

НЕКОТОРЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Новикова И.А., Водолажский Д.И.,
Шуликов П.Б., Харагезов Д.А., Ильченко С.А., Дашков А.В., Полужков С.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России», Ростов-на-Дону, e-mail: snv-rnioi@yandex.ru

Направленность современной онкологии к персонализированной терапии инициирует проведение молекулярно-биологических исследований опухолей, в том числе и колоректальных, с целью лучшего понимания их биологической сущности и определения новых мишеней для направленной терапии. Цель исследования: изучить некоторые биологические особенности метастатического колоректального рака. Методы. Объектом исследования послужили данные о 48 больном колоректальным раком T1-4N0-2M0-1. Проведен анализ клинических, морфологических и молекулярных особенностей локализованных и метастатических форм опухолей толстой и прямой кишки. Исследование циркулирующих опухолевых клеток проводили с использованием системы CellSearch™ Veridex. В образцах тканей опухолей проводили определение 7 SNP-мутаций в 12 и 13 кодонах гена KRAS с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). Результаты исследования показали, что первично-метастатические формы колоректального рака наблюдаются преимущественно у женщин и располагаются в ободочной кишке. Метастатические колоректальные опухоли отличаются смещением дифференцировки в сторону низкодифференцированных аденокарцином и увеличением частоты выявления и среднего числа (в 3,7 раза) циркулирующих опухолевых клеток. Более высокий метастатический потенциал имеют метастатические опухоли с диким типом гена KRAS. Заключение. Метастатические колоректальные опухоли имеют молекулярно-биологические особенности в отношении степени дифференцировки опухоли, характеристики гена KRAS, содержания циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови. Выявленные особенности возможно учитывать для прогнозирования клинического течения заболевания и планирования лечения.

Ключевые слова: метастатический колоректальный рак, молекулярно-биологические особенности.

SOME MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF METASTATIC COLORECTAL CANCER

Kit O.I., Gevorkyan Y.A., Soldatkina N.V., Novikova I.A., Vodolazhskiy D.I.,
Shulikov P.B., Kharagezov D.A., Ilchenko S.A., Dashkov A.V., Poluektov S.I.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: snv-rnioi@yandex.ru

Successful implementation of fundamental oncology achievements into clinical practice initiates new fundamental studies which will allow better understanding of biological nature of colorectal tumors and will determine new targets for the targeted therapy. Aim of the study: to investigate some biological characteristics of metastatic colorectal cancer. Methods. Data on 48 patients with T1-4N0-2M0-1 colorectal cancer were studied. Clinical, morphological and molecular characteristics of localized and metastatic tumors of the colon and rectum were analyzed. Circulating tumor cells were studied using CellSearch™ Veridex system. 7 SNP-mutations in the codons 12 and 13 of the KRAS gene were determined in tissue samples using Bio-Rad CFX96 thermocycler (Bio-Rad, USA). The results showed that primary metastatic colorectal tumors were observed mainly in women and were localized in the middle intestine. Metastatic colorectal tumors were characterized by differentiation shift towards poorly differentiated adenocarcinomas and a higher detection rate and average number (by 3.7 times) of circulating tumor cells. Metastatic tumors with the KRAS wild-type gene had a higher metastatic potential. Conclusion. Metastatic colorectal tumors have certain molecular and biological characteristics which can be used for prognosis of the disease clinical course and for treatment planning.

Keywords: metastatic colorectal cancer, molecular and biological characteristics.

Проблема метастатического колоректального рака в последнее десятилетие стала особенно актуальной, что обусловлено не только увеличением числа метастатических форм опухолей толстой и прямой кишки, но, в основном, внедрением высокотехнологичных

методов лечения, которые позволили значительно улучшить результаты лечения и достичь 5-летней выживаемости. В ряду инновационных методов лечения особо следует отметить: современные схемы полихимиотерапии (FolFox, Xelox, FolFiri), применение таргетных препаратов, хирургическое лечение метастатических форм колоректального рака (в том числе и малоинвазивное), радиочастотную термоабляцию метастазов в печени [2; 4; 8].

Успехи в области лекарственной терапии метастатического колоректального рака стали возможны благодаря фундаментальным исследованиям, которые привели к прогрессу в понимании молекулярных механизмов колоректального рака и определили молекулярные мишени для направленной противоопухолевой терапии [1]. Так, в арсенале онкологов появились такие препараты, как цетуксимаб и панитумумаб – моноклональные антитела к рецептору EGFR, и бевацизумаб – моноклональные антитела к рецепторам сосудистого эндотелиального фактора роста. Проводимые многочисленные исследования показывают эффективность таргетных препаратов как в монорежиме, так и при включении их в режимы химиотерапии метастатического колоректального рака [2; 8].

