

## Циркулирующие опухолевые клетки и их связь с клиничко-морфологическими характеристиками колоректального рака

*Олег Иванович Кит, Владимир Евгеньевич Колесников, Роман Евгеньевич Толмах, Инна Арнольдовна Новикова, Оксана Геннадьевна Шульгина, Екатерина Фёдоровна Комарова\*, Александра Александровна Демидова*  
*Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону, Россия*

### Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-005

**Цель.** Исследовать зависимость количества циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови у больных колоректальным раком от клиничко-морфологических характеристик основного заболевания.

**Методы.** В исследование был включён 91 пациент с верифицированным метастатическим колоректальным раком Т3–4N1–2M1. Средний возраст больных составлял 61,5±1,7 года. Пациенты были разделены на основную группу (лапароскопическое хирургическое лечение, n=44) и контрольную (хирургическое вмешательство открытым доступом, n=47). Число циркулирующих опухолевых клеток определяли в системе CellSearch™ в периферической крови, взятой до оперативного вмешательства. Изучение ассоциации признаков по методу построения таблиц сопряжённости заключалось в расчёте коэффициента взаимной сопряжённости Пирсона  $\chi^2$  с поправкой Мантеля–Хэнзеля на правдоподобие (непараметрическая поправка), оценке статистической значимости сопряжённости и анализе тесноты ассоциации по коэффициенту взаимной сопряжённости А. Чупрова.

**Результаты.** Нами обнаружена сопряжённость числа циркулирующих опухолевых клеток с клиничко-морфологическими параметрами больных колоректальным раком. Выявлена взаимосвязь потенциальных факторов риска и повышения в периферической крови количества циркулирующих опухолевых клеток для всех больных колоректальным раком, независимо от способа хирургического вмешательства. Показано, что наиболее выраженная ассоциация числа циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови до операции у больных с метастатическим колоректальным раком по коэффициенту взаимной сопряжённости (K) сложилась с наличием отдалённых метастазов (статус M1b; K=0,63, p=0,0001) и стадией T4 (K=0,56, p=0,0009).

**Вывод.** Полученные результаты подчёркивают важную предикторную значимость уровня циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови для оценки потенциала прогрессирования колоректального рака.

**Ключевые слова:** циркулирующие опухолевые клетки, колоректальный рак, регионарные и отдалённые метастазы, степень дифференцировки.

### Circulating tumor cells and their relationship with clinical and morphological characteristics of colorectal cancer

*O.I. Kit, V.E. Kolesnikov, R.E. Tolmakh, I.A. Novikova, O.G. Shul'gina, E.F. Komarova, A.A. Demidova*  
*Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia*

**Aim.** To investigate the dependence of the number of circulating tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients on the clinical and morphological characteristics of underlying disease.

**Methods.** 91 patients with verified metastatic colorectal cancer T3–4N1–2M1 were included in the study. The average age of the patients was 61.5±1.7 years. The patients were divided into the study group (laparoscopic surgical treatment, n=44) and control group (open surgical intervention, n=47). The number of circulating tumor cells was determined in CellSearch™ system in the peripheral blood drawn before the intervention. The study of the association of attributes by constructing contingency tables consisted in calculating Pearson's contingency coefficient  $\chi^2$  with Mantel–Haenszel correction for likelihood (nonparametric correction), estimating statistical significance of contingency and analyzing the tightness of the association by A. Chuprov's mutual contingency coefficient.

**Results.** We found contingency of the number of circulating tumor cells with clinical and morphological parameters of patients with colorectal cancer. The relationship between potential risk factors and increase of the number of circulating tumor cells in the peripheral blood was observed in all colorectal cancer patients, regardless of the surgical intervention method. The most pronounced association of the number of circulating tumor cells in the peripheral blood of metastatic colorectal cancer patients before surgery according to the mutual contingency coefficient (K) was shown to be with present distant metastases (status M1b; K=0.63, p=0.0001) and stage T4 (K=0.56, p=0.0009).

