²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
³ФГБУ «НМИЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России,
г. Москва

Цель исследования. Определить прогностическое значение стволовых клеток (СКО) опухоли у пациентов с первичной меланомой кожи I–II стадии.

Материалы и методы. Исследование проводилось на операционном материале 48 пациентов с установленным диагнозом меланомы кожи I–II стадий. Плановое гистологическое исследование материала проводилось по рутинной технологии с оценкой типа меланомы, толщины (Бреслоу), инвазии (по Кларку), наличия или отсутствия изъязвления, выраженности лимфоидной инфильтрации. Иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров ABCB5 и CD133 проводилось с моноклональными антителами: CD133 (кроличьи поликлональные к CD133 человека, разведение 1:100, ab19898, Abcam) и ABCB5 (клон 5H3C6, разведение 1:200, ab140667, Abcam); инкубацию с антителами проводили при 4°C 16–18 час. Экспрессию оценивали при помощи бальной шкалы интенсивности (0, 1+, 2+, 3+) и процента (0–100%) позитивных клеток среди всех опухолевых клеток в образце. Оценку статистической значимости результатов выполняли путём вычисления коэффициента корреляции методом рангов (метод Спирмена).

Результаты. Выявлена статистически значимая связь между наличием маркёров стволовых клеток опухоли меланомы и 2-летней общей и безрецидивной выживаемостью, а также корреляция между наличием СКО и рядом морфологических признаков.

Выводы. Наличие маркёров стволовых клеток опухоли влияет на 2-летний прогноз у пациентов с первичной меланомой кожи I–II стадий. Кроме того, наличие СКО ассоциируется с большей толщиной опухоли по Бреслоу и большим уровнем инвазии по Кларку, более выраженной лимфоидной инфильтрацией. Эти данные могут позволить улучшить прогнозирование и диагностику пациентов с локализованной меланомой кожи.

Ключевые слова: стволовые клетки опухоли, прогноз, локализованная меланомы

Введение

Меланомы кожи — одна из самых злокачественных опухолей человека, для которой характерен неуклонный рост заболеваемости среди трудоспособного светлого населения как в России, так и за рубежом (ежегодный прирост заболеваемости 5%) [1]. Следует отметить, что, к сожалению, в России при первом обращении к онкологу меланомы кожи в 20,6% случаев выявляются на уже запущенных III–IV стадиях опухолевого процесса, что обуславливает в целом неблагоприятный прогноз. До недавнего времени отсутствовали эффективные методы лекарственного и лучевого лечения метастатической меланомы кожи.

Прогресс фундаментальной науки способствовал разработке и созданию целых классов противоопухолевых таргетных препаратов — BRAF/MEK-ингибиторов и иммуноонкологических лекарств — анти-PD-1/анти-CTLA-4 ингибиторов, что существенно улучшило результаты лечения и прогноз пациентов с меланомой кожи, значительно увеличив их выживаемость, несмотря на то, что данная форма по-прежнему остаётся неизлечимой у большинства пациентов [2]. Ведущие ученые мира продолжают поиск новых факторов прогноза меланомы кожи и предикторов ответа на системную терапию. На данный момент в стандартной практике локальных форм меланомы уже много лет используются патоморфологические факторы прогноза. Например, толщина опухоли по Breslow, уровень инвазии по Clark, митотический индекс, изъязвление эпидермиса. Но данные параметры не учитывают биологию опухоли, ее агрессивный потенциал. Понимание рисков распространения заболевания может помочь при выборе правильного режима адъювантной терапии, частоты и интенсивности контрольного обследования.

