

УДК 616-006.6-018.1: 612.1-07

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЦОК ПРИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЙ

Кит О.И., Новикова И.А., Селютина О.Н., Дурицкий М.Н., Донцов В.А., Черникова Е.Н., Саманева Н.Ю., Нистратова О.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: rnioi@list.ru, novikovainna@yahoo.com

Одним из факторов, существенно влияющих на вероятность и частоту метастазирования, является уровень циркулирующих в крови опухолевых клеток. Показана различная частота выявления ЦОК при ранних стадиях рака и его генерализованных формах. Стадия опухолевого процесса с наличием метастазов в лимфатических узлах и отдаленных органах в несколько раз повышает вероятность выявления опухолевых клеток в крови. Отмечена тенденция к повышению частоты обнаружения ЦОК при низкодифференцированных опухолях. Показана перспективность использованием системы CellSearch для детекции ЦОК с иммунофенотипом CD45-/CK8/18+/CK19+ при эпителиальных опухолях различных локализаций. Определение в крови ЦОК может быть рекомендовано к использованию в качестве динамического онкомаркера как для прогноза течения заболевания, так и для мониторинга больных, получающих системное лечение и оценки его эффективности.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), рак молочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ)

STUDY OF CTC LEVEL IN EPITHELIAL TUMORS OF VARIOUS LOCALISATIONS

Kit O.I., Novikova I.A., Selyutina O.N., Duritskiy M.N., Dontsov V.A., Chernikova E.N., Samaneva N.Y., Nistratova O.V.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: rnioi@list.ru, novikovainna@yahoo.com

The level of circulating tumor cells in the blood is one of the factors that significantly affect probability and frequency of metastasis. Various rates of CTC detection at early stages of cancer and in its generalized forms were shown. Tumor stage with metastases to lymph nodes and distant organs several times increased probability of CTC detection in the blood. Tendency to increased CTC detection rate in poorly differentiated tumors was found. Prospects of CellSearch system use to detect CTCs with CD45-/CK8/18+/CK19+immunophenotype in epithelial tumors of various localizations were demonstrated. Detection of CTCs in the blood can be recommended as a dynamic tumor marker for both disease prognosis and monitoring of patients receiving systemic treatment, as well as for assessment of its effectiveness.

Keywords: circulating tumor cells (CTCs), breast cancer, colon cancer, prostate cancer, small-cell lung cancer (SCLC), non-small cell lung cancer (NSCLC)

Как известно, критическим моментом канцерогенеза является приобретение злокачественными клетками способности к инвазии и интравазации, выживание в кровотоке и колонизация микроциркуляторного русла отдаленных органов (этапы метастатического каскада). Однако, способностью метастазировать обладают не все клетки первичной опухоли, а только определенная ее часть (клон), приобретшая в результате накопления мутаций агрессивный фенотип и метастатический потенциал [8]. Одним из факторов, существенно влияющих на вероятность и частоту метастазирования, является уровень циркулирующих в крови опухолевых клеток. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) происходят из клонов первичной опухоли и представляют собой клетки эпителиального происхождения, которые определяются в периферической крови больных с различными формами солидного рака [6]. Циркулирующие клетки

не вступают в клеточный цикл (находятся в фазе покоя – G0), не пролиферируют и поэтому не подвергаются апоптозу и действию цитотоксических агентов. Они могут циркулировать в виде единичных клеток или объединяться в кровотоке в циркулирующие опухолевые микроэмболы (феномен «коллективной миграции»). Микроэмболы имеют высокий пролиферирующий потенциал, устойчивы к апоптозу и обладают свойствами агрессивного метастазирования. Опухолевые микроэмболы не могут покинуть просвет сосуда экстравазацией, но вызывают опухолевую эмболию, пермеацию в сосуде, разрыв стенки капилляра с последующей пролиферацией в просвете сосуда и интестии. Современные технологии позволяют определять и их фенотип, который, как показали исследования, может отличаться от фенотипа клеток первичной опухоли и который необходимо учитывать при планировании схемы и режима проти-

воопухоловой терапии [2]. Изучение ЦОК представляет собой вариант «жидкостной биопсии», позволяющей в ранние сроки предсказывать рецидив рака, прогнозировать течение болезни, осуществлять мониторинг эффективности терапии.

