

Чуть реже представлена гиперхолестеринемия – 42,5%. На порядок реже встречались такие факторы риска, как гипергликемия, гиподинамиия, нерациональное питание (около 20,0%). Обобщённая информация по факторам риска среди исследуемых пациентов представлена на рисунке.

Мы обратились к вопросу факторов риска атеросклероза среди пациентов с ОИМ, проживающих в крупном промышленном городе. Полученные данные свидетельствуют о высокой распространённости хронического стресса (72,0%) и артериальной гипертензии (67,5%) с низким уровнем диспансерного наблюдения (30,5%) и постоянным приёмом препаратов, корректирующих артериальное давление (18,5%). К часто встречающимся факторам риска также относятся избыточный вес (55,0%), курение (49,0%), повышенный уровень холестерина (42,5%). В меньшей степени отмечены гиподинамиия (20,5%), гипергликемия (18,5%), нерациональное питание (16,5%). При этом только у 26,0% респондентов развитие ОИМ было ассоциировано с неправильным образом жизни. Можно сделать вывод о недостаточной информированности преимущественно трудоспособного городского населения о негативных влияниях факторов риска атеросклероза на развитие болезней системы кровообращения. На данном медико-социальном аспекте необходимо концентрировать ресурсы здравоохранения.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бокерия Л. А. Здоровье России: Атлас. – М.: НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2013. – 420 с.
- Государственная программа Российской Федерации «Развитие здравоохранения», утв. Распоряжением Правительства Российской Федерации от 24 декабря 2012 г. № 2511-р, г. Москва // Рос. газ. – 2012. 31 дек.
- Кисляк О. А., Малышева Н. В., Чиркова Н. Н. Факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний в развитии болезней, связанных с атеросклерозом // Клиническая геронтология. – 2008. – № 3. – С. 3–11.
- Максимова Т. М., Белов В. Б., Лушкина Н. П. Смертность населения и характеристики госпитализации при заболеваниях системы кровообращения // Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. – 2013. – № 5. – С. 7–10.
- Николаевский Е. Н. Атеросклероз: факторы риска, клиническая картина и современная диагностика // Справочник фельдшера и акушерки. – 2015. – № 7. – С. 20–31.
- Оганов Р. Г., Масленникова Г. Я. Стратегии профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации // Клиническая медицина. – 2012. – № 3. – С. 4–7.
- Смертность населения Челябинской области: Статистический сборник. – Челябинск: Челябинскстат, 2014.
- Чазов Е. И., Бойцов С. А. Оказание медицинской помощи больным с острым коронарным синдромом в рамках программы создания региональных и первичных сосудистых центров в Российской Федерации // Кардиологический вестник. – 2008. – № 2. – С. 5–11.

Поступила 11.01.2016

**О. И. КИТ, О. В. НИСТРАТОВА, И. А. НОВИКОВА, Д. И. ВОДОЛАЖСКИЙ,  
Е. А. НИКИПЕЛОВА, Е. М. НЕПОМНЯЩАЯ, Е. П. УЛЬЯНОВА, Е. Н. ОЛЕЙНИКОВА**

## АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ НАЛИЧИЕМ KRAS-МУТАЦИЙ В ОПУХОЛИ И КОЛИЧЕСТВОМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,  
Россия, 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 Линия, 63;  
тел. 8 (863) 295-53-62. E-mail: nistratova.o.v@mail.ru

У 40 больных с впервые установленным диагнозом колоректального рака (КРР) выявляли циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) с использованием системы CellSearch Veridex. В ткани удаленной опухоли определяли наличие мутаций в гене KRAS методом Real-Time qPCR. Была установлена связь повышенного количества ЦОК в венозной крови с наличием мутаций в гене KRAS. У пациентов с высоким уровнем ЦОК и наличием мутаций отдаленные метастазы развивались в более ранние сроки.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, циркулирующие опухолевые клетки, KRAS-мутации.

**О. И. КИТ, О. В. НИСТРАТОВА, И. А. НОВИКОВА, Д. И. ВОДОЛАЖСКИЙ,  
Е. А. НИКИПЕЛОВА, Е. М. НЕПОМНЯЩАЯ, Е. П. УЛЬЯНОВА, Е. Н. ОЛЕЙНИКОВА**

THE ASSOCIATION BETWEEN DETECTION THE PRESENCE OF KRAS MUTATIONS IN TUMORS  
AND CIRCULATING TUMOR CELLS FROM PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

In 40 patients with newly diagnosed colorectal cancer identify circulating tumor cells the Veridex CellSearch system. In the tissue of the tumor was determined by the presence of KRAS mutations for Real-Time qPCR technique. Was found a connection of an elevated number of CTCS in the venous blood with the presence of tumor mutations in the KRAS gene. In patients with high levels of CTCS and the presence of mutations, earlier developed distant metastases.

