

*Д.Р. Долгова, С.О. Генинг, Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева,  
Т.П. Генинг, А.Ю. Федотова*

## **Предикторы химиорезистентности при платиносодержащей неoadъювантной химиотерапии распространенного рака яичников**

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Ульяновск

Химиорезистентность является одной из основных причин неудач лечения распространенных форм рака яичников (РЯ). С целью выявления предикторов химиорезистентности были обследованы 30 пациенток с асцитной формой РЯ, получавших неoadъювантную химиотерапию (НАХТ) по схеме AP. В эпителиальных клетках асцита и опухолевой ткани после НАХТ оценивали экспрессию генов VEGFa, ABCB1 и ERCC1 методом ПЦР-РТ. Эффективность НАХТ оценивали с помощью критериев лечебного патоморфоза, выживаемость - с использованием критерия Каплан-Майера, связь клинических и молекулярных параметров - с помощью критерия Манна-Уитни.

Полученные результаты. Установлено, что у 43% больных ответ опухоли на НАХТ отсутствовал (CRS1), выраженный ответ (CRS2) был в 35% случаев, и полный ответ (CRS3) - в 21% случаев. Экспрессия VEGFa была повышена в группе CRS1 в асците в 17% случаев, в опухолевой ткани - в 33%. В группах с CRS 2,3 гиперэкспрессия VEGFa в асците выявлена в 25% случаев, в опухолевой ткани в 37,5%. Экспрессия мРНК ABCB1 повышена после НАХТ в 50% случаев в группе CRS1 и 25% случаев в группах CRS 2,3. Таким образом, платиносодержащая НАХТ инициирует повышение экспрессии VEGFa и ABCB1 в опухолевой ткани. Установлено, что при выраженной экспрессии (ERCC+/VEGF+/ABCB1+) в асците наблюдается статистически значимое увеличение безрецидивной выживаемости по сравнению с группой с низкой или отсутствующей экспрессией ( $p=0,012$ ). При гиперэкспрессии изученных генов в ткани первичной опухоли после НАХТ общая выживаемость составила 41,8 месяца; при низкой экспрессии - 25,3 месяца ( $p=0,058$ ).

**Вывод.** Уровень мРНК ERCC1, VEGFa и ABCB1 в клетках асцита до НАХТ и в первичной опухоли после НАХТ по схеме AP может служить предиктором эффективности данной схемы лечения асцитного РЯ.

**Ключевые слова:** рак яичников, асцит, химиорезистентность

### **Введение**

У каждой пятой пациентки с эпителиальной овариальной карциномой - самым смертоносным гинекологическим злокачественным новообразованием в мире, возникает резистентность к платиносодержащим препаратам, которые используются в первой линии химиотерапии (ХТ). Согласно современным представлениям, эффективность ХТ зависит от фармакокинетической чувствительности опухоли и, зачастую, обусловлена васкуляризацией новообразования, определяющей условие для высокой или низкой концентрации противоопухолевых препаратов. Резистентность - проявление фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) с перекрестной невосприимчивостью к воздействию функционально «неродственных» цитостатиков. МЛУ обуславливается комплексной активацией нескольких ключевых генов, относящихся к разным эндогенным системам защиты опухолевых клеток - усиление репарации ДНК, стимуляция детоксикации, АТФ-зависимый обратный транспорт химиопрепарата из клетки [2, 12]. Рядом исследователей показано, что уровень транскрипции ERCC1, белка, участвующего в вырезании поврежденного участка ДНК, коррелирует с чувствительностью клеточных линий РЯ к препаратам платины [4]. Система АТФ-связанных кассетных транспортеров является одним из основных механизмов лекарственной устойчивости. Это белки семейства ABC, которые осуществляют АТФ-зависимый транспорт, в том числе и цитостатиков. Регуляция экспрессии генов ABC-транспортеров возможна на уровне опухолевых клеток и организма в целом. При этом под влиянием химиопрепаратов экспрессия ABC-транспортеров повышается [6]. Роль различных представителей ABC-транспортеров в развитии первичной и приобретенной химиорезистентности изучается. Показано, в частности, что длительная цисплатиновая терапия сопровождалась повышенной экспрессией ABCB1

[14]. Также показано, что повышение экспрессии ABCB1 при РЯ коррелирует с укорочением безрецидивного периода [13]. Ранее Н.В. Литвяковым [1, 10] выявлен градиентный феномен генов МЛУ при проведении неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) при раке молочной железы, согласно которому при уменьшении экспрессии (отрицательный градиент) в опухоли по сравнению с биопсийными образцами лечение связано с хорошим ответом, положительный градиент – с отсутствием непосредственного эффекта НАХТ.