Одним из механизмов резистентности и рецидивирования с последующим метастазированием является присутствие в опухолевой ткани так называемых стволовых клеток опухоли

(СКО) [3, 4]. Данные клетки имеют сходство с нормальными стволовыми клетками (способность к самообновлению и образованию клеточных линий), однако отличаются от них происхождением и способностью участвовать в ряде патологических процессов [5]. На присутствие СКО указывает наличие определённых белков и кластеров дифференцировки на поверхности опухолевых клеток, для меланомы это: ABCB5, CD133, CD20, CD271 и др. [6]. Присутствие данных маркёров не только говорит о принадлежности клеток к СКО, но и придаёт им ряд свойств, потенцирующих их инвазивные и метастатические свойства, повышающих их резистентность к проводимой терапии [7]. ABCB5 является белком плазматической мембраны (семейство Р-гликопротеинов человека (ABC-транспортер)). Одной из важнейших функций ABCB5 является активация перехода СКО в так называемый медленный цикл (slow-cycling). Находясь в таком состоянии, опухолевые клетки значительно снижают скорость роста, увеличивая период самоудвоения опухолевой массы [8]. Переход в slow-cycling делает опухолевую стволовую клетку практически невосприимчивой как к химиотерапии, так и к таргетной терапии, тем самым давая ещё одно объяснение, помимо активации альтернативных сигнальных путей, краткосрочному эффекту лекарственной терапии [9, 10]. Данный переход реализуется посредством цитокинового каскада IL-1 β -IL8-CXCR1 [11]. Способность переключаться между медленным циклом и активной формой отчасти объясняет феномен отсроченного рецидивирования и активации метастатических очагов — через годы после лечения первичной опухоли [10].

Свойства CD133 (трансмембранный протеин) влияют на метастатическую активность, так как его гиперэкспрессия ассоциируется с повышенным синтезом матричных металлопротеиназ MMP-2, разрушающих межклеточный матрикс и способствующих инвазии, росту, неоангиогенезу и метастазированию [12]. Клетки, несущие CD133 и ABCB5, кроме того, активно участвуют в васкулогенной мимикрии [13, 14]. ABCB5 и CD133 являются наиболее изученными маркёрами СКО меланомы кожи, поэтому данное исследование будет посвящено именно им.

Материалы и методы

В исследование вошло 48 пациентов с установленным диагнозом первичной меланомы кожи I (A+B) и II (A+B) стадий. Медиана возраста — 56 лет. Всем пациентам проводилось хирургическое удаление новообразования (пациенты со II стадией после этого получали адъювантную иммунотерапию интерфероном- α максимально до 1 года).

Распределение по стадиям: IA стадия 17 пациентов (34,5%), IB — 10 (21,9%), IА — 8 (16,6%), IВ — 13 (27%). В 30 (62,4%) случаях наблюдалась поверхностно-распространяющаяся форма меланомы кожи, а в 18 (37,6%) — узловая меланома кожи.

При морфологическом анализе оценивали: гистологическую форму меланомы, толщину (по Бреслоу), инвазию (по Кларку), выраженность лимфоидной инфильтрации и наличие или отсутствие изъязвления. Для выявления экспрессии антигенов CD133 использовались кроличьи поликлональные антитела к CD133 человека, разведение 1:100, ab19898, Abcam, для выявления экспрессии ABCB5 — клон 5H3C6, разведение 1:200, ab140667, Abcam. Инкубация проводилась 16 часов при температуре 4°C. Инкубация со вторичными антителами (меченными пероксидазой — REAL Envision+ kit, Dako) проводилась при температуре 18°C в течение 15 минут. Для визуализации ИГХ-реакции использовался диаминобензидин (Invitrogen). Срезы докрашивались гематоксилином Майера (Sigma-Aldrich) и заключались в синтетическую основу Shandon Mount (Thermo).

Оценку результатов исследования проводили с применением светового микроскопа «NIKON 80i». Экспрессия маркёров СКО оценивалась с помощью шкалы интенсивности (0, 1+, 2+, 3+) и процента (0–100%) клеток в образце, экспрессирующих маркёры СКО.

Статистическая оценка результатов осуществлялась вычислением коэффициента корреляции методом рангов (метод Спирмена).

Результаты

Маркеры СКО выявлены в 25 (52%) случаях локальной меланомы кожи. ABCB5 был выявлен в 20 (54%) случаев, CD133 — в 17 (46%). Коэкспрессию наблюдали у 12 пациентов (32%). На рис. 1, 2 представлены результаты ИГХ окрашивания опухолевого материала, положительно по ABCB5, CD133.

