



Гетерогенность EpCAM-положительных клеток в асцитической жидкости low-grade серозной карциномы яичников: клинический случай

Е.В. Кайгородова^{1,2}, О.В. Ковалев², А.Л. Чернышова¹, С.В. Вторушин^{1,2}, О.В. Шпилёва¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634050 Томск, пер. Кооперативный, 5;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2

Контакты: Евгения Викторовна Кайгородова zlobinae@mail.ru

Рак яичников (РЯ) – одна из наиболее злокачественных и агрессивно протекающих опухолей женской репродуктивной системы. Одной из наиболее актуальных проблем является поздняя диагностика РЯ: согласно статистическим данным, более 2/3 всех случаев заболевания выявляются лишь на III–IV стадии. РЯ характеризуется уникальным метастатическим процессом. Самый ранний и наиболее распространенный путь метастазирования – имплантационный. Он часто сопровождается накоплением в брюшной полости жидкости, называемым асцитом. В данном клиническом случае отражена большая гетерогенность опухолевых клеток в асцитической жидкости пациентки с low-grade серозной карциномой яичников, выявленной с помощью многоцветной проточной цитометрии. Показаны преимущество и польза данного метода в диагностике РЯ. Применение многоцветной проточной цитометрии открывает большие возможности для развития жидкостной биопсии в онкологии.

Ключевые слова: low-grade серозная карцинома яичников, асцитические опухолевые клетки, опухолевая гетерогенность, EpCAM, многоцветная проточная цитометрия, жидкостная биопсия

Для цитирования: Кайгородова Е.В., Ковалев О.В., Чернышова А.Л. и др. Гетерогенность EpCAM-положительных клеток в асцитической жидкости low-grade серозной карциномы яичников: клинический случай. Опухоли женской репродуктивной системы 2021;17(4):90–5. DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-4-90-95.

Heterogeneity of EpCAM-positive cells in low-grade serous ovarian carcinoma ascitic fluid: a clinical case

E. V. Kaigorodova^{1,2}, O. V. Kovalev², A. L. Chernyshova¹, S. V. Vtorushin^{1,2}, O. V. Shpileva¹

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5, Kooperativnyy St., Tomsk 634009, Russia;

²Siberian State Medical University; 2, Moscovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia

Contacts: Evgeniya Viktorovna Kaigorodova zlobinae@mail.ru

Ovarian cancer is one of the most malignant and aggressive tumors of the female reproductive system. Late diagnosis is one of the most significant problems: more than two-thirds of cases are detected only at stage III–IV. Ovarian cancer is characterized by a unique metastatic process. Implantation is the earliest and most common way of metastasis. It is often accompanied by fluid accumulation in the abdominal cavity, known as ascites. We report a case of low-grade serous ovarian carcinoma with a large heterogeneity of tumor cells in the ascitic fluid detected using multicolor flow cytometry. We demonstrated the advantages and benefits of this method in the diagnosis of ovarian cancer. Multicolor flow cytometry opens new horizons for liquid biopsy in oncology.

Key words: low-grade ovarian serous carcinoma, ascitic tumor cells, tumor heterogeneity, EpCAM, multicolor flow cytometry, liquid biopsy

For citation: Kaigorodova E. V., Kovalev O. V., Chernyshova A. L. et al. Heterogeneity of EpCAM-positive cells in low-grade serous ovarian carcinoma ascitic fluid: a clinical case. Opuholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system 2021;17(4):90–5. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-4-90-95.

