

## Различные популяции EpCam-положительных клеток в асцитической жидкости у больных раком яичников: связь со степенью канцероматоза

Кайгородова Е.В.<sup>1,2</sup>, Очиров М.О.<sup>1</sup>, Молчанов С.В.<sup>1</sup>, Рогачев Р.Р.<sup>2</sup>, Дьяков Д.А.<sup>2</sup>, Чернышова А.Л.<sup>1</sup>, Шпилёва О.В.<sup>1</sup>, Ковалев О.И.<sup>2</sup>, Вторушин С.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук  
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Канцероматоз брюшины является одним из наиболее неблагоприятных факторов прогрессирования рака яичников. Он часто сопровождается накоплением жидкости в брюшной полости – асцитом. Прогностические факторы, связанные со злокачественным асцитом, изучены недостаточно.

**Цель.** Оценка различных популяций EpCam-положительных опухолевых клеток в асцитической жидкости, их связь с наличием перитонеальных «инвазивных» имплантатов и степенью распространенности канцероматоза по шкале Predictive Index Value (PIV) у больных раком яичников.

**Материалы и методы.** В проспективное исследование включены 22 больных с впервые диагностированным раком яичников, с Iс–IV стадиями по системе FIGO, в возрасте 36–76 лет, поступившие на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Материалом для исследования служила асцитическая жидкость, стабилизированная ЭДТА, взятая во время лапароскопии. Количество различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости определяли методом многоцветной проточной цитометрии и проточной цитометрии с визуализацией. Степень канцероматоза определяли по шкале PIV.

**Результаты.** Показано, что клеточный состав асцитической жидкости больных раком яичников представляет собой гетерогенную популяцию. Положительная корреляционная связь с PIV, характеризующим степень распространенности канцероматоза, наблюдалась у асцитических клеток с фенотипом EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ ( $r = 0,58$ ;  $p = 0,004$ ) и у атипичных/гибридных форм клеток EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/- ( $r = 0,51$ ;  $p = 0,01$ ).

**Заключение.** Полученные результаты показывают большую гетерогенность опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников. Обнаруженный факт наличия атипичных (гибридных форм) EpCam-положительных клеток представляет интерес для клеточной биологии и требует дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** гетерогенность опухолевых клеток, канцероматоз, Predictive Index Value, асцитическая жидкость, рак яичников, жидкостная биопсия.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Президента РФ (грант № МД-2017.2020.7).

**Соответствие принципам этики.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 4 от 02.04.2018).

**Для цитирования:** Кайгородова Е.В., Очиров М.О., Молчанов С.В., Рогачев Р.Р., Дьяков Д.А., Чернышова А.Л., Шпилёва О.В., Ковалев О.И., Вторушин С.В. Различные популяции EpCam-положительных

клеток в асцитической жидкости у больных раком яичников: связь со степенью карциноматоза. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20 (2): 44–53. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-44-53>.

## Dissimilar populations of EpCam-positive cells in ascitic fluid of ovarian cancer patients: a relationship with the degree of carcinomatosis

Kaigorodova E.V.<sup>1,2</sup>, Ochirov M.O.<sup>1</sup>, Molchanov S.V.<sup>1</sup>, Rogachev R.R.<sup>2</sup>, Dyakov D.A.<sup>2</sup>, Chernyshova A.L.<sup>1</sup>, Shpileva O.V.<sup>1</sup>, Kovalev O.I.<sup>2</sup>, Vtorushin S.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC), Russian Academy of Sciences (RAS) 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

### ABSTRACT

**Background.** Peritoneal carcinomatosis (PC) is one of the most unfavorable factors of ovarian cancer progression. It is often accompanied by accumulation of fluid in the abdominal cavity, which is called ascites. However, prognostic factors associated with malignant ascites are not well understood.

**The aim** of this study was to evaluate dissimilar populations of EpCAM-positive cells in ascitic fluid and their relationship with the presence of invasive peritoneal implants and the prevalence of carcinomatosis on the Predictive Index Value (PIV) scale in ovarian cancer patients.

**Materials and methods.** The prospective study included 22 patients aged 36–76 years with newly diagnosed FIGO stage Ic–IV ovarian cancer, who were admitted for treatment to Cancer Research Institute of Tomsk NRMC. The study material included EDTA-stabilized ascitic fluid sampled during laparoscopy.

Various populations of ascites tumor cells were identified by laser multicolor flow cytometry. The degree of carcinomatosis was determined according to the PIV scale.

**Results.** The study identified twelve populations of EpCAM-positive cells in the ascitic fluid of ovarian cancer patients. EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ cells ( $r = 0.58$ ;  $p = 0.004$ ) and atypical (hybrid) EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/- cells ( $r = 0.51$ ;  $p = 0.01$ ) had a positive correlation with the PIV index.

**Conclusion.** The obtained results show a high degree of heterogeneity of tumor cells in the ascitic fluid of ovarian cancer patients. Identified atypical (hybrid) forms of EpCam-positive cells are of great interest for cell biology and require further investigation.

