

## Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток CD44, CD133 и ALDH в первичной опухоли на фоне платиносодержащей химиотерапии при раке яичников

С.О. Генинг<sup>1</sup>, И.И. Антонеева<sup>1,2</sup>, Т.В. Абакумова<sup>1</sup>, Т.П. Генинг<sup>1</sup>, Е.В. Слесарева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Институт медицины, экологии и физической культуры, Ульяновск, Россия

<sup>2</sup> ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, Ульяновск, Россия

**Введение.** Рак яичников характеризуется неблагоприятным клиническим течением. Сложности в его лечении могут быть обусловлены внутриопухолевой гетерогенностью, включающей наличие пула стволовых клеток. Целью данного исследования была оценка экспрессии маркеров стволовых опухолевых клеток в ткани первичного рака яичников до и в процессе химиотерапии (ХТ) в связи с клиническими характеристиками заболевания.

**Материалы и методы.** В ретроспективном исследовании оценивали образцы ткани первичной опухоли пациенток (n=28) с первичным эпителиальным раком яичников I–IV стадии, полученные до трех курсов ХТ либо после них. Оценку экспрессии ALDH, CD44, CD133 проводили методом иммуногистохимии.

**Результаты.** В образцах низкодифференцированной серозной аденокарциномы процент клеток, экспрессирующих ALDH (p=0,008), CD44 (p=0,026), CD133 (p=0,059), был ниже, чем в опухолях других подтипов. В образцах ткани, полученных до лечения, процент клеток, экспрессирующих CD44, был больше (p=0,053), чем в образцах, полученных после неoadъювантной ХТ. Прослеживалась тенденция к более высокой экспрессии CD44 (p=0,056) и ALDH (p=0,074) в опухолях I–II стадии в сравнении с III–IV стадией. У пациенток с клинически платиночувствительными опухолями в группе после ХТ, но не до ХТ, процент CD44<sup>+</sup> клеток в опухоли был больше, чем у нечувствительных к платине (p=0,038). Количество опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH, возрастало прямо пропорционально количеству опухолевых клеток, экспрессирующих CD44 (R<sup>2</sup>=0,280, p=0,005). Между количеством CD44<sup>+</sup> и CD133<sup>+</sup> клеток в паренхиме опухоли присутствовала положительная корреляция (r=0,408, p=0,031).

**Заключение.** Маркеры стволовых опухолевых клеток коэкспрессируются в тканях первичного очага рака яичников. Экспрессия маркеров различается в зависимости от гистологического подтипа и наличия предшествующего химиотерапевтического воздействия.

**Ключевые слова:** стволовые опухолевые клетки, рак яичников, химиотерапия, CD44, CD133, ALDH, иммуногистохимия

**Для корреспонденции:** Снежанна Олеговна Генинг. E-mail: sgening@bk.ru

**Для цитирования:** Генинг С.О., Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Слесарева Е.В. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток CD44, CD133 и ALDH в первичной опухоли на фоне платиносодержащей химиотерапии при раке яичников. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):63–71. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.63-71.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90011.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 28.07.2021. Получена после рецензирования 16.08.2021. Принята в печать 22.09.2021.

## Expression of cancer stem cell markers CD44, CD133, and ALDH in a primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer

S.O. Gening<sup>1</sup>, I.I. Antoneeva<sup>1,2</sup>, T.V. Abakumova<sup>1</sup>, T.P. Gening<sup>1</sup>, E.V. Slesareva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ulyanovsk State University, Institution of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk, Russia

<sup>2</sup> Regional Clinical Oncological Dispensary, Ulyanovsk, Russia

**Introduction.** Ovarian cancer (OC) is characterized by an unfavorable clinical course. Difficulties in the treatment of OC can be due to intratumoral heterogeneity, which includes the presence of stem cells. The aim of this study was to assess the expression of stem markers in the tissue of primary OC before and during chemotherapy of OC in association with the clinical features of the disease.

*Materials and methods.* A retrospective study evaluated tissue samples of the primary tumors of patients (n=28) with stages I–IV epithelial OC obtained before or after 3 courses of chemotherapy. The expression of ALDH, CD44, and CD133 was assessed by immunohistochemistry.

*Results.* In samples of high-grade serous adenocarcinoma, the percentages of cells expressing ALDH (p=0.008), CD44 (p=0.026), and CD133 (p=0.059) were lower than in other subtypes. Tissue samples obtained before treatment showed a higher percentage of cells expressing CD44 (p=0.053) than the ones obtained after neoadjuvant chemotherapy. There was a tendency towards higher expression of CD44 (p=0.056) and ALDH (p=0.074) in stages I–II tumors when compared to that in stages III–IV. In the neoadjuvant chemotherapy group, patients with clinically platinum-sensitive tumors had a higher percentage of CD44<sup>+</sup> cells than those with non-platinum-sensitive ones (p=0.038). The number of tumor cells expressing ALDH rose with the increase in CD44<sup>+</sup> cells number (R<sup>2</sup>=0.280, p=0.005). We found a positive correlation between the numbers of CD44<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup> cells in the tumor parenchyma (r=0.408, p=0.031).

*Conclusion.* Cancer stem cell markers are co-expressed in primary tumor tissue in OC. The expression of stem markers differs depending on the histological subtype and the presence of prior exposure to chemotherapy.

**Keywords:** tumor stem cells, ovarian cancer, chemotherapy, CD44, CD133, ALDH, immunohistochemistry

**Corresponding author:** Snezhanna O. Gening. E-mail: sgening@bk.ru

**For citation:** Gening S.O., Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P., Slesareva E.V. Expression of cancer stem cell markers CD44, CD133, and ALDH in a primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):63–71. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.63–71 (In Russ.).