Считается установленным, что опухолевый асцит играет существенную роль в интраперитонеальной диссеминации опухолевых клеток и, следовательно, в возникновении распространенных и рецидивных форм рака яичников [3]. Показано, что количество и злокачественный потенциал асцитных опухолевых клеток (АОК) увеличивается после курсов ХТ [15]. Считается общепризнанным сегодня, что опухолевые клетки асцита доступны и могут быть использованы для оценки факторов, рассматриваемых в качестве маркеров при оценке эффективности противоопухолевой терапии [7, 8, 9, 11]. Исходя из вышеизложенного, целью исследования была оценка предикторов химиорезистентности при платиносодержащей НАХТ распространенного РЯ.

### Материал и методы

В исследование были включены 30 больных в возрасте от 35 до 75 лет (медиана 62 года), проходившие лечение в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере в 2015-2018 гг. Критериями включения были впервые диагностированный и верифицированный асцитный рак яичников III-IV стадии по FIGO, общее состояние больной по шкале Eastern Cooperative Oncology Group 0-2 балла, подписанное информированное согласие и ожидаемая продолжительность жизни более 6 месяцев. Все пациентки на первом этапе лечения получали НАХТ по схеме AP от 2 до 4 курсов с интервалом 3 нед. Количество курсов определялось в зависимости от эффективности НАХТ по клиническим, ультразвуковым параметрам и динамике опухолевого маркера СА-125. В последующем выполнялась циторедуктивная операция и адьювантная химиотерапия. Забор биоматериала для исследования производился при выполнении диагностической лапароскопии (асцит) и интраоперационно (ткань опухоли и условно нормальная ткань яичника). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ИМЭиФК ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (№ 9 от 15.09.2015 г.).

Для оценки экспрессии генов VEGFa, ABCB1, ERCC1 были использованы эпителиальные клетки асцита, взятые до лечения, и интраоперационный материал после НАХТ. Исследуемые образцы помещали в раствор IntactRNA (ООО «Евроген», г.Москва), инкубировали 24 часа при +4°C и сохраняли при -80°C для дальнейшего выделения РНК. Тотальная РНК была выделена с использованием реагента ExtractRNA. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора MMLV RTkit (ООО «Евроген», Москва) со случайными гексануклеотидными прайме-

рами в соответствии с инструкцией производителя. Для последующей ПЦР-РТ использованы следующие пары зондов и праймеров (TaqMan® Gene Expression Assay) производства ThermoScientific: VEGFA (Hs03929054\_s1), ERCC1 Hs01012155\_g1, ABCB1, Hs01070648\_m1, 18S (Hs99999901\_s1), GAPDH (Hs03929097\_g1). В качестве результата использовался уровень экспрессии генов в опухолевых клетках, нормализованный относительно GAPDH, 18S в нормальной ткани яичников и вычисленный по методу Pfaffl (2001). Для оценки безрецидивной и общей выживаемости пациентов РЯ использовали критерий Каплан-Майера (ПО Statistika 10). Связь между клиническими и молекулярными параметрами анализировали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали значения при  $p \leq 0,05$ .