**Key words:** heterogeneity of tumor cells, carcinomatosis, Predictive Index Value (PIV), ascitic fluid, ovarian cancer, liquid biopsy.

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The study was supported by the President of the Russian Federation (grant No. MD-2017.2020.7).

**Conformity with the principles of ethics.** All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee at Cancer Research Institute, Tomsk NRMC (Protocol No. 4 of 02.04.2018).

**For citation:** Kaigorodova E.V., Ochirov M.O., Molchanov S.V., Rogachev R.R., Dyakov D.A., Chernyshova A.L., Shpileva O.V., Kovalev O.I., Vtorushin S.V. Dissimilar populations of EpCam-positive cells in ascitic fluid of ovarian cancer patients: a relationship with the degree of carcinomatosis. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2021; 20 (2): 44–53. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-2-44-53>.

## ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников характеризуется уникальным метастатическим процессом. Самый ранний и наиболее

распространенный путь метастазирования – имплантационный. Он часто сопровождается накоплением жидкости в брюшной полости – асцитом. До 38% случаев асцитов, ассоциированных со злокачественными

опухольями у женщин, приходится на рак яичников. Асцитическая жидкость является перспективным биологическим материалом для получения информации о характере опухолевого процесса. В отличие от сыворотки, она является более информативной, особенно на ранней стадии злокачественного процесса [1].

В целом асцит – это многокомпонентная, динамическая система, где все элементы в совокупности способствуют формированию провоспалительной и иммуносупрессивной среды. Он состоит из сложной смеси клеточных популяций и богатого цитокинового профиля [2]. Разнообразие клеток обусловлено несколькими факторами. Во-первых, фенотипической пластичностью, возникающей под влиянием сигналов микроокружения от иммунных, стромальных клеток, а также растворимых факторов. Во-вторых, гетерогенность появляется под действием гидродинамических сил, которые значительно изменяют морфологию клеток [3]. В-третьих, источником опухолевых клеток в асцитической жидкости является сама опухоль, в частности рак яичников, который представляет собой гетерогенную популяцию клеток [4].

В настоящее время гетерогенность опухолевых клеток определяют по их антигенным свойствам, спектру различных маркеров клеточной поверхности, активности ключевых сигнальных путей. При обнаружении циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в качестве специфического биомаркера, широко используют молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpCam), так как она сверхэкспрессируется в более чем 70% случаев рака яичников, и ее уровень тесно связан со злокачественным асцитом, химиорезистентностью и снижением выживаемости у пациентов. Роль EpCam не ограничивается клеточной адгезией, есть многочисленные данные об ее участии в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) [5]. Известно, что ЭМП позволяет клеткам разделяться, терять свою апико-базальную полярность, типичную для эпителиальных клеток, демонстрировать повышенную устойчивость к апоптозу и возвращаться к более подвижному мезенхимальному фенотипу, способствующему перитонеальной диссеминации. Эту молекулу также используют в качестве маркера стволовых опухолевых клеток (CSCs) [6].

В дополнение к EpCam для идентификации ЦОК используется рецептор CD44, широко представленный на поверхности опухолевых клеток. Он опосредует прикрепление опухолевых клеток яичника к перитонеальному мезотелию за счет связывания с гиалуроновой кислотой (НА). CD44, как биомаркер, имеет несколько преимуществ. Во-первых, нормальные клетки имеют низкий уровень экспрессии CD44

и плохую адгезию к НА. Во-вторых, НА является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса опухоли, который помимо связывания с ЦОК поддерживает целостность клеток [7].

Еще одним маркером опухолевых клеток в асцитической жидкости выступает CD24, который экспрессируется в 70,1% случаев рака яичников и является независимым предиктором выживания. CD24 увеличивает метастатический потенциал опухолевых клеток, так как является лигандом для Р-селектина, рецептора адгезии на активированных эндотелиальных клетках. Кроме того, CD24 индуцирует ЭМП, который приводит к формированию высокопролиферативного фенотипа, устойчивости к химиотерапии, посредством активации PI3K/Akt, NF-κB и ERK сигнальных каскадов [8].

Общей чертой ЭМП является уменьшение экспрессии эпителиального кадгерина (Е-кадгерина) и сопутствующее увеличение или экспрессия *de novo* нейронного кадгерина (N-кадгерина). Это так называемое переключение кадгерина связано с усилением миграционного и инвазивного поведения опухолевых клеток. Повышенная экспрессия N-кадгерина в солидных опухолях способствует «коллективной» миграции клеток, усилению передачи сигналов фактора роста фибробластов и модулирует канонический путь Wnt, что приводит к формированию агрессивного фенотипа [9].

CD133 – наиболее часто используемый антиген клеточной поверхности для обнаружения и выделения стволовых опухолевых клеток при различных злокачественных заболеваниях, включая рак яичников. Высокая экспрессия CD133 в опухолях считается прогностическим маркером прогрессирования заболевания. Несмотря на то, что функциональная роль CD133 при злокачественных новообразованиях до конца не раскрыта, большинство исследований предполагают, что CD133 обладает значительной прогностической ценностью для оценки общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования при различных видах рака [10].

