

## **ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И НЕКОТОРЫЕ МОРФО-ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ**

**Непомнящая Е. М., Кит О. И., Нистратова О. В., Новикова И. А., Никипелова Е. А., Бахтин А. В., Ульянова Е. П., Вострикова Ж. И., Селютина О. Н.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: nistratova.o.v@mail.ru*

Изучено содержание циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови 40 больных колоректальным раком. У исследованных больных был обнаружен повышенный уровень циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) >3 клеток (от 3 до 400 клеток в образце) в 75 % случаев. Все опухоли по своей гистоструктуре были аденокарциномами, различной степени дифференцировки (высокая, умеренная, низкая). Определено соотношение между содержанием ЦОК и некоторыми морфо-иммуногистохимическими показателями (пролиферативной активностью Ki-67, фактором апоптоза p53, ангиогенеза CD31 и адгезии ММП-2). Морфологические изменения в опухоли были сопоставимы с клиническими проявлениями в виде возникновения ранних рецидивов и метастазов в сроки до 24 месяцев. Полученные результаты исследования важны для понимания механизмов прогрессии рака толстой кишки и являются прогностическими.

Ключевые слова: колоректальный рак, циркулирующие опухолевые клетки, морфо-иммуногистохимические показатели.

## **CIRCULATING TUMOR CELLS AND SOME MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL INDICATORS IN COLORECTAL CANCER**

**Nepomnyschaya E. M., Kit O. I., Nistratova O. V., Novikova I. A., Nikipelova E. A., Bachtin A. V., Ulianova E. P., Vostrikova Z. I., Selutina O. N.**

*Rostov research institute of oncology, Rostov-on-Don, e-mail: nistratova.o.v@mail.ru*

The content of circulating tumor cells in the peripheral blood of 40 patients with colorectal cancer was studied. In the studied patients was discovered elevated levels circulating tumor cells (CTC) >3 cells (3 to 400 cells in the sample) in 75% of cases. All the tumors according to their histologic structure were adenocarcinomas, varying degrees of differentiation (high, moderate, low). Correlation between CTC content and some morphological and immunohistochemical indices (proliferative activity using ki-67, apoptosis factor p53, angiogenesis using CD31, and adhesion using MMP-2) was determined. Morphological changes in the tumor were comparable with clinical manifestations such as early relapses and metastases in terms of up to 24 months. The results research important for understanding the mechanisms progression of colon cancer and are prognostic.

Keywords: colorectal cancer, circulating tumor cells, morphological and immunohistochemical indicators.

Колоректальный рак занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности [1,2,4]. Только в России ежегодно регистрируется до 60000 новых случаев в год. У 30–50 % больных со II и III стадией заболевания после радикальных операций в течение первых пяти лет возникают рецидивы и/или метастазы [1,2,4]. В связи с этим актуальным остается вопрос прогнозирования развития последних. Опухолевую прогрессию определяют несколько механизмов: пролиферативная активность, факторы апоптоза, ангиогенеза. Они отвечают за рост и развитие опухоли, способности к инвазии и метастазированию. Одним из ведущих факторов в ангиогенезе являются матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП относятся к семейству цинковых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков межклеточного матрикса [9]. Им принадлежат

функции активации, инактивации и модификации большого количества молекул, которые контролируют процессы инвазии, метастазирования и ангиогенеза [9].

Повышенная экспрессия ММП наблюдается практически во всех злокачественных опухолях и ассоциируется с агрессивным течением заболевания и неблагоприятным прогнозом. ММП с определенной избирательностью гидролизуют все основные компоненты соединительнотканного матрикса (СТМ). Тканевые коллагеназы: ММП-1, ММП-8, ММП-13 – гидролизуют фибриллярные коллагеназы – основу соединительнотканного матрикса, обеспечивая развитие процесса инвазии. Активность ММП в клетке реализуется различными механизмами: транскрипцией, активацией белка и взаимодействием с тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИММП). ММП-2 и ММП-9 – гидролизуют коллаген IV типа – основу базальных мембран, которая обеспечивает отделение эндотелиальных клеток от мембран с последующей их миграцией и участием в процессе ангиогенеза. ММП-2 и ММП-9 высвобождают ряд ангиогенных факторов, связанных с соединительнотканым матриксом [8,9]. Показано, что у больных с аденокарциномой легкого, выявлен значительный уровень экспрессии ММП-2 и ММП-9 опухолевыми клетками, что обуславливает высокую инвазивность опухоли, аналогичные данные получены и при раковых опухолях желудка [4,8].