### Полученные результаты

Эффективность НАХТ у пациентов была оценена с помощью критериев лечебного патоморфоза — chemotherapy response score CRS [5]. У 43% больных ответ опухоли на НАХТ отсутствовал (CRS1), выраженный ответ опухоли, но с наличием резидуальной опухоли (CRS2) наблюдался в 35% случаев, полный или почти полный ответ (CRS3) — в 21%. При дальнейшем динамическом наблюдении на основании УЗИ и уровня СА-125 выявлено, что у 50% пациентов наблюдался рецидив заболевания в период до 6 месяцев (платинорезистентный тип), у 35% - отсутствие рецидива после 6 курсов стандартной ХТ (платиночувствительный тип), у 15% - продолженный рост (платинорефрактерный тип). При этом в группе с CRS1 в клеточной фракции асцита уровень транскрипта VEGFa был снижен в 83% случаев, а после НАХТ в опухолевой ткани — в 67% случаев. У пациентки с положительным градиентом изменения экспрессии VEGFa был выявлен ранний рецидив через 3 месяца после завершения ХТ 1 линии. В группе CRS 2,3 гиперэкспрессия VEGFa в клетках асцита выявлена в 25%, в опухолевой ткани после НАХТ — 37,5% случаев. При анализе взаимосвязи степени лечебного патоморфоза с уровнем мРНК ABCB1 и ERCC1 до проведения НАХТ установлено, что в асците больных РЯ клетки гиперэкспрессируют ABCB1 только в 14% случаев от общего числа наблюдений, в остальных случаях либо не было выявлено экспрессии, либо она была снижена. Уровень мРНК ERCC1 в клетках асцита был повышен в 33% случаев в группе CRS1, в 50% - в группе CRS 2, 3. После проведения НАХТ была оценена экспрессия генов ABCB1 и ERCC1 в опухоли относительно нормальной ткани яичников каждого пациента. Выявлено, что в 50% случаев в группе CRS1 и 25% с CRS 2, 3 повышена экспрессия ABCB1 в опухоли. Гиперэкспрессия ERCC1 не выявлена в образцах с CRS1 и в 25% случаев выявлена в

группе с CRS 2, 3. Таким образом, после проведения платиносодержащей НАХТ наблюдалась тенденция к повышению экспрессии VEGFa, ABCB1 в опухолевой ткани, достоверно значимых различий между группами с CRS1 и CRS2,3 не выявлено.

Сывороточный уровень СА-125 у больных, включенных в когорту, колебался в широком диапазоне от 5 до 5598 ед/мл: до лечения среднее значение составило 1177,5±304,99, после лечения — 146,89±31,55 ед/мл. Критическим уровнем СА-125 в сыворотке после НАХТ был принят 50 ед/мл, при этом у большинства больных (93%) наблюдалось снижение его уровня относительно данных до лечения. Высокий уровень СА-125 сопровождался гиперэкспрессией VEGF. Для транскрипта ABCB1 в опухолевых клетках данная взаимосвязь была выявлена как до начала, так и после проведения НАХТ. Мутации BRCA1 (ins5382), выявленные у 4 пациенток, не были ассоциированы с экспрессией ERCC1. При оптимальной циторедукции после НАХТ экспрессия ABCB1 была ниже, чем при субоптимальной или неоптимальной (p=0,040). В случае с экспрессией VEGF и ERCC1 в опухоли статисти-

чески значимых различий в зависимости от объема хирургического вмешательства не было выявлено.

### Обсуждение

При анализе взаимосвязи степени лечебного патоморфоза с уровнем мРНК ABCB1 и ERCC1 в опухолевой ткани различия между группами CRS1 и CRS 2,3 по уровню транскрипта были не достоверны (табл. 1).

Наблюдалась зависимость уровня онкомаркера СА-125 с выраженностью экспрессии VEGFa и ABCB1 в опухолевой ткани после НАХТ (табл. 1). Уровень VEGF в сыворотке значимо не отличался в группах с разным уровнем мРНК VEGF в опухолевой ткани в динамике лечения (табл. 1).

Таким образом, у больных с распространенным РЯ на III-IV стадиях анализ транскриптов VEGFa и ERCC1 в опухолевой ткани после НАХТ информативен в соотношении прогноза ранних рецидивов, уровень мРНК ABCB1 коррелирует с уровнем СА-125. Анализ связи клиничко-морфологических параметров РЯ с

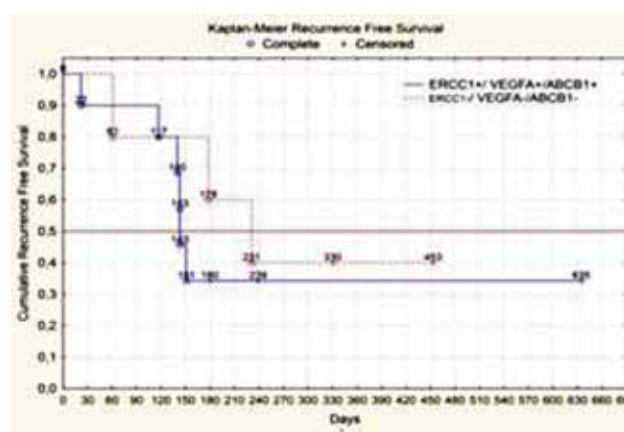
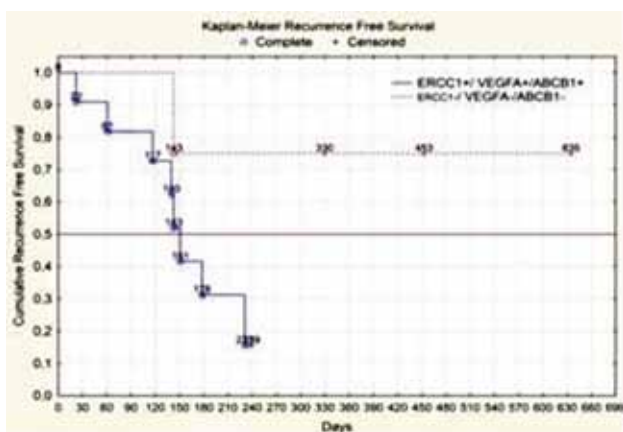