Пациентов разделили на группы: в первую группу вошли 25 человек, у которых наблюдали наличие экспрессии ABCB5 и/или CD133, во вторую группу вошли 23 пациента без экспрессии СКО. При сравнении первой группы пациентов со второй группой было обнаружено следующее: 2-хлетняя общая выживаемость (ОВ) в первой группе составила 75%, во второй группе — 92,4%. Показатели безрецидивной выживаемости (БРВ) также показали различия между двумя группами: в первой группе БРВ составила 82%, во второй — 93,4%.

Поскольку потенциально в группу с более плохими ОВ и БРВ могло попасть больше пациентов со II стадией, в результате чего вывод о влиянии именно наличия СКО на ОВ и БРВ был бы не обоснован, мы провели подгрупповой анализ, разделив пациентов с экспрессией СКО на группы из I и II стадии и сравнили их выживаемость с пациентами тех же стадий без экспрессии СКО. В группу с экспрессией СКО вошло: с I стадией (A+B) 18 человек, со II стадией (A+B) 7 человек.

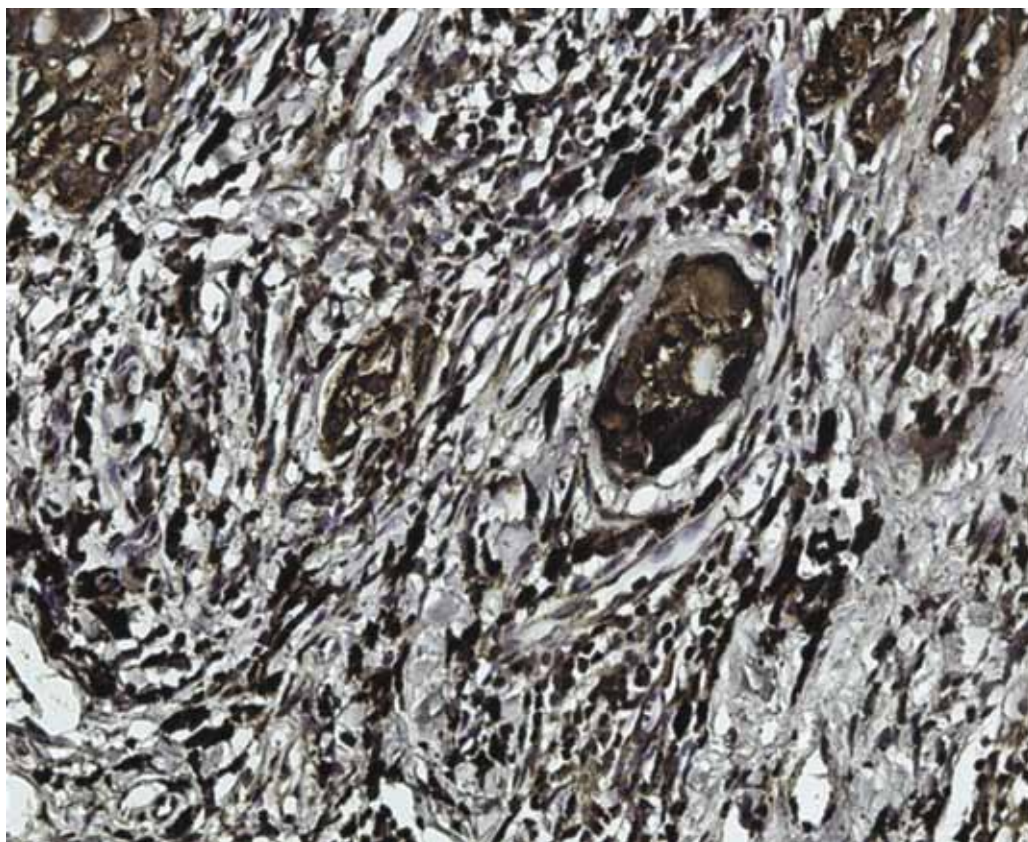


Рис. 1. ИГХ определение присутствия ABCB5 на стволовых клетках (интенсивность 3+)