Перитонеальная диссеминация, обусловленная асцитом, является одним из наиболее неблагоприятных факторов прогрессирования злокачественных опухолей. В 2006 г. итальянскими авторами предложена шкала Predictive Index Value (PIV) для оценки распространенности канцероматоза, учитывающая состояние париетальной брюшины, диафрагмальной поверхности брюшины, брыжейки кишки, сальника, стенки кишки, желудка, печени. Авторами показано, что при  $PIV \geq 8$  вероятность резекции R0 практически равна 0, соответственно, рекомендовано проведение неоадьювантной химиотерапии [11].

Учитывая вышеизложенное, актуальным представляется исследование различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников, их связь с наличием перитонеальных «инвазивных» имплантатов и степенью распространенности карциноматоза по шкале PIV.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. В проспективное исследование включены 22 больные с впервые диагностированным раком яичников, с Ic–IV стадиями по системе FIGO, в возрасте 36–76 лет, поступившие на лечение в отделение гинекологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Всем женщинам с целью

хирургического стадирования была проведена лапароскопия с помощью стойки Karl Storz (Германия) с последующим морфологическим исследованием биоптатов и асцитической жидкости. Также оценена распространенность процесса по шкале PIV. Материалом для исследования служили 5 мл стабилизированной ЭДТА асцитической жидкости, взятой во время лапароскопии.

*Определение Predictive Index Value.* PIV у больных раком яичников был подсчитан при использовании видеоматериалов, полученных во время лапароскопии с помощью стойки Karl Storz. Шкала PIV (Fagotti score, range 0–14) позволяет оценить распространенность канцероматоза, учитывая состояние париетальной брюшины, диафрагмальной поверхности брюшины, брыжейки кишки, сальника, стенки кишки, желудка, печени (табл. 1) [11].

Таблица 1

Определение Predictive Index Value для оценки распространенности канцероматоза		
Показатель	Баллы = 2	Баллы = 0
Перитонеальный канцероматоз	Нерезектабельное массивное поражение брюшины	Канцероматоз изолированных областей, хирургически удалимый при перитонеумэктоми
Диафрагмальная поверхность брюшины	Распространенный инфильтрирующий канцероматоз или сливающиеся узлы различных отделов диафрагмальной поверхности брюшины	Изолированное поражение брюшины
Брыжейка кишки	Большие инфильтрирующие узлы или вовлечение корня брыжейки	Малые узлы, потенциально резектабельные с помощью аргонно-плазменной коагуляции
Сальник	Распространение опухоли до большой кривизны желудка	Изолированное поражение сальника
Инфильтрация кишечника	Предполагается резекция кишки или милиарный канцероматоз	–
Инфильтрация желудка	Неопластическое поражение стенки желудка	–
Поражение печени	Поражение любой поверхности печени	–

*Оценка различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости методом многоцветной проточной цитометрии.* Методом многоцветной проточной лазерной цитометрии на аппарате BDFACSCanto (США) с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и NovoExpress определяли различные популяции асцитических опухолевых клеток (с признаками стволовости, признаком ЭМП, без признаков стволовости и ЭМП, с сочетанием этих признаков), а также атипичные/гибридные популяции опухолевых клеток.

Для этого асцитическую жидкость инкубировали с мечеными различными флуорохромами моноклональными антителами к CD45: клон HI30 (APC/Cy7) (Biolegend, США), EpCam клон 9C4 (PE) (Biolegend, США), CD44 клон BJ18 (FITC) (Biolegend, США), CD24 клон ML5 (PE/Cy7) (Biolegend, США), N-Cadherin клон 8C11 (PerCP/Cy5.5) (Biolegend, США), CD133 клон AC-133 (APC) (Miltenyi Biotec,

США). После чего эритроциты, находящиеся в образце, лизировали раствором BD FACS lysing solution и дважды отмывали CellWash буфером, затем к клеточному осадку добавляли 1 мл BD Flow. Все образцы хранились в темноте при 4 °C и были проанализированы на проточном цитофлуориметре в течение часа. Уровень клеток выражали в количестве клеток в 1 мл асцитической жидкости.

*Проточная цитометрия с визуализацией.* Для визуализации выявленных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости применялась проточная цитометрия высокого разрешения с функцией микроскопии. Клетки инкубировали с мечеными флуорохромом моноклональными антителами к CD45: клон HI30 EpCam клон 9C4 (PE) (Biolegend, США), CD44 клон BJ18 (FITC) (Biolegend, США), CD24 клон ML5 (PE/Cy7) (Biolegend, США), N-Cadherin клон 8C11 (PerCP/Cy5.5) (Biolegend, США), CD133 клон AC-133 (APC) (Miltenyi Biotec, США) и DAPI

(ZytoVision, Германия). Аликвоты анализировали с помощью проточного цитометра Amnis ImageStream Mk II Imaging (Luminex, Польша). Все данные были сохранены в виде необработанных файлов изображений для анализа в программе IDEAS (версия 6.2).

