

УДК 616.5-006.81-033.2:616-097.1

А.Ю. Барышников^{1,3}, Н.В. Голубцова¹, О.С. Бурова¹, А.Е. Бармашов¹, П.К. Иванов¹,
 К.А. Барышников¹, К.А. Парсункова², Г.З. Чкадуа¹, И.Н. Михайлова¹

ЭКСПРЕССИЯ АНТИГЕНА CD44 У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

¹ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

²ГУП «МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, кафедра иммунологии и аллергологии, Москва

Контактная информация

Барышников Анатолий Юрьевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел: +7(499)324-22-74

e-mail: baryshnikov_anat@mail.ru

Статья поступила 28.10.2013, принята к печати 01.11.2013

Резюме

Исследовано содержание сывороточного уровня CD44 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии дендритными клетками. В зависимости от исходного уровня CD44 пациенты делились на две группы (с нормальными и повышенными значениями) относительно показателей в контрольной группе доноров. В обеих группах больных был проведен анализ содержания уровня S-100. В сыворотке крови больных с исходно нормальным уровнем CD44 установлено статистически достоверное повышение уровня S-100, а у пациентов с повышенным CD44 уровень S-100 повысился незначительно ($p > 0,05$). Проведенный анализ не выявил статистически значимых различий в выживаемости больных в зависимости от начального уровня CD44 в образцах сыворотки крови пациентов обеих групп ($p > 0,05$). Медиана выживаемости пациентов в группе №1 составила $68,0 \pm 35,0$ мес. В группе №2 медиана выживаемости составила $75,0 \pm 4,6$ мес ($p > 0,05$). Был проведен анализ времени до прогрессирования пациентов в двух группах больных, распределенных в зависимости от исходного уровня CD44. В группе №1 ($n=16$) медиана времени до прогрессирования составила $14,0 \pm 7$ мес., 5 больных – с высоким временем до прогрессирования. В группе №2 ($n=15$) медиана времени до прогрессирования составила $22,0 \pm 18,0$ мес., с высоким временем до прогрессирования было 8 пациентов ($p=0,086$). Выявлена экспрессия антигена CD44 на клеточных линиях меланомы человека методом РИФ.

Ключевые слова: антиген CD44, белок S-100, вакцина, дендритные клетки, меланома.

A.Yu. Baryshnikov^{1,3}, N.V. Golubzsoya¹, O.S. Burova¹, A.E. Barmachov¹, P.K. Ivanov¹,
 K.A. Baryshnikov¹, K.A. Parsunkova², G.Z. Chkadua¹, I.N. Mikhailova¹

EXPRESSION OF THE CD44 ANTIGEN IN PATIENTS WITH METASTATIC MELANOMA OF THE SKIN

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

²«Intermedbiophyschem», Moscow

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Abstract

In this study we have the serum level of CD44 in patients with disseminated melanoma during dendritic cell vaccinotherapy. Depending on the starting level of the patients were divided into two groups (with normal values CD44 and high values) in compare with healthy donors. Was analyzed content level of S-100 marker in both groups of patients. In the serum of patients with initially normal levels of CD44 found a statistically significant increase in the level of S-100, and in patients with elevated levels of CD44 S-100 increased significantly ($p > 0,05$). The analysis of survival showed no statistically significant differences in survival depending on the initial level of CD44 in serum samples of patients in both groups ($p > 0,05$). The median survival of patients in group 1 was number $68,0 \pm 35,0$ months. In the group number 2 the median survival was $75,0 \pm 4,6$ months ($p > 0,05$). We analyzed the time to progression of patients in both groups of patients distributed depending on the starting level of CD44. In the group number 1 ($n=16$), median time to progression was $14,0 \pm 7$ months, 5 patients – high time to progression. In the group number 2 ($n=15$), median time to progression was $22,0 \pm 18,0$ months. High time to progression was 8 patients ($p=0,086$). Revealed the expression of CD44 antigen on human melanoma cell lines of the method RIF.

Key words: antigen CD44, protein S-100, vaccine, dendritic cells, melanoma.

Введение

Антиген CD44, также известный как Pgp-1, Ly-24, Hermes, lymphocyte homing receptor, H-CAM и HUTCH-1, является широко распространенным многоструктурным и многофункциональным поверхностным клеточным гликопротеидом, ответственным за адгезию клеток с клетками и клеток с матриксом, который кроме того управляющим различными клеточными сигналами. Антиген CD44 экспрессирован на всех этапах эмбриогенеза, во-

влечен в морфогенез и гомеостаз различных тканей и органов, присутствует на всех гемопоэтических клетках, за исключение тромбоцитов [9].