Рак яичников (РЯ) является одной из наиболее злокачественных и агрессивно протекающих опухолей женской репродуктивной системы. Среди женского населения Российской Федерации РЯ занимает 9-е место (4,2 %) в структуре онкологической заболеваемости, с повышением показателя заболеваемости на 4,66 %, что было зафиксировано в период с 2008 по 2018 г. [1]. По данным, предоставленным международной группой экспертов, показатель смертности от данной нозологической формы продолжит неуклонно расти и к 2035 г. превысит 250 000 [2–4]. Стоит отметить, что одной из наиболее актуальных проблем РЯ является его поздняя диагностика: согласно статистическим данным, более 2/3 всех случаев заболевания выявляются лишь на III–IV стадии процесса [5, 6]. Эпителиальный РЯ можно разделить на более распространенные, агрессивные виды рака типа II и менее распространенные, медленно растущие виды рака типа I. В рамках этой модели серозные карциномы яичников можно разделить на опухоли высокой степени злокачественности (high-grade) (тип II) и опухоли низкой степени злокачественности (low-grade) (тип I). Серозные карциномы низкой степени злокачественности обычно встречаются у молодых женщин и имеют относительно благоприятный прогноз, несмотря на то что устойчивы к химиотерапии [7]. РЯ характеризуется уникальным метастатическим процессом. Самый ранний и наиболее распространенный путь метастазирования — имплантационный. Он часто сопровождается накоплением в брюшной полости жидкости (асцитом).

Асцитическая жидкость является перспективным биологическим материалом для получения информации о характере опухолевого процесса при РЯ. Недавние исследования показали, что клетки асцитической жидкости больных РЯ представляют собой гетерогенную популяцию, в состав которой входят стволовые опухолевые клетки [8]. Известно, что маркерами стволовых опухолевых клеток РЯ являются CD44, CD24, CD133, CD117 [9]. Молекулу адгезии эпителиальных клеток (EPCAM) широко используют при обнаружении циркулирующих опухолевых клеток. EPCAM сверхэкспрессируется в более чем 70 % случаев РЯ, и ее уровень тесно связан со злокачественным асцитом, химиорезистентностью и снижением выживаемости у пациентов [10, 11].

Цель описания клинического случая — показать гетерогенность EPCAM-положительных асцитических опухолевых клеток, выявленных методом многоцветной проточной цитометрии у пациентки с low-grade серозной карциномой яичников, и пользу данного метода в диагностике.

Клинический случай

Пациентка 44 лет поступила в отделение онкогинекологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский

медицинский центр Российской академии наук» в марте 2021 г. с жалобами на слабость, недомогание, периодические ноющие тянущие боли в низу живота в течение 6 мес, с тенденцией к усилению в последние 2 мес. Из анамнеза: менструации с 14 лет, установились сразу, по 4 дня через 27, регулярные, умеренные, безболезненные. Гинекологический паритет: Б-4, Р-2, А-2. Гинекологический анамнез не отягощен, гормональную терапию не получала. Наследственный анамнез отягощен по линии отца — рак кишечника. За время нахождения в стационаре проведено полное клиничко-лабораторное обследование. При бимануальном осмотре: наружные половые органы сформированы правильно, оволосение по женскому типу, влагалище емкое, своды свободные. Матка и придатки пальпируются в едином конгломерате до 16 см в диаметре, бугристые, плотные, ограниченно подвижные. Выделения — бели.

По данным ультразвукового исследования органов малого таза и брюшной полости: умеренные диффузные изменения печени. Хронический холецистит. Миома матки. Гематометра. Кисты шейки матки и эндоцервикса. Объемные новообразования яичников. Свободная жидкость в полости малого таза. Канцероматоз брюшины. По данным магнитно-резонансной томографии органов малого таза с болюсным контрастированием (контрастный препарат Мультихэнс, 15 мл): МР-признаки опухоли яичников (Cr). Вероятна инфильтрация матки и мезоректальной фасции. Канцероматоз? Асцит. Наботовы кисты.

Исследование опухолевых маркеров показало повышение уровней СА-125 до 2800 МЕ, HE-4 до 2766 pM.

