

## Стволовые опухолевые клетки – новые горизонты в прогнозе течения рака молочной железы

Е.А. Маслюкова<sup>1</sup>, С.И. Заброда<sup>1</sup>, Л.И. Корытова<sup>1</sup>, К.М. Пожариский<sup>1</sup>, Г.А. Раскин<sup>1</sup>, О.В. Корытов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России;

Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70;

<sup>2</sup>ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;

Россия, 195009, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 5

**Контакты:** Сергей Иванович Заброда [zabrodasergey@yandex.ru](mailto:zabrodasergey@yandex.ru)

Несмотря на прогресс в лечении рака молочной железы (РМЖ) с помощью комбинированного подхода с учетом морфологических данных, отдаленные метастазы могут развиваться у 30–90 % пациентов с первичным РМЖ, даже на ранних стадиях данного заболевания. Одной из версий, которые могли бы по крайней мере частично объяснить неэффективность лечения, является теория раковых стволовых клеток (cancer stem cells). Эта теория предполагает, что рак может возникать и развиваться из небольшой части стволовых клеток, которые способны вызывать рост опухоли, а также влиять на резистентность к химио- и лучевой терапии. Раковые стволовые клетки были идентифицированы в различных злокачественных опухолях, включая РМЖ, рак простаты, толстой кишки, поджелудочной железы, головы и шеи, меланому и множественные миеломы.

В настоящем исследовании мы проанализировали экспрессию альдегиддегидрогеназы 1-го типа (ALDH1) у больных РМЖ. Кроме того, исследовали взаимосвязь между наличием этого маркера и клинико-патологическими особенностями РМЖ. В исследование были включены 83 пациентки с местно-распространенным РМЖ (T1–4N0–3M0), получавшие лечение с 2005 по 2009 г. В целях обнаружения стволовых раковых клеток проводилось иммуногистохимическое исследование ALDH1 в 83 гистологических образцах, полученных при биопсии у больных РМЖ, пролеченных в ФГБУ РНЦРХТ. Иммуногистохимическое исследование выполнялось по разработанному протоколу. Анализ зависимости времени до возникновения метастазов от экспрессии ALDH1 показал статистически достоверное уменьшение времени до прогрессирования заболевания при высокой экспрессии ALDH1 (high) у больных РМЖ по сравнению с группой больных с низкой экспрессией ALDH1 (low). Аналогичная закономерность наблюдалась при оценке общей выживаемости. Выживаемость больных, у которых опухолевые клетки имели экспрессию ALDH1 меньше 1 %, была статистически выше, чем в группе больных, где выявлялась высокая экспрессия ALDH1 – больше 1 %.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, стволовые опухолевые клетки, ALDH1, резистентность к химиотерапии, резистентность к лучевой терапии

DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-3-10-14

### Cancer stem cells are new vistas for predicting the course of breast cancer

E.A. Maslyukova<sup>1</sup>, S.I. Zabroda<sup>1</sup>, L.I. Korytova<sup>1</sup>, K.M. Pozharissky<sup>1</sup>, G.A. Raskin<sup>1</sup>, O.V. Korytov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia;

70 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg, 197758, Russia;

<sup>2</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia;

5 Academician Lebedev St., Saint Petersburg, 195009, Russia

Despite progress in treating breast cancer (BC) using a combined approach in view of morphological findings, distant metastases may develop in 30–90 % of patients with primary BC even at its early stages. The cancer stem cell (CSC) theory is one of the versions that could at least partially explain therapeutic inefficiency. This theory suggests that cancer may occur and arise from a small proportion of stem cells that are able to induce tumor growth and to affect resistance to chemo- and radiotherapy. CSCs were identified in different malignant tumors, including BC, cancer of the prostate, colon, pancreas, head and neck, melanoma, and multiple myelomas.

This investigation analyzed aldehyde dehydrogenase type 1 (ALDH1) expression in patients with BC. Moreover, the investigators examined the relationship between this marker and the clinical and pathological features of BC. The investigation enrolled 83 locally advanced BC (T1–4N0–3M0) patients treated in 2005 to 2009. To detect CSCs, 83 histological specimens obtained at biopsy in BC patients treated at the Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies underwent immunohistochemical examination for ALDH1 according to the developed protocol. Analysis of a relationship between time to metastases and ALDH1 expression showed a statistically significant decrease in time to disease progression in BC patients with high ALDH1 expression versus those with low ALDH1 expression. The similar trend was observed in overall survival. The survival of patients with less than 1 % ALDH1 expression in the cancer cells was statistically higher than that in the patients with high ALDH1 expression (more than 1 %).