**Conclusion.** The obtained results emphasize the important predictive significance of the circulating tumor cells level in peripheral blood for assessment of the potential for colorectal cancer progression.

**Keywords:** circulating tumor cells, colorectal cancer, regional and distant metastases, degree of differentiation.

Несмотря на длительную историю изучения и совершенствования методологических подходов [1], вопрос об участии циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в прогрессировании злокачественного процесса остаётся актуальным до настоящего времени.

В исследованиях показана связь числа ЦОК с метастатическим потенциалом при колоректальном раке. Так, S.J. Cohen и соавт. [2] при проспективном исследовании 430 больных метастатическим раком толстой кишки до лечения, после 1-го, 2-го и 3-го курсов химиотерапии установили порог позитивности в три ЦОК (метод CellSearch™).

По данным исследования О.И. Кита и соавт. [3], была выявлена связь повышенного уровня ЦОК и раннего метастазирования (в первые 18–24 мес) при колоректальном раке. Также была показана прямая связь уровня ЦОК с поражением лимфатических узлов и стадией заболевания при колоректальном раке, при этом частота обнаружения ЦОК была выше в группе больных с наличием лимфогенных метастазов (50,0 против 21,0%) [4]. При содержании ЦОК более пяти в 7,5 мл крови и наличии мутации гена KRAS, определяющего лимфогенное метастазирование злокачественных опухолей толстой кишки [5, 6], метастазирование при раке толстой кишки отмечено в 100% случаев [7].

В связи с вышесказанным целью было исследовать зависимость числа ЦОК в периферической крови у больных колоректальным раком от клинико-морфологических характеристик основного заболевания.

В исследование был включён 91 пациент с верифицированным метастатическим колоректальным раком T3–4N1–2M1. Среди больных были 50 (54,9%) женщин и 41 (45,1%) мужчина. Средний возраст составлял  $61,5 \pm 1,7$  года. Опухоль локализовалась в прямой кишке у 45,1% больных, в сигмовидной кишке — у 22,9%, в правой половине ободочной кишки — у 17,7% пациентов, в левой половине ободочной кишки — у 9,7%, в поперечной ободочной кишке — у 4,6% больных.

Пациенты были распределены по группам в зависимости от вида хирургического вмешательства. Основную группу составили больные, которым проводили лапароскопическое хирургическое лечение ( $n=44$ ), контрольную группу — больные, которым

было проведено хирургическое вмешательство открытым доступом ( $n=47$ ).

Исследования выполняли в соответствии с этическими стандартами комитета, входящего в состав учреждения.

Анализ образцов периферической крови больного на наличие ЦОК осуществляли на системе CellSearch™ с использованием набора реагентов CELLSEARCH® CTC Kit. Число выявленных ЦОК было конечным результатом. Периферическую кровь в объёме 8–10 мл забирали у больного до оперативного вмешательства.

Изучение ассоциации признаков по методу построения таблиц сопряжённости заключалось в расчёте коэффициента взаимной сопряжённости Пирсона  $\chi^2$  с поправкой Мантеля–Хэнзеля на правдоподобие (непараметрическая поправка), оценке статистической значимости сопряжённости и анализе тесноты ассоциации по коэффициенту взаимной сопряжённости А. Чупрова.

Полученные результаты показали, что анализ исходной взаимосвязи потенциальных факторов риска и повышения в периферической крови количества ЦОК информативен для всех больных. Однако на начальном этапе исследования мы проанализировали сопряжение между различными факторами и метастатическим потенциалом отдельно в основной и контрольной группах.

При изучении ассоциации количества ЦОК и степени дифференцировки опухолевых клеток при колоректальном раке было выявлено, что при низкой дифференцировке клеток опухоли число ЦОК в периферической крови исходно было выше. Достоверное сопряжение между степенью дифференцировки опухолевых клеток и количеством ЦОК сложилось в общем по группе, а также в контрольной группе (табл. 1, 2). Выраженное сопряжение между низкой дифференцировкой клеток опухоли и числом ЦОК в периферической крови стало продолжением этой закономерности.

