

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.34/.35-006.6-085.273:577.2.088

*М.В. Антонов¹, А.Х. Сабиров², Т.М. Сабиров², К.В. Уткин², В.В. Решетникова³, А.Ю. Барышников³, О.Д. Мустаев⁴***ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ТАРГЕТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**¹Салехардская окружная клиническая больница, Салехард²ГОУ ВПО ТюмГМА Минздравсоцразвития России, Тюмень³РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург**Контактная информация***Антонов Максим Владимирович, врач-онколог отделения онкологии***Адрес:** 629001, Салехард, ул. Мира, 39; **тел.:** +7(3492)24-43-66**e-mail:** amv77@inbox.ru

Статья поступила 06.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В исследовании показано прогностическое значение таргетных препаратов в лечении больных КРР. Проведена оценка молекулярно-биологических маркеров и их значимость в оптимизации проводимой терапии.

Ключевые слова: колоректальный рак, цетуксимаб, бевацизумаб, FOLFIRI.*M.A. Antonov¹, A.Kh. Sabirov², T.M. Sabirov², K.V. Utkin², V.V. Reshetnikova³, A.Yu. Barishnikov³***THE SIGNIFICANCE OF BIOMARKERS IDENTIFICATIONS
FOR TREATMENT OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER**¹Clinical Hospital, Salekhard²State Medical Academy, Tumen³N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow⁴S.M. Kirov medical corps academy, Sankt-Peterburg**Abstract**

The study shows the prognostic significance of targeted therapies in the treatment of patients with colo-rectal cancer. The estimation of molecular biological markers and their significance in the optimization of therapy.

Key words: colorectal cancer, biomarkers.**Введение**

В России ежегодно регистрируется 40 000 случаев рака толстой кишки. Умирает 31 000 больных. Средний показатель заболеваемости КЛРМ составляет примерно 13,1 на 100 тысяч населения. Прослеживается стойкая тенденция к росту частоты развития опухолей этой локализации во всех развитых странах, в том числе и России. При этом отмечается значительное число случаев с поздней стадией заболевания, когда существенно затрудняется возможность выполнения радикального хирургического вмешательства и оказания полноценной медицинской помощи. Ведущей причиной поздней диагностики новообразований кишечника является разнообразие клинических форм заболевания и скудность их появлений на ранних стадиях, а как следствие, несвоевременное обращение больных за медицинской помощью [1]. Таким образом, неуклонный рост заболеваемости и чрезвычайно низкая выявляемость ранних форм КРР, а также малоутешительные результаты хирургического вмешательства заставляют искать новые и совершенствовать традиционные методы комбинированного и комплексного лечения с включением в лечебный план ЛТ и ХТ. В столь сложной ситуации только успехи лекарственного лечения могут существенным образом улучшить отдаленные результаты и увеличить продолжительность жизни этой категории пациентов [2].

Задачи исследования

Изучение экспрессии молекулярно-биологических маркеров в опухолях и сыворотке крови больных КРР иммуногистохимическими, молекулярно-генетическими и биохимическими методами с учетом основных клинико-морфологических характеристик опухоли и возможности использования этих показателей для оценки клинического течения болезни и прогноза развития факторов риска КРР с использованием таргетной терапии препаратами бевацизумаб и цетуксимаб.

Материалы и методы

Работа основана на анализе клинических данных и результатов лабораторных методов диагностики 150 больных КРР, подвергшихся хирургическому лечению и получавших специальное противоопухолевое лечение в Салехардской окружной клинической больнице (главный врач Коган М.И.). Данные пациенты были разделены на 3 равные группы, каждая по 50 человек. Предварительно на этапе лечения колоректального рака у всех больных проведен анализ статуса гена *K-Ras* в образцах опухоли. Также проведено молекулярно-генетическое исследование плазмы крови, в результате которого у наблюдаемых больных определена гиперэкспрессия *EGFR* и *VGFR*.

С целью выявления возможной закономерности между агрессивностью течения заболевания и топографическими характеристиками онкологического процесса, в когорте исследуемых отдельно рассматривались пациенты с поражением ободочной кишки – 70% (105 из 150 человек) и больные с раком прямой кишки – 30% (45 из 100 человек). Кроме этого, анализировались симптомы болезни и наличие опухолевых осложнений (перфорация стенки органа, кишечная непроходимость).

Из общего числа рассматриваемых пациентов с КРР у 44% стадия заболевания согласно классификации Dukes соответствовала категории Dukes'C, а у 56% – Dukes'D. У большинства больных – 93,3% (140 из 150) при морфологическом исследовании операционного материала была обнаружена АТК. Минимальное число больных – 6,7% (10 из 150) имело неоплазии кишечника со слизееобразованием. Опухоли по степени дифференцировки распределялись следующим образом: 15,3% (23 из 150) – низко, 76,7% (115 из 150) – умеренно и 8% (12 из 150) – высокодифференцированных новообразований.