**Key words:** breast cancer, cancer stem cells, ALDH1, chemotherapy resistance, radiotherapy resistance

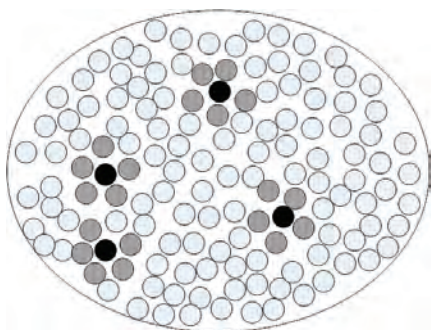
### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) в настоящее время занимает 1-е место среди причин смерти от рака у женщин и является гетерогенным заболеванием, которое подразделяется на различные гистологические подтипы [1].

Несмотря на прогресс в лечении РМЖ с помощью комбинированного подхода с учетом морфологических данных, отдаленные метастазы могут развиваться у 30–90 % пациентов с первичным РМЖ, даже на ранних его стадиях. Одной из версий, которые могли бы по крайней мере частично объяснить неэффективность лечения, является теория раковых стволовых клеток (cancer stem cells, CSC). Эта теория предполагает, что рак может возникать и развиваться из небольшой части стволовых клеток, которые способны вызывать рост опухоли, а также влиять на резистентность к химио- и лучевой терапии (рис. 1) [2, 3].

CSC были идентифицированы в различных злокачественных опухолях, включая РМЖ, рак простаты, толстой кишки, поджелудочной железы, головы и шеи, меланому и множественные миеломы [4–6]. В 2003 г. М. Al-Hajj и соавт. впервые использовали CD24 и CD44 в качестве клеточно-поверхностных маркеров стволовых клеток [7]. CD24 и CD44 используются для выделения клеток со свойствами стволовой клетки из множественных типов опухоли, включая РМЖ, рак простаты, кишечника, поджелудочной железы и сквамозно-клеточные карциномы головы и шеи. С. Ginestier и соавт. показали, что альдегиддегидрогеназа 1-го типа (ALDH1) может быть лучшим маркером для характеристики стволовых клеток РМЖ, высокое содержание которых в опухоли является предиктором плохого прогноза [2].

Высокая экспрессия ALDH1 коррелирует с более агрессивными подтипами РМЖ [8]. В работах разных авторов было показано, что более высокая экспрессия ALDH1 связана с резистентностью к химиотерапии и низкой выживаемостью [9, 10].



**Рис. 1.** Схема цитологического состава опухоли согласно стволовклеточной концепции канцерогенеза. Основную массу составляют пролиферирующие опухолевые клетки на разных ступенях дифференцировки (светлые круги). CSC обозначены черным цветом, их минимальное количество. Крапчатые клетки — предшественники, происходящие из CSC, которые дают начало всей остальной клеточной популяции

В настоящее время становится очевидным, что обычная гистологическая оценка рака, включая тип опухоли, ее дифференцировку и стадию, не всегда является адекватной для предсказания поведения РМЖ. Влияние новых информативных диагностических и прогностических маркеров по-новому представляет современные проблемы патологии РМЖ.

**Цель исследования** — выявить зависимости между выраженностью экспрессии ALDH1 в опухолевых клетках, временем до прогрессирования и выживаемостью.

### Материалы и методы

В настоящем исследовании мы проанализировали экспрессию ALDH1 у больных РМЖ. Кроме того, исследовали взаимосвязь между наличием этого маркера и клинико-патологическими особенностями РМЖ.