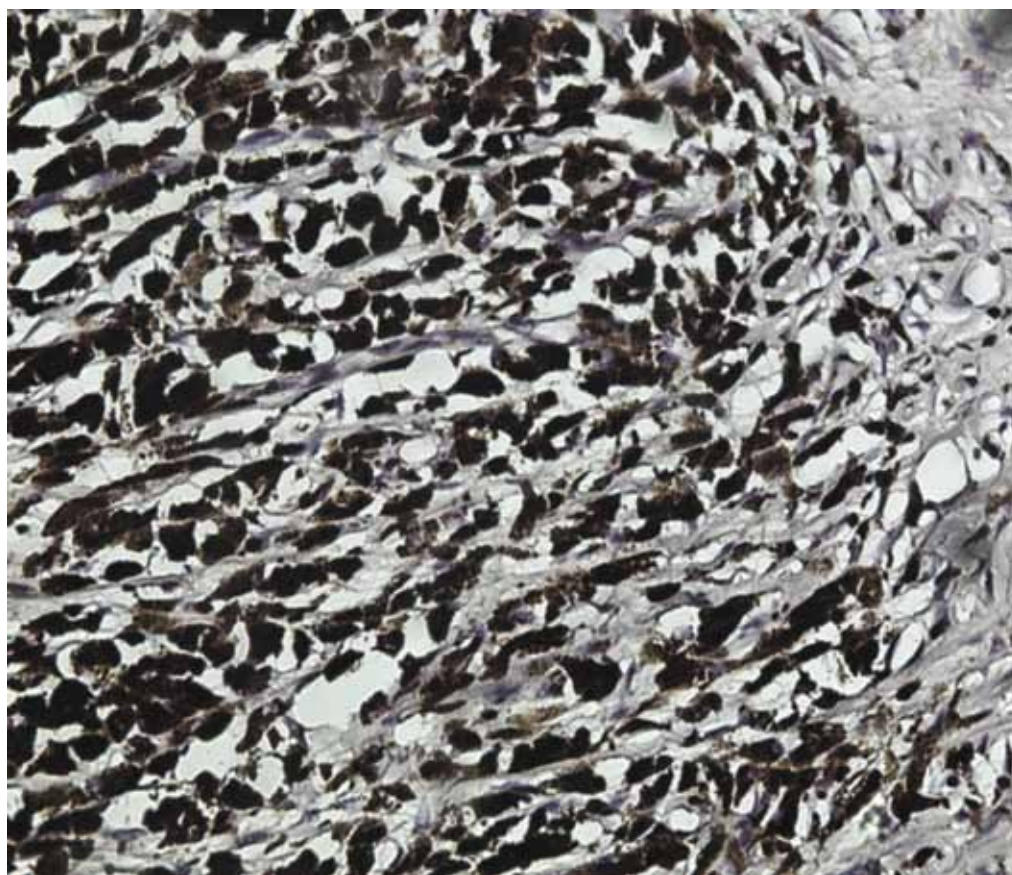


Рис. 2. ИГХ определение присутствия CD133 на стволовых клетках (интенсивность 3+)

Среди первой стадии, группа пациентов с экспрессией маркёров СКО имела 2-хлетние ОВ и БРВ 81,2% и 68,8% соответственно, в то время как группа пациентов без экспрессии маркёров СКО имела ОВ и БРВ 92,3% и 88% соответственно. Различия в ОВ составили 9,1%, в БРВ — 19,2%.

Такой же анализ для пациентов II стадии показал, что 2-хлетняя ОВ СКО-положительных пациентов составила 66,35%, 2-х летняя БРВ — 33,8%. Для СКО-отрицательных пациентов ОВ составила 78%, БРВ — 67%. Различия в ОВ и БРВ между группами составила 11,6% и 33,2% соответственно.

Как видно из сводной таблицы, разные соотношения маркёров СКО не являются предиктором как минимум 2-хлетней выживаемости. Такой результат может быть связан с недостаточным сроком исследования, так как прогностический потенциал данных маркёров может проявиться при анализе 5-ти и 10-тилетней выживаемости.

В группе пациентов с IA и IB стадиями выявлена сильная прямая корреляционная связь между увеличением процента клеток, экспрессирующих CD133, и повышением показателя степени инвазии ($P=0,855 \pm 0,118$), кроме того, показана сильная прямая корреляционная связь между повышением процента ABCB5 — положительных клеток, и ростом толщины опухоли по Бреслоу ($P=0,882 \pm 0,173$).