Важным достижением в лекарственной терапии злокачественных опухолей является возможность определения молекулярно-генетических маркеров химиочувствительности, развития побочных токсических эффектов и риска прогрессирования опухоли. Так, в настоящее время установлено, что на риск прогрессирования влияют: анеуплодия, процент клеток в S-фазе цикла, микросателлитная нестабильность, уровень тимидилатсинтетазы, уровень белков Pgp 170, MRP, LRP, мутации p27, p53, гиперэкспрессия Bcl-2, уменьшение экспрессии CD95, экспрессия эпидермальных и эндотелиальных факторов роста [6].

Молекулярными маркерами ответа на химиотерапию являются: p53, EGFR, Ki-67, p21, bcl-2 и тимидилатсинтетаза [6]. Определены и факторы, определяющие отсутствие чувствительности к химиотерапии, например для оксалиплатина и иринотекана - это тесты «cross-complementing gene ERCC1» и «topo-isomerase-1 (Topo1)» [3].

В последнее время активно изучаются и циркулирующие опухолевые клетки при злокачественных опухолях, в том числе и при колоректальном раке. Так, установлено, что при метастатических формах рака циркулирующие опухолевые клетки обнаруживаются у 70% больных, при локализованных – у 30-40%. Обнаружение циркулирующих опухолевых клеток у больных после завершения адьювантной химиотерапии свидетельствует о развитии прогрессирования заболевания в 70% случаев [5; 7]. В настоящее время устанавливается связь количества циркулирующих опухолевых клеток со стадией, клиническим течением, особенностями прогрессирования рака.

Успешное внедрение достижений фундаментальной онкологии в клиническую практику инициирует проведение новых фундаментальных исследований, которые позволят

лучше понять биологическую сущность колоректальной опухоли и определяют новые мишени для направленной терапии.

Цель работы – изучить некоторые биологические особенности метастатического колоректального рака.

Материал и методы. В исследование включено 48 больных колоректальным раком T1-4N0-2M0-1, находившихся на лечении в клинике ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ в 2015-2016 гг. Среди больных было 48 (52,7%) женщин и 43 (47,3%) мужчины. Средний возраст пациентов на момент лечения составил 62,3 года. Опухоль локализовалась в прямой кишке у 32 (35,2%) больных, в сигмовидной кишке – у 25 (27,5%) больных, ободочной кишке – у 34 (37,4%) больных. У всех больных гистологически опухоли характеризовались как аденокарциномы различной степени дифференцировки: G1 – в 4 (4,4%) случаях, G2 – в 70 (76,9%) случаях, G3 – в 17 (18,7%) случаях. По классификации TNM выявлено следующее распределение: T2 – 2 (2,2%) больных, T3 – 21 (23,1%), T4 – 68 (74,7%). Метастазы в регионарных лимфоузлах выявлены у 49 (53,8%) больных. Первично генерализованные формы с метастазами в печень (T1-4N0-2M1) были у 26 (49) больных, они составили основную группу пациентов. У 42 больных колоректальные опухоли были локализованные, без отдаленных метастазов (T1-4N0-2M0), эти пациенты составили контрольную группу. Всем больным выполнены циторедуктивные и радикальные оперативные вмешательства. У больных обеих групп исследовали содержание циркулирующих опухолевых клеток и наличие мутаций гена KRAS.

Для этого до оперативного вмешательства у больных производили забор 7,5 мл крови в пробирки CellSavePreservativeTube, содержащие антикоагулянт ЭДТА, а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Детекцию циркулирующих опухолевых клеток проводили с использованием системы CellSearch™ Veridex (Johnson&Johnson, США). Для отделения клеток крови и опухолевых от плазмы кровь смешивалась с рабочим буфером из набора реагентов CellSearch® CTCkit и центрифугировалась при ускорении 800 g в течение 10 минут. После этого образцы переносились в аппарат CellTracks® AutoPrep® System, который в автоматическом режиме, удаляя плазму крови и форменные элементы, иммуномагнитно обогащал образец микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинами 8,18,19. Качество работы системы оценивали с использованием стандартного контроля CTC controlkit. Материал сканировался в анализаторе CellTracks® AnalyzerII®. С учетом морфологических характеристик и экспрессии маркеров регистрировались циркулирующие опухолевые клетки. Общее число выявленных опухолевых клеток являлось конечным результатом.