В исследование были включены 83 пациентки с местно-распространенным РМЖ (T1–4N0–3M0), находившиеся на лечении с 2005 по 2009 г. Критериями включения являлись гистологически подтвержденный диагноз инвазивного РМЖ, возраст старше 18 лет, ECOG 0 или 1. Все необходимые клинические данные были получены при детальном изучении медицинской документации, а также при динамическом наблюдении пациенток.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 8. Для сравнения клинико-морфологических характеристик среди групп ALDH1 (high) и ALDH1 (low) использовались критерий  $\chi^2$  и тест Фишера. Общая выживаемость (ОВ) была определена как продолжительность жизни (в месяцах) между датой постановки диагноза и датой смерти. Для построения кривых выживания использовали Метод Каплана–Майера, а тесты Кокса и Вилкоксона — для оценки статистических различий между этими 2 группами. Величина  $p < 0,005$  считалась статистически значимой.

### Иммуногистохимическое исследование

В целях обнаружения CSC проводилось иммуногистохимическое исследование ALDH1 в 83 гистологических образцах, полученных при биопсии у больных РМЖ, пролеченных в ФГБУ РНЦРХТ. Иммуногистохимическое исследование выполнялось по разработанному протоколу. Антитело к ALDH1 было кроличьим моноклональным (клон EP1932Y), разведение 1:200. Инкубация антитела проводилась в условиях холодильной камеры (4–8 °C) в течение ночи, что являлось особенностью методики. Оценка иммуногистохимического окрашивания осуществлялась путем подсчета числа позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток (рис. 2–4). Количество окрашенных клеток более 1 % относилось к группе с высоким содержанием CSC — ALDH1 (high) (1-я группа), менее 1 % — с низким содержанием —



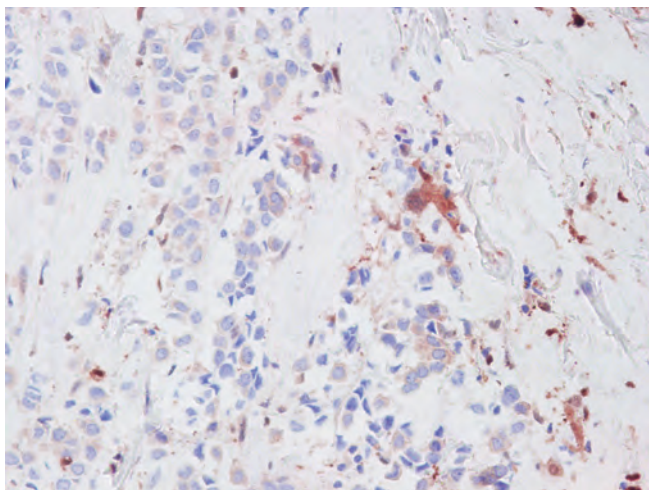


Рис. 2. Положительная экспрессия ALDH1 – 1 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток

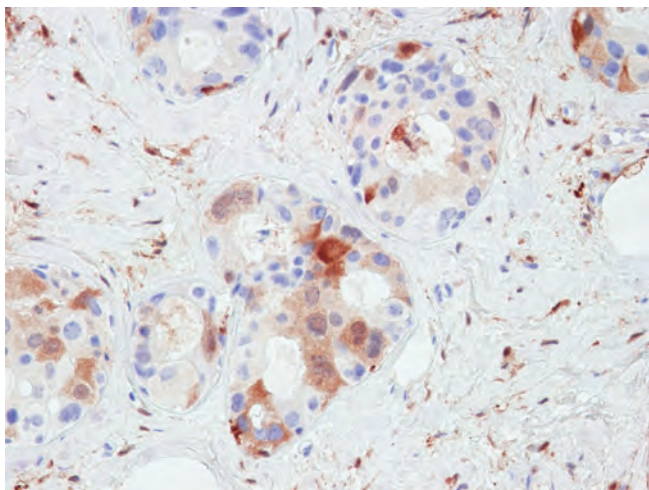


Рис. 3. Положительная экспрессия ALDH1 – 20 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток

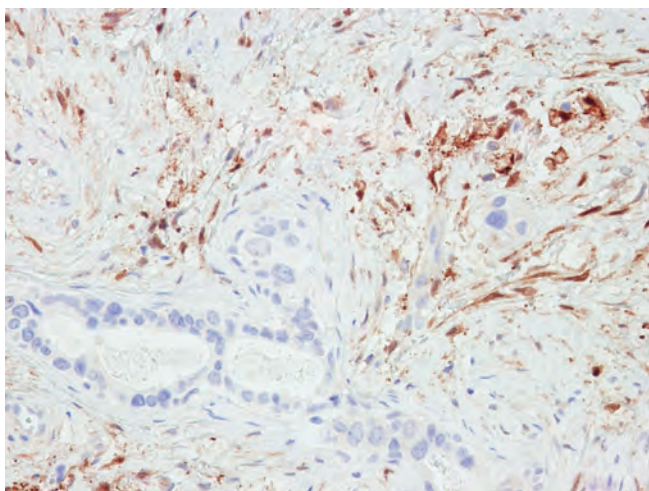


Рис. 4. Отсутствие экспрессии ALDH1 – 0 % позитивных клеток относительно общего числа опухолевых клеток

ALDH1 (low) (2-я группа). В 1-ю группу вошли 16 пациенток, во 2-ю – 67.

По течению заболевания пациенток разделили на группу благоприятного прогноза – 20 больных, которые не имели метастазов в течение 5 лет после хирургического лечения, и группу неблагоприятного прогноза – 63 пациентки, у которых метастазы возникли в течение 5 лет после установления диагноза.

### Результаты

Для разделения больных на подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, HER-2-позитивный люминальный, ErbB-2 нелюминальный и трижды негативный) применялись рекомендации St. Gallen (2011) [11]. Большинство больных в обеих группах (80,7 %) имели гормоноположительные опухоли и относились к типу люминальный А или люминальный В. Индекс Ki-67 в группе благоприятного прогноза колебался в интервале от 2 до 50 %, среднее значение составило 13,6 %. В группе больных неблагоприятного прогноза минимальное значение Ki-67 составило 2 %, максимальное – 80 %, среднее – 20,4 %. В группе больных, где метастазы не возникли в течение 5 лет, низкие значения пролиферативного индекса ( $Ki-67 < 14$ ) встречались достоверно чаще, чем в группе плохого прогноза ( $p = 0,0123$ ). В группе больных с благоприятным прогнозом (метастазы не возникли в течение 5 лет) CSC не были выявлены ни в одном случае. В группе пациенток с неблагоприятным прогнозом (у всех в течение 5 лет появились отдаленные метастазы) высокое содержание ALDH1 установлено в 16 образцах опухолевой ткани, взятой при биопсии. Это свидетельствует о прогностической значимости данного маркера ( $p = 0,0121$ ; табл. 1)

При анализе клинико-патологических характеристик больных РМЖ с учетом экспрессии ALDH1 не было отмечено каких-либо статистически значимых различий в отношении наличия или отсутствия пораженных регионарных лимфатических узлов, категории Т, подтипа РМЖ и индекса Ki-67. Однако выявлена следующая закономерность: высоко и умеренно дифференцированные опухоли чаще встречались в группе ALDH1 (low), тогда как низкодифференцированные – в группе ALDH1 (high) ( $p = 0,006$ ; табл. 2).

Анализ зависимости времени до возникновения метастазов от экспрессии ALDH1 показал статистически достоверное уменьшение времени до прогрессирования заболевания при экспрессии ALDH1 (high) у больных РМЖ по сравнению с группой больных с экспрессией ALDH1 (low).

Cox's F-Test:  $T1 = 43,15441$ ;  $T2 = 6,845593$ ;  $F(70, 28) = 2,521588$ ;  $p = 0,00401$ . Gehan's Wilcoxon Test:  $WW = 278,00$ ;  $Sum = 1062E2$ ,  $Var = 17430$ ,  $Test\ statistic = 2,101909$ ;  $p = 0,03556$  (рис. 5).

Таблица 1. Клинико-патологические характеристики больных РМЖ

Характеристика	Группа благоприятного прогноза	Группа неблагоприятного прогноза	<i>p</i>
Возраст, годы:			
< 50	5	20	0,566
> 50	15	43	
Стадия Т:			
T1	5	25	0,208
T2	5	20	
T3	2	6	
T4	8	12	
Статус лимфоузлов:			
N (+)	17	52	0,798
N (-)	3	11	
Гистологический тип:			
протоковый	17	60	0,123
дольковый	3	3	
Люминальный А	14	28	0,093
Люминальный В	2	23	
HER-2 люминальный	2	2	
ErbB-2	0	3	
Трижды негативный	2	7	
Степень злокачественности:			
1 или 2	17	58	0,351
3	3	5	
Ki-67:			
> 14 %	5	36	0,0123
≤ 14 %	15	27	
ALDH1 (high)	0	16	0,0121
ALDH1 (low)	20	47	