По данным проведенного обследования было принято решение о целесообразности выполнения хирургического вмешательства в объеме лапароскопии, ревизии, стадирования, биопсии опухоли. В марте 2021 г. пациентке проведено оперативное лечение. При ревизии выявлено: по париетальной брюшине всех отделов брюшной полости определяются множественные метастатические узлы диаметром до 5–8 мм, местами сливающиеся между собой. Аналогичные изменения по брюшине надпеченочного пространства и в селезеночном углу. Большой сальник тотально имбибирован множеством метастатических узлов различного диаметра. Придатки увеличены до 8 см справа, до 7 см слева, плотные, с множественными папиллярными разрастаниями, в едином конгломерате с маткой и тесной взаимосвязи с петлями кишечника. В заднем своде — опухолевые массы, плотные, бугристые. Выпот в брюшной полости до 200 мл, светло-желтого опалесцирующего цвета, без взвеси. Отмечается наличие «нежных» спаек в малом тазу и верхнем этаже брюшной полости.

Взяты фрагменты опухолевой ткани (папиллярных разрастаний) по париетальной брюшине, в области придатков, большом сальнике. На рис. 1 представлены фотографии брюшной полости при проведении лапароскопии с помощью лапароскопической стойки Karl Storz.

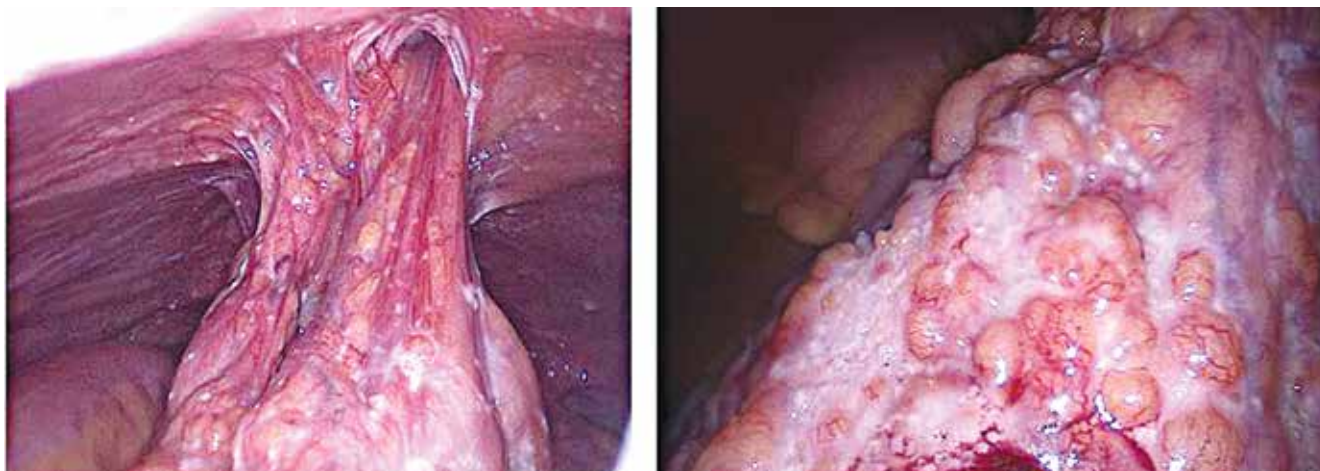


Рис. 1. Фотографии брюшной полости при проведении лапароскопии пациентки 44 лет

Fig. 1. Photos of the abdominal cavity during laparoscopy in a 44-year-old patient