**Key words:** colorectal cancer, circulating tumor cells, KRAS mutations.

В последние десятилетия отмечается неуклонный рост заболеваемости колоректальным раком (не менее 12% за последние 5 лет). Доля колоректального рака среди опухолей желудочно-кишечного тракта в Российской Федерации составляет от 40% до 47%, по данным различных авторов. В 2013 г. стандартизованный показатель заболеваемости для рака прямой кишки составил 12,3 на 100 тысяч населения [3]. Сходные тенденции и в других странах. Такой рост заболеваемости связывают с различными факторами: частым употреблением рафинированной пищи, экологической нестабильностью, увеличением частоты обнаружения опухоли в связи с применением новых технологий и др. Основным методом лечения по-прежнему остается хирургический. Одной из современных диагностических проблем – является изучение метастазирования при колоректальном раке. Наличие минимальной остаточной опухоли и микрометастазов существенно ограничивает перспективу дальнейшего увеличения показателей выживаемости. В наметившейся тенденции индивидуализации лечения пациентов необходимо определение прогнозирования рецидивирования и метастазирования. Одним из маркеров, свидетельствующих о прогрессировании опухолевого процесса, является увеличение количества циркулирующих в крови клеток опухоли [5]. Известно, что раковые клетки возникают вследствие накопления соматических мутаций в критическихprotoонкогенах и ассоциированных с опухолями генах-супрессорах. На основании этого логично предположить, что раннее выявление опухолевого зачатка возможно, хотя и сложно методологически [1]. В экспериментальных моделях было показано, что в кровоток ежедневно поступают опухолевые клетки, до 99,99% которых распознаются иммунокомпетентными клетками, уничтожаются, и лишь 0,01% достигает своей локализации и реализуется как метастатический очаг [8, 9]. Рядом исследований показано, что при проведении химиотерапии в адьювантном режиме при наличии метастазов пятилетняя выживаемость увеличивается до 20% [2]. Интересным является не только изучение количества ЦОК в венозной крови, но и определение молекулярно-генетических характеристик опухоли. Современ-

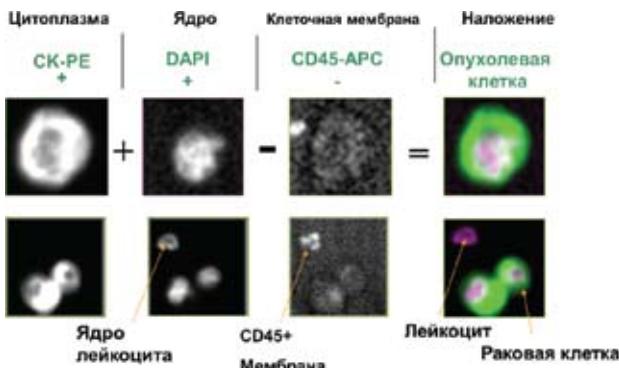
ная концепция общего канцерогенеза базируется на экзо- и эндогенных влияниях на весь организм и его подсистемы. Происходит действие на орган-мишень, клеточный аппарат и микроокружение. В дальнейшем развиваются генетические мутации и неконтролируемая пролиферация клеток [7].

В 60–80% случаев КРР отмечается гиперэкспрессия рецепторов эпидерmalного фактора роста (EGFR). Сигнал через receptor от эпидерmalного фактора роста (EGFR) передается через внутриклеточный сигнальный путь, включающий белковые молекулы RAS-RAF-MEK-ERK и P13K-Akt-mTOR, на геном клетки и оказывает влияние на такие клеточные процессы, как дифференцировка, пролиферация, миграция, ангиогенез, апоптоз [4]. Одной из таких молекул-передатчиков являются белки KRAS. При наличии активирующей мутации в этих генах, имеющей место у 50–60% больных, нарушается работа данного сигнального пути, и применение моноклональных антител к EGFR становится неэффективным [6].

Цель исследования – изучить связь между наличием в крови больных колоректальным раком циркулирующих опухолевых клеток и мутацией в гене KRAS в операционных биоптатах опухолей.