Таблица 2. Клинико-патологические характеристики больных РМЖ с учетом экспрессии CSC

Признак	Статус	ALDH1 (high)	ALDH1 (low)	<i>p</i>
Регионарные лимфатические узлы	0 1	14 2	55 12	0,603
Стадия	T1 T2 T3 T4	4 4 1 7	25 22 7 13	0,313
Подтип РМЖ	Люминальный А Люминальный В HER-2 люминальный ErbB-2 Трижды негативный	7 7 0 1 1	35 18 4 2 8	0,539
Ki-67	> 14 % ≤ 14 %	5 11	32 35	0,232
Степень злокачественности	1 или 2 3	13 3	62 5	0,006

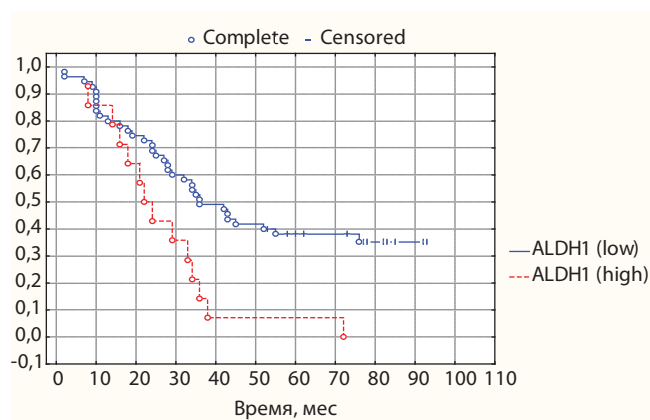


Рис. 5. Время до прогрессирования (возникновения метастазов) у больных РМЖ в зависимости от экспрессии ALDH1

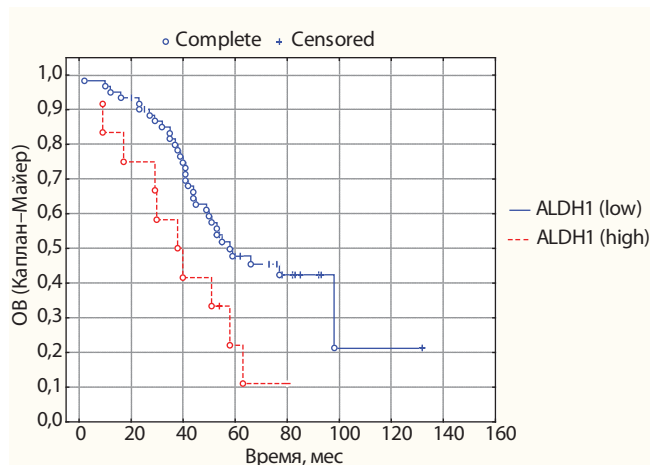


Рис. 6. ОВ больных РМЖ в зависимости от экспрессии ALDH1 в опухоли

Аналогичная закономерность наблюдалась при оценке ОВ. Выживаемость больных, у которых опухолевые клетки имели экспрессию ALDH1 меньше 1 %, была статистически выше, чем в группе больных, где выявлялась экспрессия ALDH1 больше 1 %. Достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждалась тестами Gehan's Wilcoxon и Cox's F-Test.

Gehan's Wilcoxon Test: WW = 258,00; Sum = 1091E2, Var = 15 190; Test statistic = 2,089319; *p* = 0,03668. Cox's F-Test: T1 = 38,92074; T2 = 5,079257; F (66, 20) = 2,322025; *p* = 0,01904 (рис. 6).

