

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

О. Кит, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН,
П. Шуликов,
И. Новикова, кандидат медицинских наук,
А. Гранкина,
В. Колесников, кандидат медицинских наук,
Ю. Геворкян, доктор медицинских наук, профессор,
Н. Солдаткина, доктор медицинских наук, профессор
Ростовский научно-исследовательский онкологический институт
E-mail: grankina.anastasia@mail.ru

Представлены результаты изучения частоты выявления и количества циркулирующих в периферической крови опухолевых клеток (ЦОК) у больных метастатическим и неметастатическим колоректальным раком. В ходе исследования были выявлены интересные различия между группами. Полученные данные доказывают возможность и целесообразность использования уровня ЦОК в качестве фактора прогноза клинического течения опухолевого процесса.

Ключевые слова: онкология, циркулирующие опухолевые клетки, метастатический и неметастатический колоректальный рак.

За последние 5 лет частота выявления колоректального рака (КРР) увеличилась не менее чем на 12% [1]. Основная проблема терапии пациентов с КРР — развитие отдаленных метастазов и выбор дальнейшей тактики лечения [2, 3]. Одним из высокоточных маркеров прогноза рецидивирования и метастазирования является количество циркулирующих в крови опухолевых клеток (ЦОК). На экспериментальных моделях показано, что лишь 0,01% опухолевых клеток в кровотоке достигают своей метастатической ниши и реализуются в метастазы [4].

Для ЦОК характерен агрессивный метастатический потенциал, который они приобретают в результате эволюции клона, что позволяет рассматривать их в качестве основного механизма опухолевой прогрессии [5]. Во многих работах показано, что ЦОК имеют существенное прогностическое значение. Так, в исследовании S. Cohen и соавт. при сравнении групп больных КРР с благоприятным (<3 ЦОК в 7,5 мл крови) и неблагоприятным (>3 ЦОК в 7,5 мл крови) исходным уровнем ЦОК безрецидивная выживаемость составила 4,5 против 7,9 мес, а общая — 9,4 против 18,5 мес [6, 7]. Н. Katsuno и соавт. предполагают, что уровень ЦОК имеет прямую связь с поражением лимфатических узлов и стадией заболевания [8].

Авторами изучены частота выявления и количество ЦОК в периферической крови больных метастатическим и неметастатическим КРР.

Объектом исследования явилась периферическая кровь 23 больных КРР с отдаленными метастазами T1N0-2M1 (основная группа) и 30 больных без отдаленных метастазов T1-4N0-2M0 (контрольная группа).

Кровь для исследования у больных брали из локтевой вены в объеме 8–10 мл в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт ЭДТА, а также реагент, способствующий сохранению жизнеспособности опухолевых клеток. Отделение клеток крови и опухолевых клеток от плазмы производилось путем смешивания крови с рабочим буфером из набора реагентов CellSearch® CTC Kit. Полученная смесь центрифугировалась при 800 g в течение 10 мин. Далее образцы крови переносили в аппарат CellTracks® AutoPrep® System для автоматического удаления плазмы и форменных элементов; аппарат иммуномагнитно обогащает образец микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинам-8, -18, -19. Для проверки качества работы системы использовали стандартный контроль — CTC Control Kit. Затем материал переносили в анализатор CellTracks® Analyzer II® для сканирования полученных образцов и далее с учетом морфологических характеристик и экспрессии маркеров регистрировали ЦОК. Конечным результатом исследования являлось определение общего количества ЦОК.

В ходе исследования нами были установлены достоверно значимые различия среднего количества ЦОК в крови больных основной и контрольной групп — соответственно $8,2 \pm 2,0$ против $3,0 \pm 0,7$ ($p \leq 0,05$).

В основной группе преобладали больные с уровнем ЦОК >3 (39,1%); при этом в контрольной группе практически с такой же частотой (36,7%) детектировались лишь единичные опухолевые клетки. Доля в контрольной группе больных с уровнем ЦОК от 2 до 3 в 1,5 раза превосходила аналогичный показатель основной группы, тогда как в основной группе больных с уровнем ЦОК >3 было в 1,7 раза больше, чем в контрольной. Мы отметили также в обеих группах примерно одинаковое число больных с единичными клетками: 30,4% в основной группе и 36,7% — в контрольной. На рис. 1–3 представлены полученные нами в ходе исследования данные о количестве ЦОК на разных стадиях онкопатологии.

