

ВЛИЯНИЕ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ НА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАСТАЗОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ПЕЧЕНИ

Е.М. Пальцева, доктор медицинских наук, **М.И. Секачева**, кандидат медицинских наук,
Д.Н. Федоров, кандидат медицинских наук, **О.Г. Скипенко**, доктор медицинских наук, профессор

Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского РАМН, Москва

E-mail: paltseva-k@yandex.ru

Современные стратегии химиотерапевтического лечения метастатического колоректального рака (КРР), основанные на комбинации цитотоксических и таргетных препаратов, способствовали значительному увеличению продолжительности жизни пациентов. Для изучения действия анти-EGFR-препаратов (панитумумаб), блокирующих связывание эндогенных лигандов со своим рецептором, мы определяли экспрессию лигандов рецептора эпидермального фактора роста – трансформирующего фактора роста- α (ТФР α) и амфирегулина, участвующих в прогрессировании КРР. С целью оценки воздействия комбинации цитотоксических и анти-EGFR-препаратов на адгезивные свойства опухолевых клеток изучалась экспрессия молекулы межклеточной адгезии E-кадгерина. При иммуногистохимическом исследовании выявлено, что в метастазах в печени пациентов, получавших предоперационное химиотерапевтическое лечение (FOLFOX6 в сочетании с панитумумабом), отмечалось появление нормальной мембранной экспрессии E-кадгерина в отличие от патологической мембранно-цитоплазматической экспрессии у нелеченых пациентов ($p=0,002$). У получавших таргетную анти-EGFR-терапию показана более низкая экспрессия ТФР α и амфирегулина по сравнению с таковой в контрольной группе (без достоверных различий). Кроме того, в группе пациентов, не получавших химиотерапевтического лечения, при повышенной экспрессии амфирегулина общая выживаемость была больше, чем при низкой экспрессии (разница недостоверна). Наше исследование продемонстрировало положительное влияние сочетанной терапии метастатического КРР цитотоксическими и таргетными препаратами на адгезивные свойства опухолевых клеток, а также эффективное воздействие анти-EGFR-препаратов на опухолевые клетки, заключающееся в ингибировании их роста.

Ключевые слова: метастатический колоректальный рак, трансформирующий фактор роста- α , амфирегулин, E-кадгерин, анти-EGFR-препараты

INFLUENCE OF PREOPERATIVE CHEMOTHERAPY ON BIOLOGICAL FEATURES OF COLORECTAL CANCER LIVER METASTASES

E.M. Paltseva, M.I. Sekacheva, D.N. Fedorov, O.G. Skipenko
B.V. Petrovsky Russian Surgery Research Center, RAMS, Moscow

The modern strategies of chemotherapy of metastatic colorectal cancer (CRC) based on the combination of cytotoxic and targeted agents resulted in significant increase of patient's life duration. To study the action of anti-EGFR agents (panitumumab), which block the endogenous ligand binding with the receptor, we detected the expression of epidermal growth factor receptor ligands – transforming growth factor α (TGF α) and amphiregulin who take part in CRC progression. To examine the effect of combination of cytotoxic and anti-EGFR agents on adhesive properties of tumor cells the expression of the molecule of intercellular adhesion E-cadherin was investigated. Immunohistochemically there was normal membranous E-cadherin expression in liver metastases of patients who received preoperative chemotherapy (FOLFOX6 in combination with panitumumab) in contrast with pathological membranous and cytoplasmic expression in patients who had no chemotherapy ($p=0,002$). We demonstrated the lower TGF α and amphiregulin expression in patients who received anti-EGFR therapy compared with control group, but the difference was not statistically reliable. Additionally patients with no chemotherapy and amphiregulin overexpression had higher overall survival than those with low expression (the difference also was not statistically reliable). Our study demonstrated the positive effect of combined cytotoxic and targeted chemotherapy of metastatic colorectal cancer on adhesive properties of tumor cells and inhibition of tumor cell growth by anti-EGFR agents.

Key words: metastatic colorectal cancer, transforming growth factor α , amphiregulin, E-cadherin, anti-EGFR agents

В последние годы современные стратегии лечения колоректального рака (КРР) привели к значительному увеличению продолжительности жизни больных с гематогенными метастазами. Химиотера-

певтическое лечение метастатического КРР, ранее проводившееся одним препаратом, теперь осуществляется с помощью комбинации цитотоксических и таргетных средств. Мишенями таргетных препаратов

являются сигнальные пути, участвующие в регуляции роста, клеточного цикла, ангиогенеза и метастазирования опухолевых клеток. Повышенная экспрессия рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и его лигандов, наблюдающаяся в некоторых новообразованиях, делает его привлекательной терапевтической мишенью. Моноклональные антитела (например, панитумумаб – человеческое IgG₂ анти-EGFR-моноклональное антитело), связывающиеся с EGFR, довольно широко применяются для лечения метастатического КРР [1, 2, 9, 10, 14].