Идентификация циркулирующих опухолевых клеток начиналась с исследований у больных раком молочной и предстательной железы. К настоящему времени циркулирующие опухолевые клетки выявлены при большинстве локализаций злокачественных опухолей и даже введено понятие «высокодиссеминированной ангиогенной болезни». Число ЦОК используют как независимый высокоспецифичный прогностический фактор при раке молочной железы [3], простаты [5] и прямой кишки [4]. Обнаружение ЦОК в крови больных раком молочной железы, предстательной железы и толстой кишки может служить маркером распространенности опухолевого процесса и оценки эффективности проводимого лечения, а также индикатором активности опухолевого процесса и его стабилизации, даже при наличии дистантных метастазов [1].

Изучение циркулирующих опухолевых клеток может внести большой вклад в развитие фундаментальной онкологии и будет способствовать расширению познаний биологии опухолевого роста, которые, несомненно, изменяют стандарты диагностики и лечения злокачественных опухолей.

Цель исследования: провести количественную оценку и частоту выявления циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в крови больных раком предстательной железы, молочной железы, толстой кишки, легкого.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась периферическая кровь 203 больных, из них – 135 больных раком толстой кишки (42–82 года, средний возраст $63,7 \pm 1,9$ года), III–IV стадии; 38 больных раком молочной железы (31–76 лет, средний возраст $52,6 \pm 2,2$ года), II–III стадии; 20 больных раком легкого (50–61 год, средний возраст $52,3 \pm 4,8$ года), IV стадии; 10 больных раком предстательной железы, III–IV стадии (58–83 года, средний возраст $71,6 \pm 3,9$ года).

Кровь в объеме 8–10 мл забиралась в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт ЭДТА, а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Для отделения клеток крови и опухолевых от плазмы кровь смешивалась с рабочим буфером из набора реагентов CellSearch® CTC kit и центрифугировалась при ускорении 800g 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 анти-

телами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинам 8,18,19. Качество работы системы оценивали с использованием стандартного контроля CTC control kit. Материал сканировался в анализаторе CellTracks® Analyzer II®. С учетом морфологических характеристик и экспрессии маркеров регистрировались циркулирующие опухолевые клетки. Общее число выявленных опухолевых клеток являлось конечным результатом. Референсными значениями считалось менее 5-ти ЦОК в образце при раке груди, менее 3х при колоректальном раке и менее 5-ти при раке простаты.

Результаты исследования и их обсуждение

У больных раком молочной железы II–III стадии ЦОК выявлены в 52,6% случаев (у 20 из 38 больных), при этом единичные опухолевые клетки отмечены в 25% случаев (у 5 из 20 больных), от 2 до 5 ЦОК в 45% (у 9 из 20), от 5 до 10 ЦОК в 10% (у 2 из 20) и свыше 10 клеток выявлено у 4 больных, что составило 20% от всех выявленных случаев с ЦОК. Из 20 больных, в крови которых выявлены ЦОК, в 15% (3 больных) определялась IIa стадия заболевания, при этом количество ЦОК в двух случаях составило 1 клетку, в одном – 2 ЦОК. На III стадию заболевания приходилось 85% случаев с выявленными ЦОК (17 больных). Нами отмечено увеличение вероятности появления ЦОК в крови больных, при наличии метастазов в лимфатических узлах или других органах (в нашем случае, у больной выявлена генерализация процесса с метастазами в кости). Так, у 3 из 15 больных (20%) при отсутствии метастазов в лимфатических узлах или других органах и у 17 из 23 (74%) при наличии метастазов нами выявлены опухолевые клетки в крови.

У больных колоректальным раком III стадии проведенный анализ выявил в крови наличие клеток опухоли от 1 до 14 ЦОК в 45,5% случаев (у 20 из 44 больных), из которых только 25% случаев (5 из 20) превысили референсные значения в 3 клетки в 7,5мл крови. В IV стадии заболевания в 83,5% случаев обнаружены опухолевые клетки (у 76 из 91 больных), где от 1 до 3 ЦОК выявлено у 45 больных, что составило 59,2% от общего количества больных с выявленными ЦОК, и свыше 3 клеток – у 31 больных (40,8%). Среди больных, у которых количество клеток превысило порог позитивности, отмечено, что от 3 до 10 ЦОК выявлено у 19 больных (в 61,3%), свыше 10 – у 12 больных (38,7%). Максимальное количество клеток в нашем исследовании – 402 ЦОК выявлено в крови больной раком сигмовидной кишки 63 лет, г/а G3 аденокарцинома с метастазами в печень.