У больных колоректальным раком было установлено достоверное сопряжение между размером опухоли и числом ЦОК в периферической крови до операции в основной ( $p=0,02$ ) и контрольной ( $p=0,03$ ) группах, в общем по группе ( $p=0,0009$ ) (табл. 3, 4). Со стадией T4 клетки приобретали более высокую подвижность и в большем объёме мигрировали в периферический кровоток.

**Таблица 1.** Сопряжённость степени дифференцировки опухоли и числа циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в основной и контрольной группах (абс.)

Степень дифференцировки	Основная группа			Контрольная группа		
	Число ЦОК в крови			Число ЦОК в крови		
	0	1–3	>3	0	1–3	>3
G2	1	1	1	2	1	1
G3	0	6	5	0	5	6
Итого	2	7	6	2	6	7
p ( $\chi^2$ )	p=0,52 ( $\chi^2=1,3$ )			p=0,04 ( $\chi^2=6,4$ )		
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,28			0,55		

**Таблица 2.** Сопряжённость степени дифференцировки опухоли и числа циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в общей группе (абс.)

Степень дифференцировки	Число ЦОК в периферической крови			Всего
	0	1–3	>3	
G2	3	2	2	7
G3	1	11	11	23
Итого	4	13	13	30
p ( $\chi^2$ )	p=0,03 ( $\chi^2=6,89$ )			
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,43			

**Таблица 3.** Сопряжённость между размером опухоли и числом циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в основной и контрольной группах (абс.)

Размер опухоли	Основная группа			Контрольная группа		
	Число ЦОК в крови			Число ЦОК в крови		
	0	1–3	>3	0	1–3	>3
T3	2	6	1	1	4	0
T4	0	1	5	1	2	7
Итого	2	7	6	2	6	7
p ( $\chi^2$ )	p=0,02 ( $\chi^2=7,96$ )			p=0,03 ( $\chi^2=6,75$ )		
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,59			0,56		

**Таблица 4.** Сопряжённость между размером опухоли и числом циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в общей группе (абс.)

Размер опухоли	Число ЦОК в периферической крови			Всего
	0	1–3	>3	
T3	3	10	1	14
T4	1	3	12	16
Итого	4	13	13	30
p ( $\chi^2$ )	p=0,0009 ( $\chi^2=14,006$ )			
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,564			

**Таблица 5.** Сопряжённость между объёмом поражения лимфатических узлов и числом циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в основной и контрольной группах (абс.)

Число удалённых лимфатических узлов	Основная группа			Контрольная группа		
	Число ЦОК в крови			Число ЦОК в крови		
	0	1–3	>3	0	1–3	>3
≤12	1	4	2	2	4	0
>12	1	3	4	0	2	7
Итого	2	7	6	2	6	7
$p(\chi^2)$	$p=0,69 (\chi^2=0,75)$			$p=0,009 (\chi^2=9,44)$		
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,22			0,62		

**Таблица 6.** Сопряжённость между объёмом поражения лимфатических узлов и числом циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в общей группе (абс.)

Число удалённых лимфатических узлов	Число ЦОК в периферической крови			Всего
	0	1–3	>3	
≤12	3	8	2	13
>12	1	5	11	17
Итого	4	13	13	30
$p(\chi^2)$	$p=0,02 (\chi^2=7,51)$			
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,45			

**Таблица 7.** Сопряжённость отдалённых метастазов и числа циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в основной и контрольной группах (абс.)

Метастазы	Основная группа			Контрольная группа		
	Число ЦОК в крови			Число ЦОК в крови		
	0	1–3	>3	0	1–3	>3
M1a	2	6	0	2	5	1
M1b	0	1	6	0	1	6
Итого	2	7	6	2	6	7
$p(\chi^2)$	$p=0,003 (\chi^2=11,56)$			$p=0,016 (\chi^2=8,2)$		
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,66			0,595		

**Таблица 8.** Сопряжённость отдалённых метастазов и числа циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови до операции в общей группе (абс.)