Ни одному из больных, включенных в исследование, не проводилось специфическое лечение до операции. В послеоперационном периоде: 50 из 150 пациентов получали адъювантную химиотерапию, 50 пациентов получали адъювантную химиотерапию с таргетным препаратом по схеме – FOLFIRI + цетуксимаб и 50 пациентов – FOLFIRI + бевацизумаб.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 7.0 for Windows и Microsoft® Office Excel 2003. Рассчитывали среднее значение показателей, стандартную ошибку среднего, а также их медианы. Определение достоверности различий частот признаков в изучаемых группах проводили с использованием критерия χ^2 и непараметрического точного критерия Фишера для малых выборок. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Иммуногистохимическое определение EGFR и VEGFR

Иммуногистохимическое исследование выполнено на парафиновых срезах опухолей с помощью биотинстрептавидинового иммунопероксидазного метода с моно- и поликлональными антителами. Для каждого антигена оценивали тип специфического окрашивания, который зависел от локализации продукта реакции в клетке (цитоплазматический, мембранный, ядерный, смешанный).

У всех больных КРР, независимо от степени дифференцировки опухоли, наблюдаются повышенные значения EGFR и VEGFR. При этом, чем выше степень злокачественности, тем больше увеличены показатели факторов роста.

ИГХ определение экспрессии антигена KI-67 в опухолевых клетках

Уровень пролиферативной активности раковых клеток является ключевым фактором, определяющим потенциал злокачественности опухоли и агрессивность течения заболевания. В данном исследовании проведен анализ пролиферативной активности первичных АТК с помощью оценки индексов пролиферации KI-67 и сопоставления полученных данных с клинико-морфологическими факторами прогноза и показателями выживаемости

больных КРР. У большинства больных КРР выявлен высокий уровень пролиферативной активности KI-67, при этом большой процент KI-67⁺ клеток (>50%) отмечен в 33 случаях, умеренные индексы пролиферации (21–50%) – в 105 случаях и низкий уровень пролиферации (< 20%) – в 12 случаях.

Экспрессия маркера наблюдалась в опухолях с различной степенью гистологической дифференцировки и, как правило, в меньшей степени была выражена в участках с секреторной активностью (слизееобразованием). Средний уровень экспрессии антигена KI-67 прямо пропорционально коррелировал со степенью злокачественности КРР. В опухолях с более высоким уровнем злокачественности индекс KI-67 был выше, чем в опухолях с более низким уровнем злокачественности (табл. 3). При изучении связи экспрессии маркеров с показателями выживаемости больных КРР высокая пролиферативная активность клеток КРР, исследованная с помощью индексов KI-67, являлась одним из факторов неблагоприятного прогноза течения заболевания.

Изучение мутационного статуса больных с КРР

Следующим этапом исследования стало изучение молекулярно-генетических изменений в зависимости от гистологического варианта опухоли и пролиферативной активности (табл. 4). Из таблиц 4–7 видно, что на фоне ПХТ происходят изменения молекулярно-генетического статуса больных КРР, а именно: уменьшается количество мутаций и снижается уровень EGFR и VEGFR. Наиболее выраженные изменения происходят у больных КРР с высокодифференцированной АТК (более благоприятный фенотип). При анализе изменений, произошедших после проведения 6 курсов ПХТ, наблюдается уменьшение количества мутаций в генах, а также снижение уровня EGFR, VEGFR у всех больных.

При анализе молекулярно-генетического статуса больных КРР, которые получали лечение по схеме FOLFIRI + цетуксимаб и FOLFIRI + бевацизумаб, видно, что выраженность его изменений (нарушений) меньше, чем у больных, получавших просто ПХТ по схеме FOLFIRI. При этом наблюдается не только качественно-количественное улучшение молекулярно-генетического статуса больных КРР (в виде уменьшения количества мутаций), но и снижение уровня экспрессии ростовых факторов, что также является признаком улучшения состояния клеток.

Установлено, что на фоне специального лечения количество мутаций уменьшается. В группе пациентов, получавших ХТ по схеме FOLFIRI, частота объективных ответов составила 54%, время до прогрессирования – 10,9 мес. и продолжительность жизни – 20,6 мес.

В группе пациентов, получавших ХТ по схеме FOLFIRI + цетуксимаб, частота объективных ответов составила 57%, время до прогрессирования – 11,4 месяцев и продолжительность жизни – 26,1 месяцев.

В группе пациентов, получавших ХТ по схеме FOLFIRI + бевацизумаб, частота объективных ответов – 57,9%, время до прогрессирования – 13,5 месяцев и продолжительность жизни – 27,7 мес.