**Статистический анализ.** Полученные данные обработаны методами вариационной статистики с использованием Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (для независимых выборок). Также применяли корреляционный анализ Спирмена ( $r$ ). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха  $Me (Q_1-Q_3)$ . Различия считались статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования с помощью многоцветной проточной цитометрии в асцитической жидкости больных раком яичников было выявлено 12 популяций EpCam-положительных клеток. Асцитические опухолевые клетки без признаков стволовости и без признаков ЭМП (AC1) – EpCam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin-; асцитические опухолевые клетки без признаков стволовости с признаком ЭМП (AC-2) – EpCam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin+; асцитические опухолевые клетки с признаком стволовости без признаков ЭМП с фенотипами EpCam+CD45-CD44+CD24-

CD133+/-Ncadherin- (AC-3), EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin- (AC-6), EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133+/-Ncadherin- (AC-8); асцитические опухолевые клетки с признаками стволовости и с ЭМП – EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadherin+ (AC-4), EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133+Ncadherin+(AC-5), EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133+Ncadherin+ (AC-7), EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133-Ncadherin+(AC-9), EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+(AC-10), а также атипичные/гибридные формы клеток без признаков стволовости – EpCam+CD45+CD44-CD24-CD133-Ncadh+/- (AC-11) и атипичные/гибридные формы клеток с признаками стволовости – EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadh+/- (AC-12).

Показано, что у пациенток с наличием перитонеальных «инвазивных» имплантатов количество опухолевых клеток в асцитической жидкости с фенотипами EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133-Ncadherin+ и EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ значимо превышало количество данных клеток в асцитической жидкости у больных с неинвазивными перитонеальными имплантами ( $p = 0,025$  и  $p = 0,003$  соответственно). Стоит отметить, что уровень атипичных/гибридных форм клеток с признаками стволовости (EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/-) также был выше в асцитической жидкости у больных с наличием перитонеальных «инвазивных» имплантатов ( $p = 0,016$ ) (табл. 2).

Таблица 2

Количество различных популяций EpCam-положительных клеток в асцитической жидкости у больных с наличием инвазивных и неинвазивных перитонеальных имплантатов, клеток/мл, $Me (Q_1-Q_3)$		
Фенотип асцитических клеток	Наличие перитонеальных инвазивных имплантатов, $n = 13$	Наличие перитонеальных неинвазивных имплантатов, $n = 9$
AC-1 EpCam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin-	290 (110–4 270)	55 (0–420) $p_{1-2} = 0,082$
AC-2 EpCam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin+	40 (0–1 220)	170 (0–320) $p_{1-2} = 0,84$
AC-3 EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadherin-	10 (0–530)	0 (0–80) $p_{1-2} = 0,35$
AC-4 EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadherin+	300 (30–720)	40 (0–90) $p_{1-2} = 0,126$
AC-5 EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133+Ncadherin+	360 (160–740)	110 (0–283) $p_{1-2} = 0,160$
AC-6 EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin-	50 (0,00–1 100)	0 (0–140) $p_{1-2} = 0,640$
AC-7 EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133+Ncadherin+	312 (20–940)	0 (0–10) $p_{1-2} = 0,064$
AC-8 EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133+/-Ncadherin-	170 (0–1 030)	0 (0–30) $p_{1-2} = 0,194$
AC-9 EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133-Ncadherin+	2 030 (520–11 420)	150 (0–540) $p_{1-2} = 0,025$
AC-10 EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+	1 640 (260–3 870)	10 (0–50) $p_{1-2} = 0,003$



Фенотип асцитических клеток	Наличие перитонеальных инвазивных имплантов, $n = 13$	Наличие перитонеальных неинвазивных имплантов, $n = 9$
AC-11 EpCam+CD45+CD44-CD24-CD133-Ncadherin+/-	185 (29–716)	219 (18–436) $p_{1-2} = 0,940$
AC-12 EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/-	2 476 (813–3835)	907 (216–1 032) $p_{1-2} = 0016$

На рис. 1 и 2 показаны часть протокола многоцветной проточной цитометрии при оценке различных популяций EpCam-положительных клеток в асцитической жидкости больной раком яичников (рис. 1) и фотографии брюшной полости данной пациентки, полученные во время проведения лапароскопии (рис. 2).

На фотографиях брюшной полости виден распространенный инфильтрирующий канцероматоз и сливающиеся узлы различных отделов диафрагмальной поверхности брюшины, а также большие инфильтрирующие узлы.

В данном исследовании была проведена оценка степени канцероматоза с помощью шкалы PIV.