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 19-315-90011.

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

**Received** 28.07.2021. **Received in revised form** 16.08.2021. **Accepted** 22.09.2021.

## Введение

Рак яичников (РЯ) характеризуется рядом неблагоприятных особенностей клинического течения. К ним относятся отсутствие симптомов до момента развития интраперитонеальной диссеминации, низкая 5-летняя общая выживаемость, несмотря на высокую частоту ответа на химиотерапию первой линии, укорочение интервала без прогрессирования с каждым последующим рецидивом, критическое значение наличия чувствительности к платиновым препаратам для прогноза болезни [1, 2]. Исследования новых лекарственных средств для терапии РЯ в последние годы демонстрируют многообещающие результаты, однако патогенез данного заболевания до сих пор во многом неясен.

Все больше авторов связывают сложности в лечении РЯ с высоким уровнем внутриопухолевой гетерогенности [3]. Общепринятая в настоящее время концепция стволовых клеток (СК) опухолей как источника гетерогенности [4] актуальна и для РЯ. Два основных свойства стволовых клеток – самообновление пула и мультилинейная дифференцировка – позволяют им воспроизводить широкий спектр фенотипов клеток опухолевой паренхимы и даже стромы [3]. Способность СК к формированию сфероидных колоний, растущих в жидкой среде без подложки, может успешно реализоваться внутри асцита, появление которого часто становится первым симптомом прогрессирующего РЯ [4].

В 2010 году L. Hu et al. описали наличие в РЯ клеток «сторонней популяции» (side population). После введения красителя эти клетки гораздо эффективнее осуществляли его удаление (эффлюкс) из цитоплазмы,

чем другие клетки паренхимы [5]. Данное явление наблюдается в стволовых опухолевых клетках и вызвано высокой экспрессией в составе их мембраны белков-транспортёров, которые также помогают выведению молекул цитостатиков, потенциально нивелируя эффект лечения [6]. В последующих исследованиях были описаны маркеры детекции СК РЯ, которые могут использоваться в иммуногистохимических исследованиях, в том числе CD44, CD133 альдегиддегидрогеназа (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) [7]. Описана роль гликопротеина CD44 в опухолевой прогрессии и модуляции опухолевого микроокружения, экспрессия CD133 обнаружена на СК различных опухолей, однако функция и клиническое значение этого маркера до сих пор неясны [8]. Также до настоящего момента не определена оптимальная комбинация маркеров для выявления СК РЯ; кроме того, высокая пластичность фенотипа стволовых опухолевых клеток может приводить к различиям в паттернах экспрессии в зависимости от клинической ситуации [9].

Целью данного исследования была оценка экспрессии маркеров стволовых клеток опухоли CD44, CD133 и ALDH в ткани первичного РЯ до и в процессе химиотерапии в связи с клиническими характеристиками заболевания.

## Материалы и методы

В ретроспективное исследование были включены пациентки (n=28) с первичным гистологически верифицированным эпителиальным РЯ I–IV стадии по FIGO, проходившие лечение в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологическо-

го диспансера в 2016–2019 годах. Критерии включения в исследование: планово выполненная хирургическая операция, наличие биоматериала достаточного объема и качества для иммуногистохимического (ИГХ) исследования, отсутствие иных злокачественных опухолей (в анамнезе и синхронно развивающихся).

Добровольное информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2013) подписано всеми участницами исследования. Исследование одобрено этическим комитетом ИМЭиФК Ульяновского государственного университета (протокол № 3 от 15.03.2017). Образцы ткани опухоли получены интраоперационно: у пациенток, получавших адъювантную химиотерапию (АХТ), – до начала химиотерапии, а у пациенток, получавших неoadъювантную химиотерапию (НАХТ), – после трех курсов химиотерапии по схеме TP (карбоплатин AUC6 + паклитаксел 175 мг/м<sup>3</sup> внутривенно капельно 1 раз в 3 недели) согласно международным и национальным рекомендациям [10]. Хирургическое лечение выполнялось в объеме гистерэктомии с двусторонней сальпингоофорэктомией и оментэктомией. Согласно рекомендациям GCI4th, пациенток считали клинически платиночувствительными, если рецидив/прогрессирование возникали через более чем 6 месяцев от последнего введения химиопрепаратов первой линии; нечувствительными – если интервал от последнего введения до рецидива/прогрессирования составлял менее 6 месяцев [11].

Морфологическое исследование включало гистологический и иммуногистохимический методы. Ткани фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин по обычной методике. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали по стандартной схеме и окрашивали гематоксилином и эозином. Для ИГХ исследования серийные срезы толщиной 3–5 мкм наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием. ИГХ реакцию проводили ручным методом. На одно стекло антитело разводили в соотношении 1:100. Предварительная обработка стекла проводилась в буфере для высокотемпературной демаскировки эпитопов антигена в течение 30 минут. После этого стекла помещали в автостейнер, где окрашивали согласно стандартному протоколу с помощью системы детекции UltraVision (Thermo Scientific, США).