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных с асцитной формой рака яичников после НАХТ в зависимости от уровня экспрессии ERCC1/VEGFA/ABCB1: А – в клетках асцитической жидкости (до начала ХТ); Б – в опухолевой ткани после НАХТ

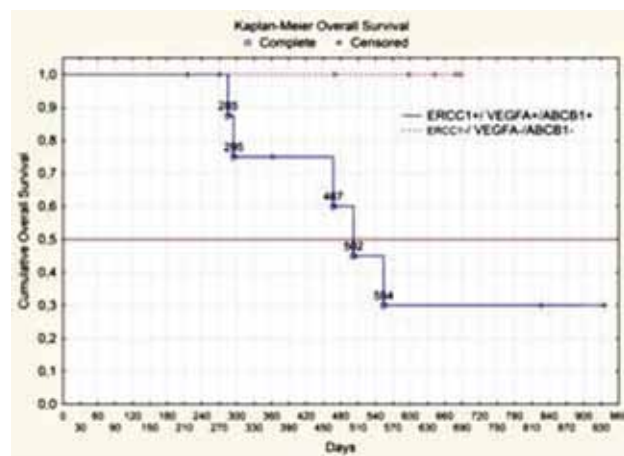
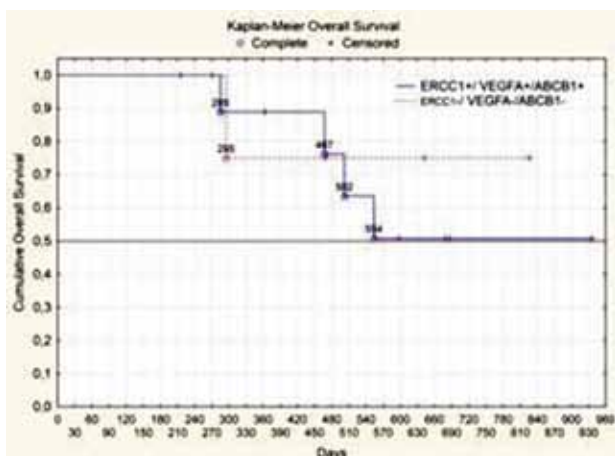


Рис. 2. Общая выживаемость больных с асцитной формой рака яичников в зависимости от уровня экспрессии ERCC1/VEGFA/ABCB1: А – в клетках асцитической жидкости (до начала ХТ); Б – в опухолевой ткани после НАХТ

**Таблица 1. Связь между клинико-патологическими параметрами и экспрессией генов VEGFa, ABCB1, ERCC1 в клетках асцита и ткани первичной опухоли пациентов с асцитной формой рака яичников на фоне химиотерапии по схеме AP**

Клинико-патологические параметры		VEGF (асцит)	VEGF (опухоль)	ABCB1 (асцит)	ABCB1 (опухоль)	ERCC1 (асцит)	ERCC1 (опухоль)
Возраст, лет	<50 >50	p=0,122	p=0,241	p=0,112	p=0,258	p=0,070	p=0,241
CA-125, ед/мл	До начала ХТ - до 500 ед/мл После НАХТ - до 50 ед/мл	p=0,240	p=0,030	p=0,043	p=0,017	p=0,089	p=0,156
Лечебный патоморфоз после НАХТ	CRS1 CRS2,3	p=0,362	p=0,127	p=0,679	p=0,102	p=0,245	p=0,064
Мутации BRCA1, 2	Да Нет					p=0,081	p=0,202
Наличие ранних рецидивов (до 6 месяцев по окончании ХТ 1 линии)	Да Нет	p=0,401	p=0,043	p=0,340	p=0,056	p=0,358	p=0,034
Объем операции	Оптимальная циторедукция Суб/неоптимальная циторедукция	p=0,739	p=0,048	p=0,226	p=0,037	p=0,317	p=0,156

