

Различные популяции опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников

Кайгородова Е.В.^{1,2}, Федулова Н.В.², Очиров М.О.¹, Дьяков Д.А.²,
Молчанов С.В.¹, Часовских Н.Ю.²

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

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

РЕЗЮМЕ

Введение. Рак яичников (РЯ) является одним из самых агрессивных и тяжело поддающихся лечению онкологических заболеваний. Около 75% случаев РЯ выявляется на поздних стадиях заболевания. Асцитическая жидкость является перспективным биологическим материалом для получения информации о характере опухолевого процесса при РЯ. Перитонеальная диссеминация считается одним из наиболее неблагоприятных факторов прогрессирования злокачественных опухолей. Однако прогностические факторы, связанные со злокачественным асцитом, изучены недостаточно.

Целью данного исследования явилась оценка различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости больных РЯ методом многоцветной проточной лазерной цитометрии на основе молекулярной панели маркеров EpCam, CD45, CD44, CD24, CD133 и N-cadherin. В проспективное исследование включены 16 больных с впервые диагностированным РЯ, стадии Iс–IV по системе FIGO, возраст 36–76 лет, поступившие на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Материалом для исследования служила асцитическая жидкость, стабилизированная ЭДТА, взятая во время лапароскопии. Различные популяции асцитических опухолевых клеток (с признаками стволовости, с признаком EMT (epithelial-mesenchymal transition), без признаков стволовости и EMT, с сочетанием этих признаков, а также атипичные / гибридные популяции клеток определяли методом многоцветной проточной лазерной цитометрии на аппарате BDFACSCanto (США) с помощью меченных различными флуорохромами моноклональных антител к EpCam, CD45, CD44, CD24, CD133 и N-cadherin и программного обеспечения BD FACSDiva. В результате исследования в асцитической жидкости больных РЯ было выявлено 12 популяций EpCam-положительных клеток. Клеточный состав асцитической жидкости больных РЯ представляет собой гетерогенную популяцию. Большую концентрацию асцитических опухолевых клеток представляют собой атипичные / гибридные формы опухолевых клеток с признаком стволовости, а также стволовые опухолевые клетки EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133+/- как с признаком EMT, так и без него.

Ключевые слова: рак яичников, асцитические опухолевые клетки, стволовые опухолевые клетки, многоцветная проточная цитометрия, жидкостная биопсия.

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

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МД-544.2018.7.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 4 от 02.04.2018).

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

Для цитирования: 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): 50–58. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-50-58>.

Dissimilar tumor cell populations in ascitic fluid of ovarian cancer patients

Kaigorodova E.V.^{1,2}, Fedulova N.V.², Ochirov M.O.¹, Dyakov D.A.²,
Molchanov S.V.¹, Chasovskikh N.Yu.²

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634009, Russian Federation

² Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the most aggressive and hard-to-treat cancers. About 75% of ovarian cancer cases are detected at later stages of the disease. Ascitic fluid is promising biological material to get information about the tumor nature in ovarian cancer. Peritoneal dissemination is one of the most unfavorable factors of malignant tumor progression. However, prognostic factors associated with malignant ascites are not well understood.

The aim of the study was to evaluate various tumor cell populations in ascitic fluid of ovarian cancer patients by laser multicolor flow cytometry using a molecular panel of EpCam, CD45, CD44, CD24, CD133, and N-cadherin markers. The prospective study included 16 patients aged 36 to 76 years with newly diagnosed FIGO stage Ic–IV ovarian cancer, who were admitted for treatment to the Cancer Research Institute of Tomsk National Research Medical Center. The study material included EDTA-stabilized ascitic fluid sampled during laparoscopy. Various populations of ascitic tumor cells (with stemness features, with epithelial mesenchymal transition (EMT) features, without stemness and EMT features, with a combination of these features, as well as atypical / hybrid cell populations) were identified by multicolor flow cytometry on a BDFACSCanto apparatus (USA) using fluorochrome-labeled EpCam, CD45, CD44, CD24, CD133, and N-cadherin monoclonal antibodies and the BD FACSDiva software. The study revealed twelve populations of Epcam-positive cells in ascitic fluid of ovarian cancer patients. The cell composition of ascitic fluid in ovarian cancer patients is represented by a heterogeneous population. A large fraction of ascitic tumor cells are atypical / hybrid tumor cells with stemness features as well as Epcam+CD45–CD44+CD24+CD133+/-cancer stem cells, both with and without EMT features.