В обеих группах наблюдалась тенденция к повышению числа ЦОК в периферической крови у мужчин. Отмечено, что у больных моложе 50 лет ЦОК практически не детектировались. Основными локализациями опухолей при наличии ЦОК являлись прямая и сигмовидная кишка, что, скорее, связано с частотой встречаемости данных видов онкопатологии у больных в нашей выборке.

Анализ корреляции между уровнем ЦОК и степенью дифференцировки опухоли выявил, что у больных обеих групп с аденокарциномой G2 единичные опухолевые клетки определялись практически с равной частотой: в основной группе — у 38,9% больных и в контрольной — у 45,5%. Доля больных с аденокарциномой G2 и уровнем ЦОК >3 в основной группе в 1,8 раза превосходила таковую в контрольной группе. Схожая картина наблюдалась при аденокарциноме G3: так, в основной группе таких больных было 27,8%, в контрольной — 27,2%.

Основной причиной смерти пациентов со злокачественными новообразованиями по-прежнему остаются отдаленные метастазы даже при значительных успехах в диагностике и лечении. При наличии метастазов продолжительность жизни в среднем снижается с 90 до 5% на фоне ограничения вариантов лечения [9]. Выход опухолевых клеток из опухолевого узла может составлять от нескольких тысяч до нескольких миллионов в день на 1 г ткани [10], что

в наибольшей степени связано с ангиогенезом в опухоли, сосудистой инвазией, размерами и пролиферативным потенциалом опухоли. По данным литературы, примерно у 20–45% больных с онкологическим диагнозом при отсутствии дистантных метастазов обнаруживаются ЦОК. Вместе с тем <2% опухолевых клеток, находящихся в кровяном русле, способны формировать микрометастазы и при этом только около 0,2% (примерно 4600 ЦОК в организме больного) способны запускать механизмы, которые приводят к появлению истинного метастатического узла [11]. Метастатические клетки могут оставаться «дремлющими» в течение неопределенного времени и приобретать пролиферативные свойства после варибельного по продолжительности периода покоя из-за факторов, природа которых пока раскрыта не полностью [12].

Наибольший интерес представляют работы, посвященные возможной связи ЦОК и стволовых опухолевых клеток [11]. Известно, что стволовые опухолевые клетки – весьма редкая самообновляющаяся популяция, необходимая для инициации новообразования и поддерживающая его рост. Вероятно, стволовые опухолевые клетки являются «глубоким резервом» опухоли в состоянии покоя (Go), вследствие чего представляют собой наиболее радио- и химиорезистентную клеточную популяцию [13].

Критическим этапом канцерогенеза, как известно, является приобретение опухолевыми клетками способности к инвазии и интравазации, выживание в кровотоке и колонизация микроциркуляторного русла отдаленных органов (этапы метастатического каскада). При этом способность к метастазированию присуща не всем клеткам первичной опухоли, а только определенной ее части (клону), которая приобрела в результате накопления мутаций агрессивнейший фенотип и метастатический потенциал [14].

Значительным этапом метастатического каскада считается эпителиально-мезенхимальный переход злокачественной клетки [15, 16]. Для феномена эпителиально-мезенхимального перехода характерно двойное значение. Во-первых, эпителиальные клетки, способные трансформироваться в миофибробласты, утрачивают злокачественный фенотип, что представляет собой основу для формирования собственной фиброзной опухолевой стромы и обеспечивает дополнительные возможности для сохранения жизнеспособности ее клеток. Во-вторых, клетки во время эпителиально-мезенхимального перехода приобретают и накапливают свойства стволовых клеток опухоли для реализации своих главных функций – метастазирования, колонизации и пролиферации в отдаленные органы. Абсолютно неоспоримо то, что солитарные опухолевые клетки периферической крови могут быть использованы для мониторинга больных, получающих системную химиотерапию или гормонотерапию [4].

Уровень в крови ЦОК относится к числу возможных факторов, существенно влияющих на вероятность и частоту метастазирования. Метастатический процесс обычно связывают с лимфогенным и гематогенным путями. Среди сложных механизмов метастазирования опухоли, зависящих от ее локализации, пролиферативных характеристик, гистологического строения, иммунофенотипа, молекулярно-биологических и прочих особенностей, важны те, которые действуют на этапе циркуляции опухолевых клеток в крови [6].