Из фиксированных в 10%-ном забуференном формалине и залитых в парафин

образцов тканей опухолей, полученных после оперативного вмешательства, получали срезы толщиной 8-10 мкм. Процедура экстракции ДНК включала в себя стандартную депарафинизацию срезов. Затем образцы обрабатывали набором реагентов QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной из образцов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0® с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen, США). Концентрация ДНК нормализовывалась до величины 1 нг/мкл. При помощи набора реагентов Real-Time-PCR-KRAS-7M («Биолинк», Россия) проводили определение 7 SNP-мутаций (Single Nucleotide Polymorphism) в 12 и 13 кодонах гена KRAS: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D с использованием термоциклера Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). Статистический анализ выполняли с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010 и STATISTICA 8.0. Оценку различий проводили с использованием χ^2 -критерия и точного двухстороннего критерия Фишера, при сравнении числа ЦОК применяли критерий Манна - Уитни для уровня статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

В группе пациентов с метастатическим колоректальным раком средний возраст больных составил 59,49 года. Среди больных было 32 (65,3%) женщины (средний возраст 59,35 года) и 17 (34,7%) мужчин (средний возраст 59,77 года). Опухоль локализовалась в прямой кишке у 15 (30,6%) больных, в сигмовидной кишке – у 13 (26,5%) больных, ободочной кишке – у 21 (42,9%) больных. У всех больных гистологически опухоли характеризовались как аденокарциномы различной степени дифференцировки: G1 – в 2 (4,1%) случае, G2 – в 40 (81,6%) случае, G3 – в 7 (14,3%) случаях. По классификации TNM выявлено следующее распределение: T3 – 4 (8,2%), T4 – 46 (92,3%). Метастазы в регионарных лимфоузлах выявлены у 38 (77,6%) больных.

Мутации гена KRAS выявлены у 13 (26,5%) больных, циркулирующие опухолевые клетки выявлены у 38 (77,6%) больных метастатическим колоректальным раком. Если рассматривать особенности метастатической колоректальной опухоли в зависимости от состояния гена KRAS и особенностей содержания циркулирующих опухолевых клеток, то получим следующие данные. При одинаковом характере распределения гистологической структуры опухоли и частоте наличия циркулирующих опухолевых клеток (табл. 1) у пациентов с метастатическим колоректальным раком с диким типом гена KRAS среднее число циркулирующих клеток в 5 раз выше, чем при мутированном гене KRAS ($p=0,0010$).

Таблица 1

Особенности метастатических колоректальных опухолей
в зависимости от состояния гена KRAS

Состояние гена KRAS	Есть мутация 13 (26,5%)	Нет мутации 36 (73,5%)	p
Наличие ЦОК	10 (76,9%)	28 (77,8%)	1,0
Среднее число ЦОК	2,8 (1-9)	14,5 (1-121)	0,0010
Аденокарцинома G1	0	2 (5,6%)	0,24
Аденокарцинома G2	12 (92,3%)	28 (77,8%)	
Аденокарцинома G3	1 (7,7%)	6 (16,7%)	

Примечание: p - статистическая значимость различий между группами.

У пациентов с метастатическим колоректальным раком с наличием циркулирующих опухолевых клеток наблюдается такая же частота мутаций гена KRAS, как и у пациентов без выявленных циркулирующих опухолевых клеток (табл. 2). А вот в гистологической структуре опухолей мы нашли достоверные изменения. Так, циркулирующие опухоли клеток достоверно чаще ($p=0,040$) выявляются при смещении дифференцировки аденокарциномы в сторону низкодифференцированных опухолей.

Таблица 2

Особенности метастатических колоректальных опухолей
в зависимости от наличия циркулирующих опухолевых клеток

	Наличие ЦОК 38 (76,9%)	Отсутствие ЦОК 11 (23,1%)	p
Среднее число ЦОК	11,5 (1-121)	-	
Мутации гена KRAS	10 (25,3%)	3 (27,3%)	1,0
Аденокарцинома G1	0	2 (18,2%)	0,040
Аденокарцинома G2	32 (84,2%)	8 (72,7%)	
Аденокарцинома G3	6 (15,8%)	1 (9,1%)	

Примечание: p - статистическая значимость различий между группами.