Key words: ovarian cancer, ascitic tumor cells, cancer stem cells, multicolor flow cytometry, liquid biopsy.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out with the financial support of the grant of the President of the Russian Federation MD-544.2018.7.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local Ethics Committee at Research Institute of Oncology, Tomsk NRMC (Protocol No. 4 of 02.04.2018).

For citation: Kaigorodova E.V., Fedulova N.V., Ochirov M.O., Dyakov D.A., Molchanov S.V., Chasovskikh N.Yu. Dissimilar tumor cell populations in ascitic fluid of ovarian cancer patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (1): 50–58. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-50-58>.

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников (РЯ) является одним из самых агрессивных и тяжело поддающихся лечению онкологических заболеваний. Ежегодно в мире регистрируется более 225 тыс. новых случаев РЯ, более 140 тыс. женщин умирают от этого заболевания. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике, около 75% случаев РЯ выявляется на поздних стадиях заболевания. Лечение больных распространенным опухолевым процессом является трудным и не всегда приводит к должным результатам. Пятилетняя выживаемость больных при III стадии составляет 23,8%, а при IV – 11,6%. Бессимптомный характер заболевания приводит к поздней диагностике пациентов и, как следствие, к 60%-й смертности в течение 5 лет.

В отличие от других опухолей, рак яичников характеризуется уникальным метастатическим процессом. Самый ранний и наиболее распространенный путь метастазирования – имплантационный. Он часто сопровождается накоплением жидкости в брюшной полости, называемой асцитом. До 38% случаев асцитов, ассоциированных со злокачественными опухолями у женщин, приходится на рак яичников. Асцитическая жидкость является перспективным биологическим материалом для получения информации о характере опухолевого процесса. В отличие от сыворотки, она более информативна, особенно на ранней стадии злокачественного процесса. 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. 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 [1]. В-третьих, источником опухолевых клеток в асцитической жидкости является опухоль, в частности РЯ, который сам представляет собой гетерогенную популяцию клеток.

В настоящее время гетерогенность опухолевых клеток определяют по их антигенным свойствам, спектру различных маркеров клеточной поверхности, по активности ключевых сигнальных путей. При обнаружении циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в качестве специфиче-

ского биомаркера широко используют молекулу адгезии эпителиальных клеток (ЕpСAM), так как она сверхэкспрессируется в более чем 70% случаев РЯ, и ее уровень тесно связан со злокачественным асцитом, химиорезистентностью и снижением выживаемости у пациентов. Роль ЕpСAM не ограничивается клеточной адгезией, есть многочисленные данные об ее участии в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЕМТ). Известно, что ЕМТ 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) [2].

В дополнение к ЕpСAM 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. CD44 как биомаркер имеет несколько преимуществ. Во-первых, нормальные клетки имеют низкий уровень экспрессии CD44 и плохую адгезию к гиалуроновой кислоте. Во-вторых, гиалуроновая кислота является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса опухоли, который помимо связывания с ЦОК поддерживает целостность клеток [3].

Еще одним маркером ЦОК 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 ЕМТ, который приводит к формированию высокопролиферативного фенотипа, устойчивости к химиотерапии посредством активации PI3K / Akt, NF-κB и ERK сигнальных каскадов [4].

Лейкоциты в асцитической жидкости морфологически напоминают циркулирующие опухолевые клетки, поэтому для аффинного связывания с лейкоцитами целесообразно использовать дифференцировочный антиген CD45.

Общей чертой ЕМТ 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 инвазивно-

го 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 [5].

CD133 – наиболее часто используемый антиген клеточной поверхности для обнаружения и выделения CSC 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 [6].

Полная картина различных популяций опухолевых клеток при РЯ может позволить предсказать течение заболевания, общую и безрецидивную выживаемость, ответ на химиотерапию. Обусловленная асцитом перитонеальная диссеминация является одним из наиболее неблагоприятных факторов прогрессирования злокачественных опухолей. Однако прогностические факторы, связанные со злокачественным асцитом, изучены недостаточно. В связи с этим исследование различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости представляется актуальным.