Для определения СК в опухолевой популяции и в строме применяли антитела к CD44 (Anti-CD44 antibody (EPR1013Y) ab 51037 Abcam, Великобритания), ALDH (BD Transduction Laboratories, Purified Mouse Anti-ALDH 611195 Clone: 44/ALDH aa 7-128 Becton Dickinson, США), CD133/1 (AC133) antibodies, human, Clone: AC133, Miltenyi Biotec, США). Экспрессию каждого показателя клетками паренхимы опухоли определяли по системе Klein et al [12]. Финальный балл экспрессии (от 0 до 9) определяли как произведение количества окрашенных клеток (0 баллов – нет окрашенных клеток, 1 балл – окрашивается менее 30% клеток, 2 балла – 30–60% клеток, 3 балла – более 60%

клеток) на интенсивность окрашивания (0 баллов – нет реакции, 1 балл – слабое окрашивание, 2 балла – умеренное окрашивание, 3 балла – сильное окрашивание). Экспрессию маркеров в строме опухоли оценивали по шкале от 0 до 3 баллов. Образцы независимо оценивали два специалиста-патоморфолога.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программного обеспечения Jamovi 2.0.0 for MacOS. Поскольку распределение количественных данных отличалось от нормального, для сравнения независимых подгрупп использовали критерий Манна–Уитни. С учетом числа образцов корреляции оценивали с помощью коэффициента Спирмена. При оценке двухлетней выживаемости рассчитывали отношение шансов; для оценки прогностической значимости использовали обобщенную линейную модель. Результаты расценивались как статистически значимые при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты

Клинические характеристики участниц исследования представлены в таблице 1.

При анализе данных, полученных в результате изучения экспрессии ALDH в опухолевых клетках первичной опухоли, по 14,3% случаев как до ХТ, так и после нее не имело в своем пуле клеток, экспрессирующих ALDH. Высокая (9 баллов) экспрессия ALDH наблюдалась лишь в одном случае после ХТ. Интенсивность экспрессии ALDH в клетках стромы варьировала от слабой очаговой до очаговой умеренно сильной как до ХТ, так и после нее. Во всех изученных образцах ткани до начала лечения наблюдалась экспрессия CD44 клетками паренхимы. После ХТ в двух случаях (14,3%) не имелось клеток, экспрессирующих CD44. Интенсивность экспрессии CD44<sup>+</sup> в клетках стромы до ХТ варьировала от ярко очаговой до диффузно яркой. Экспрессия в 9 баллов также присутствовала только в одном образце после ХТ. В паренхиме первичной опухоли РЯ в 50% случаев до начала лечения и в 64,3% случаев после ХТ не выявлена экспрессия CD133. Высший балл экспрессии присутствовал в одном образце до лечения (табл. 2). В строме всех изученных образцов не экспрессировался маркер CD133.

В образцах низкодифференцированной серозной аденокарциномы процент клеток, экспрессирующих ALDH ( $p=0,008$ ), CD44 ( $p=0,026$ ), CD133 ( $p=0,059$ ), был ниже, чем в опухолях других подтипов.

В образцах ткани, полученных до лечения, был несколько выше процент клеток, экспрессирующих ALDH ( $p=0,063$ ) и CD44 ( $p=0,053$ ), но не CD133, чем в образцах, полученных после неoadъювантной химиотерапии (рис. 1, 2). В образцах до лечения чаще наблюдалась экспрессия ALDH более чем в 1% клеток паренхимы, а в образцах после лечения экспрессия чаще отсутствовала (хи-квадрат 5,04,  $p=0,025$ ).

Содержание клеток CD133<sup>+</sup> в опухоли у пациенток с асцитом было несколько ниже, чем у пациенток без него ( $p=0,050$ ), тогда как показатели CD44<sup>+</sup> и ALDH<sup>+</sup>

не отличались. При этом в нашей когорте пациенток асцит чаще присутствовал у неплатиночувствительных пациенток (хи-квадрат 8,13,  $p=0,004$ ).

Экспрессия изученных маркеров не зависела от стадии заболевания. Это наблюдение согласуется с данными GEPIC – базы, включающей информацию секвенирования генома образцов опухолевой ткани из проекта The Cancer Genome Atlas [13]. Тем не менее прослеживалась тенденция к более высокой экспрессии CD44 ( $p=0,056$ ) и ALDH ( $p=0,074$ ) в опухолях I–II стадии в сравнении с III–IV стадией.

У пациенток с клинически платиночувствительными опухолями в когорте в целом процент CD44<sup>+</sup> клеток

в опухоли был выше, чем у нечувствительных к платине ( $p=0,038$ ). При подгрупповом анализе оказалось, что данное наблюдение обусловлено подгруппой образцов, полученных после химиотерапии ( $p=0,011$ ), но не до лечения ( $p=0,814$ ). Однако в уравнении биномиальной регрессии изученные показатели экспрессии стволовых маркеров не продемонстрировали предиктивной значимости в отношении чувствительности либо нечувствительности рецидива к платине.

Количество опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH, возрастало прямо пропорционально количеству опухолевых клеток, экспрессирующих CD44 ( $R^2=0,280$ ,  $p=0,005$ ).

Таблица 1 | Table 1

**Клинические характеристики пациенток, включенных в исследование |  
Clinical characteristics of patients included in the study**

Клиническая характеристика   Clinical characteristics	Число пациенток   Number of patients (%)
1. Возраст – медиана (IQR Q1–Q3), лет – 61,5 (55,5–67)   Age – median (IQR Q1–Q3), years – 61.5 (55.5–67)	
2. Уровень СА-125 до лечения – медиана (IQR), Ед/мл – 341 (133–478)   CA-125 level before treatment – median (IQR), U/mL – 341 (133–478)	
3. Стадия FIGO   FIGO stage	
I	3 (11%)
II	1 (4%)
III	18 (64%)
IV	6 (21%)
4. Наличие асцита на момент первичной диагностики   Presence of ascites at the time of initial diagnosis	
Да   Yes	11 (39%)
Нет   No	17 (61%)
5. Гистологический подтип   Histological subtype	
• серозная high-grade аденокарцинома   serous high-grade adenocarcinoma	19 (68%)
• серозная low-grade аденокарцинома   serous low-grade adenocarcinoma	1 (4%)
• светлоклеточная карцинома   clear cell carcinoma	3 (11%)
• муцинозная карцинома   mucinous carcinoma	1 (4%)
• недифференцированный эпителиальный рак яичников   undifferentiated epithelial OC	4 (14%)
6. Режим химиотерапии   Chemotherapy regimen	
• неoadъювантная (НАХТ)   neoadjuvant chemotherapy	14 (50%)
• адъювантная (АХТ)   adjuvant chemotherapy	14 (50%)
7. Патоморфологический ответ CRS (в подгруппе НАХТ)   Pathological response CRS (in the neoadjuvant chemotherapy subgroup)	
• CRS 0–1	7 (50%)
• CRS 2	6 (43%)
• CRS 3	1 (7%)
8. Клиническая платиночувствительность первого рецидива/прогрессирования   Clinical platinum sensitivity at first relapse/progression	
• платиночувствительный   platinum sensitive	15 (54%)
• неплатиночувствительный   non-platinum-sensitive	13 (46%)