экспрессией исследованных генов показал, что в группе с высоким уровнем VEGF в опухоли после НАХТ отмечены более высокие значения СА-125 (p=0,030). Анализ взаимосвязи нормализованной экспрессии в клетках асцита и опухолевой ткани гена ABCB1, одного из ключевых факторов формирования химиорезистентности, с уровнем сывороточного СА-125 также продемонстрировал наличие достоверно значимых различий в группах с низким и высоким уровнем транскрипта, причем как в группе до лечения (p=0,043), так и после проведения НАХТ (p=0,017).

С частотой ранних рецидивов коррелируют высокие значения экспрессии в опухолевой ткани генов VEGF и ERCC1 (соответственно, p=0,041 и p=0,034) (табл. 1).

При анализе генов химиорезистентности клеток, выделенных из асцитической жидкости, нами показано, что для формирования инвазивно-метастатического потенциала при прогрессировании РЯ, возможно, в ответ на НАХТ отбираются опухолевые клоны, имеющие агрессивный фенотип, сочетающие разные механизмы преодоления (защиты) действия цитостатиков 1 линии (неоангиогенез (VEGF), механизм репарации ДНК (ERCC1), усиление обратного транспорта из клетки (ABCB1 (MDR1)). Прослеживается связь динамики этих факторов в клетках асцита со сроками безрецидивной выживаемости в наблюдаемой выборке пациентов (рис. 1 а, б).

При выраженной экспрессии одного или всех изученных генов (фенотип ERCC+/VEGF+/ABCB1+) в клеточной фракции асцита наблюдается статистически значимое увеличение перио-

да безрецидивной выживаемости в отличие от группы пациентов с низкой или отсутствующей экспрессией (p=0,012, log-rank test). Необходимо заметить, что в 86% случаев в клетках асцита не наблюдается экспрессия ABCB1, которая проявляется в 74% (n=22) в ответ на НАХТ. Таким образом, для ABCB1 наблюдается положительный градиентный феномен в 70% наблюдений.

На общую выживаемость (рис. 2 а, б) в большей степени влияет динамика изученных биомаркеров в опухоли после НАХТ. Установлено, что при формировании опухоли яичников, гиперэкспрессирующей ERCC1, VEGFa, ABCB1 после НАХТ, общая выживаемость составила 41,8 месяца, что существенно больше отличалось от группы с низкой экспрессией изученных генов (25,3 месяца, p=0,058).

### Вывод

Таким образом, уровень мРНК ERCC1, VEGFa и ABCB1 в клетках асцита до НАХТ и в первичной опухоли после НАХТ по схеме AP может служить предиктором эффективности данной схемы лечения асцитного РЯ.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Исследование было поддержано грантом Президента РФ (МК-3196.2018.7).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., и др. Связь безметастатической выживаемости больных раком молочной железы и вектора изменения экспрессии генов множественной лекарственной устой-

