

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© Коллектив авторов

### ЭКСПРЕССИЯ ГАНГЛИОЗИДА GD2 НА КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ

*А.Ю. Лунатов<sup>1</sup>, А.М. Гисина<sup>1</sup>, Я.С. Ким<sup>1</sup>, С.А. Быкасов<sup>2</sup>,  
Н.Н. Волченко<sup>2</sup>, Д.В. Сидоров<sup>2</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>1</sup>, Р.В. Холоденко<sup>3\*</sup>*

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул., 10

<sup>2</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена –  
филиал “Национального медицинского исследовательского центра радиологии” Минздрава России,  
125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; \*эл. почта: khol@mail.ru

Методом проточной цитометрии исследована экспрессия ганглиозида GD2 на клетках линий колоректальной аденокарциномы HT29 и CaCo-2, а также на образцах опухолевой ткани от больных колоректальным раком. Исследуемый маркер фактически отсутствовал на клеточных линиях, но экспрессировался на EpCAM-позитивных опухолевых клетках у 6 из 12 пациентов. Экспрессия GD2 не была ассоциирована с субпопуляцией раковых стволовых клеток, поскольку уровень его экспрессии не отличался на CD133-позитивных и CD133-негативных клетках. Таким образом, впервые выявлено присутствие ганглиозида GD2 на клетках колоректальной аденокарциномы, что открывает возможность использования таргетной терапии для лечения этого заболевания.

**Ключевые слова:** колоректальный рак; ганглиозид GD2; таргетная терапия; CD133; EpCAM

**DOI:** 10.18097/PBMC20206601095

## ВВЕДЕНИЕ

Ганглиозид GD2 является перспективной молекулярной мишенью для таргетной терапии рака. Эта молекула относится к классу гликофинголипидов и гиперэкспрессируется на ряде опухолей преимущественно нейроэктодермального происхождения. В настоящий момент ганглиозид GD2 считается общепризнанным онкомаркером нейробластомы, в лечении которой применяют препарат на основе GD2-специфичных антител [1]. Такое лечение увеличивает 5-летнюю выживаемость пациентов и становится общепринятым в США и странах Западной Европы [2]. Для увеличения эффективности таргетной терапии GD2-позитивных опухолей разрабатываются новые подходы, которые включают в себя создание иммуноконъюгатов и адресных наночастиц, применение адоптивной иммунотерапии (CAR T-клеток), а также биспецифических антител и их фрагментов [3]. Кроме нейробластомы ганглиозид GD2 присутствует и на клетках других опухолей, таких как глиома, меланома, медуллобластома, различные саркомы, ретинобластома, мелкоклеточный рак лёгкого [4]. В ряде работ было показано, что ганглиозид GD2 представлен также на опухолях, которые ранее считались GD2-негативными. Так, было установлено, что ганглиозид GD2 экспрессируется на клетках рака молочной железы [5], причём преимущественно при тройном негативном варианте данного заболевания, не имеющем пока эффективных способов лечения.

Одним из самых распространённых и опасных онкологических заболеваний является колоректальный рак. Колоректальная аденокарцинома

составляет около 10% от всех ежегодно диагностируемых опухолей [6]. Для лечения этой опухоли используются различные подходы, в том числе таргетная терапия, которая имеет хорошие перспективы, особенно при лечении метастазов. В то же время, количество онкомаркеров колоректальной аденокарциномы, на которые может быть направлена таргетная терапия, ограничено [7]. В настоящий момент колоректальную аденокарциному не относят к GD2-позитивным опухолям и возможность использования данного маркера для её таргетной терапии не рассматривают.

Целью данного исследования был анализ экспрессии ганглиозида GD2 на поверхности раковых клеток, выделенных из опухолевого материала, полученного после хирургического лечения больных колоректальной аденокарциномой, а также оценка его экспрессии на ряде клеточных линий этой опухоли.