Метастазы	Число ЦОК в периферической крови			Всего
	0	1–3	>3	
M1a	4	11	1	16
M1b	0	2	12	14
Итого	4	13	13	30
$p(\chi^2)$	$p=0,0001 (\chi^2=19,49)$			
Коэффициент взаимной сопряжённости	0,628			

По количеству удалённых во время операции лимфатических узлов у больных основной и контрольной групп судили об объёме их поражения. Чем обширнее был объём поражения лимфатических узлов, тем выше было число ЦОК в периферической крови, что было установлено в контрольной группе ( $p=0,009$ ) и по всей группе ( $p=0,45$ ) (табл. 5, 6).

В исследовании было выявлено, что наличие метастазов более чем в одном органе (M1b), связанное с разрушением ткани нескольких органов, повышало мигрирующие способности опухолевых клеток в периферическом русле (табл. 7, 8). Коэффициент взаимной сопряжённости между развитием отдалённых метастазов и числом ЦОК в периферической крови до операции был высоким и составил 0,628 ( $p=0,0001$ ). Коэффициент согласия Пирсона ( $\chi^2=19,49$ ) также во много раз превышал критический уровень.

#### ВЫВОДЫ

1. Обнаружена сопряжённость числа циркулирующих опухолевых клеток с клинико-морфологическими параметрами больных колоректальным раком. Выявлена взаимосвязь потенциальных факторов риска и повышения в периферической крови количества циркулирующих опухолевых клеток для всех больных колоректальным раком, независимо от способа хирургического вмешательства.

2. Наиболее выраженная ассоциация числа циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови до операции у пациентов с метастатическим колоректальным раком по итогам анализа величины коэффициента взаимной сопряжённости (K) сложилась с наличием отдалённых метастазов (статус M1b;  $K=0,63$ ,  $p=0,0001$ ) и стадией T4 ( $K=0,56$ ,  $p=0,0009$ ).

3. Полученные результаты подчёркивают важную предикторную значимость уровня циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови для оценки

потенциала прогрессирования колоректального рака.

*Потенциальные конфликты или существующие противоречия в интересах отсутствуют.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Van Der Auwera I., Peeters D., Benoy I.H. et al. Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2009; 102: 276–284. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605472.
2. 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; 26 (19): 3213–3221. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.8923.
3. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В. и др. Особенности мутаций гена KRAS при колоректальном раке на юге России. *Тюменский мед. ж.* 2015; 17 (3): 20–22. [Kit O.I., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V. et al. The features of KRAS mutations in colorectal cancer in southern Russia. *Tyumenskiy meditsinskiy zhurnal.* 2015; 17 (3): 20–22. (In Russ.)]
4. 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): 3083–3091. DOI: 10.1245/s10434-008-0131-8.
5. Мазуренко Н.Н., Гагарин И.М., Цыганова И.В. и др. Частота и спектр мутации KRAS в метастатическом колоректальном раке. *Вопр. онкол.* 2013; 59 (6): 751–755. [Mazurenko N.N., Gagarin I.M., Tsyganova I.V. et al. The frequency and spectrum of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer. *Voprosy onkologii.* 2013; 59 (6): 751–755. (In Russ.)]
6. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В., Водолажский Д.И. Частота и спектр мутаций гена KRAS при распространенном колоректальном раке на юге России. *Колоректология.* 2014; (S3): 64–64а. [Kit O.I., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V., Vodolazhskiy D.I. The frequency and spectrum of KRAS gene mutations in advanced colorectal cancer in southern Russia. *Koloproktologiya.* 2014; (S3): 64–64а. (In Russ.)]
7. Кит О.И., Геворкян Ю.А., Солдаткина Н.В. и др. Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток при метастатическом колоректальном раке. *Академич. ж. Западной Сибири.* 2015; 5 (60): 75. [Kit O.I., Gevorkyan Yu.A., Soldatkina N.V. et al. Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer. *Akademicheskii zhurnal Zapadnoy Sibiri.* 2015; 5 (60): 75. (In Russ.)]