Антиген CD44 обнаружен на мезенхимальных стволовых клетках, гемопоэтических стволовых клетках и на стволовых опухолевых клетках [7; 10; 11]. При регенерации тканей CD44 помогает в миграции и дифференцировке. В опухоли CD44 усиливает метастазирование, самоподдержание, лекарственную резистентность и устойчивость к апоптозу [7; 8; 12].

Высокая концентрация растворимого антигена CD44 обнаружена в сыворотке крови больных раком желудка, толстой кишки и молочной железы. Антиген CD44 высоко экспрессирован в опухолевой ткани при раке молочной железы, эндометрия, толстой кишки, печени, почки, мочевого пузыря, шейки матки, кожи легкого, яичника. На стволовой опухолевой клетке антиген CD44 экспрессирован у больных раком молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, легких, головы и шеи, мочевого пузыря, яичника, предстательной железы, шейки матки, желчного пузыря, а также гепатоцеллюлярной и назофарингиальной карциноме [6].

Целью нашей работы было определение растворимого антигена CD44 в сыворотке крови больных метастатической меланомой кожи при вакцинации дендритными клетками.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы сывороток крови от 31 больного диссеминированной меланомой, получавших в течение года дендритноклеточную вакцину после удаления первичной опухоли [5]. Образцы сывороток получали до начала химиотерапии и после 1 года лечения. В качестве контроля использовались образцы сывороток крови от 15 здоровых доноров.

Растворимый антиген CD44 (sCD44std) определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью диагностических тест-систем Bender MedSystems® (Австрия). Учет результатов проводился спектрофотометрически при λ 450 нм. Результаты выражали в нг/мл [4].

Определение сывороточного уровня белка S-100 (S-100 A1B и S-100 BB формы) проводили иммуноферментным методом с использованием диагностической тест-системы CanAg Diagnostics (Швеция). Учет результатов проводился спектрофотометрически при λ 405 нм. Результаты выражали в нг/л. [4].

Экспрессию антигена CD44 на клеточной поверхности проводили методом прямой иммунофлуоресценции и оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II В работе использовали меченные FITC антитела против человеческого CD44 (BD Pharmingen). Исследовали экспрессию антигена CD44 на клеточных линиях меланомы человека mel Si, mel II, mel Z, mel Kor, mel Cher, mel Mtp и mel Ibr, полученных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН [2; 3].

Статистический анализ полученных данных проводился с помощью пакета программ EXCEL 2007 и SPSS 20.0. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Расчет выживаемости проводили методом Каплан-Майер. Сравнение двух кривых выживаемости проводили с помощью логранкового критерия.

Результаты и обсуждение

Средний уровень CD44 в сыворотке крови 31 больного диссеминированной меланомой кожи составил $414,41 \pm 85,2$ нг/мл, а у здоровых доноров – $347,99 \pm 79,23$. Несмотря на повышенный уровень CD44, различия были статистически незначимыми. Однако анализ полученных результатов показал, что у 16 больных уровень CD44 в сыворотке крови не отличался от уровня данного маркера у здоровых доноров, тогда как у 15 больных антиген CD44 был статистически значимо повышен. На основа-

нии исходного сывороточного уровня CD44, больные были разделены на две группы.

Группу №1 (n=16) составили пациенты с нормальным начальным уровнем CD44 в сыворотке крови, а группа №2 (n=15) состояла из больных с исходно повышенным сывороточным уровнем CD44 (табл. 1).

Как видно из табл., 1 исходный уровень CD44 у всех пациентов (n=31) был повышен в 1,2 раза относительно значений данного маркера в группе доноров и незначительно повысился к концу лечения. У пациентов группы №1 (n=16) начальный уровень CD44 был сопоставим со значениями данного маркера в группе здоровых доноров и достоверно повысился в 1,3 раза в ходе химиотерапии. В образцах сыворотки крови больных группы №2 (n=15) исходный уровень содержания CD44 был повышен в 1,4 раза в сравнении с контролем (группа доноров) и достоверно снизился в 1,2 раза относительно контроля (доноры) к концу проводимой терапии.

Проведенный анализ выживаемости не выявил статистически значимых различий в выживаемости больных в зависимости от начального уровня CD44 в образцах сыворотки крови пациентов в обеих группах. Медиана выживаемости пациентов в группе №1 составила = $68,0 \pm 35,0$ мес.

В группе №2 медиана выживаемости составила $75,0 \pm 4,6$ мес. ($p > 0,05$). Был проведен анализ времени до прогрессирования пациентов в двух группах больных, распределенных в зависимости от исходного уровня CD44. В группе №1 (n=16) медиана времени до прогрессирования составила $14,0 \pm 7$ мес., 5 больных – с высоким временем до прогрессирования. В группе №2 (n=15) медиана времени до прогрессирования составила $22,0 \pm 18,0$ мес., с высоким временем до прогрессирования было 8 пациентов. Однако эти различия статистически незначимы, возможно, из-за малого количества больных ($p = 0,086$).