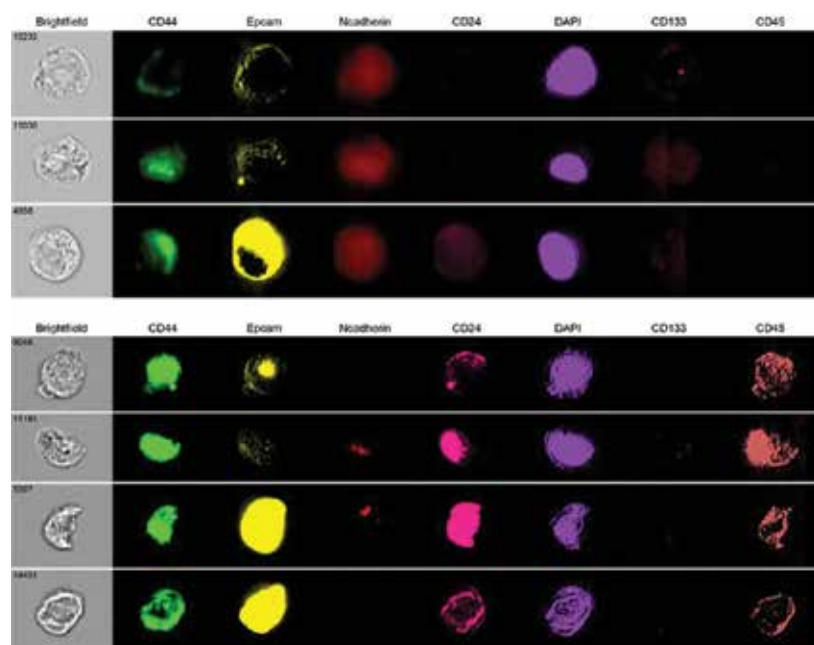


Рис. 1. Различные популяции EpCam-положительных клеток в асцитической жидкости у больной раком яичников, проточная цитометрия с визуализацией Amnis ImageStreamX (Luminex, Польша)

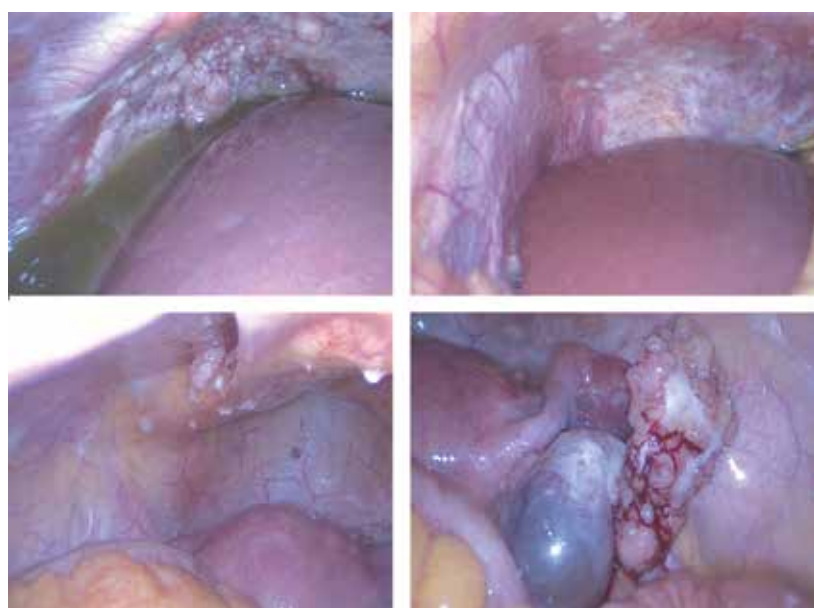


Рис. 2. Брюшная полость больной раком яичников В., 50 лет,  $T_{3c}N_xM_0$ , лапароскопия с помощью стойки Karl Storz (Германия). PIV = 8

Диапазон PIV у пациенток, вошедших в исследование, варьировал от 0 до 11. Проведенный корреляционный анализ показал, что статистически значимая положительная связь с индексом PIV наблюдалась у асцитических клеток AC-9 с фенотипом EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ ( $r = -0,58$ ;  $p = 0,004$ ) и у атипичных/гибридных форм клеток с признаками стволовости EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/- ( $r = -0,51$ ;  $p = 0,01$ ) (табл. 3).

Таблица 3

Корреляционная связь между количеством различных популяций EpCam-положительных клеток в асцитической жидкости больных раком яичников и PIV		
Пара показателей	$r$	$p$
AC1-PIV	0,32	0,137
AC2-PIV	-0,02	0,92
AC3-PIV	0,20	0,35
AC4-PIV	0,19	0,38
AC5-PIV	0,29	0,27
AC6-PIV	0,12	0,64
AC7-PIV	0,46	0,07
AC8-PIV	0,21	0,42
AC9-PIV	0,34	0,11
AC10-PIV	0,58	0,004
AC11-PIV	0,15	0,49
AC12-PIV	0,51	0,01

## ОБСУЖДЕНИЕ

В основном метастатическое распространение рака яичников происходит в результате отделения клеток от первичной опухоли в брюшную полость, заполненную злокачественным асцитом. С током жидкости клетки широко распространяются и становятся причиной вторичного роста опухоли. На всех этапах этого уникального процесса опухолевые клетки изменяют свой фенотип, коэволюционируют вместе с окружающими их фибробластами, макрофагами, адипоцитами, эндотелиальными и другими клетками.