Степень васкуляризации опухоли является мощным фактором, способствующим приобретению опухолью метастатического потенциала как на ранних, так и на поздних стадиях. При метастазировании гематогенным путем опухолевые клетки должны прикрепиться к эндотелию, выйти в просвет сосуда, выжить в циркулирующей крови, остановиться в какой-либо отдаленной ткани и образовать там клон [5].

Другим, не менее важным, маркером потенциала опухоли является белок p53. P53 выполняет три основные функции: регуляцию клеточного цикла, индукцию апоптоза (в случаях, когда повреждения ДНК клетки не могут быть репарированы), стабилизацию генома. Нарушение регуляции клеточного цикла, связанное с изменением активности p53, ведет к развитию и прогрессированию злокачественного процесса. Мутации гена p53 ведут к «сверхэкспрессии» этого белка, которые иммуногистохимическим путем выявляются с помощью анти-p53 антител. Считается, что иммуногистохимическая положительная реакция полностью зависит от наличия мутантного типа p53 [6].

Прогнозировать течение опухолевого процесса возможно, с использованием одного из маркеров пролиферативной активности ki-67. Во многих крупных исследованиях по течению опухолей различных локализаций показано, что ki-67 является универсальным фактором прогноза рецидивирования и общей безрецидивной выживаемости [3].

Не менее важным показателем развития опухолевой прогрессии является

микрососудистая инвазия опухоли, которую иммуногистохимически можно выявить с помощью антител к CD31. По уровню экспрессии CD 31 производится подсчет плотности микрососудов в опухоли, которая является важным прогностическим признаком [8].

Еще одним из маркеров прогрессирования опухолевого процесса являются циркулирующие в крови опухолевые клетки, увеличение количества которых может стать поводом к более тщательному обследованию пациентов в «досимптомном периоде» [5,8,10]. В проведенных многоцентровых рандомизированных исследованиях показана роль повышения уровня ЦОК в развитии опухолевой прогрессии при раке молочной железы, предстательной железы и колоректальном раке. В ряде стран Запада данный параметр используется для коррекции химиотерапии (отмена, смена линии и т.д.) [11].

**Цель исследования:** изучить экспрессию некоторых иммуногистохимических маркеров (ki-67, p53, CD31,ММП-2) в зависимости от количества циркулирующих опухолевых клеток у больных с раковыми опухолями толстой кишки.

**Материалы и методы исследования:** в исследование были включены 40 больных (20 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 50 до 72 лет с IIIВ стадией колоректального рака. Материалом для исследования служили удаленные опухоли толстого кишечника (после радикальной операции) и венозная кровь из периферической вены (в дооперационном периоде). Изучали количество циркулирующих опухолевых клеток в венозной крови с использованием системы CellSearch™, состоящей из двух приборов: станции пробоподготовки и анализатора. Принцип работы станции основан на подсчёте количества эпителиальных опухолевых клеток, выделяемых из крови. Идентификация клеток осуществляется с помощью флюоресцентно меченых антител к цитокератинам (CK8,CK18,CK19), общелейкоцитарному антигену CD45 и ядерного красителя DAPI. Анализ основан на иммуномагнитном обогащении клеток при помощи металлических наночастиц, покрытых полимерным слоем, содержащим антитела к EpCAM молекулам (маркеры эпителиальных клеток) с дальнейшей иммунофлюоресцентной идентификацией собранных в магнитном поле клеток. Иммуногистохимическое исследование проводили на срезах с парафиновых блоков, предназначенных для стандартного морфологического исследования, с помощью моноклональных антител ki-67, p53, CD31,ММП-2 фирмы Dako. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-LinkThermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65 °С , восстановление антигена в течение 20 минут при температуре 97 °С и дальнейшее охлаждение до 65 °С . Затем стекла промывали в течение 1–3 минут TBS-буфером (Dako) и помещали в автостейнер Thermo Scientific для окрашивания в автоматическом режиме. Для визуализации иммуногистохимической реакции использовали систему детекции

RevealPolyvalent HRP-DAB DetectionSystem. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку экспрессии маркеров изучали как минимум на 10 случайно выбранных полях зрения с применением светового микроскопа ZeissAxioImager M2 под увеличением x10, x40.