## **Материалы и методы**

В исследование были включены 40 пациентов (20 мужчин и 20 женщин) с впервые установленным диагнозом «колоректальный рак III В стадии» (классификация TNM) в возрасте от 42 до 84 лет. Локализация опухоли была следующей: прямая кишка – 15 (37,5%) больных, сигмовидная кишка – 25 (62,5%) больных. Исследование крови на наличие ЦОК проводили с использованием системы CellSearch™, состоящей из двух приборов: станции пробоподготовки и анализатора, – принцип работы которой основан на подсчете количества эпителиальных опухолевых клеток, выделяемых из крови. Идентификация клеток осуществляется с помощью флуоресцентно-меченых антител к цитокератинам [8, 18, 19], общелейкоцитарному антигену CD45 и ядерного красителя DAPI. Анализ основан на иммуномагнитном обогащении клеток при помощи металлических наночастиц, покрытых полимерным слоем, содержащим антитела к EpCAM молекулам (маркеры эпителиальных клеток), с дальнейшей



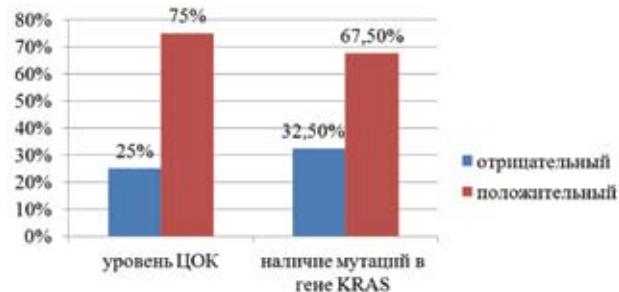
**Рис. 1.** Анализ изображения циркулирующих опухолевых клеток в исследуемом образце венозной крови

иммунофлуоресцентной идентификацией собранных в магнитном поле клеток (рис. 1).

В настоящее время данная система утверждена FDA для клинического применения при трёх локализациях злокачественных опухолей: раке молочной железы, простаты и толстого отдела кишечника. Референсными значениями считаются не более 5 ЦОК в образце при раке груди, не более 3 при колоректальном раке и не более 5 при раке простаты. При превышении референсных значений образец считается положительным на наличие ЦОК. Для определения уровня ЦОК исследовали 8 мл венозной крови (из периферической вены) в предоперационном периоде. Исследование ткани опухоли на наличие мутаций в гене KRAS проводили методом Real-Time qPCR. Из фиксированных в 10%-ном забуференном формалине и залитых в парафин образцов тканей опухолей получали срезы толщиной 3–5 мкм. Процедура экстракции ДНК включала стандартную депарафинизацию срезов. Затем образцы обрабатывали набором реагентов «QIAamp DNA FEPE Tissue Kit» («QIAGENE», 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 нормализовалась до величины 1 нг/мкл. С помощью набора реагентов «Real-Time PCR- KRAS-7M» («Биолинк», Россия) проводили определение 7 SNP-мутаций (Single Nucleotide Polymorphism) в 12-м и 13-м кодонах гена KRAS: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D, с использованием термоциклира «Bio-Rad CFX96» («Bio-Rad», США).

### Результаты исследования

У больных колоректальным раком III стадии был обнаружен повышенный уровень ЦОК в 75% случаев (у 30 из 40 пациентов), при этом у 90% (67,5% от общего количества больных) ЦОК-по-



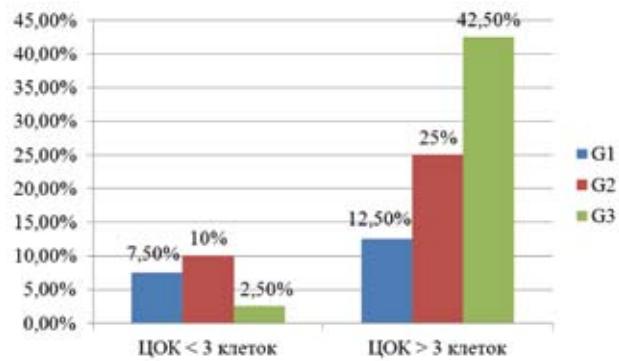
**Рис. 2.** Уровень ЦОК и мутации в гене KRAS при КРР

ложительных больных были выявлены активирующие мутации в гене KRAS (рис. 2).

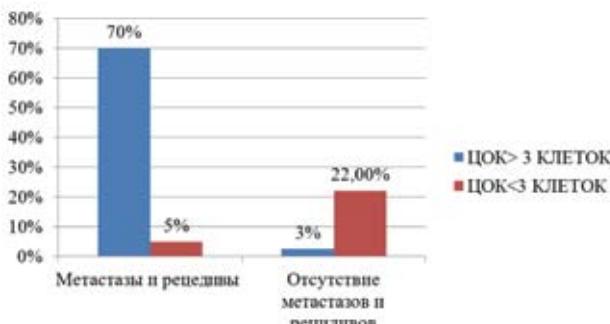
По гистологической структуре все опухоли имели строение аденокарциномы различной степени дифференцировки. Из них у 8 (20%) больных морфологически была диагностирована высокодифференцированная аденокарцинома, у 14 (35%) – умеренно дифференцированная, у 18 (22%) – низкодифференцированная. При этом были выявлены статистически значимые различия в уровне ЦОК в зависимости от степени дифференцировки опухоли ( $p<0,05$ ). У 80% пациентов пороговое значение уровня ЦОК было превышено ( $>3$  клеток в одном образце), количество клеток варьировало от 10 до 400. У 20% пациентов значение уровня ЦОК было ниже порогового ( $<3$  клеток), однако циркулирующие опухолевые клетки присутствовали в каждом образце: от 1 до 3 клеток.