В результате проведенного исследования в асцитической жидкости были обнаружены различные популяции опухолевых клеток: атипичные формы (гибридные клетки), как с признаками стволовости, так и без них, с признаками ЭМП и сочетанием этих признаков, стромальные и иммунные клеточные популяции, идентификация и характеристика которых могут стать полезным инструментом в прогнозировании течения заболевания и ответа на химиотерапию.

Литературные данные показывают, что из 150 различных комбинаций маркеров наиболее распространена панель из трех – CD44, CD24 и EpCam. Экспрессия этих молекул в линиях OVCAR-5, SKOV-3

и IGROV-1 соответствовала клеткам с большей колониобразующей способностью. Эти клетки продемонстрировали короткий безрецидивный интервал *in vivo* после ксенотрансплантации и большую миграционную способность в исследовании инвазии *in vitro* по сравнению с CD44-CD24-EpCam-клетками. Кроме того, доксорубин, цисплатин и паклитаксел способствовали увеличению этой популяции, что говорит о лекарственной устойчивости, но антимюллеров гормон эффективно подавлял ее рост [12].

В нашем исследовании мы показали, что концентрации опухолевых клеток с фенотипами EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133-Ncadherin+ и EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ были значимо выше в асцитической жидкости больных с наличием перитонеальных инвазивных имплантатов, по сравнению с уровнем данных клеток в асцитической жидкости у больных с неинвазивными перитонеальными имплантатами. Следует отметить, что указанные популяции опухолевых клеток положительны по маркеру CD24. В исследовании, направленном на изучение механизмов приобретенной лекарственной резистентности, показано, что CD24+ фракция, полученная из образцов опухолевой ткани пациента с раком яичника, была относительно устойчива к цисплатину *in vitro*, по сравнению с его CD24- клетками. Кроме того, туморогенность CD24+ также превосходит таковую у CD24- клеток, о чем свидетельствует более короткий период до появления опухолей у мышей (Nude mice), которым вводили равное число CD24+ и CD24- клеток. Также обнаружено, что клетки CD24+ экспрессируют более высокие уровни мРНК некоторых генов «стволовости», включая Nestin,  $\beta$ -catenin, Vmi-1, Oct4, Oct3/4, Notch1 и Notch4, которые участвуют в модулировании многих функций стволовых клеток, и более низкий уровень мРНК E-кадгерина, чем у CD24- клеток [13].

Полученные нами результаты клинического исследования согласуются с данными литературы. Так, многочисленные экспериментальные исследования показали, что популяция EpCam+CD44+CD24+CD133+CD117+ обладает повышенной способностью инициировать рак и (или) стимулировать метастазирование *in vivo* [13, 14]. На модели мышей (NOD/Shi-scid/IL-2R $\gamma$  null mice) продемонстрировано, что клетки CD24+ и CD133+ обладают большей способностью к сферообразованию, распространению и инициации опухоли *in vivo*. Кроме того, CD24+ клетки демонстрировали более «мезенхимальный» фенотип с более высокой экспрессией Twist1, Snail и Vimentin, что связывает маркер CD24 с фенотипом ЭМП. Интересно, что CD24- клетки также способны инициировать опухолевый рост,

хотя и в меньшей степени, чем CD24+. Вероятно, это связано с тем, что подмножество CD24- клеток со стволовыми свойствами имеют более низкую скорость пролиферации, чем клетки CD24+ [15].

Гибридные клетки и многоклеточные агрегаты, значение которых показаны при раке [16–18], также были обнаружены в нашем исследовании. Другие ученые выявили слияние клеток крови и эпителиальных клеток при карциноме легких Льюиса, а также при метастазировании эпителиальной карциномы яичника [19]. Подобные результаты были также получены для колоректального рака А.Е. Powell и соавт. [20]. В другом исследовании утверждалось, что их образование и форма зависят от профиля экспрессии кадгерина, например клетки Ncadherin+ образовывали стабильные и плотные сферические структуры, а клетки Ecad+ – кластеры с более низкой адгезионной способностью (по сравнению с Ncadherin+) [21].

В нашем исследовании мы показали, что количество EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ опухолевых клеток и атипичных/гибридных клеток EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/- имеет прямую корреляционную связь с PIV, который характеризует степень распространенности канцероматоза. Данный индекс учитывает состояние париетальной брюшины, диафрагмальной поверхности брюшины, брыжейки кишки, сальника, стенки кишки, желудка, печени [11, 22–24]. Так, A. Fagotti и соавт. (2006) было показано, что при PIV  $\geq 8$  вероятность резекции R0 практически равна 0, соответственно, рекомендовано проведение неoadъювантной химиотерапии. Эффективность данного подхода в последующем была подтверждена рядом рандомизированных исследований.