## МЕТОДИКА

В исследование включено 12 пациентов (6 женщин и 6 мужчин) в возрасте от 49 до 80 лет с диагнозом колоректальный рак на I-IV стадиях, подвергшихся на первом этапе только хирургическому лечению. Забор опухолевого материала осуществлялся сразу после завершения резекционного этапа операции. Ткань опухоли около 0,5 см<sup>3</sup> помещали в раствор Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) с добавлением антибиотика/антимикотика (“Gibco”, США) для предотвращения бактериальной и грибковой контаминации, переносили в чашки Петри, очищали от элементов крови и участков некроза, после чего измельчали с помощью скальпеля.

## ЭКСПРЕССИЯ GD2 НА КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ

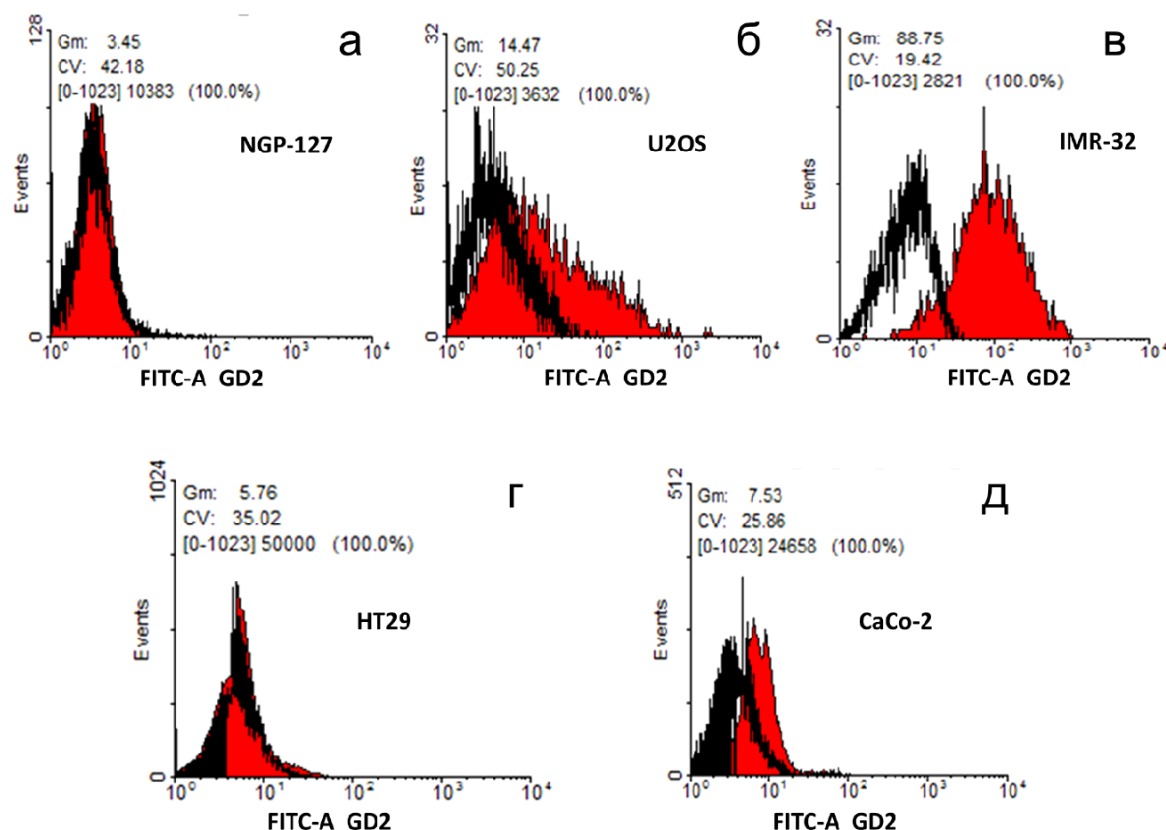
Измельчённую ткань инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы IV типа ("Gibco") в течение 30 мин при 37°C при постоянном перемешивании. По окончании инкубации суспензию фильтровали через фильтр 70 мкм, центрифугировали в течение 5 мин при 300 g и ресуспендировали в растворе Хэнкса. Клеточные линии нейробластом IMR-32 и NGP-127, а также остеосаркомы U2OS были получены из банка клеточных культур Института биоорганической химии РАН. Линии колоректальной аденокарциномы HT29 и CaCo-2 получены из банка культур Научно-исследовательского института биомедицинской химии и были верифицированы при помощи анализа коротких tandemных повторов ДНК. Клеточные линии выращивали на среде DMEM ("ПанЭко") с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телёнка ("Gibco"). Для получения клеточной суспензии клетки открепляли от подложки смесью растворов трипсина и Версена ("ПанЭко"). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