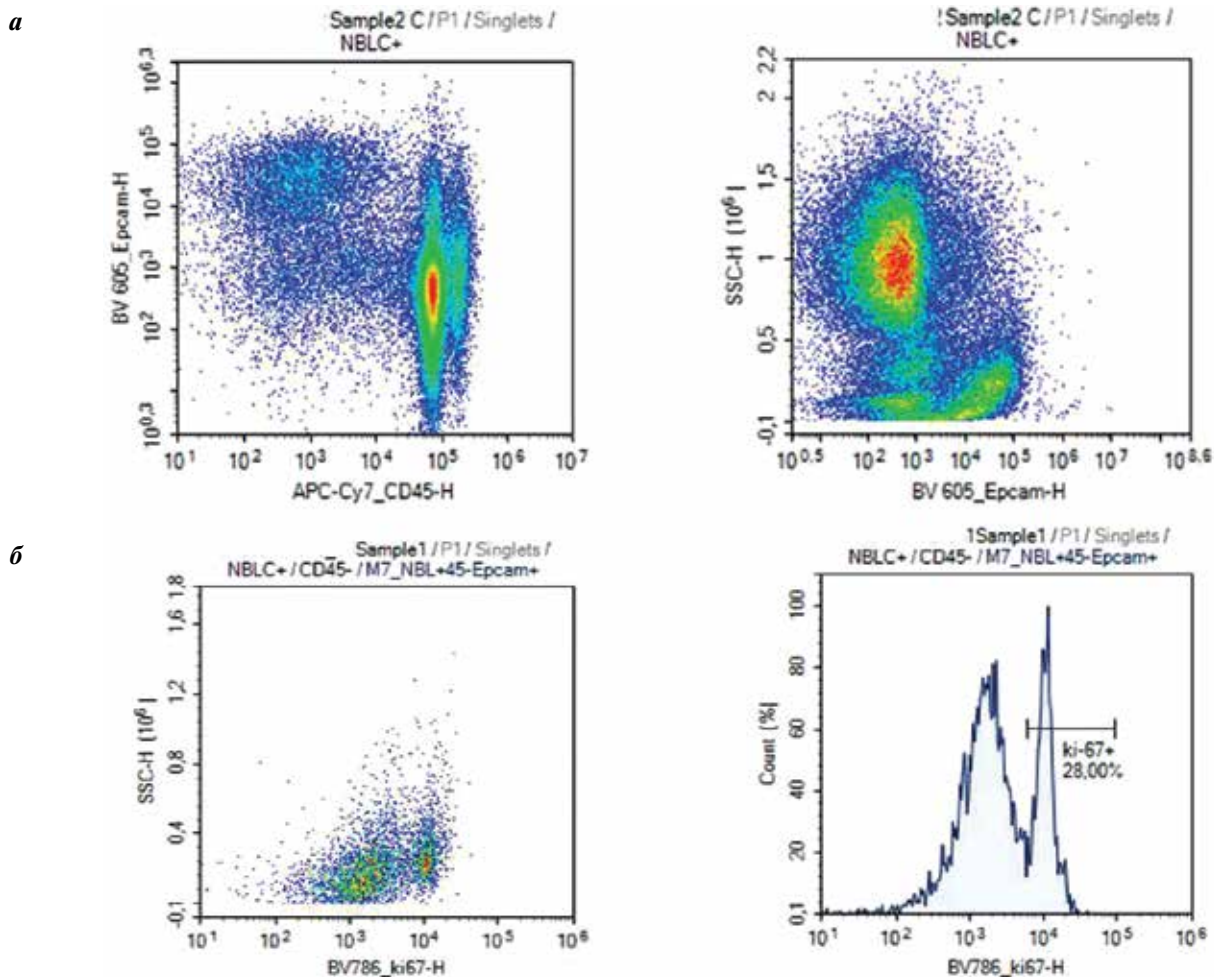


Рис. 2. Популяции ЕpСAM-положительных клеток в асцитической жидкости, выявленные методом многоцветной проточной цитометрии на аппарате Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США) с применением программного обеспечения NovoExpress (Agilent, США): а – гейтирование живых ядродержащих клеток по CD45 и ЕpСAM; б – гейтирование по маркеру Ki-67 популяции ЕpСAM+CD45– опухолевых клеток в асцитической жидкости пациентки 44 лет

Fig. 2. Clusters of EpCAM-positive cells in ascitic fluid detected using multicolor flow cytometry with Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, USA) and NovoExpress software (Agilent, США): а – gating of living nucleated cells by CD45 and EpCAM markers; б – gating of EpCAM+CD45– tumor cells by Ki-67 in the ascitic fluid of a 44-year-old patient

Цитологический анализ асцитической жидкости показал только наличие выраженного воспаления и клеток мезотелия с признаками пролиферации (стекло №425 от 18.03.2021), в то время как многоцветная проточная цитометрия асцитической жидкости при использовании меченных различными флуорофорами моноклональных антител к CD45, EpCAM, CK, MUC16, CD44, CD24, CD133, N-cadherin, HER2, Ki-67 и ядерного красителя живых клеток NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent выявила большое разнообразие EpCAM+ опухолевых клеток в асцитической жидкости.