Из рисунка 3 видно, что количество ЦОК было выше, у пациентов с умеренной и низкой степенью дифференцировки опухоли, чем у пациентов с высокой степенью дифференцировки.

В результате ретроспективного анализа данных о больных исследованной группы и развития у них отдаленных метастазов и рецидивов была выявлена связь повышенного уровня ЦОК и раннего метастазирования и рецидивирования (в первые 18–24 месяца). У 75% больных были выявлены отдаленные метастазы и рецидивы при этом у 70% из них уровень ЦОК был выше порогового значения. У 25% больных рецидивы и отдаленные метастазы



**Рис. 3.** Зависимость количества ЦОК от степени дифференцировки опухоли



**Рис. 4.** Зависимость обнаружения метастазов и рецидивов от количества ЦОК

отсутствовали, при этом уровень ЦОК не превысил порогового значения у 22% из них, что отражено на рисунке 4.

У 90% больных с развивающимися отдаленными метастазами очаги поражения локализовались в печени и по гистоструктуре были аналогичны первичной опухоли. У 7,5% больных при рентгенологическом контроле были обнаружены метастазы в лёгких (морфологическая верификация которых не производилась). У 2,5% больных отдаленные метастазы локализовались в большом сальнике, по гистоструктуре они также были аналогичны первичной опухоли.

Таким образом, проведенное исследование показало, что обнаружение ЦОК в периферической крови и активирующих мутаций в гене KRAS при колоректальном раке имеет ряд достоверно доказанных взаимодействий: во-первых, чем больше количество ЦОК в крови, тем выше частота положительных мутаций KRAS, во-вторых, высокий процент ЦОК имеет прямую корреляцию с ранним метастазированием и рецидивированием КРР. Определена обратная зависимость степени дифференцировки опухоли и её агрессивности: при умеренно и низкодифференцированных опухолях количество ЦОК в периферической крови выше в сравнении с высокодифференцированными. Все различия были статистически значимы ( $p<0,05$ ).

В результате полученных данных можно утверждать, что превышение порогового значения уровня ЦОК – больше 3 клеток в одном образце (варьирование количества от 10 до 400 клеток) –

при изучении флуоресцентно-меченых антител к цитокератинам [8, 18, 19], общелейкоцитарного антигена CD45 и ядерного красителя DAPI является одним из прогностических факторов, предсказывающим агрессивное течение колоректального рака.

## ЛИТЕРАТУРА

- Глузман Д. Ф., Осинский С. П. Молекулярные технологии в диагностике злокачественных новообразований // DOKTOR. – 2013. – № 4. – С. 11–17.
- Горбунова В. А. Необходимость углубленного анализа RAS-мутаций для стратегии лекарственной терапии колоректального рака // Онкологическая колопроктология. – 2014. – № 1. – С. 7–13.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). – Москва: ФГБУ «МНИОИ им. П. А. Герцена» Минздравсоцразвития России. – 2015. – С. 11–53.
- Ким О. И., Геворкян Ю. А., Солдаткина Н. В. и соавт. Частота и спектр мутаций гена KRAS при распространенном колоректальном раке. Клинико-морфологические особенности // Молекулярная медицина. – 2015. – № 5. – С. 26–29.
- Ким О. И., Новикова И. А., Бахтин А. В. и соавт. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 11. – С. 37–39.
- URL:www.rae.ru/meo/?section=content&op=show\_article&article\_id=4312 (дата обращения: 24.11.2015).
- Федягин М. Ю., Трякин А. А., Тюляндина С. А. Перспективы лечения больных раком толстой кишки с мутацией в гене BRAF// Онкологическая колопроктология. – 2014. – № 3. – С. 9–16.
- Шапошников А. В. Колоректальный рак. Канцерогенез и онкопревенция. – М., 2015. – С. 160.
- 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. – 2010. – Vol. 102. № 2. – P. 276–284.
- Massimo Cristofanilli, G. Thomas Budd, Matthew J. Ellis, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer // N. engl. j. med. – 2004. – Vol. 351. № 8. – P. 781–791.

Поступила 19.12.2015