Клетки, выделенные из опухолевой ткани, или клетки опухолевых линий отмывали в растворе Хэнкса и окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к поверхностным маркерам. В работе использовали AF488-меченные GD2-специфичные антитела 14G2a ("Santa Cruz", США), PE-меченные EpCAM-специфичные антитела ("BD Biosciences", США) и APC-меченные CD133-специфичные антитела ("Miltenyi Biotec", Германия). Моноклональные

антитела 14G2a являются строго специфичными к ганглиозиду GD2 и не имеют кросс-реактивности с другими ганглиозидами [8]. После инкубации с антителами в течение 1 ч клетки дважды отмывали фосфатным буфером. Измерение проводили на проточном цитофлуориметре FACS Aria III ("BD Biosciences"). Клеточный дебрис и агрегаты исключали по параметрам прямого и бокового светорассеяния. Для исключения мёртвых клеток использовали SYTOX™ Blue dead cell stain ("ThermoFisher Scientific", США). Относительную интенсивность флуоресценции (ИФ) рассчитывали как отношение медианы интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных мечеными антителами, к ИФ контрольных неокрашенных клеток. Результаты измерений обрабатывали в программе WinMDI. Достоверность различий оценивали с помощью пакета программ STATISTICA. Достоверными считали различия при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы было проведено сравнение экспрессии ганглиозида GD2 на клеточных линиях с известным GD2-фенотипом и линиях колоректальной аденокарциномы. Были использованы GD2-позитивные линии нейробластомы IMR-32 и остеосаркомы U2OS, отличающиеся по уровню экспрессии GD2, а также GD2-негативная линия нейробластомы NGP-127 (рис. 1 а-в). Колоректальная



**Рисунок 1.** Цитометрический анализ экспрессии ганглиозида GD2 на клетках опухолевых линий. Заполненная кривая – клетки, окрашенные антителами к GD2, конъюгированными с FITC. Незаполненная кривая – те же клетки, не окрашенные антителами (негативный контроль). По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах; по оси ординат – количество регистрируемых событий (клеток).

аденокарцинома была представлена линиями HT29 и CaCo-2. Цитометрический анализ показал отсутствие связывания GD2-специфичных антител с клетками линии HT29 и слабое связывание с клетками линии CaCo-2 (рис. 1 г-д). Полученные результаты в целом соответствуют представлениям о колоректальной карциноме, как о GD2-негативной опухоли, однако необходим дополнительный анализ экспрессии ганглиозида GD2 на большем количестве клеточных линий колоректального рака с целью поиска возможной GD2-позитивной клеточной модели этого заболевания.

На следующем этапе работы был проведён анализ опухолевых клеток, изолированных непосредственно из опухолевой ткани пациентов с колоректальной аденокарциномой. Для этого клеточные суспензии окрашивали как GD2-специфичными антителами, так и антителами к ЕрСАС. Молекула адгезии эпителиальных клеток (ЕрСАС) использовалась в качестве маркера раковых клеток. ЕрСАС характеризуется высокой экспрессией на большинстве злокачественных клеток эпителиального происхождения, включая аденокарциному кишечника [9], что позволяет отличать их от клеток опухолевой стромы и крови, также присутствующих в клеточной суспензии, полученной из опухолевой ткани. В отличие от клеточных линий, анализ биологического материала от пациентов выявил экспрессию GD2 на половине исследованных образцов от пациентов разного пола, возраста и стадии заболевания. Результаты измерений представлены в таблице. Уровень экспрессии GD2 на опухолевых клетках, обнаруженный в результате совместного окрашивания антителами к ЕрСАС и GD2, значительно отличался у различных пациентов (рис. 2 а-в).