Целью данного исследования явилась оценка популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости больных РЯ методом многоцветной проточной лазерной цитометрии на основе молекулярной панели маркеров EpCam, CD45, CD44, CD24, CD133 и N-cadherin.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включены 16 больных с впервые диагностированным раком яичников, стадии Ic–IV по системе FIGO, возраст 36–76 лет, поступившие на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Материалом для исследования служила асцитическая жидкость, стабилизированная ЭДТА, взятая во время лапароскопии. На основе молекулярной панели маркеров к EpCam, CD45, CD44, CD24, CD133 и N-cadherin методом многоцветной проточной лазерной цитометрии на аппарате BDFACSCanto (США) с помощью программного

обеспечения BD FACSDiva определяли различные популяции асцитических опухолевых клеток (с признаками стволовости, с признаком EMT (epithelial-mesenchymal transition), без признаков стволовости и EMT, с сочетанием этих признаков), а также атипичные / гибридные популяции опухолевых клеток.

Для этого асцитическую жидкость инкубировали с мечеными различными флюорохромами моноклональными антителами к CD45 клон HI30 (APC/Cy7) (Biolegend, США), EpCAM клон 9C4 (PE) (Biolegend, США), CD44 клон VJ18 (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 хранили в темноте при 4 °C и проанализировали на проточном цитофлуориметре в течение часа. Уровень клеток выражали в количестве клеток в 1 мкл асцитической жидкости.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона для зависимых выборок с поправкой Бонферрони в программном пакете для статистического анализа Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей $Me [Q_1-Q_3]$. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования с помощью многоцветной проточной цитометрии в асцитической жидкости было выявлено 12 популяций EpCam-положительных клеток. Асцитические опухолевые клетки с признаком стволовости без признаков EMT с фенотипами EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133+Ncadherin-; EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133-Ncadherin-; EpCam+CD45-CD44+CD24+CD133+Ncadherin-, асцитические опухолевые клетки без признаков стволовости и без признаков EMT – EpCam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin-; асцитические опухолевые клетки без признаков стволовости с признаком EMT – EpCam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin+; асцитические опухолевые клетки с признаками стволовости и с EMT – EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133+Ncadherin+; EpCam+CD45-CD44+CD24-CD133-Ncadherin+;

Ерсam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin+/-;
 Ерсam+CD45-CD44-CD24+CD133+/- Ncadherin+/-;
 Ерсam+CD45-CD44+CD24+CD133+Ncadherin+, а
 также атипичные / гибридные формы клеток без
 признаком стволовости – Ерсam+CD45+CD44-
 CD24-CD133-Ncadh+/- и атипичные / гибри-

дые формы клеток с признаками стволовости –
 Ерсam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadh+/-.
 На рисунке представлен протокол результата
 многоцветной проточной цитометрии при оценке
 различных популяций Ерсam+ клеток в асцити-
 ческой жидкости.

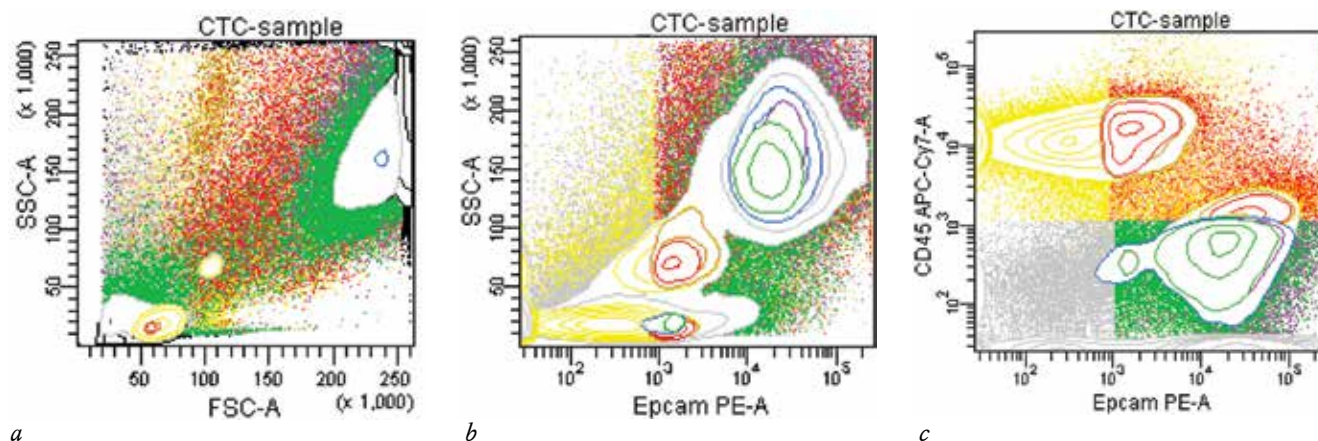


Рисунок. Различные популяции клеток в асцитической жидкости, определенные многоцветной проточной цитометрией у больной раком яичников: *a* – популяции асцитических клеток в проекциях прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния; *b* – популяции Ерсam-положительных и Ерсam-отрицательных клеток в асцитической жидкости; *c* – популяции CD45+Ерсam-; CD45+Ерсam+; CD45-Ерсam-; CD45-Ерсam+ клеток