В исследовании применяли следующие критерии оценки маркеров:

1) опухоль считали отрицательной по p53, если в ткани опухоли отсутствовала ядерная реакция с антителами или количество окрашенных клеток было менее 25 %, и положительной по p53, если было окрашено более 25 % ядер опухолевых клеток;

2) для оценки пролиферативной активности (ПА) опухоли подсчитывали количество ki-67-положительных опухолевых клеток, приходящихся на 200–300 опухолевых клеток. Индекс ki-67 определяли по формуле:

ПА= число ki-67 положительных клеток x 100/общее количество клеток.

Маркеры пролиферативной активности расценивали на основе наиболее часто употребляющегося способа оценки пролиферативной активности: 0 % – 20 % – низкая пролиферативная активность, 21 % – 50 % – умеренная пролиферативная активность, 51 % – 100 % – высокая пролиферативная активность;

3) Для оценки ангиогенеза в опухолях использовали индекс внутриопухолевой микрососудистой плотности (intratumormicrovesseldensity – MVD). Микрососуды окрашивали антителом CD31. Количество сосудов определяли в каждом поле зрения препарата при использовании объектива x40 с использованием программы AxioVs40 v-4.8.1.0.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 7.0 (StatSoftInc., США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

**Результаты исследования и их обсуждение:** у исследованных больных был обнаружен повышенный уровень ЦОК>3 клеток (от 3 до 400 клеток в образце) в 75 % случаев. По стандартам, применяемым к исследованию ЦОК, образец считается положительным, при любом количестве ЦОК большем, чем 3 клетки. При этом у большего числа пациентов (42,5 %) с высоким уровнем ЦОК при морфологическом исследовании операционного материала была диагностирована низкодифференцированная аденокарцинома. Соотношение количества ЦОК со степенью дифференцировки опухоли показана в таблице 1.

Таблица 1

Зависимость количества ЦОК в периферической крови от степени дифференцировки  
опухоли

| Степень дифференцировки опухоли           | Количество больных (абсолютные числа, %) с ЦОК>3n=30 | Количество больных (абсолютные числа, %) с ЦОК<3n=10 |
|---|--|--|
| Высокодифференцированная аденокарцинома   | 5 (12,5 %)   | 3 (7,5 %)  |
| Умереннодифференцированная аденокарцинома | 9 (25 %)   | 5 (10 %)   |
| Низкодифференцированная аденокарцинома    | 16 (42,5 %)*   | 2 (2,5 %)*   |

Примечание: \* – статистически значимое различие выявления у больных с ЦОК > 3 и < 3с низкодифференцированной аденокарциномой, p=0,0235.

Ретроспективный анализ показал, что ранние рецидивы и метастазы (в сроки до 24 месяцев) развивались чаще у больных с уровнем ЦОК > 3 клеток.

У 67,5 % от общего числа больных была выраженная экспрессия ММП-2. Высокая и умеренная пролиферативная активность была отмечена в 100 % случаев. Экспрессии p53 была отмечена в 67,5 % случаев. CD31 экспрессировался в 75 % образцов, что отражает выраженную микрососудистую инвазию (см. рис. 1–4). Полученные данные иммуногистохимического исследования отражены в таблице 2 и сопоставимы с уровнем ЦОК.