Поскольку считается, что ганглиозид GD2 может выступать маркером раковых стволовых клеток (РСК) эпителиального происхождения [10] мы проанализировали его совместную экспрессию с наиболее часто используемым маркером РСК колоректальной аденокарциномы – промиелином-1 (CD133) [11]. Известно, что небольшая по объёму субпопуляция CD133-позитивных клеток, присутствующая в образцах колоректального рака, способна инициировать опухолевый процесс в ксенографтных моделях, что свидетельствует о её принадлежности к РСК [12]. В связи с этим, все образцы опухолевой ткани были проанализированы на совместную экспрессию CD133 и GD2 в популяции ЕрСАС-позитивных опухолевых клеток. В результате анализа мы не выявили преимущественной локализации ганглиозида GD2 на клетках с CD133-позитивным фенотипом. В большинстве случаев GD2 экспрессировался с одинаковой интенсивностью как на опухолевых клетках, ассоциируемых с субпопуляцией РСК, так и на других опухолевых клетках (рис. 2 г-д).

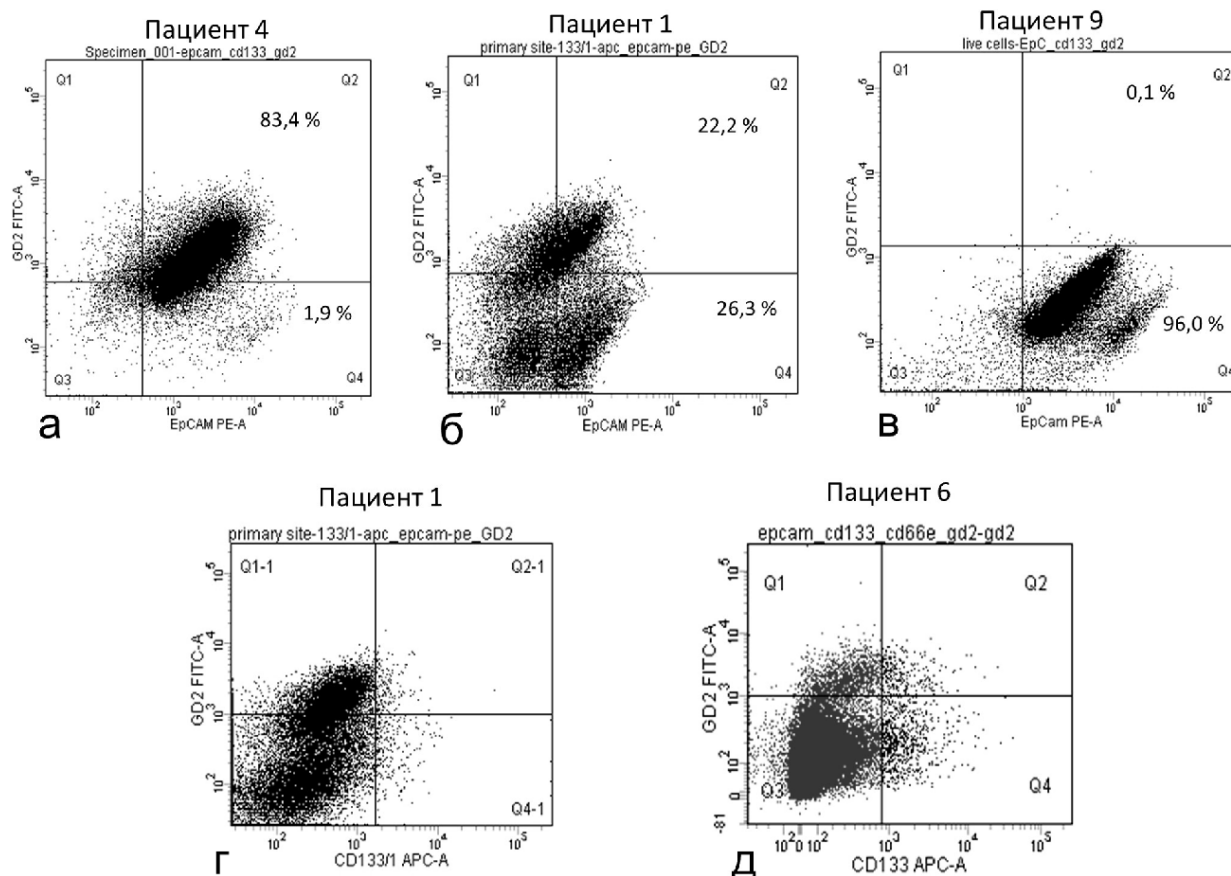
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования впервые показана экспрессия ганглиозида GD2 на клетках колоректальной аденокарциномы. У значительного количества обследованных пациентов экспрессия этого опухолевого маркера была на достаточно высоком уровне, что обеспечивает возможность применения GD2-направленной таргетной терапии в отношении колоректального рака. Совместная экспрессия ганглиозида GD2 и ЕрСАС открывает перспективы разработки биспецифичных терапевтических молекул, направленных на данные