Больные контрольной и основной групп были проанализированы нами и с точки зрения поражения лимфатиче-

ских узлов. В этой части исследования к контрольной группе были отнесены 12 больных с T1-4N1-2M0 и 18 – с T1-4N0M0. В основную группу вошли 5 больных с T1-4N0M1 и 18 – с T1-4N1-2M1.

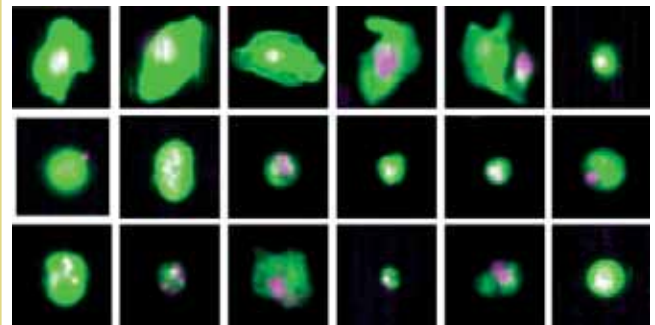


Рис. 1. Больной Б., 63 лет; основная группа; диагноз: рак сигмовидной кишки, аденокарцинома G3, T4N2M1, стадия IV; исследование периферической крови выявило 18 ЦОК; опухолевые клетки имеют иммунофенотип CK45-CK8+CK18/19+ и гетерогенны по морфологической структуре

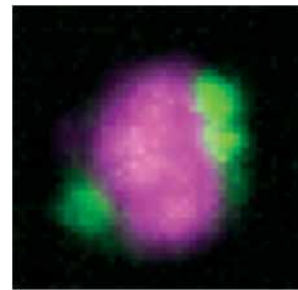


Рис. 2. Больная Ш., 47 лет; контрольная группа; диагноз: рак сигмовидной кишки, аденокарцинома G2, T3N0M0 стадия IIA; выявлена 1 ЦОК иммунофенотипа CK45-CK8+CK18/19+

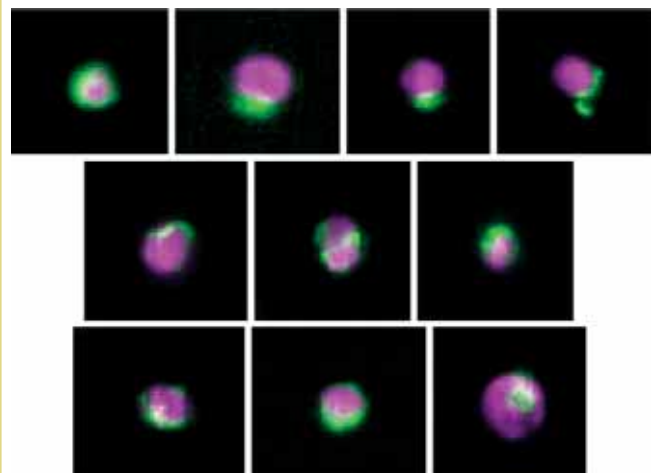


Рис. 3. Больная М., 63 лет; контрольная группа; диагноз: рак прямой кишки, аденокарцинома G2, T4N1M0, стадия III; исследование периферической крови выявило 10 ЦОК; опухолевые клетки имеют иммунофенотип CK45-CK8+CK18/19+

Выяснилось, что частота выявления ЦОК и их количество широко варьируют у больных с наличием/отсутствием поражения регионарных лимфатических узлов и отдаленных метастазов. Так, в контрольной группе с T1-4N0M0 опухолевые клетки выявлены в крови у 12 (66,7%) больных из 18. Количество ЦОК варьировало в пределах от 1 до 14, в среднем – $2,8 \pm 1,1$. При этом референсные показатели (3 ЦОК в 7,5 мл крови) были превышены только у 3 (25%) пациентов из 12. В основном при T1-4N0M0 единичные опухолевые клетки определялись у 7 (58,3%) из 12 больных. Доля больных с числом ЦОК от 1 до 3 составила 16,7% (2 из 12). При T14 (без регионарных и дистантных метастазов) опухолевые клетки в крови не выявлялись у 6 (33,3%) из 18 больных.

Из 12 человек контрольной группы с T1-4N1-2M0 опухолевые клетки определялись у 10 (83,3%) пациентов. Количество ЦОК находилось в пределах от 1 до 10 в 7,5 мл крови, в среднем – $3,2 \pm 0,9$. Единичные опухолевые клетки и >3 в кровяном русле детектировались при T1-4N1-2M0 у 4 (40%) из 10 больных. От 1 до 3 клеток выявлено у 2 (20%) больных из 10. У 2 (16,7%) из 12 пациентов с T1-4N1-2M0 ЦОК не обнаруживались.