В группе с IIA и IIB стадиями обнаруживалась сильная прямая корреляционная связь между увеличением процентного содержания клеток, экспрессирующих ABCB5, и увеличением степени инвазии ($P=0,89 \pm 0,31$), и сильная прямая корреляционная связь между увеличением процента клеток, экспрессирующих ABCB5, и увеличением толщины опухоли по Бреслоу ($P=0,937 \pm 0,151$).

Среди I стадии было обнаружено увеличение степени лимфоидной инфильтрации у больных с повышенным процентом клеток, экспрессирующих ABCB5, что может говорить о наличии механизмов повышения иммуногенности СКО, несущих данный маркёр ($P=0,742 \pm 0,162$). Среди II стадии у всех пациентов с экспрессией маркёров СКО была выявлена выраженная лимфоидная инфильтрация.

Обсуждение

Как видно из результатов проведенного нами исследования, присутствие СКО в первичной локализованной опухоли значительно влияет на как минимум 2-хлетний прогноз (ОВ и БРВ), независимо от стадии заболевания. Кроме того, наличие СКО статистически значимо ассоцииру-

ется с повышением толщины опухоли по Бреслоу, увеличением степени инвазии по Кларку, повышением уровня лимфоидной инфильтрации. Всё это в дальнейшем может позволить улучшить как диагностику, так и прогнозирование локализованных форм первичной меланомы кожи, оптимизировать тактику лечения и динамического наблюдения за такими пациентами.

Выводы

1. Экспрессия маркеров стволовых клеток опухоли — CD133 и ABCB5 при локальной меланоме кожи I-II стадии влияет на общую и безрецидивную 2-хлетнюю выживаемость пациентов, давая различия для I стадии в 9,1% и 19,2% соответственно, для II стадии — 11,6% и 33,2% соответственно.

2. Разные соотношения маркёров СКО не являются предиктором как минимум 2-хлетней выживаемости (статистически значимо).

3. При I стадии выявлена сильная прямая корреляционная связь между увеличением процента клеток несущих CD133, и увеличением степени инвазии по Кларку ($p=0.855 \pm 0,118$) и сильная прямая корреляционная связь между увеличением процента клеток экспрессирующих ABCB5, и увеличением толщины опухоли по Бреслоу ($p=0.882 \pm 0,173$).

4. При II стадии выявлена сильная прямая корреляционная связь между увеличением процента клеток несущих ABCB5 и увеличением степени инвазии по Кларку ($p=0.89 \pm 0,31$), и сильная прямая корреляционная связь между увеличением процента клеток, экспрессирующих ABCB5, и увеличением толщины опухоли по Бреслоу ($p=0.937 \pm 0,151$).

5. При I стадии обнаружено увеличение степени лимфоидной инфильтрации у больных с повышенным процентом клеток, экспрессирующих ABCB5, что может свидетельствовать о наличии механизмов повышения иммуногенности СКО, несущих данный маркёр ($p=0.742 \pm 0,162$).

6. При II стадии у всех пациентов с экспрессией маркёров СКО была выявлена выраженная лимфоидная инфильтрация.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петров Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. — МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2018.
- Titov K.S., Chikileva I.O., Kiselevskiy M.V., Kazakov A.M. Lymphoid infiltration as a predictor of successful immuno-