Таблица. Экспрессия ганглиозида GD2 на клетках колоректальной аденокарциномы, выделенных от пациентов

№ пациента	Пол <sup>1</sup>	Возраст (лет)	Клинический диагноз <sup>2</sup>	Интенсивность флуоресценции <sup>3</sup>	Относительная интенсивность флуоресценции <sup>4</sup>	GD2-позитивных клеток (%) <sup>5</sup>
1	м	51	РОК, Т3N0M0	1245 (66,2)	9,73	45,8
2	ж	69	РОК, Т3N1M1	477 (113,3)	1,39	нет
3	ж	79	РОК, Т2N0M0	89 (200,9)	2,62	нет
4	ж	80	РПК, Т3N0M0	1003 (60,8)	10,78	97,8
5	ж	62	РОК, Т3N2M1	185 (86,6)	2,18	4,3
6	м	70	РПК, Т4N2M1	330 (113,2)	2,00	6,2
7	ж	55	РПК, Т4N2M1	769 (71,0)	7,06	62,3
8	ж	52	РОК, Т3N0M0	102 (64,4)	1,44	3,6
9	м	67	РОК, Т4N2M0	204 (122,4)	1,15	нет
10	м	49	РПК, Т3N0M0	289 (61,6)	1,15	нет
11	м	57	РПК, Т4N2M0	54 (348,6)	1,04	нет
12	м	64	РПК, Т3N0M0	177 (134,8)	1,44	нет

Примечание. <sup>1</sup> “м” – мужской, “ж” – женский. <sup>2</sup> “РОК” – рак ободочной кишки, “РПК” – рак прямой кишки. Использована номенклатура TNM-7. <sup>3</sup> Представлена медиана интенсивности флуоресценции (ИФ) окрашенных клеток, выраженная в условных единицах. В скобках – коэффициент вариации (%). <sup>4</sup> Относительную ИФ вычисляли как отношение ИФ окрашенных к ИФ неокрашенных клеток. <sup>5</sup> К GD2-позитивным клеткам относили клетки совместно экспрессирующие ЕрСАС и GD2 и достоверно ( $p \leq 0,05$ ) отличающиеся по ИФ от неокрашенного контроля.



**Рисунок 2.** Цитометрический анализ совместной экспрессии ганглиозида GD2 с молекулами клеточной адгезии EpCAM (а-в) и маркером раковых стволовых клеток CD133 (г, д) на клетках, изолированных из опухолевой ткани пациентов. По оси абсцисс и ординат – интенсивность флуоресценции, выраженная в условных единицах.

онкомаркеры. В то же время, значительное количество GD2-негативных случаев колоректального рака делают актуальной разработку методов дифференциальной диагностики GD2-позитивных и негативных опухолей. Всё это потребует дальнейших исследований, которые, прежде всего, должны быть направлены на расширение количества исследуемых случаев заболевания, сравнительное изучение молекулярных и функциональных особенностей двух типов опухолевых клеток, а также клинических характеристик течения GD2-позитивных и негативных случаев колоректального рака.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Проточная цитометрия осуществлялась с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” поддержанного Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00360.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала “Национального медицинского исследовательского центра радиологии” Минздрава России. У всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kholodenko I.V., Kalinovsky D.V., Doronin I.I., Deyev S.M., Kholodenko R.V. (2018) J. Immunol. Res., 7394268. DOI: 10.1155/2018/7394268.
2. Ladenstein R., Pötschger U., Valteau-Couanet D., Luksch R., Castel V., Yaniv I., Laureys G., Brock P., Michon J.M., Owens C., Trahair T., Chan G.C.F., Ruud E., Schroeder H., Beck Popovic M., Schreier G., Loibner H., Ambros P., Holmes K., Castellani M.R., Gaze M.N., Garaventa A., Pearson A.D.J., Lode H.N. (2018) Lancet Oncol., 19(12), 1617-1629.
3. Kholodenko R.V., Kalinovsky D.V., Doronin I.I., Ponomarev E.D., Kholodenko I.V. (2019) Curr. Med. Chem., 26(3), 396-426.
4. Perez Horta Z., Goldberg J.L., Sondel P.M. (2016) Immunotherapy, 8(9), 1097-1117.