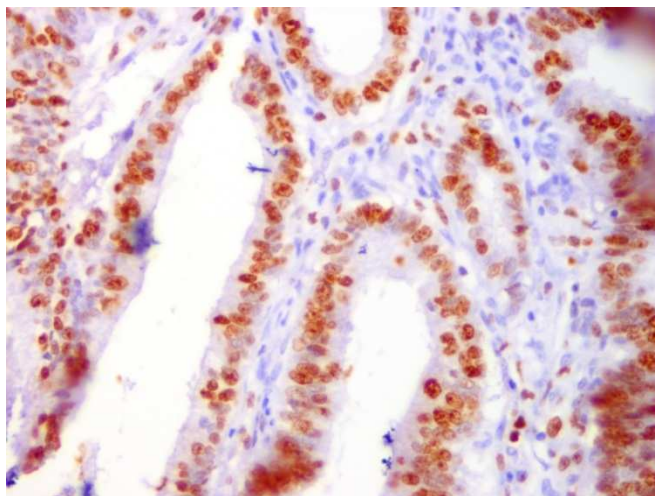
Таблица 2

Показатели ЦОК и иммуногистохимических маркеров

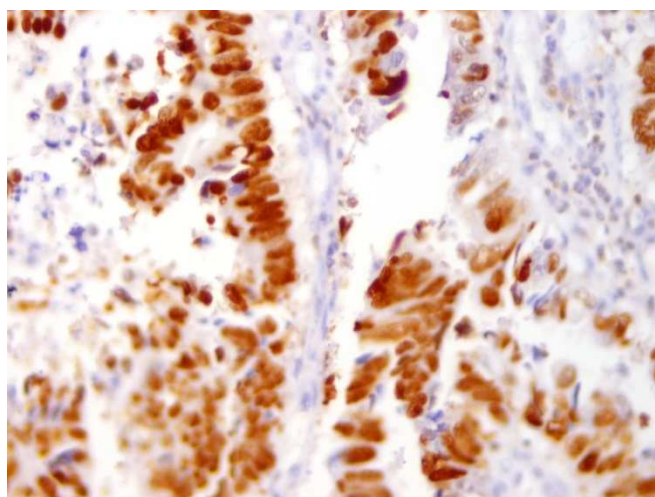
| Экспрессия ИГХ маркеров                      | Количество больных (абсолютные числа, %) с ЦОК>3(n=30) | Количество больных (абсолютные числа, %) с ЦОК<3(n=10) |
|--|--|--|
| Положительная экспрессия p53                 | 23(76,7%)*   | 4(40%)*  |
| Отсутствие экспрессии p53                    | 7(23,7%)**   | 6(60%)**   |
| умеренная пролиферативная активность (ki-67) | 10(33,3%)  | 3(30%)   |
| высокая пролиферативная активность (ki-67)   | 20(66,7%)  | 7(70%)   |
| Положительная экспрессия CD31                | 28(93,3%)°   | 2(20%)°  |
| Отсутствие экспрессии CD31                   | 2(6,7%)°°  | 8(80%)°°   |
| Положительная экспрессия ММП-2               | 26(86,7%)'   | 1(10%)'  |
| Отсутствие экспрессии ММП-2                  | 4(13,3%)''   | 9(90%)''   |

Примечание: статистически значимые различия при ЦОК <3и > 3 выявлены: \* и \*\* – по экспрессии p53, p=0,0383; ° и °° – по экспрессии CD31, p=0,00001; ' и '' – по экспрессии ММП-2, p=0,0001.

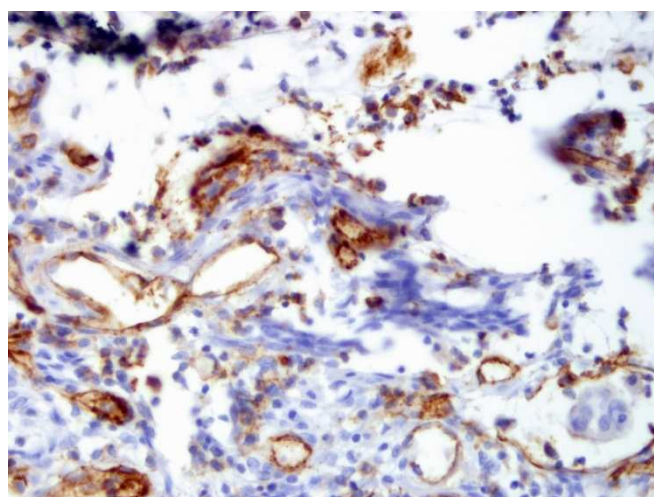
Из таблицы 2 видно, что у больных с высоким уровнем ЦОК отмечена положительная экспрессия маркеров апоптоза, а также маркеров, отражающих микрососудистую инвазию и метастатический потенциал опухоли.