Далее уровень CD44 сравнили с уровнем белка S-100, который коррелирует с прогрессией меланомы [1]. Группы больных №1 и №2, выделенные по уровню CD44, не различались по уровню S-100. Однако через год на фоне химиотерапии отмечено статистически достоверное повышение уровня S-100 у пациентов группы №1 ($p < 0,05$). Это может свидетельствовать о том, что невысокий уровень CD44 указывает на неблагоприятное течение заболевания (табл. 2).

Методом РИФ проводилась оценка экспрессии CD44 на клеточных линиях меланомы человека (табл. 3). Была обнаружена экспрессия антигена на всех исследованных клеточных линиях.

Заключение

Таким образом, наше исследование показало, что содержание антигена CD44 в сыворотке крови до начала лечения было повышено у половины больных диссеминированной меланомой и через год, в конце химиотерапии дендритными клетками выявлено повышенное содержание уровня CD44 у всех больных. У больных меланомой с изначально нормальным уровнем антигена CD44 содержание белка S-100, который является маркером прогрессии меланомы, достоверно повысилось ($p < 0,05$), тогда как у больных с повышенным CD44 уровень белка S-100 повысился незначительно ($p > 0,05$). Следовательно, нормальный уровень CD44 указывает на неблагоприятное течение заболевания.

Таблица 1

Содержание CD 44 в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии дендритными клетками (M±m), нг/мл

Группы	Содержание уровня CD 44 (нг/мл)	
	до лечения	после лечения
1. Все пациенты (n=31)	414,41±85,2	438±71,2*
2. Группа №1 (n= 16) нормальные значения CD 44	355,65±42,0** ***	455,36±63,0* ***
3. Группа №2 (n= 15) повышенные значения CD 44	477,66±73,6* **	419,43±86,4*
4. Контрольная группа доноров (n= 15)	347,99±79,23*	

*статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой (доноры) (p<0,05)
 **статистически достоверные различия между группами №1 и №2 (p<0,05)
 ***статистически достоверные различия внутри группы (до и после лечения) (p<0,05)

Таблица 2

Содержание уровня S-100 в сыворотке крови больных диссеминированной меланомой, распределенных в зависимости от исходного уровня CD 44 (M±m), нг/л

Группы	Содержание уровня S-100(M±m), нг/л	
	До лечения	После лечения
1. Все пациенты (n=31)	83,86±47,3	110,3±52,8
2. Группа №1 (n= 16) нормальные значения CD 44	81,9±52,1**	122,3±64,5* **
3. Группа №2 (n= 15) повышенные значения CD 44	85,8±41,4	97,41±43,5
4. Контрольная группа доноров (n= 15)	69,4±38,7*	

*статистически достоверные различия по сравнению с группой доноров (p<0,05)
 **статистически достоверные различия внутри группы (до и после лечения) (p <0,05)

Таблица 3

Экспрессия CD44 на клеточных линиях

Название линии	Степень дифференцировки	Отрицательный контроль	CD 44 (%)
mel Si	высоко-дифференцированные	0,1±0,2	100,0±0,2
mel IL	умеренно-дифференцированные	0,1±0,2	99,9±0,2
mel z	умеренно-дифференцированные	0,1±0,2	99,9±0,2
mel Kor	низко-дифференцированные	0,1±0,2	99,1±0,2
mel Cher	низко-дифференцированные	0,1±0,2	99,8±0,2
mel Mtp	низко-дифференцированные	0,1±0,2	98,7±0,2
mel Ibr	низко-дифференцированные	0,1±0,2	93,3±0,2
mel Ibr (клон)	низко-дифференцированные	0,1±0,2	96,4±0,2

При анализе времени до прогрессирования в двух группах больных, распределенных в зависимости от исходного уровня CD44, в группе с нормальными значениями CD44 у 5 из 16 пациентов отмечено высокое время до прогрессирования, а медиана времени до прогрессирования составила 14,0±7 мес.

В группе с повышенными значениями CD44 медиана времени до прогрессирования составила 22,0±18,0 мес., высокое время до прогрессирования отмечено у 8 из 15 больных меланомой, Также методом РИФ выявлена высокая экспрессия антигена CD44 на всех исследованных клеточных линий меланомы человека.