IQR – интерквартильный размах | IQR – Interquartile Range

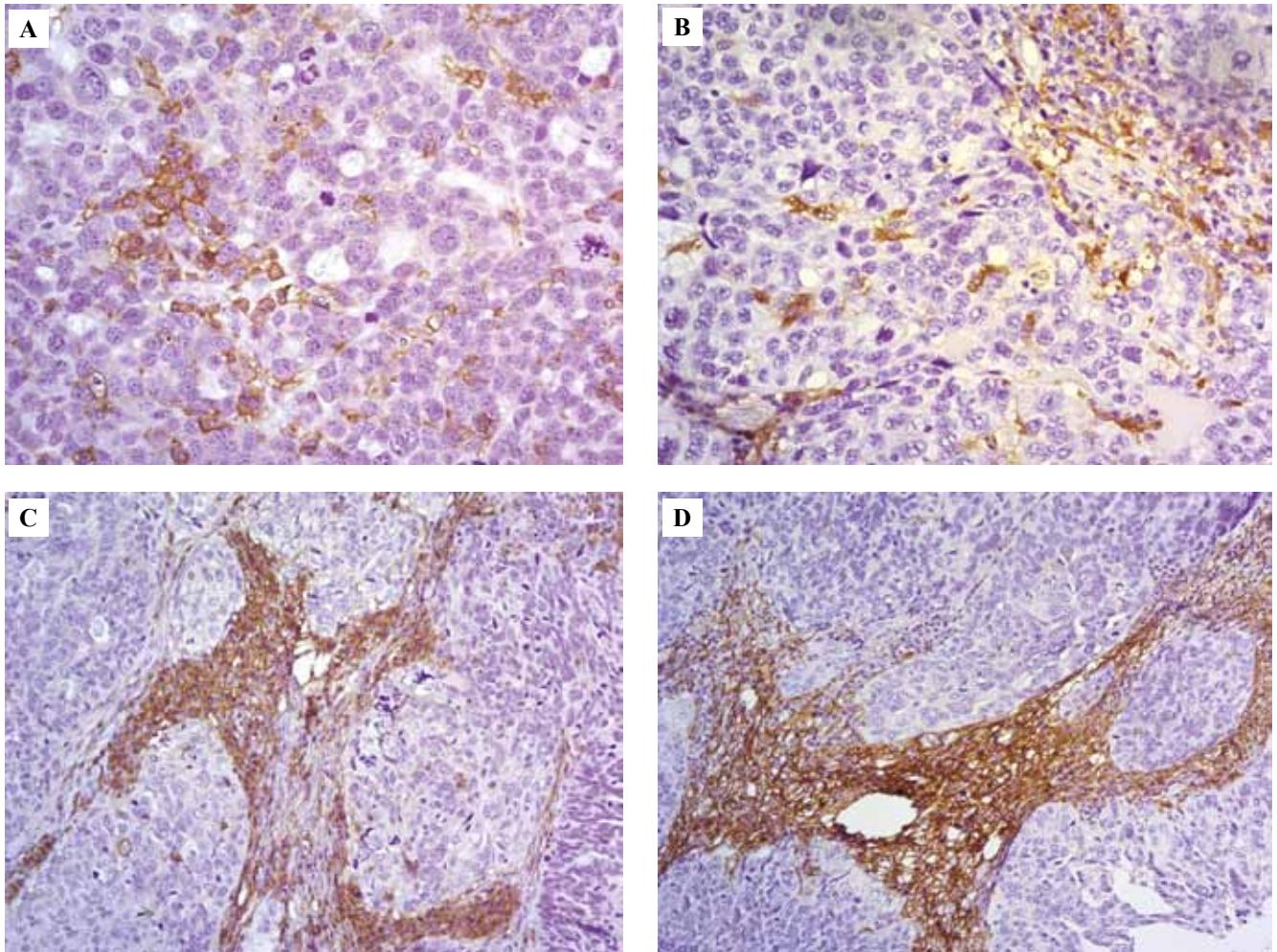


Рис. 1. Экспрессия стволовых маркеров в образцах ткани РЯ пациенток до лечения.

А, В – пациентка 66 лет, II стадия, T2N0M0. В паренхиме большое количество атипичных гигантских митозов.

А – экспрессия CD44 определяется в стромальных элементах опухоли, преимущественно на границе с паренхимой, частично в виде диффузного окрашивания, частично в виде очагового окрашивания (окраска антителами к CD44,  $\times 400$ ). В – экспрессия ALDH в клетках стромы выраженная, окрашивание диффузное. ALDH в клетках паренхимы не определяется (окрашивание антителами к ALDH,  $\times 400$ ), при окрашивании на CD133 большая часть паренхимы опухоли обнаруживает негативную реакцию, выявлен один участок с позитивными клетками (до 10), рассеянными диффузно. В опухоли отмечалась очаговая экспрессия CytokeratinPan (AE1/AE3), WT1, отсутствовала экспрессия ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, Calretinin. Недифференцированная карцинома яичника.