*Рис.1. Высокая пролиферативная активность (ki-67) в раковых клетках. ИГХ-исследование*

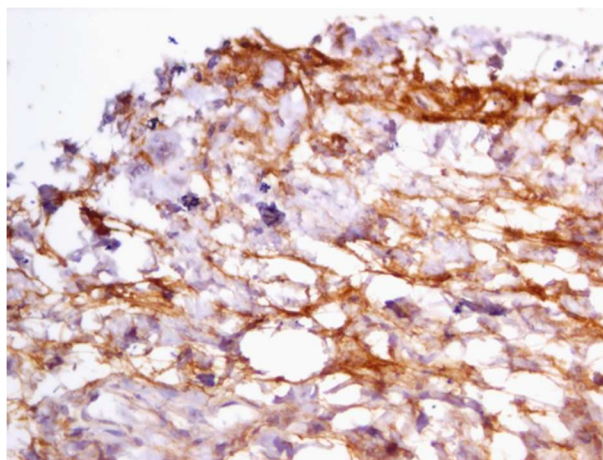


*Рис. 2. Содержание p53 в раковых клетках толстой кишки. ИГХ-исследование*



*Рис. 3. Экспрессия CD31. Микрососудистая плотность при колоректальном раке.*

*ИГХ-исследование*



*Рис. 4. Положительная реакция MMP-2 в раковых клетках толстой кишки.*

*ИГХ-исследование*

**Заключение:** проведенное исследование показало, что количество ЦОК находится в прямой зависимости от маркеров апоптоза (p53) ( $p=0,0383$ ), микрососудистой инвазии (CD31) ( $p=0,00001$ ), MMP-2 ( $p=0,0001$ ). Данные морфологические изменения были сопоставимы с клиническими проявлениями в виде возникновения ранних рецидивов и метастазов (у больных с повышенным количеством ЦОК, метастазы и рецидивы возникали в более ранние сроки). Полученные результаты важны для понимания механизмов прогрессии рака толстой кишки и являются прогностическими.

### Список литературы

1. Архипова О. Е., Черногубова Е. А., Лихтанская Н. В., Тарасов В. А., Кит О. И., Матишов Д. Г. Анализ встречаемости онкологических заболеваний в Ростовской области. Пространственно-временная статистика // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 7-3. – С. 504-510.
2. Архипова О. Е., Черногубова Е. А., Тарасов В. А., Лихтанская Н. В., Кит О. И., Еремеева А. А., Матишов Д. Г. Уровень онкологических заболеваний как индикатор медико-экологической безопасности территории (на примере Ростовской области) // *Вестник Южного научного центра РАН*. – 2013. – Т. 9. – № 3. – С.7-14.
3. Зенюкова Т. В., Перевощиков А. Г., Кузьмичев Д. В., Барсуков Ю. А. Ядерный пролиферативный антиген и степень лечебного патоморфоза в клетках аденокарциномы

- анального канала после комплексного лечения // Российский онкологический журнал. – 2015. – № 5. – С.42-46.
4. Кит О. И. Проблема колоректального рака XXI века: достижения и перспективы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2013. – Т. 23. – № 3. – С.65-71.
  5. Кит О. И., Новикова И. А., Бахтин А. В., Никипелова Е. А., Шатова Ю. С., Габараева В. М., Нистратова О. В. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 11. – С. 37-39.
  6. Колесник А. П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого // Онкология. – 2013. – Т. 15. – № 1. – С.20-23.
  7. Нефедова Н. А., Мальков П. Г. Роль стволовых клеток в канцерогенезе толстой кишки // Онкологическая колопроктология. – 2015. – 3. – Т. 5. – С.15-24.
  8. Петров С. В., Райхлин Н. Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – Казань, 2012. – С. 84,409.
  9. Старостина М. А., Афанасьева З. А., Зинкевич О. Д., Сафина Н. А. Металлопротеиназы ММП-9 и их тканевые ингибиторы TIMP-1 в копрофильтратах у больных раком толстой кишки // Российский онкологический журнал. – 2011. – № 6. – С.38-39.
  10. Хомяков Е. А. Динамическое наблюдение больных колоректальным раком после радикальных операций // Колопроктология. – 2015. – № 2(52). – С.57-67.
  11. Roy Beveridge. Circulating tumor cell in management of metastatic breast cancer patients // Community onkology. – 2007. – № 2. – pp.79-82.