- чивости в опухоли при проведении неоадьювантной химиотерапии // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59. – № 3. – С. 334-340. [Litviakov N.V., Garbukov E.Yu., Slonimskaya E.M. Connection of metastasis-free survival in breast cancer patients and an expression vector of multidrug resistance genes in tumor during neoadjuvant chemotherapy. *Voprosy onkologii*. 2013; 59(3):334-40. (In Russ).].
2. Ставровская А.А., Стромская Т.П. Транспортные белки семейства ABC и множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток (обзор) // Биохимия. – 2008. – Т. 73. - №5. - С.735–750. [Stavrovskaya A.A., Stromskaya T.P. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2008; 73(5):592-604. (In Russ).] doi: 10.1134/S0006297908050118.
  3. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Cancerous ovarian stem cells: obscure targets for therapy but relevant to chemoresistance. *J Cell Biochem*. 2013; 114(1):21-34. doi: 10.1002/jcb.24317.
  4. Arora S, Kothandapani A, Tillison K, et al. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010; 9(7):745-53. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.03.010.
  5. B hm St. Chemotherapy Response Score: Development and Validation of a System to Quantify Histopathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Tubo-Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33(22): 2457-2463. doi: 10.1200/JCO.2014.60.5212.
  6. Goler-Baron V, Assaraf YG. Overcoming multidrug resistance via photodestruction of ABCG2-rich extracellular vesicles sequestering photosensitive chemotherapeutics. *PLoS One*. 2012, 7(4): e35487. doi: 10.1371/journal.pone.0035487.
  7. Kim S, Gwak H, Kim HS, et al. Malignant ascites enhances migratory and invasive properties of ovarian cancer cells with membrane bound IL-6R in vitro. *Oncotarget*. 2016; 7(50):83148-83159. doi: 10.18632/oncotarget.13074.
  8. Kolomeyevskaya NV, Lele SB, Miller A, et al. Oxaliplatin is a safe alternative option for patients with recurrent gynecologic cancers after hypersensitivity reaction to Carboplatin. *Int J Gynecol Cancer*. 2015; 25(1):42-8. doi: 10.1097/IGC.0000000000000307.
  9. Lane D, Matte I, Garde-Granger P, et al. Inflammation-regulating factors in ascites as predictive biomarkers of drug resistance and progression-free survival in serous epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2015; 15:492. doi: 10.1186/s12885-015-1511-7.
  10. Litviakov NV, Cherdynitseva NV, Tsyganov MM, et al. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013; 71(1): 153-163. doi: 10.1007/s00280-012-1992-x.
  11. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Pich A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res*. 2012; 2(5):566-80.
  12. Ren F, Shen J, Shi H., et al. Novel mechanisms and approaches to overcome multidrug resistance in the treatment of ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1866(2):266-275. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.10.001.
  13. Sedl kov I., Laco J., Caltov K., et al. Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2015; 25(2):236-43. doi: 10.1097/IGC.0000000000000354.
  14. Sun Y, Guan Z, Liang L, et al. NF- B signaling plays irreplaceable roles in cisplatin-induced bladder cancer chemoresistance and tumor progression. *Int J Oncol*. 2016; 48(1):225-34. doi: 10.3892/ijo.2015.3256.
  15. Xu X, Wang Y, Guo W, et al. The significance of the alteration of 8-OHdG in serous ovarian carcinoma. *J Ovarian Res*. 2013; 6(1):74. doi: 10.1186/1757-2215-6-74.

Поступила в редакцию 05.12.2018 г.

*D.R. Dolgova, S.O. Gening, T.V. Abakumova,  
I.I. Antoneeva, T.P. Gening, A.Yu. Fedotova*

### **Predictors of chemoresistance to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in advanced ovarian cancer**

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk

**Summary.** Chemoresistance is one of the main causes of treatment failure in advanced ovarian cancer (OC). In order to identify predictors of chemoresistance, 30 patients with ascitic form of OC, who received neoadjuvant chemotherapy (NACT) according to AP regimen, were examined. In the epithelial cells of ascites and in tumor tissue after NACT, expression of the VEGFa, ABCB1 and ERCC1 genes was assessed by PCR-RT. The effectiveness of NACT was assessed using the criteria of therapeutic pathomorphosis, survival - using the Kaplan-Meier criterion, the relationship of clinical and molecular parameters - using the Mann-Whitney criterion.

**Results.** We established that in 43% of patients the response to NACT was absent (CRS1), the significant response (CRS2) was in 35% of cases, and the complete response (CRS3) was in 21% of cases. VEGFa expression was increased in ascites in 17% of cases, in tumor tissue - in 33% in the CRS1 group. In groups with CRS 2,3, overexpression of VEGFa in ascites was detected in 25% of cases, in tumor tissue in 37.5%. ABCB1 mRNA expression was increased after NACT in 50% of cases in the CRS1 group and in 25% of cases in the CRS 2,3 group. Thus, platinum-based NACT initiates an increase in the expression of VEGFa and ABCB1 in tumor tissue. We established that in case of high expression (ERCC + / VEGF + / ABCB1 +) in ascites, there is a statistically significant increase in relapse-free survival compared with the group with low or absent expression ( $p = 0.012$ ). The overall survival rate was 41.8 months in patients with overexpression of the studied genes in the tissue of the primary tumor after NACT and 25.3 months in patients with low expression ( $p = 0.058$ ).

**Conclusion.** The levels of ERCC1, VEGFa and ABCB1 mRNA in ascitic cells before NACT and in the primary tumor after NACT according to the AP scheme can serve as a predictor of the effectiveness of this treatment in ascitic OC.

**Key words:** ovarian cancer, ascites, chemoresistance