При анализе данных по общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования выявлено, что схемы лечения больных КРР FOLFIRI + цетуксимаб и FOLFIRI + бевацизумаб увеличивают медиану времени до прогрессирования с 10,9 до 11,4 мес. и с 10,9 до 13,5 мес., медиану общей выживаемости с 20,6 до 26,1 мес. и с 20,6 до 27,7 мес. по сравнению со схемой FOLFIRI без добавления таргетных препаратов.

Таблица 1

Распределение больных KPP в зависимости от степени дифференцировки опухоли и значения индекса EGFR

Степень дифференцировки опухоли (n пациентов)	Уровень экспрессии антигена EGFR			
	0	1+	2+	3+
Низкая (n=23)	–	–	4	19
Умеренная (n=115)	–	29	68	18
Высокая (n=12)	4	8	–	–

Таблица 2

Распределение больных KPP в зависимости от степени дифференцировки опухоли и значения индекса VEGFR

Степень дифференцировки опухоли (n – кол-во пациентов)	Уровень экспрессии антигена VEGFR			
	0	1+	2+	3+
Низкая (n=23)	–	1	3	19
Умеренная (n=115)	2	25	64	24
Высокая (n=12)	2	9	1	–

Таблица 3

Распределение больных KPP в зависимости от степени дифференцировки опухоли и значения индекса KI-67

Степень дифференцировки опухоли (n – кол-во пациентов)	Уровень экспрессии антигена KI-67		
	низкая пролиферативная активность < 20% (n=12)	умеренная пролиферативная активность 21–50% (n=105)	высокая пролиферативная активность > 50% (n=33)
Высокая (n=12)	12 (100%)	–	–
Умеренная (n=115)	–	105 (91,3%)	10 (8,7%)
Низкая (n=23)	–	–	23 (100%)

Добавление бевацизумаба, цетуксимаба к химиотерапии достоверно улучшает время до прогрессирования, и увеличивает продолжительность жизни больных. Терапия моноклональными антителами должна проводиться максимально долго, до прогрессирования. Не определены клинические и молекулярные факторы, позволяющие прогнозировать успех терапии бевацизумабом. В то же время, эффективность антиEGFR антител реализуется только у пациентов без мутации гена K-ras.

При изучении результатов мы выявили, что наибольшее количество мутаций наблюдается у больных KPP с умеренно-дифференцированными, активно пролиферирующими (KI-67 > 50 %) опухолями.

При этом преобладают мутации p53 в 7 экзоне. Существенной зависимости от гистологической формы опухоли и возраста больных выявлено не было.

Как маркер клеточной пролиферации антиген KI-67 является важным критерием прогноза клинического течения KPP. Уровень клеточной пролиферации (индекс KI-67) коррелирует с ответом опухоли на предоперационную химиотерапию и исход KPP, доказано, что уровень экспрессии антигена KI-67 значительно снижается с возрастом пациентов[3].

Результаты исследования позволяют предположить, что, несмотря на то, что апоптоз и клеточная пролиферация являются взаимосвязанными процессами, оказывающими сильное влияние на биологическое поведение опухолей, при оценке риска метастазирования KPP экспрессия этих факторов должна учитываться в комплексе с маркерами, более тесно связанными с инвазивным потенциалом раковых клеток.

Вместе с тем, полученные в исследовании результаты подтверждают, что важными факторами прогноза течения KPP являются следующие биологические параметры пролиферации и апоптоза: индекс пролиферации KI-67, ядерная аккумуляция

p53 и соотношение уровней экспрессии p53/EGFR и VEGFR в опухоли.

Таким образом, при однофакторном анализе показано, что содержание большинства изученных белков в опухолях обладает определенной прогностической ценностью. При многофакторном анализе комплексного содержания белков с учетом клинико-морфологических признаков были определены наиболее значимые независимые показатели.

Следует отметить, что такие морфологические характеристики, как низкая степень гистологической дифференцировки и наличие инвазии опухоли сосудов снижали прогностическую значимость большинства маркеров.

Подводя итог проведенного исследования можно заключить, что изучение особенностей экспрессии молекулярных маркеров при KPP, а также сопоставление собственных результатов и литературных данных показало, что процессы инвазии и метастазирования сопровождаются значительными изменениями иммунофенотипа клеток первичных опухолей и затрагивают многие биохимические процессы. Прекращение экспрессии одних и гиперэкспрессия других факторов влияет на целый ряд клеточных характеристик и приводит к возникновению злокачественного фенотипа, что в последствии способствует прогрессии опухолей, развитию отдаленных метастазов и снижению выживаемости больных KPP.

Клинико-морфологические, иммуногистохимические, биохимические сопоставления могут способствовать определению более точных критериев для совершенствования методов диагностики и определения показаний к дополнительным методам терапии.

Дальнейшее изучение и проверка выявленных закономерностей в клинике будут полезны для прогнозирования и улучшения результатов лечения опухолей данной локализации.