Из 96 больных колоректальным раком III-IV стадии, в крови которых выявлены ЦОК, у 36 выявлена G2 аденокарцинома (37,5%), у 60 больных – G3 аденокарцинома (62,5%). Т.е. значительно чаще ЦОК в крови выявлены при низкодифференцированных опухолях. Из 96 больных колоректальным раком III-IV стадии с выявленными в крови ЦОК, у 89 определялись метастазы в лимфатические узлы и печень (в 92,8% случаев), у 7 – метастазы только в лимфатические узлы (в 7,2% случаев).

У больных раком предстательной железы с диагностированными метастазами в кости и печень в 70% случаев были выявлены ЦОК в периферической крови (у 7 из 10 больных). Количество опухолевых клеток у исследуемых больных колебалось в пределах от 1 до 190 клеток в 7,5 мл образца крови. У 6 из 9 исследованных нами образцов крови больных IV стадии заболевания выявлены ЦОК (в 66,7%), у одного больного III стадии с генерализованным процессом нами также выявлены ЦОК. Из-за преобладания в нашем исследовании больных с IV стадией и небольшим количестве исследований высказаться о достоверных различиях в вероятности обнаружения ЦОК при различных стадиях опухолевого процесса не представляется возможным. От 1 до 3 ЦОК нами выявлено у 3 из 7 больных (в 42,9% случаев с обнаруженными ЦОК). От 3 до 10 ЦОК выявлено у 2 больных (в 28,6% случаев). Свыше 10 ЦОК также у 2 больных (в 28,6% случаев). У одного больного с диагностированными метастазами в кости мы обнаружили 37 опухолевых клеток, и у больного с метастазами в печень их количество в исследованном образце крови было максимальным и составило 190 CTCs. В нашем исследовании ЦОК были выявлены у 3 из 5 больных с G2 аденокарциномой (в 60%), и у 4 из 5 больных с G3 аденокарциномой (в 80%).

У всех больных с метастазами в печень и больных с метастазами в печень и кости (в нашем исследовании 2 и 1, соответственно) обнаружены циркулирующие опухолевые клетки. Стоит отметить, что максимальное количество клеток среди наших больных было выявлено у больного с диагностированными метастазами в печень. У 4 из 7 больных с метастазами в кости нами выявлены ЦОК (в 57,1% случаев). У всех больных исследование крови было проведено после или на фоне лучевого или гормонального лечения.

Наибольший интерес для нас, связанный с наличием на ЦОК маркеров ЕрСАМ, цитокератинов 8, 18 и 19, характерных также и для железистого эпителия пищевари-

тельного, респираторного, урогенитального тракта; эндокринных и экзокринных клеток, представляло исследование количества их при опухолях других локализаций. Так, ЦОК были выявлены у 16 из 20 больных раком легкого (80%) в количестве от 1 до 980 клеток в 7,5 мл крови, при НМРЛ у 10 из 11 (в 91%), при МРЛ у 6 из 9 человек (в 66,7%). При МРЛ количество ЦОК находилось в пределах от 1 до 980, тогда как при НМРЛ от 1 до 13 клеток. Доля больных с количеством ЦОК от 1 до 10 клеток составила 50% (8 из 16 больных), тогда как с уровнем ЦОК от 11 до 100 и свыше 100 клеток, по 25% (4 из 16 больных). Среди больных МРЛ с выявленными ЦОК преобладали те, у кого количество превышало 100 клеток (в 66,6% случаев, у 4 из 6 больных), тогда как с наименьшим и средним количеством ЦОК их отмечалось по 16,7% (по 1 из 6 больных для каждой группы). У больных НМРЛ нами выявлена обратная закономерность. В этой группе у 80% больных (у 8 из 10) уровень ЦОК соответствовал низким и у 20% (у 2 из 10) средним значениям. Больные с высокими значениями ЦОК среди НМРЛ отсутствовали. Полученные нами результаты по исследованию количества ЦОК при МРЛ и НМРЛ не противоречат литературным данным, свидетельствующим о снижении частоты обнаружения ЦОК при НМРЛ, чем при МРЛ [7]. Вероятнее всего, последнее связано со снижением плотности молекул адгезии ЕрСАМ на клетках НМРЛ, и как следствие, снижением частоты детекции.