### Обсуждение

Важным свойством CSC является их способность к самообновлению и генерации гетерогенной популяции раковых клеток. Пролиферация является важной характеристикой в биологии опухолей [8]. ALDH1-положительные раковые клетки высоко клоногенные и онкогенные при исследовании *in vitro*. Хотя ALDH1-положительные клетки РМЖ, как полагают, непосредственно отвечают за рост

раковых клеток *in vitro*, оценка ALDH1 в опухолевых клетках в естественных условиях до сих пор проводилась на небольшом клиническом материале. В настоящем исследовании высокая положительная экспрессия ALDH1 наблюдалась в 13,28 % (16 из 83) гистологических образцов инвазивной протоковой карциномы. Доля образцов положительного окрашивания для ALDH1 согласуется с выводами, полученными при исследовании других опухолей, таких как опухоли головы и шеи, при этом выше, чем субпопуляции ALDH1-позитивных клеток у пациентов с раком мочевого пузыря или легких [9, 12–14]. Клиническое описание фенотипа ALDH1 представляет интерес для дополнительного прогноза течения заболевания. Так, например, в работе М. Sakakibara и соавт. была продемонстрирована корреляционная связь между повышенной экспрессией ALDH1 в опухолевых клетках со степенью злокачественности и стадией у больных РМЖ. У пациенток с высокой экспрессией ALDH1 чаще наблюдалось возникновение рецидивов и были менее продолжительными сроки выживаемости [14]. В параллельных исследованиях Е. Rozetkova (2007) и Р. Sansone (2007) опухоли с высоким содержанием ALDH1 ассоциировались с трижды негативным подтипом РМЖ [15, 16].

В нашем исследовании не установлено зависимости между степенью экспрессии ALDH1 в опухоли и возрастом, TNM-стадией, гормональным статусом или поражением лимфатических узлов. Не исключено, что это связано с однородностью выборки, так как большинство пациенток имели гормонопозитивный статус. Мы наблюдали прямую взаимосвязь между экспрессией ALDH1, степенью дифференцировки опухоли, пролиферативным индексом Ki-67, временем до возникновения метастазов, а также выживаемостью.

### Выводы

Определение ALDH1 в опухолевых клетках несет дополнительный прогностический потенциал для предсказания течения заболевания у больных РМЖ. Особенный интерес представляет группа люминального рака, когда, несмотря на, казалось бы, благоприятное течение болезни, часть пациенток прогрессирует. Наличие дополнительного прогностического маркера, такого как ALDH1, позволит определить когорту больных для более тщательного мониторинга.

Настоящее исследование подчеркивает важность статуса ALDH1 в исследовании CSC и определяет ALDH1 как потенциальный прогностический маркер и, возможно, в будущем — терапевтическую мишень для лечения больных РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 2010;4(3):192–208.
2. Li X., Lewis M.T., Huang J. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(9):672–9.
3. Phillips T.M., McBride W.H., Pajonk F. The response of CD24(–/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(24):1777–85.
4. Collins A.T., Berry P.A., Hyde C. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946–51.
5. Li C., Heidt D.G., Dalerba P. et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030–7.
6. Matsui W., Huff C.A., Wang Q. et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2332–6.
7. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3983–8.
8. Morimoto K., Kim S.J., Tanei T. et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci* 2009;100:1062–8.
9. Noguchi S. Association of breast cancer stem cells identified by aldehydedehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009;15:4234–41.
10. Tanei T., Morimoto K., Shimazu K. et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res* 2009;15:4234–41.
11. Семиглазов В.Ф. Опухоли репродуктивной системы. Клинические рекомендации по диагностике и лечению рака молочной железы. СПб., 2013. С. 149–50. [Semiglazov V.F. Reproductive system tumors. Clinical recommendations on the diagnosis and treatment of the breast cancer. Saint-Petersburg, 2013. Pp. 149–50. (In Russ.).]
12. Gong C., Yao H., Liu Q. et al. Markers of tumorinitiating cells predict chemoresistance in breast cancer. *PLoS One* 2010;5:15630.
13. Lee H.E., Kim J.H., Kim Y.J. et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 2011;104:1730–8.
14. Sakakibara M., Fujimori T., Miyoshi T. et al. Aldehydedehydrogenase 1-positive cells in axillary lymph node metastases after chemotherapy as a prognostic factor in patients with lymph nodepositive breast cancer. *Cancer* 2012;118:3899–910.
15. Resetkova E., Reis-Filho J.S., Jain R.K. et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:97–108.
16. Sansone P., Storci G., Tavolari S. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* 2007;117:3988–4002.