В группе пациентов с локализованным колоректальным раком без отдаленных метастазов средний возраст больных составил 62,9 года. Среди больных было 15 (35,7%) женщин (средний возраст 64,22 года) и 27 (64,3%) мужчин (средний возраст 61,71 года). Опухоль локализовалась в прямой кишке у 17 (40,5%) больных, в сигмовидной кишке – у 13 (31,0%) больных, ободочной кишке – у 12 (28,6%) больных. У всех больных гистологически опухоли характеризовались как аденокарциномы различной степени дифференцировки: G1 – в 2 (4,8%) случаях, G2 – в 29 (69,0%) случаях, G3 – в 11 (26,2%) случаях. По классификации TNM выявлено следующее распределение: T2 – 2 (4,8%) больной, T3 – 17 (40,5%), T4 – 23 (54,8%). Метастазы в регионарных лимфоузлах выявлены у 11 (26,2%) больных.

Среди больных колоректальным раком без отдаленных метастазов мутации гена

KRAS наблюдались у 16 (38,1%) пациентов. Наличие мутации не влияет на частоту обнаружения и среднее число циркулирующих опухолевых клеток при локализованной колоректальной опухоли (табл. 3), но влияет на дифференцировку аденокарциномы. Это проявляется в смещении дифференцировки аденокарциномы в сторону низкодифференцированных опухолей при наличии мутации гена KRAS в опухолевых клетках.

Таблица 3

Особенности колоректальных опухолей без отдаленных метастазов
в зависимости от состояния гена KRAS

Состояние гена KRAS	Есть мутация 16 (38,1%)	Нет мутации 26 (61,9%)	p
Наличие ЦОК	121 (68,8%)	17 (65,4%)	0,73
Среднее число ЦОК	3 (1-10)	3,1 (1-14)	0,78
Аденокарцинома G1	2 (12,5%)	0	0,00009
Аденокарцинома G2	5 (31,3%)	24 (92,3%)*	
Аденокарцинома G3	9 (56,3%)	2 (7,7%)*	

Примечание: p - статистическая значимость различий между группами.

Циркулирующие опухолевые клетки выявлены у 29 (69,0%) больных колоректальным раком без отдаленных метастазов. Результаты исследования показали, что при локализованном колоректальном раке с наличием циркулирующих опухолевых клеток достоверно чаще встречается мутация гена KRAS по сравнению с локализованными опухолями без циркулирующих опухолевых клеток (табл. 4). По остальным показателям в этих подгруппах больных достоверных различий не было.

Таблица 4

Особенности колоректальных опухолей без отдаленных метастазов
в зависимости от наличия циркулирующих опухолевых клеток

	Наличие ЦОК 29 (69,0%)	Отсутствие ЦОК 13 (31,0%)	p
Среднее число ЦОК	3,1 (1-14)	-	0,49
Мутации гена KRAS	14 (48,3%)	2 (15,4%)	0,043
Аденокарцинома G1	2 (6,9%)	0	0,44
Аденокарцинома G2	20 (69,0%)	9 (69,2%)	
Аденокарцинома G3	7 (24,1%)	4 (30,8%)	

Примечание: p - статистическая значимость различий между группами.

Обсуждение. Основную часть пациентов с первично метастатическим

колоректальным раком, в отличие от пациентов с локализованной колоректальной опухолью, составили женщины (2/3 пациентов), причем по возрасту они были на 5 лет моложе, чем при локализованной опухоли. При первично метастатическом колоректальном раке в 1,5 раза чаще, чем при локализованном, опухоль располагалась в ободочной кишке. Метастатические колоректальные опухоли были, в основном, и местнораспространенными: выходили за пределы кишечной стенки (92,3%) и имели метастазы в регионарных лимфоузлах (76,9%). Колоректальные опухоли без отдаленных метастазов имели и меньшую степень распространения: опухоль локализовалась только в пределах кишечной стенки у 45,4% больных, выходила за пределы кишечной стенки у 54,6% больных. Локализованные колоректальные опухоли в большинстве случаев (72,7%) были без отдаленных метастазов. В отношении степени дифференцировки опухоли мы не нашли отличий между группами метастатического и локализованного колоректального рака: в обеих группах преобладали G2 аденокарциномы (69,0-81,6%), случаи G1 аденокарциномы были единичны.

Мутации гена KRAS выявлены у трети больных колоректальным раком (в 26,5% случаев метастатической опухоли и в 38,1% случаев локализованной опухоли).

У пациентов с метастатическим колоректальным раком с диким типом гена KRAS среднее число циркулирующих клеток в 5 раз выше, чем при мутированном гене KRAS ($p < 0,05$). При диком типе гена KRAS частота выявления циркулирующих клеток в крови больных выше при метастатических опухолях (77,7%), чем при локализованных (65,4%).