Литература

1. Голубцова Н.В., Михайлова И.Н., Новиков В.В. и др. Прогностическое значение сывороточных уровней растворимых молекул HLA I класса и антигена CD8 у больных диссеминированной меланомой // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т.9. – №4. – С. 103–6.
2. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
3. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Бутова О.С., и др. Сравнение уровня экспрессии HSP70 на клеточных линиях меланомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т.9, № 1. – С. 43–7.
4. Парсункова К.А., Михайлова И.Н., Евсегнеева И.Н. и др. Сравнительный анализ содержания S-100, CD44, TGF-beta1, VEGF-A в сыворотке крови больных с диссеминированной меланомой на фоне вакцинотерапии // Молекулярная медицина. – 2010. – №6. – С. 34–9.
5. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А. А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 56–62.
6. Hareda N., Mizoi T., Kinouchi M. et al. Introduction of antisense CD44s CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells // Int J Cancer. – 2001. – 91. – P. 67–75.
7. Iczkowski K.A. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer // Am J Transl Res. – 2011. – 3. – P. 1–7.
8. Lesley J., Hyman R., Kincade P.W. CD44 and its interaction with extracellular matrix // Adv Immunol. – 1993. – Vol. 54. – P. 271–335.
9. Naor D., Wallach-Dayana S.B., Zahalka M.A., Slonon R.V. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination // Semin Cancer Biol. – 2008. – 18. – P. 260–87.
10. Pham Ph.V. et al. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy // Journal of Transl. Medicine. – 2011. – 9– P.1–13.
11. Tran C.P., Yamashiro J., Reiter R.E. Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediare prostate epithelial cells // Mol Cancer Res. – 2002. – 1. – P. 113–21.
12. Underhill C. CD44 – the hyaluronen receptor // Cell Sci. – 1992. – 103. – P. 293–8.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

Работа может быть статьей экспериментального или клинического характера, теоретической или концептуальной, обзором по материалам литературы, рецензией, сообщением дискуссионного, исторического или хроникального характера, рефератом зарубежных работ.

Статьи экспериментального или клинического характера имеют разделы: Резюме; Введение; **Материалы и методы**; **Результаты и обсуждение**; **Выводы (Заключение)**; **Литература**.

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера имеют разделы: **Резюме**; **Введение**; **Разделы по отдельным обсуждаемым вопросам**; **Выводы**; **Литература**.

Статья должна быть представлена в виде файла формата RTF на дискете или CD и распечатана в 2 экземплярах. На внешней стороне дискеты или коробке CD должны быть указаны фамилия первого автора, названия статьи и файлов.

В основном файле должен содержаться текст статьи, таблицы, подписи и надписи к рисункам, список литературы. Кроме того, на дискете или CD должны быть записаны рисунки (каждый в виде отдельного файла).

Штриховые и тоновые рисунки (фотографии, рентгенограммы и т.д.), то есть растровая графика, должны быть сохранены в виде файлов формата TIF или JPEG, графики и диаграммы (векторная графика) – в виде файлов формата EPS. Если автор не работает с современными программными пакетами для создания векторной графики, можно прислать график в виде файла Microsoft Excel 5.0/95 с обязательным приложением в виде таблицы, по которой данный график построен.

Обзорные статьи не должны превышать 17 страниц, оригинальные статьи – 12 страниц.

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 12 через полуторный интервал. Текст должен быть выровнен по левому краю.

Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, начиная со второй. Каждый абзац должен начинаться с красной строки, которая устанавливается меню «Абзац».

Не следует использовать для красной строки клавишу Tab. Десятичные дроби следует писать через запятую. При наборе текста следует различать дефис и тире. Последнее вводится одновременным нажатием клавиш Ctrl+Alt+дефис с дополнительной клавиатуры при горящем указателе Num Lock.

Набирая заголовки, названия разделов, таблиц, подписи и надписи на рисунках, точку в конце ставить не нужно. Выравнивать по центру и устанавливать красную строку для всего перечисленного также не нужно.

В начале статьи следует указать *имя, отчество и фамилии авторов* полностью, **НАЗВАНИЕ СТАТЬИ**, место работы в именительном падеже (если авторы работают в разных учреждениях, уточнить это дополнительно), должность и контактную информацию для каждого автора (почтовый **адрес, e-mail**). Авторы несут ответственность за точность предоставляемой ими информации о себе и месте своей работы.

В начале статьи должно быть приведено **Резюме**. В нем должны быть кратко без рубрики указаны цель исследования, материалы и методы, полученные автором результаты и основные выводы. В конце резюме автор приводит **Ключевые слова** работы (не более 5). Рекомендуемый объем реферата – 500–1000 печатных знаков. Отступление от этой схемы допустимо только в отношении обзорных статей.

Далее необходимо на английском языке дать фамилии авторов и их инициалы, название статьи, название учреждений, резюме (**Abstract**) и ключевые слова (**Key words**).

Статья должна быть написана ясно, четко, лаконично, тщательно выверена авторами, не содержать повторов и исправлений. Сокращения допустимы только в отношении часто встречающихся в статье терминов. Сокращение вводится при первом вхождении в круглых скобках и в дальнейшем используется по всему тексту.