Таблица 4

Молекулярно-генетический статус больных КРР в зависимости от экспрессии ростовых факторов *EGFR*, *hVEGFR-165* до лечения (n=150)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (п пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген										Кол-во мутаций
			p53, экзон			C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras; кодоны	E-cadherin	p16		
			5	6	7							8	
Высокая (n-12)	10,8	130,0	4	4	9	8	2	–	3	–	4	1	35
Умеренная (n-115)	36,7	168,0	27	54	79	42	12	–	18	–	32	26	290
Низкая (n-23)	15,4	174,7	11	10	21	9	7	1	14	–	11	8	92

Таблица 5

Молекулярно-генетический статус больных КРР после 6 курсов FOLFIRI (n=50)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (n пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген										E-cadherin	p16
			Исследуемый ген											
			p53, экзон			C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras; кодоны					
			5	6	7	8	12	15	—	12; 13				
Высокая (n=4)	9,8	128,0	1	1	3	2	—	—	1	—	—	2	—	
Умеренная (n=38)	34,9	165,0	9	21	32	15	4	—	8	—	—	12	10	
Низкая (n=8)	13,8	143,9	5	4	8	4	3	1	4	4	—	4	4	

Таблица 6

Молекулярно-генетический статус больных КРР после 6 курсов FOLFIRI + цетуксимаб (n=50)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (n пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген										E-cadherin	p16
			p53, экзон						C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras, кодоны		
			5	6	7	8	9	10						
Высокая (n=4)	9,8	128,0	1	–	3	2	–	–	1	–	–	–	–	
Умеренная (n=39)	34,9	165,0	7	16	16	12	3	–	3	–	–	8	7	
Низкая (n=7)	13,8	143,9	3	3	5	3	3	–	4	–	–	3	2	

Таблица 7

Молекулярно-генетический статус больных КРР после 6 курсов FOLFIRI + бевацизумаб (n=50)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (п пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген										E-cadherin	p16
			p53, экзон			C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras кодоны					
			5	6	7					8				
Высокая (n=4)	9,3	125,9	—	—	3	2	—	—	—	—	1	—		
Умеренная (n=38)	34,3	161,3	5	10	13	9	2	—	3	—	6	4		
Низкая (n=8)	13,3	139,2	2	2	5	2	1	—	3	—	2	1		

Выводы

Многофакторный анализ прогностической значимости комплекса клинико-морфологических признаков с учетом экспрессии молекулярно-биологических маркеров позволил выявить тесную связь между EGFR и VEGFR и молекулярно-генетическим статусом больных КРР.

На основании полученных результатов установлено, что изменения их экспрессии рассматривается как общий независимый фактор прогноза безрецидивной выживаемости больных КРР.

Молекулярно-генетическое исследование выявило выраженные изменения: в большинстве наблюдений встречаются мутации генов *p53* в 6; 7 экзонах, *APC*, *C-kit*, *E-cadherin*.

Полученные результаты позволяют рассматривать иммуногистохимический анализ EGFR и VEGFR в опухоли как метод прогнозирования развития отдаленных метастазов у больных КРР после операции. У всех больных выявлено превышение нормальных значений EGFR и VEGFRs.

Литература

1. Базин И.С., Гарин А.М., Жарков С.А., Нариманов М.Н. Рак толстой кишки состояние проблемы. // Российский медицинский журнал. 2003, Т. 11. С. 674-79
2. Имянитов Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. // Практ. онкол. — 2005. — Т. 6, N2. С. 65-70.
3. Oesterreich S., Deng W., Jiang S., Cui X., Inanova M., Schiff R., Kaiyan K., Kang K., Hadsell D.L., Behrens J. & Lee A.V. Estrogenmediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. // Cancer Res. 63. P. 5203-8.

Высокая пролиферативная активность клеток АТК, исследованная с помощью индекса KI-67, является достоверным фактором неблагоприятного прогноза общей выживаемости, но не связана с БРВ больных РТК. На фоне проводимого комплексного лечения в группах больных наблюдалась положительная динамика изменения молекулярно-генетического статуса: уменьшилось число мутаций у больных с заранее благоприятным фенотипом. Уровень EGFR и VEGFRs на фоне применения схем FOLFIRI + бевацизумаб и FOLFIRI + цетуксимаб достоверно снижался по сравнению с FOLFIRI без добавления таргетных препаратов.

У больных, проходивших лечение по схеме FOLFIRI + бевацизумаб и FOLFIRI + цетуксимаб наблюдается значительное улучшение молекулярно-генетического статуса (число мутаций сократилось) по сравнению с группой FOLFIRI без добавления таргетных препаратов. У групп больных проходивших лечение с добавлением таргетных препаратов наблюдалось увеличение показателей общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