При локализованной колоректальной опухоли с диким типом гена KRAS выше частота G2 аденокарциномы (92,3%) по сравнению с метастатическим раком (77,8%), при котором наблюдается смещение дифференцировки аденокарциномы в сторону низкодифференцированных опухолей. При смещении дифференцировки аденокарциномы в сторону низкодифференцированных опухолей при метастатическом раке наблюдается достоверное увеличение частоты выявления циркулирующих опухолевых клеток.

Колоректальные опухоли с мутированным геном KRAS отличаются по дифференцировке аденокарцином в зависимости от распространенности опухоли. Так, при локализованной форме опухоли в половине случаев наблюдались низкодифференцированные аденокарциномы, при этом встречались и умеренно- и высокодифференцированные аденокарциномы. При первично метастатических опухолях гистологически опухоли были представлены, в основном, умереннодифференцированными аденокарциномами.

Циркулирующие опухолевые клетки выявлены нами у 3/4 больных колоректальным раком. При этом среднее их число в 3,7 раза было выше при опухолях с отдаленными метастазами. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследований,

выявившими циркулирующие опухолевые клетки у 70% больных метастатическими формами рака. Кроме того, в настоящее время установлена связь между выявлением циркулирующих опухолевых клеток и течением заболевания, развитием прогрессирования опухоли [5; 9]. Эти данные подтверждают высокий риск развития метастазов опухоли при наличии циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови. Целесообразно использование циркулирующих опухолевых клеток как фактора прогноза клинического течения опухоли и эффективности терапии, что уже отражено в рекомендациях ASCO и FDA.

В подгруппе больных локализованным колоректальным раком с наличием циркулирующих опухолевых клеток в 2 раза чаще встречалась мутация гена KRAS по сравнению с локализованными опухолями без циркулирующих опухолевых клеток и с метастатическими раками. Эти данные нуждаются в дальнейшем исследовании.

Таким образом, метастатические колоректальные опухоли имеют молекулярно-биологические особенности, которые возможно учитывать для прогнозирования клинического течения заболевания и при планировании лечения.

Выводы

1. Первично-метастатические формы колоректального рака преимущественно наблюдаются у женщин на 5 лет моложе, чем при локализованной опухоли. Первичная опухоль в 1,5 раза чаще располагается в ободочной кишке и имеет и местнораспространенный характер (выходит за пределы кишечной стенки (92,3%), и метастазы в регионарных лимфоузлах (76,9%)).
2. При метастатическом колоректальном раке наблюдается смещение дифференцировки аденокарциномы в сторону низкодифференцированных опухолей, что сопровождается достоверным увеличением частоты выявления и среднего числа (в 3,7 раза) циркулирующих опухолевых клеток.
3. Метастатический колоректальный рак с диким типом гена KRAS имеет более высокий метастатический потенциал: в 1,2 раза выше частота выявления и в 5 раз выше среднее число циркулирующих опухолевых клеток ($p < 0,05$).

Список литературы

1. Беляева А.В. Мутации в гене K-ras у больных колоректальным раком: эпидемиология и клиническое значение : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - СПб., 2012. – 24 с.
2. Владимирова Л.Ю., Геворкян Ю.А., Абрамова Н.А., Солдаткина Н.В. Оценка эффективности и токсичности моноклонального антитела к EGFR панитумумаба при

колоректальном раке // Материалы VII Съезда онкологов и радиологов стран СНГ. Астана. - 2012. – С. 189.

3. Имянитов Е.Н., Моисеенко В.М. Применение молекулярно-генетического анализа для выбора противоопухолевой цитостатической терапии // Онкогематология. – 2007. - № 3. – С. 4-8.

4. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Колесников В.Е., Харагезов Д.А. Лапароскопические комбинированные оперативные вмешательства при метастатическом колоректальном раке // Колопроктология. - 2015. - № 4 (54). - С. 19-23.

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. - № 11-2. - С. 37-39.

6. Кушлинский Н.Е., Исаков В.А., Делекторская В.В. Колоректальный рак. Опухолевые маркеры и молекулярно-генетические методы диагностики // Сибирский онкологический журнал. – 2004. - № 2-3. – С. 134-148.

7. Bzhadug O.B., Tjuliandin S.A., Grivtsova L.Yu. The prognostic value of circulating tumor cells in blood of patients with advanced breast cancer // Haematopoiesis Immunology. – 2007. - № 4. – P. 73-101.

8. Tol J., Koopman M., Cats A. et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer // N. Engl. J. Med. – 2009. - № 360. – P. 563-572.