На рис. 2 показаны популяции EpCAM+ клеток в асцитической жидкости, выявленные методом многоцветной проточной цитометрии на аппарате Novocyt 3000 (ACEA Biosciences, США) с применением программного обеспечения NovoExpress (Agilent, США).

Гистологическое исследование операционного материала (рег. №7127-28/21 от 23.03.2021) показало наличие low-grade серозной карциномы (ICD-O code 8461/3) с единичными псаммомными тельцами. На рис. 3 представлен микропрепарат операционного материала опухолевой ткани. Опухоль микропапиллярного строения, с наличием единичных железистых структур и немногочисленными отдельно лежащими кластерами атипичных клеток. Опухолевые структуры выполнены слабополиморфными, преимущественно призматическими и кубическими клетками средних размеров, с тонкой нечеткой цитоплазматической мембраной, скудной, слабоэозинофильной гомогенной цитоплазмой и крупными, относительно мономорфными, гиперхромными ядрами преимущественно округлой и овоидной формы, с четкой ровной кариоплазматической мембраной, равномерно распределенным пылевидным хроматином; в части клеток визуализируются мелкие округлые ядрышки. Митотическая

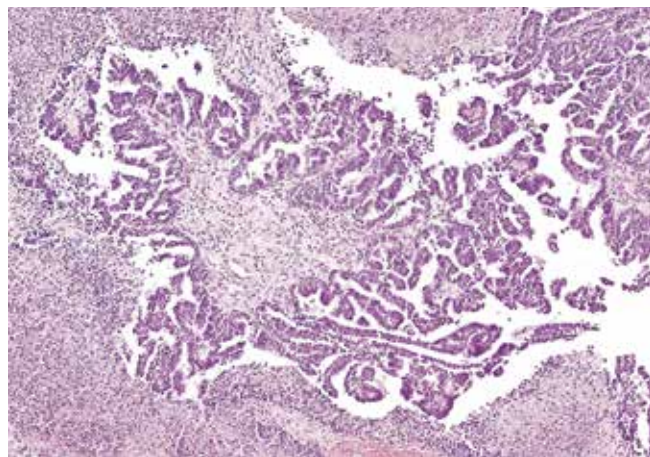


Рис. 3. Low-grade серозная карцинома яичника. Микрофотография получена с помощью гистологического сканера Aperio AT2, Leica, большое увеличение. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 3. Low-grade serous ovarian carcinoma. The photo was made using the histological scanner Aperio AT 2, Leica; high magnification. Hematoxylin and eosin staining

активность опухоли составляет до 3 фигур на 10 полей зрения (при увеличении 400). Опухоль погружена в умеренно выраженную строму с неравномерно выраженной лимфоидной инфильтрацией, в части полей представленной крупными лимфоидными агрегатами, в части полей зрения — дискретно расположенными лимфоцитами. В единичных полях визуализируются очаговые скопления нейтрофилов. Определяются единичные мелкие очаговые некрозы.

Иммуногистохимическое исследование операционного материала показало положительную экспрессию EpCAM и цитокератина 7 (рис. 4–5). Уровень пролиферативной активности опухолевой ткани составил 70 % (рис. 6).