Статистический анализ данных при использо-
 вании непараметрического критерия Фридмана и
 Кендалла, а также попарное сравнение Вилкоксона
 показали статистически значимые различия
 между уровнями данных популяций. Наиболее
 высокая концентрация асцитических опухолевых
 клеток наблюдалась у атипичных / гибридных
 форм с признаками стволовости. Так, уровень
 Ерсam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadh+/-
 клеток составил 240,97 (80,54–383,5) клеток/мкл
 против асцитических опухолевых клеток без
 признаков стволовости и EMT (Ерсam+CD45-
 CD44-CD24-CD133-Ncadh-) – 0,28 (0,11–4,27) кле-
 ток/мкл ($p = 0,0009$) и атипичных / гибридных

опухолевых клеток без признаков стволовости
 (Ерсam+CD45+CD44-CD24-CD133-Ncadh+/-) –
 2,07 (0,29–7,16) клеток/мкл ($p = 0,00098$).

Количество стволовых опухолевых клеток
 с положительной экспрессией CD24 как с при-
 знаком EMT, так и без него (Ерсam+CD45-
 CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin+/-) значи-
 мо не отличалось от количества опухолевых клеток
 без признаков стволовости и EMT (Ерсam+CD45-
 CD44-CD24-CD133-Ncadherin-) и превышало уро-
 вень клеток без признаков стволовости в со-
 стоянии EMT (Ерсam+CD45-CD44-CD24-CD133-
 Ncadherin+) на уровне тенденции ($p = 0,073$) (та-
 блица).

Таблица

Уровень различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников, клеток/мкл, $Me [Q_1-Q_3]$		
АОК	Фенотип асцитических опухолевых клеток	Кол-во клеток/мкл
АОК-1	Ерсam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin-	0,28 [0,11–4,27]
АОК-2	Ерсam+CD45-CD44-CD24-CD133-Ncadherin+	0,09 [0,00–1,22] $p_{1-2} = 0,054$
АОК-3	Ерсam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadherin-	0,02 [0,00–0,52] $p_{1-3} = 0,021, p_{2-2} = 0,91$
АОК-4	Ерсam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadherin+	0,29 [0,03–0,72] $p_{1-4} = 0,035, p_{2-4} = 0,27, p_{3-4} = 1,00$
АОК-5	Ерсam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin+	0,34 [0,21–0,53] $p_{1-5} = 0,085, p_{2-5} = 0,31,$ $p_{3-5} = 0,77, p_{4-5} = 0,37$

АОК	Фенотип асцитических опухолевых клеток	Кол-во клеток/мкл
АОК-6	Еpcam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin-	0,09 [0,00–1,45] $p_{1-6} = 0,21$ $p_{2-6} = 0,76$ $p_{3-6} = 0,91$ $p_{4-6} = 0,76$ $p_{5-6} = 0,88$
АОК-7	Еpcam+CD45-CD44-CD24+CD133+/-Ncadherin+	0,09 [0,04–0,78] $p_{1-7} = 0,26$ $p_{2-7} = 0,32$ $p_{3-7} = 0,95$ $p_{4-7} = 0,85$ $p_{5-7} = 0,76$ $p_{6-7} = 0,85$
АОК-8	Еpcam+CD45-CD44-CD24+CD133+/-Ncadherin-	0,17 [0,00–0,74] $p_{1-8} = 0,068$ $p_{2-8} = 0,39$ $p_{3-8} = 0,77$ $p_{4-8} = 0,85$ $p_{5-8} = 0,85$ $p_{6-8} = 0,95$ $p_{7-8} = 0,39$
АОК-9	Еpcam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin+/-	2,07 [0,53–11,42] $p_{1-9} = 0,36$ $p_{2-9} = 0,073$ $p_{3-9} = 0,039$ $p_{4-9} = 0,030$ $p_{5-9} = 0,043$ $p_{6-9} = 0,011$ $p_{7-9} = 0,31$ $p_{8-9} = 0,21$
АОК-10	Еpcam+CD45-CD44-CD24+CD133+/-Ncadherin+/-	1,58 [0,22–3,87] $p_{1-10} = 0,36$ $p_{2-10} = 0,086$ $p_{3-10} = 0,084$ $p_{4-10} = 0,047$ $p_{5-10} = 0,514$ $p_{6-10} = 0,374$ $p_{7-10} = 0,027$ $p_{8-10} = 0,017$ $p_{9-10} = 0,27$
Атипичные / гибридные клетки без признаков стволовости	Еpcam+CD45+CD44-CD24-CD133-Ncadherin+/-	2,07 [0,29–7,16] $p_{1-11} = 0,55$ $p_{2-11} = 0,0029$ $p_{3-11} = 0,177$ $p_{4-11} = 0,013$ $p_{5-11} = 0,015$ $p_{6-11} = 0,0506$ $p_{7-11} = 0,011$ $p_{8-11} = 0,011$ $p_{9-11} = 0,68$ $p_{10-11} = 0,506$
Атипичные / гибридные клетки с признаками стволовости	Еpcam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/-	240,97 [80,54–383,50] $p_{1-12} = 0,0009$ $p_{2-12} = 0,0009$ $p_{3-12} = 0,0009$ $p_{4-12} = 0,0009$ $p_{7-12} = 0,0076$ $p_{8-12} = 0,0076$ $p_{9-12} = 0,0076$ $p_{10-12} = 0,0009$ $p_{11-12} = 0,0009$