С, D – пациентка 65 лет, III стадия, T3N0M0. Опухоль преимущественно паренхиматозного типа с узкими прослойками стромы. С – строма активно экспрессирует CD44. Фиксация маркера отмечается на границе стромы и эпителиального пласта. Экспрессия CD44 в паренхиматозных элементах незначительная, позитивны единичные клетки (окрашивание антителами к CD44,  $\times 200$ ). D – экспрессия ALDH в строме менее выражена, ALDH в паренхиме не выявляется (окрашивание антителами к ALDH,  $\times 200$ ). Опухоль CD133-негативна. Низкодифференцированная (high-grade) серозная карцинома яичника

Fig. 1. Expression of stem markers in OC tissue samples before treatment.

A, B – patient 66 years old, stage II, T2N0M0. The parenchyma contains a large number of atypical giant mitoses.

A – CD44 expression is determined in the stromal elements of the tumor, mainly at the border with the parenchyma, partly in the form of diffuse staining and partly in the form of focal staining (staining with antibodies to CD44,  $\times 400$ ). B – ALDH expression in stromal cells is pronounced; staining is diffuse. ALDH staining is negative in parenchyma cells (staining with antibodies to ALDH,  $\times 400$ ). When staining for CD133, most of the tumor parenchyma had a negative reaction, 1 area with diffusely positive cells (up to 10 cells) being detected. The tumor showed focal expression of Cytokeratin Pan (AE1/AE3), WT1. There was no expression of ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, or Calretinin. Undifferentiated ovarian carcinoma.

C, D – patient 65 years old, stage III, T3N0M0. The tumor is predominantly of parenchymal type with narrow stromal layers. C – the stroma actively expresses CD44. The fixation of the marker is noted at the border of the stroma and the epithelial layer. The expression of CD44 in the parenchymal elements is insignificant, single cells are positive (staining with antibodies to CD44,  $\times 200$ ). D – the expression of ALDH in the stroma is less pronounced, ALDH is not detected in the parenchyma (staining with antibodies to ALDH,  $\times 200$ ). The tumor is CD133 negative. High-grade serous ovarian carcinoma

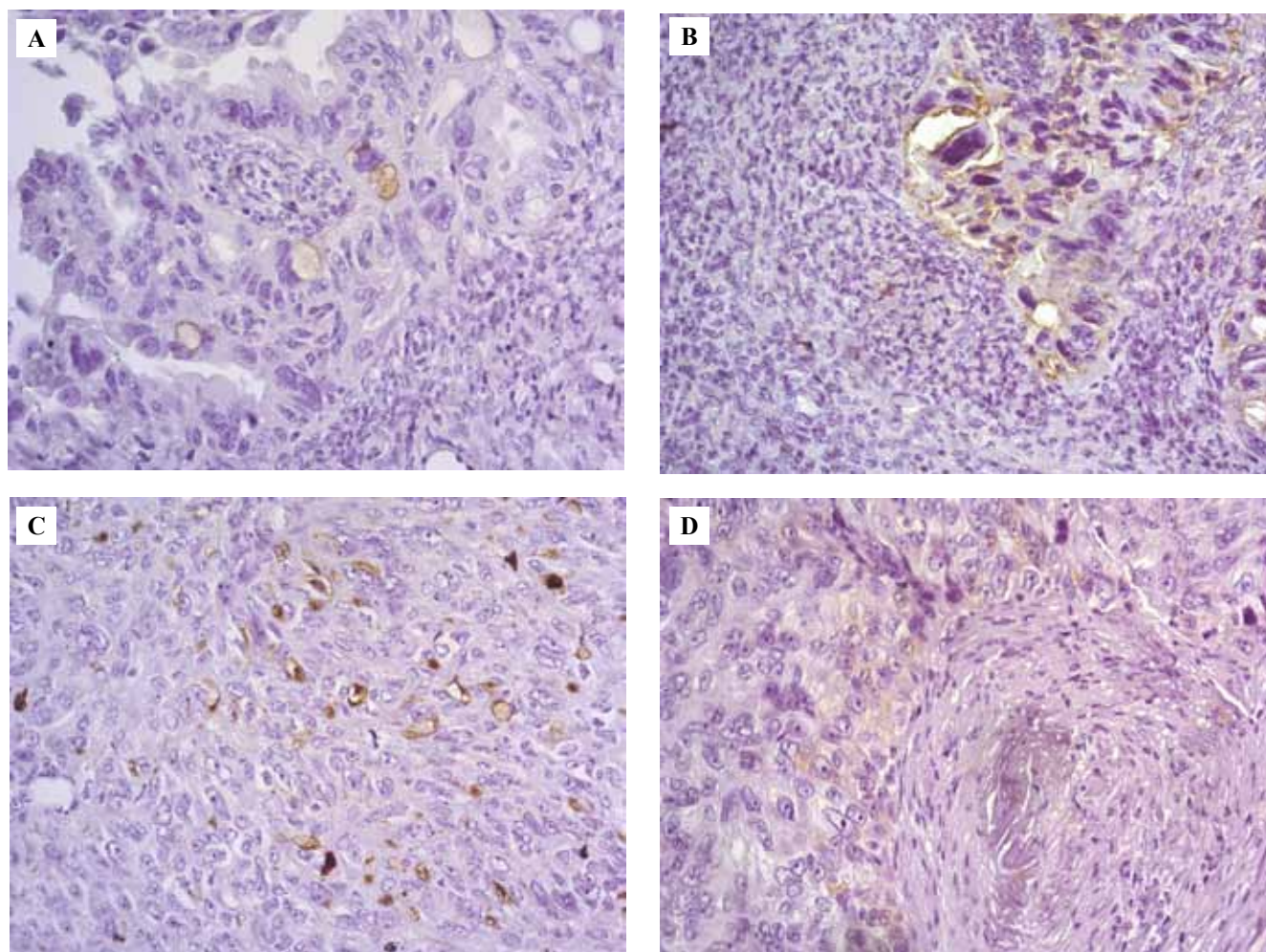


Рис. 2. Экспрессия стволовых маркеров в образцах ткани РЯ пациенток после неoadьювантной химиотерапии.