В 2017 г. опубликованы данные голландского многоцентрового рандомизированного исследования, включающего анализ лечения 201 больной распространенным раком яичников [24]. Для оценки возможности проведения первичной оптимальной циторедуктивной операции 102 пациенткам проведена лапароскопия с определением PIV (основная, лапароскопическая группа), 99 пациенткам – первичная циторедуктивная операция без лапароскопической оценки (контрольная группа). Одним из основных плюсов предлагаемой методики авторы считают снижение неоправданных лапаротомий (диагностических операций, субоптимальных циторедукций), ослабляющих эффективность лечения данной категории больных [24].

Полученные в нашем исследовании результаты показали прямую корреляционную связь PIV с уровнем асцитических опухолевых клеток с признаками ЭПМ (АС-10) и с атипичными (ги-

бридными клетками) с признаками стволовости (АС-12). Можно предположить, что определение EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ и EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/- клеток в асцитической жидкости совместно с PIV будет полезно для уточнения стратегии лечения больных раком яичников.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты показывают большую гетерогенность опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников. Обнаруженный факт наличия атипичных/гибридных форм EpCam-положительных клеток представляет интерес для клеточной биологии и требует дальнейших исследований. Выявленные в нашем исследовании популяции клеток (EpCam+CD45-CD44-CD24+CD133-Ncadherin+ и EpCam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/-) и обнаружение их в асцитической жидкости могут быть полезны для определения стратегии лечения больных раком яичников.

Дальнейшее исследование различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости, их связь с клиническим течением и эффективностью химиотерапии больных раком яичников является весьма целесообразным направлением и открывает большие перспективы для практических разработок в области жидкостной биопсии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Виллерт А.Б., Коломиец Л.А., Юнусова Н.В., Иванова А.А. Асцит как предмет исследований при раке яичников. *Сибирский онкологический журнал*. 2019; 18 (1): 116–123. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-116-123.
2. Weinberg R.A. Coevolution in the tumor microenvironment. *Nat. Genet.* 2008; 40: 494–495. DOI: 10.1038/ng0508-494.
3. Hyler A.R., Baudoin N.C., Brown M.S., Stremmer M.A., Cimini D., Davalos R.V., Schmelz, E.M. Fluid shear stress impacts ovarian cancer cell viability, subcellular organization, and promotes genomic instability. *PLoS One*. 2018; 13 (3): e0194170. DOI: 10.1371/journal.pone.
4. Кайгородова Е.В., Федулова Н.В., Очиров М.О., Дьяков Д.А., Молчанов С.В., Часовских Н.Ю. Различные популяции опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (1): 50–59. DOI: 10.20538/1682-0363-2020-1-50-58.
5. Kaigorodova E.V., Savelieva O.E., Tashireva L.A., Tarabonovskaya N.A., Simolina E.I., Denisov E.V., Slonimskaya E.M., Choyzonov E.L., Perelmuter V.M. Heterogeneity of circulating tumor cells in neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Molecules*. 2018; 23 (4): 727–737. DOI: 10.3390/molecules23040727.
6. Tayama S., Motohara T., Narantuya D., Li C., Fujimoto K., Sakaguchi I., Tashiro H., Saya H., Nagano O., Katabuchi H.