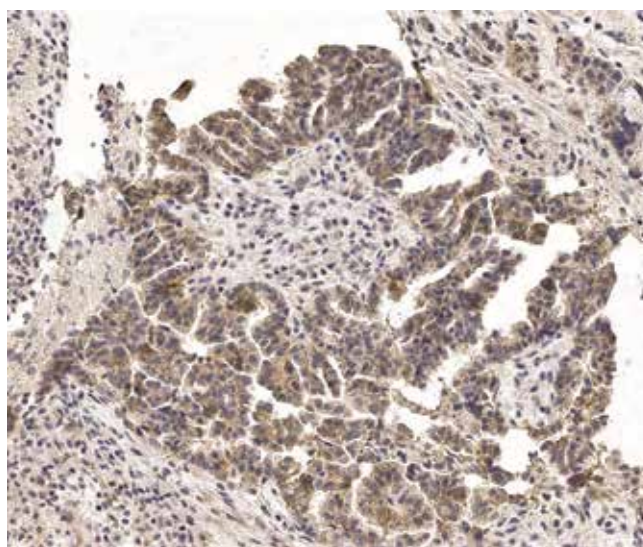


Рис. 4. Мембранная экспрессия EpCAM в low-grade серозной карциноме яичника. Микрофотография получена с помощью гистологического сканера Aperio AT2, Leica, большое увеличение

Fig. 4. Membrane expression of EpCAM in low-grade serous ovarian carcinoma. The photo was made using the histological scanner Aperio AT2, Leica; high magnification

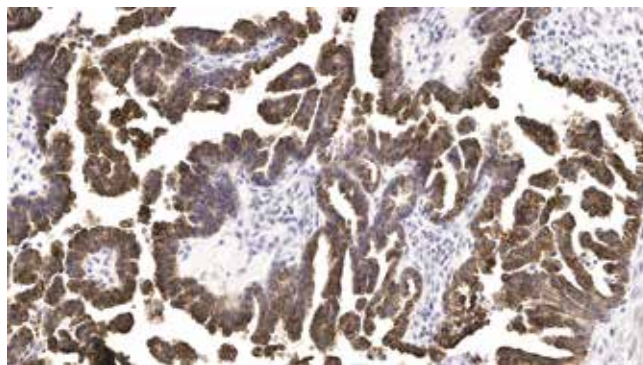


Рис. 5. Экспрессия цитокератина 7 в low-grade серозной карциноме яичника. Микрофотография получена с помощью гистологического сканера Aperio AT2, Leica, малое увеличение

Fig. 5. Expression of cytokeratin 7 in low-grade serous ovarian carcinoma. The photo was made using the histological scanner Aperio AT2, Leica; low magnification

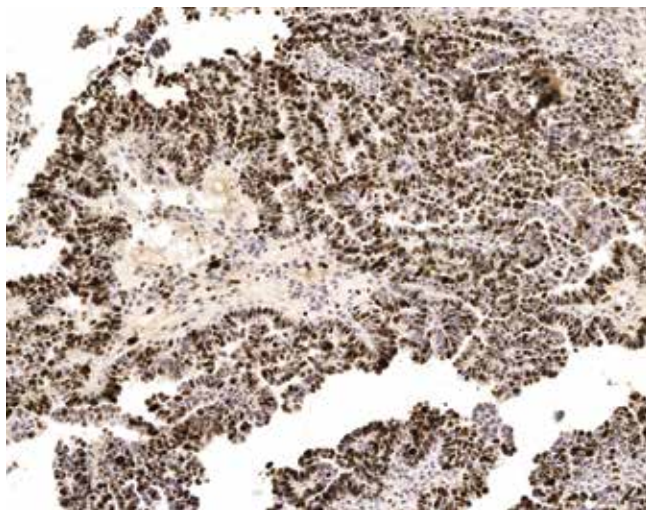


Рис. 6. Ядерная экспрессия Ki-67 в low-grade серозной карциноме яичника. Микрофотография получена с помощью гистологического сканера Aperio AT2, Leica, среднее увеличение

Fig. 6. Nuclear expression of Ki-67 in low-grade serous ovarian carcinoma. The photo was made using the histological scanner Aperio AT2, Leica; medium magnification

Недавние исследования показали, что в асцитической жидкости больных РЯ выявлено 12 популяций Ерсам+ 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 Ерсам+CD45–CD44+CD24+CD133± как с признаком EMT (epithelial-mesenchymal transition), так и без него [8]. Также показано, что количество асцитических клеток с фенотипом Ерсам+CD45–CD44–CD24+CD133–N-cadherin+ и атипичных/гибридных форм клеток Ерсам+CD45+CD44+–CD24±CD133±N-cadherin± в асцитической жидкости прямо коррелирует со степенью канцероматоза [12].