А, В – пациентка 60 лет, IV стадия, T3N1M1, асцит. Эпителиальная опухоль солидно-папиллярного строения, построенная из клеток с полиморфными атипичными ядрами, среди которых преобладают крупные светлые пузырьковидные ядра с отчетливыми ядрышками, встречаются также гигантские уродливые ядра. В 1 мм<sup>2</sup> опухоли менее 1 митоза. Низкодифференцированная (high-grade) серозная карцинома яичника. А – окрашивание антителами к CD133, ×400, В – окрашивание антителами к CD44, ×400.

С, D – пациентка 69 лет, III стадия, T3N1M0. Опухоль представлена солидными разрастаниями светлых клеток округлой и вытянутой формы. Ядра их крупные, светлые, пузырьковидные, с отчетливыми ядрышками. В 1 мм<sup>2</sup> опухоли до 5 митозов. В опухоли отмечалась диффузная экспрессия CytokeratinPan (AE1/AE3), экспрессия WT1 единичными клетками, отсутствовала экспрессия ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, Calretinin. Недифференцированная карцинома яичника. С – окрашивание антителами к CD133, ×400, D – окрашивание антителами к ALDH, ×400

Fig. 2. Expression of stem markers in OC tissue samples after neoadjuvant chemotherapy.

A, B – patient 60 years old, stage IV, T3N1M1, ascites. An epithelial tumor of a solid-papillary structure, built from cells with polymorphic atypical nuclei, among which there are giant ugly nuclei and prevalence of large light vesicular nuclei with distinct nucleoli. There is less than 1 mitosis in 1 mm<sup>2</sup> of the tumor. High-grade serous ovarian carcinoma. A – staining with antibodies to CD133, ×400, B – staining with antibodies to CD44, ×400.

C, D – patient 69 years old, stage III, T3N1M0. The tumor is represented by solid areas of round and elongated light cells. Their nuclei are large, light, vesicular, and with distinct nucleoli. There are up to 5 mitoses in 1 mm<sup>2</sup> of a tumor. The tumor showed diffuse expression of Cytokeratin Pan (AE1/AE3) and WT1 by single cells. There was no expression of ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, or Calretinin. Undifferentiated ovarian carcinoma. C – staining with antibodies to CD133, ×400, D – staining with antibodies to ALDH, ×400

Таблица 2 | Table 2

**Распределение случаев РЯ по уровню экспрессии стволовых маркеров в паренхиме первичной опухоли до и после платиносодержащей ХТ | Distribution of OC cases by the level of expression of stem markers in the parenchyma of the primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy**

Число случаев   Number of cases	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH (финальный балл)   Distribution of cases by level of ALDH expression (final score)			
	0 баллов   0 points	1–3 балла   1–3 points	4–6 баллов   4–6 points	7–9 баллов   7–9 points
До ХТ   Before chemotherapy	2 (14,3%)	6 (42,8%)	6 (42,8%)	0 (0%)
После ХТ   After chemotherapy	2 (14,3%)	10 (71,4%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)
Распределение случаев по уровню экспрессии CD44   Distribution of cases by level of CD44 expression				
До ХТ   Before chemotherapy	0 (0%)	10 (71,4%)	4 (28,6%)	0 (0%)
После ХТ   After chemotherapy	2 (14,3%)	8 (57,1%)	3 (21,4%)	1 (7,1%)
Распределение случаев по уровню экспрессии CD133   Distribution of cases by the level of CD133 expression				
До ХТ   Before chemotherapy	7 (50%)	6 (42,8%)	0 (0%)	1 (7,2%)
После ХТ   After chemotherapy	9 (64,3%)	5 (35,7%)	0 (0%)	0 (0%)

Между количеством CD44<sup>+</sup> и CD133<sup>+</sup> клеток в паренхиме опухоли присутствовала положительная корреляция ( $r=0,408$ ,  $p=0,031$ ). Показатели экспрессии ALDH и CD133 в паренхиме не были положительно связаны между собой. Уровень экспрессии ALDH в строме опухоли отрицательно коррелировал с числом клеток, экспрессирующих ALDH в паренхиме ( $r=-0,413$ ,  $p=0,032$ ).

Двухлетняя общая выживаемость была ниже в подгруппе НАХТ (отношение шансов (ОШ) 11,90, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,87–128,28,  $p=0,017$ ) и среди пациенток с высокой экспрессией ALDH в строме опухоли (ОШ 2,58, 95% ДИ 1,07–7,92,  $p=0,055$ ). При построении предиктивной модели для выживаемости, однако, показатель экспрессии ALDH в строме, а также другие изученные маркеры не продемонстрировали прогностической значимости.