В основной группе с T1-4N1-2M1 ЦОК выявлены у 14 (77,8%) из 18 больных; в целом обнаружено от 1 до 31 ЦОК, в среднем – $8,6 \pm 2,4$. Опухолевые клетки отсутствовали у 4 (22,2%) из 18 больных. Окончательный результат: в основной группе у пациентов с ЦОК они детектировались в количестве >3 и обнаружены у 9 (64,3%) из 14 больных. У 1 (7,1%) больного из 14 число ЦОК не превышало 1–3 клетки. Единичные опухолевые клетки в крови выявлены у 4 (28,6%) из 14 больных.

У 5 (75,0%) больных основной группы с T1N0M1 зарегистрировано от 1 до 3 опухолевых клеток, у 1 (20,0%) – >3 клеток; опухолевые клетки в периферической крови отсутствовали.

Сравнительный анализ среднего содержания ЦОК у больных обеих групп показал, что максимальные достоверно значимые различия количества ЦОК выявлялись у больных основной группы с поражением лимфатических узлов и наличием отдаленных метастазов. Их данные соответственно в 3,1 и 6,6 раза превосходили аналогичные показатели больных контрольной и основной групп без поражения лимфатических узлов – соответственно с T1-4N0M0 и T1-4N0M1 ($p \leq 0,05$). Выявлены и межгрупповые достоверно значимые различия среднего содержания ЦОК. Средний уровень ЦОК у больных основной группы с T1-4N1-2M1 в 2,7 раза был выше, чем в контрольной группе с T1-4N1-2M0 ($p \leq 0,05$).

Нами был также проведен сравнительный анализ числа больных контрольной и основной групп с наличием или отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы в зависимости от уровня ЦОК. Известно, что опухолевый процесс с наличием метастазов в лимфатические узлы и отдаленные органы существенно увеличивает возможность обнаружения опухолевых клеток в периферической крови [3]. У 7,5% больных контрольной группы с T1-4N0M0 без поражения регионарных лимфатических узлов число опухолевых клеток не превышало референсных значений (3 ЦОК в 7,5 мл крови). Сравнивая данный показатель с таковым в контрольной группе с T1-4N1-2M0 и основной с T1-4N1-2M1, мы обнаружили, что он соответственно в 1,3 и 2,1 раза превышал таковой в упомянутых группах. Доля больных с уровнем ЦОК ниже референсных показате-

телей основной группы без поражения регионарных лимфатических узлов с T1-4N0M0 также составила 75,0%, однако ввиду малого числа наблюдений рассуждать о внутри- и межгрупповой разнице показателя не представляется возможным. У больных основной группы с поражением лимфатических узлов и отдаленными метастазами T1-4N1-2M1 опухолевые клетки обнаружены в количестве >3 в 7,5 мл крови, что превышало аналогичный показатель у больных контрольной группы без поражения регионарных лимфатических узлов (T1-4N0M0) и с их поражением (T1-4N1-2M0) соответственно в 2,6 и 1,6 раза.

Таким образом, наше исследование выявило отсутствие ЦОК у больных основной группы в 21,7% против 26,7% случаев в контрольной группе. Вместе с тем усредненное число ЦОК, выявленных в основной группе, в 2,7 раза превышало таковое в контрольной группе ($p \leq 0,05$). Превышение референсных значений ЦОК (>3 клеток в 7,5 мм крови) наблюдалось в основной группе в 1,7 раза чаще, чем в контрольной.

Отмечалась тенденция к повышению возможности детекции ЦОК в периферической крови у больных мужского пола в обеих группах: у 61,1% больных основной группы и у 54,5% – контрольной. Отсутствие ЦОК наиболее часто регистрировалось у больных моложе 50 лет. В основном ЦОК выявлялись при онкологической патологии сигмовидной и прямой кишки: у 72,2% больных основной группы и у 77,3% – контрольной.

В основной группе при аденокарциноме G2 доля больных с уровнем ЦОК, превышающим референсные значения, в 1,8 раза превосходила таковую в контрольной группе, а доля больных с детектированными ЦОК при аденокарциноме G3 в основной и контрольной группах была практически одинаковой – соответственно 27,8 и 27,2%.