Выводы

Проведенное нами исследование демонстрирует, что частота выявления и количество ЦОК при опухолях различных локализаций широко варьирует.

Полученные нам данные позволили прийти к выводу о различной частоте выявления их при ранних стадиях рака и его генерализованных формах. Так, у больных РМЖ с выявленными ЦОК, вероятность их обнаружения увеличивалась в 5,7 раза при III стадии заболевания, в сравнении с больными IА стадией; при раке толстой кишки IV стадии частота обнаружения ЦОК в 1,4 раза превосходила данный показатель больных III стадии. Стадия опухолевого процесса с наличием метастазов в лимфатические узлы и отдаленные органы в несколько раз повышает вероятность выявления опухолевых клеток в крови. Так, у больных РМЖ в 3,7 раза чаще выявлялись ЦОК в крови при наличии метастазов в лимфатических узлах или других органах; при раке толстой кишки в 12,9 раза возрастала вероятность

обнаружения ЦОК у больных с метастазами в лимфатические узлы и печень, в сравнении с больными, у которых отмечено поражение только лимфатических узлов. В 70% случаев рака предстательной железы с метастазами в кости и печень выявлены ЦОК в периферической крови.

Отмечена тенденция к повышению частоты обнаружения ЦОК при низкодифференцированных опухолях, где в 1,7 раза чаще ЦОК выявлены при низкодифференцированных опухолях толстой кишки и в 80% случаев G3 аденокарциномы и в 60% случаев G2 аденокарциномы предстательной железы.

Проведенное исследование также показало перспективность использованием системы CellSearch для детекции ЦОК с иммунофенотипом CD45-/CK8/18+/CK19+ при эпителиальных опухолях различных локализаций, в частности у больных МР и НМРЛ, демонстрирующее высокую частоту выявления опухолевых клеток у больных генерализованными формами рака легкого. У больных НМРЛ в 1,4 раза чаще выявлялись опухолевые клетки в крови, в сравнении с МРЛ, однако, при НМРЛ преобладающим являлся низкий уровень ЦОК, тогда как при МРЛ – высокий.

Таким образом, определение в крови циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови может быть рекомендовано к использованию в качестве динамического онкомаркера как для прогноза течения заболевания и тем самым определять «интенсивность» адьювантной терапии, так и для мониторинга больных, получающих системное лечение и оценки его эффективности.

Исследование циркулирующих опухолевых клеток может играть значимую клиническую роль в качестве прогностического онкомаркера нового поколения, влияющего на выбор и контролирующего эффективность противоопухолевого лечения. Возможно, ценность научного и клинического значения циркулирующих опухолевых клеток еще более повысится при изучении их в совокупности с другими прогностическими факторами.

Список литературы

1. 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.
2. Alix-Panabieres C., Pantel K. Detection and characterization of disseminating cancer cells in patients with solid epithelial malignancies // Haematopoiesis Immunology. – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 79–93.
3. Christophanilly M., Budd G.T., Ellis M.J. Circulating Tumor Cells. Disease Progression and Survival in Metastatic Breast Cancer // N. Engl. J. Med. – 2004. – P. 781–791.
4. Cohen S.J., Punt C.J., 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. – Vol.26, № 19. – P. 3213–21.
5. De Bono J.S., Scher H.I., Montgomery R.B. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer // Clin. Cancer Research. – 2008. – Vol. 14. – P. 6302–6309.
6. Fehm et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant // Clin. Cancer Res. – 2002. – № 8. – P. 2073–84.
7. G. Krebs, L. Priest, L. Lancashire et al. Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer // J Clin Oncol. – Apr 20, 2011. – Vol. 29, № 12. – P. 1556–63.
8. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell. – 2000. – Vol. 100, № 1. – P. 57–70.