### Обсуждение

Большинство исследованных образцов опухолевой ткани экспрессировало CD44 и ALDH, тогда как экспрессия CD133 в паренхиме наблюдалась только у 12 пациенток (42,8%), а экспрессия CD133 в строме отсутствовала у всех. В ткани низкодифференцированной серозной аденокарциномы процент клеток, экспрессирующих ALDH, CD44, CD133, был ниже, чем в опухолях других подтипов. Это может быть связано с тем, что среди остальных подтипов в когорте было несколько образцов недифференцированной карциномы. По данным K. Kar et al. [14], в менее дифференцированных опухолях яичников уровень экспрессии CD44 выше, чем в опухолях low-grade. Однако авторы не наблюдали экспрессии CD44 светлоклеточными опухолями ( $n=3$ ), тогда как в нашей когорте все три образца светлоклеточной карциномы экспрессировали данный маркер. У пациенток рецидив заболевания развился в течение первого года, что характерно для

малочувствительного к химиотерапии светлоклеточного РЯ [11].

Мы не наблюдали значимой связи между экспрессией изученных маркеров и стадией заболевания, что согласуется с данными The Cancer Genome Atlas; в то же время присутствовала тенденция к более высокому содержанию CD44<sup>+</sup> и ALDH<sup>+</sup> клеток при I–II стадии, чем при III–IV. Подобное наблюдение описано для CD133 в метаанализе [15]. Авторы метаанализа также продемонстрировали негативное прогностическое значение экспрессии CD133 в отношении двухлетней выживаемости, подчеркивая, однако, существование противоречивых результатов и предпочтительную оценку коэкспрессии CD133 с другими стволовыми маркерами.

В изученных нами образцах количество CD133<sup>+</sup> клеток положительно коррелировало с количеством CD44<sup>+</sup>. Процент ALDH<sup>+</sup> клеток также был положительно связан с процентом CD44<sup>+</sup>. Корреляция между экспрессией ALDH1 и CD44 в злокачественных опухолях яичников ( $r=0,16$ ,  $p=0,0012$ ) также наблюдается по данным GEPIA [13]; при этом экспрессия CD133 и ALDH в наших образцах не была связана между собой. Известно, что CD133<sup>+</sup>ALDH<sup>+</sup> клетки РЯ очень агрессивны [16]; возможно, CD133-позитивные клетки представляют собой лишь малочисленную высокомутогенную часть пула ALDH<sup>+</sup>. Экспрессия ALDH1 >50% в комбинации с CD44 ассоциирована с ярко выраженными стволовыми свойствами клеток РЯ [17].

В образцах ткани, полученных до лечения, больше клеток экспрессировало ALDH и CD44, чем в образцах, полученных после неoadъювантной химиотерапии; кроме того, в подгруппе НАХТ большее число CD44<sup>+</sup> парадоксально ассоциировалось с платиночувствительностью, в отличие от опухолей до лечения. Мы не наблюдали предиктивной значимости

показателей экспрессии CD44, но, возможно, статистические различия отражают разницу в биологической роли опухолевых СК до лечения и в процессе лечения. Ранее в ретроспективном исследовании [18] было продемонстрировано отрицательное прогностическое значение экспрессии CD44 в тканях РЯ после химиотерапии в отношении общей, но не безрецидивной выживаемости, что может объясняться способностью стволовых клеток останавливать клеточный цикл и инициировать отдаленные рецидивы.

В нашей когорте процентное содержание клеток CD133<sup>+</sup> в опухоли у пациенток с асцитом было несколько ниже, чем у пациенток без него, что не согласуется с данными N. Li et al. [19], по которым число CD133-положительных опухолей среди пациенток с асцитом было выше, чем без него. Возможная причина расхождения заключается в оцениваемых гистологических подтипах, так как в нашей когорте к CD133-положительным опухолям без асцита относились светлоклеточные и недифференцированные карциномы, не включенные в исследование N. Li et al.

Двухлетняя общая выживаемость была ниже среди пациенток с высокой экспрессией ALDH в строме опухоли. Это может быть вызвано процессами васкулогенной мимикрии, в которых активно участвуют ALDH-положительные клетки РЯ [20]; в данном исследовании мы не оценивали наличие признаков васкулогенной мимикрии в образцах. Уровень экспрессии ALDH в строме не имел прогностического значения в мультивариантном анализе. Это может быть связано с неоднородностью выборки, которая включала подгруппы АХТ и НАХТ, поскольку мы наблюдали различия в экспрессии стволовых маркеров между этими подгруппами, а также существенные различия в длительности бесплатинового интервала и двухлетней выживаемости. I. Ruscito et al. [21] продемонстрировали отрицательное прогностическое значение коэкспрессии CD133 и ALDH для безрецидивной и общей выживаемости при первичной низкодифференцированной серозной карциноме яичника, при этом экспрессия каждого маркера в отдельности не имела прогностического значения в мультивариантном анализе. Коэкспрессия в данном исследовании встречалась в 23,2% случаев; в нашей когорте коэкспрессия CD133 и ALDH по тем же критериям (балл экспрессии ALDH 2–9, CD133 >10%) наблюдалась лишь у трех пациенток (10,7%), две из которых имели I стадию заболевания. Таким образом, оценка экспрессии маркеров СК в ткани РЯ требует комплексного подхода с учетом гистологических, а также клинических характеристик.

## Заключение

Маркеры стволовых опухолевых клеток коэкспрессируются в тканях первичного очага рака яичников. Экспрессия маркеров различается в зависимости от гистологического подтипа опухоли и наличия предшествующего химиотерапевтического воздействия.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.О. Генинг, Т.П. Генинг.  
Сбор и обработка материала – Е.В. Слесарева, И.И. Антонева,  
Т.В. Абакумова.

Написание текста – С.О. Генинг.

Редактирование – Т.П. Генинг, И.И. Антонева.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.O. Gening, T.P. Gening.

Collected the data and performed the analysis – E.V. Slesareva, I.I. Antoneeva, T.V. Abakumova.