В представленном нами случае многоцветная проточная цитометрия позволила не только выявить факт наличия опухолевых клеток в асцитической жидкости, подтверждающий клинически выявленный канцероматоз, но и показать гетерогенность асцитических опухолевых клеток и высокий уровень пролиферативной активности. Дальнейшее исследование различных популяций опухолевых клеток в асцитической жидкости и их связи с клиническим течением и эффективностью химиотерапии у больных РЯ является весьма целесообразным и открывает большие перспективы для практических разработок в области жидкостной биопсии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2018 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2018 (incidence and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: P.A. Herzen Moscow Oncology Research Institute — a branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia, 2019. 250 p. (In Russ.)].
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210.
3. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin 2018;68(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21442.
4. Lheureux S., Braunstein M., Oza A.M. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. CA Cancer J Clin 2019;69(4):280–304. DOI: 10.3322/caac.21559.
5. Matulonis U.A., Sood A.K., Fallowfield L. et al. Ovarian cancer. Nat Rev Dis Primers 2016;2:16061. DOI: 10.1038/nrdp.2016.61.
6. Reid F., Bhatla N., Oza A.M. et al. The World Ovarian Cancer Coalition Every Woman Study: identifying challenges and opportunities to improve survival and quality of life. Int J Gynecol Cancer 2021;31(2):238–44. DOI: 10.1136/ijgc-2019-000983.
7. Kaldawy A., Segev Y., Lavie O. et al. Low-grade serous ovarian cancer: A review. Gynecol Oncol 2016;143(2):433–8. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.08.320.
8. Kaigorodova E.V., Fedulova N.V., Ochirov M.O. et al. Dissimilar tumor cell populations in ascitic fluid of ovarian cancer patients. Bulletin of Siberian Medicine 2020;19(1):50–8. DOI: 10.20538/1682-0363-2020-1-50-58.
9. Hatina J., Boesch M., Sopfer S. et al. Ovarian Cancer Stem Cell Heterogeneity. Adv Exp Med Biol 2019;1139:201–21. DOI: 10.1007/978-3-030-14366-4_12.
10. Keller L., Werner S., Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. Cell Stress 2019;3(6):165–80. DOI: 10.15698/cst2019.06.188.
11. Tavsan Z., Ayar Kayalı H. EpCAM-claudin-tetraspanin-modulated ovarian cancer progression and drug resistance. Cell Adh Migr 2021;14(1):57–68. DOI: 10.1080/19336918.2020.1732761.
12. Kaigorodova E.V., Ochirov M.O., Molchanov S.V. et al. 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. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-2-44-53.

Благодарность

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Медицинская геномика» ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» за возможность использования научного оборудования.

Acknowledgment

The authors are grateful to The Core Facility “Medical genomics”, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences for the opportunity to use scientific equipment.

Вклад авторов

Е.В. Кайгородова, О.В. Ковалев, А.Л. Чернышова, С.В. Вторушин, О.В. Шпилёва: получение и анализ данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи.

Authors' contribution

E.V. Kaigorodova, O.V. Kovalev, A.L. Chenyshova, S.V. Vtorushin, O.V. Shpileva: obtaining data for analysis and data analysis, reviewing of publications of the article's theme, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Кайгородова / E.V. Kaigorodova: <https://orcid.org/0000-0003-4378-6915>

О.В. Ковалев / O.V. Kovalev: <https://orcid.org/0000-0002-6826-725X>

А.Л. Чернышова / A.L. Chenyshova: <https://orcid.org/0000-0002-8194-2811>

С.В. Вторушин / S.V. Vtorushin: <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

О.В. Шпилёва / O.V. Shpileva: <https://orcid.org/0000-0003-0617-4688>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ МД-2017.2020.7.

Financing. This work was funded by grant of the President of the Russian Federation MD-2017.2020.7.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Работа одобрена локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (протокол № 4 от 02.04.2018).

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The work was approved by the local ethics committee of the Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 4 dated 02.04.2018).