- The impact of EpCAM expression on response to chemotherapy and clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017; 8 (27): 44312–44325. DOI: 10.18632/oncotarget.17871.
7. Zheng J., Zhao S., Yu X., Huang S., Liu H.Y. Simultaneous targeting of CD44 and EpCAM with a bispecific aptamer effectively inhibits intraperitoneal ovarian cancer growth. *Theranostics*. 2017; 7 (5): 373–1388. DOI: 10.7150/thno.17826.
  8. Nakamura K., Terai Y., Tanabe A., Ono Y.J., Hayashi M., Maeda K., Fujiwara S., Ashihara K., Nakamura M., Tanaka Y. et al. CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncol. Rep.* 2017; 37 (6): 3189–3200. DOI: 10.3892/or.2017.5583.
  9. Mrozik K.M., Blaschuk O.W., Cheong C.M., Zannettino A.C., Vandyke W.K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 2018; 18 (1): 939. DOI: 10.1186/s12885-018-4845-0.
  10. Glumac P.M., LeBeau A.M. The role of CD133 in cancer: A concise review. *Clin. Transl. Med.* 2018; 7 (1): 18. DOI: 10.1186/s40169-018-0198-1.
  11. Fagotti A., Ferrandina G., Fanfani F., Ercoli A., Lorusso D., Rossi M., Scambia G. A laparoscopy-based score to predict surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma: A pilot study. *Ann. Surg. Oncol.* 2006; 13 (8): 1156–1161.
  12. Wei X., Dombkowski D., Meirelles K., Pieretti-Vanmarcke R., Szotek P.P., Chang H.L., Preffer F.L., Mueller P.R., Teixeira J., MacLaughlin D.T. et al. Mullerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107 (44): 18874–18879. DOI: 10.1073/pnas.1012667107.
  13. Gao M.Q., Choi Y.P., Kang S., Youn J.H., Cho N.H. CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene*. 2010; 29 (18): 2672–2680. DOI: 10.1038/onc.2010.35.
  14. Burgos-Ojeda D., Rueda B.R., Buckanovich R.J. Ovarian cancer stem cell markers: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 2012; 322 (1): 1–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.002.
  15. Burgos-Ojeda D., Wu R., McLean K., Chen Y.C., Talpaz M., Yoon E., Cho K.R., Buckanovich R.J. CD24+ Ovarian cancer cells are enriched for cancer-initiating cells and dependent on jak2 signaling for growth and metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 2015; 14 (7): 1717–1727. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0607.
  16. Gast C.E., Silk A.D., Zarour L. et al. Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. *Sci. Adv.* 2018; 4 (9): e7828. Published 2018 Sept. 12. DOI: 10.1126/sciadv.aat7828.
  17. Carter A. Cell fusion theory: can it explain what triggers metastasis? *J. Natl. Cancer Inst.* 2008; 100 (18): 1279–1281. DOI: 10.1093/jnci/djn336.
  18. Larizza L., Schirrmacher V., Pflüger E. Acquisition of high metastatic capacity after *in vitro* fusion of a nonmetastatic tumor line with a bone marrow-derived macrophage. *J. Exp. Med.* 1984; 160 (5): 1579–1584. DOI: 10.1084/jem.160.5.1579.
  19. Ramakrishnan M., Mathur S.R., Mukhopadhyay A. Fusion-derived epithelial cancer cells express hematopoietic markers and contribute to stem cell and migratory phenotype in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2013; 73 (17): 5360–5370. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0896.
  20. Powell A.E., Anderson E.C., Davies P.S. et al. Fusion between Intestinal epithelial cells and macrophages in a cancer context results in nuclear reprogramming. *Cancer Res.* 2011; 71 (4): 1497–1505. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3223.
  21. Klymenko Y., Johnson J., Bos B., Lombard R., Campbell L., Loughran E., Stack M.S. Heterogeneous cadherin expression and multicellular aggregate dynamics in ovarian cancer dissemination. *Neoplasia*. 2017; 19 (7): 549–563. DOI: 10.1016/j.neo.2017.04.002.
  22. Vizzielli G., Costantini B., Tortorella L., Pitruzzella I., Gallotta V., Fanfani F., Gueli Alletti S., Cosentino F., Nero C., Scambia G. et al. A laparoscopic risk-adjusted model to predict major complications after primary debulking surgery in ovarian cancer: A single-institution assessment. *Gynecol. Oncol.* 2016; 142 (1): 19–24. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.04.020.
  23. Feng Z., Wen H., Jiang Z., Liu S., Ju X., Chen X., Xia L., Xu J., Bi R., Wu X. A triage strategy in advanced ovarian cancer management based on multiple predictive models for R0 resection: A prospective cohort study. *J. Gynecol. Oncol.* 2018; 29 (5): e65. DOI: 10.3802/jgo.2018.29.e65.
  24. Rutten M.J., Van Meurs H.S., Van De Vrie R., Naaktgeboeren C.A., Fons G., Opmeer B.C., Spijkerboer A., Bossuyt P.M., Kenter G.G., Buist M.R. et al. Laparoscopy to predict the result of primary cytoreductive surgery in patients with advanced ovarian cancer: a randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol.* 2017; 35 (6): 613–621. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.2962.

## Благодарности

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ за возможность использования научного оборудования, а также Григория Марченко, сотрудника компании Luminex Corporation в России и СНГ за помощь в организации эксперимента с использованием проточного цитометра с визуализацией ImageStreamX (Amnis).

## Вклад авторов

Кайгородова Е.В., Очиров М.О., Молчанов С.В., Дьяков Д.А., Рогачев Р.Р., Ковалев О.В., Вторушин С.В. – проведение исследований, анализ и интерпретация данных. Очиров М.О., Молчанов С.В., Чернышова А.Л., Шпилёва О.В. – выполнение ди-

агностики и лечение больных раком яичников. Кайгородова Е.В. – разработка концепции и дизайна исследования, написание рукописи статьи.

## Сведения об авторах

**Кайгородова Евгения Викторовна**, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0003-4378-6915.

**Очиров Максим Олегович**, аспирант, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0001-6628-2918.

**Молчанов Сергей Валериевич**, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение гинекологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0522-1772.

**Рогачев Роман Романович**, студент, медико-биологический факультет, СибГМУ, г. Томск.

**Дьяков Денис Александрович**, ассистент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-8667-9306.

**Чернышова Алена Леонидовна**, д-р мед. наук, профессор РАН, вед. науч. сотрудник, отделение гинекологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-8194-2811.

**Шпилёва Ольга Владимировна**, канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник, отделение гинекологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0003-0617-4688.

**Ковалев Олег Игоревич**, ординатор, кафедра патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-6826-725X.

**Вторушин Сергей Владимирович**, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии, СибГМУ; руководитель отделения общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск. ORCID 0000-0002-1195-4008.

(✉) **Кайгородова Евгения Викторовна**, e-mail: zlobinae@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2020

Подписана в печать 28.12. 2020