Wrote the paper – S.O. Gening.

Edited the manuscript – T.P. Gening, I.I. Antoneeva.

## Литература/References

1. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TM, Myklebust TA et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): A population-based study. *Lancet Oncol.* 2019;20(11):1493–505. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30456-5.
2. Giornelli GH. Management of relapsed ovarian cancer: A review. *Springerplus.* 2016;5(1):1197. DOI: 10.1186/s40064-016-2660-0.
3. Sabini C, Sorbi F, Cunnea P, Fotopoulou C. Ovarian cancer stem cells: Ready for prime time? *Arch Gynecol Obstet.* 2020;301(4):895–9. DOI: 10.1007/s00404-020-05510-9.
4. Ahmed N, Escalona R, Leung D, Chan E, Kannourakis G. Tumour microenvironment and metabolic plasticity in cancer and cancer stem cells: Perspectives on metabolic and immune regulatory signatures in chemoresistant ovarian cancer stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2018;53:265–81. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.10.002.
5. Hu L, McArthur C, Jaffe RB. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant. *Br J Cancer.* 2010;102(8):1276–83. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605626.
6. Yamanoi K, Baba T, Abiko K, Hamanishi J, Yamaguchi K, Murakami R et al. Acquisition of a side population fraction augments malignant phenotype in ovarian cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):14215. DOI: 10.1038/s41598-019-50794-w.
7. Jain S, Annett SL, Morgan MP, Robson T. The cancer stem cell niche in ovarian cancer and its impact on immune surveillance. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4091. DOI: 10.3390/ijms22084091.
8. Puchinskaya MV. Cancer stem cell markers and their prognostic value. *Arkh Patol.* 2016;78(2):47–54. DOI: 10.17116/patol201678247-54.
9. Craveiro V, Yang-Hartwich Y, Holmberg JC, Joo WD, Sumi NJ, Pizzonia J et al. Phenotypic modifications in ovarian cancer stem cells following Paclitaxel treatment. *Cancer Med.* 2013;2(6):751–62. DOI: 10.1002/cam4.115.
10. Тюляндин С.А., Коломиец Л.А., Морхов К.Ю., Нечушкина В.М., Pokataev I.A., Rummyantsev A.A. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб. Злокачественные опухоли. 2020;10(3s2–1):183–95. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-10.  
*Tjulandin SA, Kolomiets LA, Morkhov KYu, Nechushkina VM, Pokataev IA, Rummyantsev AA et al. Practical guidelines for the drug treatment of ovarian cancer, primary peritoneal cancer and*



- tubal cancer. *Malignant Tumours*. 2020;10(3s2–1):183–95 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-10.
11. Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M et al. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(4):771–5. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31821bb8aa.
  12. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F et al. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):656–8. DOI: 10.1210/jcem.86.2.7226.
  13. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W98–102. DOI: 10.1093/nar/gkx247.
  14. Kar K, Ghosh S, Roy AK. A study of CD44 positive cancer cells in epithelial ovarian cancer and their correlation with p53 and Ki67. *J Lab Physicians*. 2021;13(1):50–7. DOI: 10.1055/s-0041-1724235.
  15. Zhou Q, Chen A, Song H, Tao J, Yang H, Zuo M. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancer: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3080–8. PMID: 26064196.
  16. Kryczek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2012;130(1):29–39. DOI: 10.1002/ijc.25967.
  17. Wang YC, Yo YT, Lee HY, Liao YP, Chao TK, Su PH et al. ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2012;180(3):1159–69. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.015.
  18. Papadaki C, Manolakou S, Lagoudaki E, Pontikakis S, Iero-diakonou D, Vogiatzoglou K et al. Correlation of PKM2 and CD44 protein expression with poor prognosis in platinum-treated epithelial ovarian cancer: A retrospective study. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):1013. DOI: 10.3390/cancers12041013.
  19. Li N, Dai C, Yang Y, Wu X, Wang L, Wang P. The expression levels and clinical significance of MFG-E8 and CD133 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Endocrinol*. 2020;36(9):803–7. DOI: 10.1080/09513590.2019.1708892.
  20. Yu L, Zhu B, Wu S, Zhou L, Song W, Gong X et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KiSS-1, and MACC1 in the prediction of metastasis and prognosis in ovarian carcinoma. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):23. DOI: 10.1186/s13000-017-0612-9.
  21. Ruscito I, Cacsire Castillo-Tong D, Vergote I, Ignat I, Stanske M, Vanderstichele A et al. Exploring the clonal evolution of CD133/aldehyde-dehydrogenase-1 (ALDH1)-positive cancer stem-like cells from primary to recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). A study of the Ovarian Cancer Therapy – Innovative Models Prolong Survival (OCTIPS) Consortium. *Eur J Cancer*. 2017;79:214–25. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.04.016.

### Информация об авторах

Снежанна Олеговна Генинг – врач-онколог, ассистент кафедры физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Инна Ивановна Антонеева – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики Ульяновского государственного университета, заведующая гинекологическим отделением Ульяновского областного клинического онкологического диспансера, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Татьяна Владимировна Абакумова – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Татьяна Петровна Генинг – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Елена Васильевна Слесарева – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой морфологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

### Author information

Snezhanna O. Gening – Oncologist, Assistant, Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.  
<https://orcid.org/0000-0001-6970-6659>

Inna I. Antoneeva – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Oncology and Radiation Diagnostics, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University; Head of the Gynecology Department, Ulyanovsk Regional Clinical Oncological Dispensary.  
<https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>

Tatyana V. Abakumova – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>

Tatyana P. Gening – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.  
<https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>

Elena V. Slesareva – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Morphology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.  
<https://orcid.org/0000-0003-3326-7863>