5. Orsi G., Barbolini M., Ficarra G., Tazzioli G., Manni P., Petrachi T., Mastrolia I., Orvieto E., Spano C., Prapa M., Kaleci S., D'Amico R., Guarneri V., Dieci M.V., Cascinu S., Conte P., Piacentini F., Dominici M. (2017) *Oncotarget*, **8**(19), 31592-31600.
6. Dekker E., Tanis P.J., Vleugels J.L.A., Kasi P.M., Wallace M.B. (2019) *Lancet*, **394**(10207), 1467-1480.
7. Piawah S., Venook A.P. (2019) *Cancer*, **125**(23), 4139-4147.
8. Doronin I.I., Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V., Ponomarev E.D., Ryazantsev D.Y., Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. (2014) *BMC Cancer*, **14**, 295.
9. Keller L., Werner S., Pantel K. (2019) *Cell Stress*, **3**(6), 165-180.
10. Battula V.L., Shi Y., Evans K.W., Wang R.Y., Spaeth E.L., Jacamo R.O., Guerra R., Sahin A.A., Marini F.C., Hortobagyi G., Mani S.A., Andreeff M. (2012) *J. Clin. Invest.*, **122**(6), 2066-2278.
11. Ким Я.С., Кайдина А.М., Чанг Ю.Х., Ярыгин К.Н., Лунатов А.Ю. (2016) *Биомедицинская химия*, **62**(3), 228-238. [Kim Y.S., Kaidina A.M., Chiang J.-H., Yarygin K.N., Lupatov A.Yu. (2016) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(3), 228-238.]
12. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. (2007) *Nature*, **445**(7123), 106-110.

Поступила в редакцию: 09. 12. 2019.  
После доработки: 20. 01. 2020.  
Принята к печати: 22. 01. 2020.

## EXPRESSION OF GANGLIOSIDE GD2 ON COLORECTAL ADENOCARCINOMA CELLS

A.Yu. Lupatov<sup>1</sup>, A.M. Gisina<sup>1</sup>, Y.S. Kim<sup>1</sup>, S.A. Bykasov<sup>2</sup>,  
N.N. Volchenko<sup>2</sup>, D.V. Sidorov<sup>2</sup>, K.N. Yarygin<sup>1</sup>, R.V. Kholodenko<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia

<sup>2</sup>Hertsen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiological Center  
of the Ministry of Health, 3 2nd Botkinsky pr., Moscow, 125284 Russia

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science,  
16/10 Mikhluho-Maklaya str., Moscow, 117997 Russia; \*e-mail: khol@mail.ru

Using flow cytometry GD2 ganglioside expression was evaluated both on colorectal adenocarcinoma cell lines and on tumor tissue samples from colorectal cancer patients. The marker was found on EpCAM-positive tumor cells in 6 of 12 patients' samples but not on the HT29 and CaCo-2 cell lines. GD2 expression was not an exceptional feature of cancer stem cells, since its expression level was similar on CD133-positive and CD133-negative tumor cells. Thus, the presence of GD2 ganglioside was revealed on colorectal adenocarcinoma cells for the first time. This finding makes it possible to use targeted therapy to treat this disease.

**Key words:** colorectal cancer; GD2 ganglioside; targeted therapy; CD133; EpCAM

**Funding.** The work is supported by RNF, grant No. 18-15-00360.

Received: 09.12.2019, revised: 20.01.2020, accepted: 22.01.2020.