Примечание. АОК – асцитические опухолевые клетки; $p < 0,05$.

При этом количество стволовых опухолевых клеток с положительной экспрессией CD24 (Epcam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin+/-) значительно превышало количество стволовых опухолевых клеток с отрицательной экспрессией CD24 как с признаком EMT, так и без него (Epcam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadh+ и Epcam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadh-) и составляло 2,07 (0,53–11,42) клеток/мкл против 0,29 (0,03–0,72) клеток/мкл и 0,02 (0,00–0,52) клеток/мкл соответственно. Уровень стволовых опухолевых клеток с положительной экспрессией CD24 с фенотипом Epcam+CD45-CD44-CD24+CD133+/-Ncadherin+/- составлял 1,58 (0,22–3,87) клеток/мкл и был значимо выше стволовых опухолевых клеток с фенотипом Epcam+CD45-CD44+CD24-CD133+/-Ncadherin+.

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 процессе метастазирования опухолевые клетки яичников демонстрируют тропизм к сальнику. Их взаимодействие приводит к формированию высокоактивного фенотипа адипоцитов (САА), продуцирующего большую часть метаболического микроокружения опухоли [7]. Кроме того, жировая ткань является источником мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (MSC), способных самообновляться и дифференцироваться в другие проонкогенные клетки (CAF-опухоль-ассоциированные фибробласты и САА), а также поддерживать популяцию опухолевых стволовых клеток (CSC) [8].

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 EMT, с сочетанием этих признаков, стромальные и иммунные клеточные популяции, идентификация и характеристика которых может стать полезным инструментом в прогнозировании течения заболевания и ответа на химиотерапию.

Самая многочисленная группа клеток в асцитической жидкости больных РЯ имеет атипичный фенотип и представлена гибридными клетками с признаками стволовости (Epcam+CD45+CD44+CD24+/-CD133+/-Ncadherin+/-). Можно предположить, что образование гибридных клеток способствует карциноматозу РЯ и препятствует запуску апоптоза и аноиксиса опухолевых клеток в асците. Данное предположение и обнаруженные нами клетки требуют дальнейших исследований.

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 колониеобразующей 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 (MIS) эффективно подавлял ее рост [9].

Можно предположить, что наличие в асцитической жидкости опухолевых клеток с фенотипом Epcam+CD45-CD44+CD24+CD133+/-Ncadherin+/- связано с агрессивным характером течения рака яичников. Многочисленные исследования показали, что популяция Epcam+CD44+CD24+CD133+CD117+ обладает повышенной способностью инициировать рак и (или) стимулировать метастазирование *in vivo* [10]. На модели мышей (NOD/Shi-scid/IL-2R γ 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 EMT. 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+ [11].

По данным E. Meng и соавт., опухолевые клетки яичников с фенотипом CD44+/CD24- обладают большим потенциалом к внутрибрюшному распространению благодаря свойствам, подобным CSC. По сравнению с другими фенотипами, они

демонстрируют 60-кратное увеличение инвазии матригеля клеточной линией SKOV3 ($p < 0,001$) и характеризуются агрессивным клиническим течением заболевания [12].