Изучив среднее содержание ЦОК у больных контрольной и основной групп с наличием или отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы, мы установили, что в основной группе (с поражением лимфатических узлов и наличием отдаленных метастазов) средние количества ЦОК превосходили таковые в контрольной и основной группах без поражения лимфатических узлов (T1-4N0M0 и T1-4N0M1) соответственно в 3,1 и 6,6 раза ($p \leq 0,05$). Вместе с тем при наличии метастазирования в лимфатические узлы средние уровни ЦОК в 2,7 раза были выше при наличии отдаленных метастазов у больных основной группы в сравнении с контрольной ($p \leq 0,05$).

В ходе исследования нами были выявлены межгрупповые различия числа больных с переменным уровнем ЦОК. Так, в основной группе у больных с поражением лимфатических узлов и отдаленными метастазами T1-4N1-2M1 в крови обнаруживалось >3 ЦОК чаще (в 64,3% случаев), чем в других группах с аналогичным количеством опухолевых клеток, тогда как у больных контрольной группы без пораженных регионарных лимфатических узлов (T1-4N0M0) в 75,0% случаев уровень ЦОК был ниже референсных значений.

Полученные нами данные доказывают возможность и целесообразность использования уровня ЦОК в качестве фактора прогноза клинического течения опухолевого процесса.

Литература

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году / М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015; 236 с.

2. Кит О.И., Новикова И.А., Бахтин А.В. и др. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // *Международн. журн. эксперим. образ.* – 2013; 11-2: 37–9.

3. Колесников В.Е., Кит О.И., Златник Е.Ю. и др. Анализ иммунного статуса больных колоректальным раком после различных вариантов оперативного вмешательства // *Совр. проблемы науки и образования.* – 2016; 6.

4. Ковалев А.А., Грудинская Т.В., Кузнецова Т.П. и др. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток // *Онкология.* – 2012; 14 (2): 126–8.

5. Осинский С.П., Глузман Д.Ф. Диссеминированные опухолевые клетки в крови и костном мозге (молекулярный прогноз в клинической онкологии) // *Онкология.* – 2006; 2: 102–8.

6. Кит О.И., Новикова И.А., Никипелова Е.А. и др. Циркулирующие опухолевые клетки как высокоспецифичный прогностический фактор. Обзор литературы // *Международн. журн. прикладных и фунд. исслед.* – 2014; 12-2: 252–7.

7. Cohen S., Punt C., Iannotti N. et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2008; 26 (19): 3213–21.

8. Katsuno H., Zacharakis E., Aziz O. et al. Does the Presence of Circulating Tumor Cells in the Venous Drainage of Curative Colorectal Cancer Resections Determine Prognosis? A Meta-Analysis // *Ann. Surg. Oncol.* – 2008; 15 (11): 3083–91.

9. Gupta G., Massague J. Cancer metastasis: building a framework // *Cell.* – 2006; 127 (4): 679–95.

10. Fidler I. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003; 3 (6): 453–8.

11. Pantel K., Alix-Panabieres C., Riethdorf S. Cancer micrometastases // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2009; 6 (6): 339–51.

12. Sleijfer S., Gratama J., Sieuwerts A. et al. Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? // *Eur. J. Cancer.* – 2007; 43 (18): 2645–50.

13. Clarke M., Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve // *Cell.* – 2006; 124 (6): 1111–5.

14. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000; 100 (1): 57–70.

15. Smerage J., Hayes D. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer // *Br. J. Cancer.* – 2006; 94 (1): 8–12.

16. Thiery J., Sleeman J. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006; 7: 131–42.

CIRCULATING TUMOR CELLS IN COLORECTAL CANCER

Professor O. Kit, MD, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences; P. Shulikov; I. Novikova, Candidate of Medical Sciences; A. Grankina; V. Kolesnikov, Candidate of Medical Sciences; Professor Yu. Gevorkyan, MD; Professor N. Soldatkina, MD
Rostov Research Oncology Institute

The paper presents the results of investigating the detection rate and number of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of patients with metastatic and non-metastatic colorectal cancer. The investigation revealed interesting differences between the groups. The findings prove the possibility and feasibility of using the level of CTCs as a predictor for the clinical course of a tumor process.

Key words: oncology, circulating tumor cells, metastatic colorectal cancer and non-metastatic colorectal cancer.