- therapy with melanoma // *Malignant Tumors*. — 2017. — Vol. 1. P. 61-66.
3. Trine O. Jensen, Henrik Schmidt, Holger Jon Møller et al. Macrophage Markers in Serum and Tumor Have Prognostic Impact in American Joint Committee on Cancer Stage I/II Melanoma // *J Clin Oncol*. — 2009. — Vol. 27(20). — P. 3330-7. — doi: 10.1200/JCO.2008.19.9919.
 4. Vartanian A.A., Oborotova M.V. Basic determinants of melanoma stem cell // *June*. — 2015. — doi: 10.17650/1726-9784-2015-14-2-7-16.
 5. Giorgio Parmiani. Melanoma Cancer Stem Cells: Markers and Functions // *Cancers (Basel)*. — 2016. — Vol. 8(3). — P. 34. — doi: 10.3390/cancers8030034.
 6. Nicholas Nguyen, Kasey L Coutts, Yuchun Luo et al. Understanding melanoma stem cells // *Melanoma Manag.* — 2015. — Vol. 2(2). — P. 179-188. — doi: 10.2217/mmt.15.4.
 7. Roesch A., Fukunaga-Kalabis M., Schmidt E.C. et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth // *Cell*. — 2010. — Vol. 141(4). — P. 583-94. — doi: 10.1016/j.cell.2010.04.020.
 8. Murphy G.F., Wilson B.J., Girouard S.D. et al. Stem cells and targeted approaches to melanoma cure // *Mol Aspects Med*. — 2013. — doi: 10.1016/j.mam.2013.10.003.
 9. Antonio Ahn, Aniruddha Chatterjee and Michael R. Eccles. The Slow Cycling Phenotype: A Growing Problem for Treatment Resistance in Melanoma // *Molecular cancer Therapeutics*. — 2017. — doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0535.
 10. Luo Y., Ellis L.Z., Dallaglio K. et al. Side Population Cells from Human Melanoma Tumors Reveal Diverse Mechanisms for Chemoresistance // *The Journal of investigative dermatology*. — 2012. — doi: 10.1038/jid.2012.161.
 11. Perego M., Maurer M., Wang J.X. et al. A slow-cycling subpopulation of melanoma cells with highly invasive properties // *Oncogene*. — 2018. — Vol. 37. — P. 302-312. — doi: <https://doi.org/10.1038/onc.2017.341>.
 12. Zhang M., Liu Y., Feng H. et al. CD133 Affects the Invasive Ability of HCT116 Cells by Regulating TIMP-2 // *Am J Pathol*. — 2013. — Vol. 182(2). — P. 565-576. — doi: 10.1016/j.ajpath.2012.10.015.
 13. Chiou-Yan Lai, Brian E. Schwartz, and Mei-Yu Hsu. CD133+ Melanoma Subpopulations Contribute to Perivascular Niche Morphogenesis and Tumorigenicity through Vasculogenic Mimicry // *Cancer Res*. — 2012. — Vol. 72(19). — P. 5111-5118. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0624.
 14. Yashwant m. deo, Tibor keler. Bispecific molecules directed to tumor associated glycoprotein-72 and fc receptor, 1997.

K.S. Titov¹, A.M. Kazakov², M.A. Baryshnikova², A.A. Markin³

The effect of tumor stem cells on prognosis for localized melanoma of the skin

¹GBUZ Moscow Clinical Scientific Center named after Loginov MHD,

²Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation,

³Federal State Budgetary Institution Scientific Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Moscow

Objective: to determine the prognostic value of tumor stem cells in patients with primary stage I-II skin melanoma.

Materials and methods: The study was conducted on surgical material from 48 patients with an established diagnosis of stage I-II skin melanoma. Planned histological examination of the material was carried out according to routine technology with an assessment of: type of melanoma, thickness (Breslow), invasion (according to Clark), the presence or absence of ulceration, the severity of lymphoid infiltration.

For immunohistochemical studies, the expression of ABCB5 and CD133 markers was carried out with monoclonal antibodies: CD133 (rabbit polyclonal to human CD133, 1: 100 dilution, ab19898, Abcam) and ABCB5 (5H3C6 clone, 1: 200 dilution, ab140667, Abcam), incubation with antibodies at 4 ° C 16-18 hours.

Expression was evaluated using a point scale of intensity (0, 1+, 2+, 3+) and the percentage (0-100%) of positive cells among all tumor cells in the sample. The statistical significance of the results was estimated by calculating the correlation coefficient by the rank method (Spearman's method).

Results: a statistically significant relationship was found between the presence of stem cell markers of melanoma tumors and 2-year overall and relapse-free survival, as well as a correlation between the presence of CSCs and a number of morphological characters.

Conclusions: the presence of tumor stem cell markers affects the 2-year prognosis in patients with primary stage I-II skin melanoma. In addition, the presence of CSCs is associated with a larger thickness of the tumor according to Breslow and a higher level of Clark invasion, more pronounced lymphoid infiltration. These data can improve the prognosis and diagnosis of patients with localized melanoma of the skin.

Key words: tumor stem cells, prognosis, localized melanoma

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.