Наличие CD44 указывает на большой потенциал к образованию клеточных сфероидов, которые, как известно, способствуют метастазированию и развитию устойчивости к химиотерапии. Это подтверждается исследованием, демонстрирующим образование крупных, полых сфероидов из популяции CD44high /CD166high, полученной от опухолевой линии РЯ (SKOV3, OV90), по сравнению с CD44low/CD166low аналогами [13].

Таким образом, полученные результаты показывают большую гетерогенность опухолевых клеток в асцитической жидкости больных раком яичников. Обнаруженный факт наличия атипичных / гибридных форм Ерсат-положительных клеток, а также различных популяций опухолевых клеток с признаками стволовости в асцитической жидкости представляет большой интерес для дальнейших исследований в области персонализированной медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточный состав асцитической жидкости больных раком яичников является гетерогенным. Большую концентрацию асцитических опухолевых клеток представляют собой атипичные / гибридные формы клеток с признаком стволовости, а также стволовые опухолевые клетки Ерсат+CD45-CD44+CD24+CD133+/- как с признаком ЕМТ, так и без него. Дальнейшее исследование различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости, их связь с клиническим течением и эффективностью химиотерапии больных раком яичников является весьма целесообразным и открывает большие перспективы для практических разработок в области жидкостной биопсии.

ЛИТЕРАТУРА

- Hyler A.R., Baudoin N.C., Brown M.S., Stremler 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.0194170.
- Tayama S., Motohara T., Narrantuya 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.
- 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): 1373–1388. DOI: 10.7150/thno.17826.
- Nakamura K., Terai Y., Tanabe A., Ono Y.J., Hayashi M., Maeda K., Fujiwara S., Ashihara K., Nakamura M., Tanaka Y., Tanaka T., Tsunetoh S., Sasaki H., Ohmichi M. 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.
- Mrozik K.M., Blaschuk O.W., Cheong C.M., Zannettino A.C.W., Vandyke 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.
- 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.
- Schild T., Low V., Blenis J., Gomes A.P. Unique metabolic adaptations dictate distal organ-specific metastatic colonization. *Cancer Cell*. 2018; 33: 347–354. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.001.
- Cuiffo B.G., Karnoub A.E. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh. Migr.* 2012; 6 (3): 220–230. DOI: 10.4161/cam.20875.
- Wei X., Dombkowski D., Meirelles K., Pieretti-Vanmarcke R., Szotek P.P., Chang H.L., Preffer F.I., Mueller P.R., Teixeira J., MacLaughlin D.T., Donahoe P.K. 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.
- 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.
- 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.
- Meng E., Long B., Sullivan P., McClellan S., Finan M.A., Reed E., Shevde L., Rocconi R.P. CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival. *Clin. Exp. Metastasis*. 2012; 29 (8): 939–948. DOI: 10.1007/s10585-012-9482-4.
- Witt A.E., Lee C.W., Lee T.I., Azzam D.J., Wang B., Caslini C., Petrocca F., Grosso J., Jones M., Cohick E.B., Gropper A.B., Wahlestedt C., Richardson A.L., Shiekhatar R., Young R.A., Ince T.A. Identification of a cancer stem cell-specific function for the histone deacetylases, HDAC1 and HDAC7, in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2017; 36 (12): 1707–1720. DOI: 10.1038/onc.2016.337.

Благодарности

Авторы выражают благодарность руководителю отделения патологической анатомии и цитологии НИИ онкологии Томского НИМЦ проф. В.М. Перельмутеру и заведующему гинекологическим отделением НИИ онкологии Томского НИМЦ проф. Л.А. Коломиец за консультацию в подборе пациенток для исследования.

Вклад авторов

Кайгородова Е.В., Федулова Н.В., Дьяков Д.А. – проведение исследований, анализ и интерпретация данных. Очиров М.О., Молчанов С.В. – выполнение диагностики и лечение больных раком яичников. Часовских Н.Ю. – статистическая обработка данных, информационный поиск по теме исследования с помощью биоинформационных ресурсов. 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.

Федулова Наталья Владимировна, студент, 6-й курс, СибГМУ, г. Томск.

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

Дьяков Денис Александрович, студент, 6-й курс, СибГМУ, г. Томск.

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

Часовских Наталия Юрьевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра медицинской и биологической кибернетики, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0001-6077-0347.

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

Поступила в редакцию 12.04.2019

Подписана в печать 25.12.2019