EGFR активируется после связывания со своими лигандами, в том числе эпидермальным фактором роста, трансформирующим фактором роста- α (ТФР α), амфирегулином, гепаринсвязывающим эпидермальным фактором роста и бетацеллюлином. Это приводит к активации сигнальных путей, играющих важную роль в развитии злокачественных опухолей, – регуляции клеточного цикла, поддержании клеточного роста, ангиогенеза, метастазирования [5]. Анти-EGFR-препараты препятствуют связыванию эндогенных лигандов со своим рецептором и блокируют, таким образом, сигнальные пути. Однако их эффективность ограничивает не только необходимость отсутствия мутации в гене *KRAS* и ряде других генов (*PIK3A*, *BRAF*) в метастатическом очаге, но и повышенной экспрессии лигандов EGFR амфирегулина и эпирегулина [1, 3, 6, 7]. В настоящее время практически не изучены экспрессия лигандов EGFR в метастазах КРР при проведении таргетной терапии и, соответственно, их возможное влияние на эффективность проводимого лечения.

Химиотерапия как цитотоксическими, так и таргетными препаратами оказывает влияние на биологию опухолевого очага. По нашим данным, лишь единичные исследования посвящены изучению изменения адгезивных свойств опухолевых клеток под действием терапии цитотоксическими препаратами [13]. Адгезивные межклеточные контакты между эпителиальными клетками обеспечиваются

Е-кадгерином – представителем семейства трансмембранных гликопротеинов. Снижение экспрессии Е-кадгерина приводит к уменьшению межклеточной адгезии и увеличивает вероятность дальнейшей инвазии и метастазирования.

Нами исследованы некоторые молекулярно-биологические маркеры в метастазах КРР в печени, которые могут служить показателями эффективности противоопухолевого предоперационного лечения. Для изучения действия анти-EGFR-препаратов, блокирующих связывание эндогенных лигандов со своим рецептором, мы определяли экспрессию лигандов рецептора эпидермального фактора роста – ТФР α и амфирегулина, участвующих в прогрессировании КРР. С целью оценки воздействия комбинации цитотоксических и анти-EGFR-препаратов на адгезивные свойства опухолевых клеток изучалась экспрессия молекулы межклеточной адгезии Е-кадгерина. Кроме того, мы оценили связь экспрессии ТФР α и амфирегулина с выживаемостью пациентов, не получавших химиотерапевтического лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены пациенты (n=9), находившиеся на лечении в РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского РАМН (мужчин было 7, женщин – 2; возраст больных – от 27 до 75 лет, медиана возраста – 52 года; основная группа), с метастазами аденокарциномы толстой кишки в печени, расцененные исходно как «потенциально резектабельные» в отношении метастатического очага и получившие предоперационную химиотерапию в качестве первой линии в режиме FOLFOX6 (оксалиплатин – 85 мг/м², лейковорин – 400 мг/м², 5-фторурацил болюсно – 400 мг/м² с последующей 46-часовой инфузией 5-фторурацила в дозе 2400 мг/м²) в сочетании с введением в 1 день панитумумаба в дозе 6 мг/кг. Панитумумаб назначали только после выявления *KRAS* дикого типа. Группу сравнения (контроль) составили 35 пациентов

ЭКСПРЕССИЯ ТФР α , АМФИРЕГУЛИНА И Е-КАДГЕРИНА В МЕТАСТАЗАХ КРР В ПЕЧЕНИ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАВШИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ И АНТИ-EGFR-ТЕРАПИЮ, И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

Маркер	Выраженность экспрессии	Основная группа	Контрольная группа	p
		количество пациентов, абс. (%)		
ТФР α	-	7 (78)	22 (63)	0,33
	+, \pm , +++	2 (22)	13 (37)	
Амфирегулин	-, +	6 (67)	13 (37)	0,11
	++, +++	3 (33)	22 (63)	
Е-кадгерин	Мембранная	7 (78)	6 (18) *	0,002
	Мембранно-цитоплазматическая	2 (22)	26 (75) *	

Примечание: «-» – отсутствие иммунопероксидазного окрашивания, «+», « \pm » – слабая, «++» – умеренная, «+++» – выраженная интенсивность иммунопероксидазного окрашивания; * – в группе сравнения из анализа результатов были исключены 1 пациент с отсутствием экспрессии и 2 пациента с цитоплазматической экспрессией Е-кадгерина.

с метастазами в печени (мужчин – 20, женщин – 15; возраст больных – от 39 лет до 71 года, медиана возраста – 59 лет), которым химиотерапию не проводили. Для оценки выживаемости пациенты из данной группы были прослежены после операции в сроки от 1 до 93 мес. Медиана наблюдения составила 23 мес. Оценка выживаемости пациентов, получавших химиотерапевтическое лечение, не проводилась в связи со слишком маленьким периодом наблюдения. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) было выполнено на операционном материале метастазов в печени.

Для ИГХ-исследования изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм с парафиновых блоков. Депарфинирование и ИГХ-исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме в анализаторе для ИГХ Bond-Max, Leica. Исполь-

зовались первичные антитела к ТФР α (Santa Cruz Biotechnology, клон D-6; разведение 1:150), амфирегулину (Santa Cruz Biotechnology, клон G-4; разведение 1:150) и E-кадгерину (DakoCytomation, клон NCH-38; разведение 1:30). Препараты исследовали с помощью световой микроскопии. Интенсивность окрашивания при иммунопероксидазной реакции оценивали полуколичественным методом. Для визуализации изображения использовали цифровую камеру (Leica).

Полученные данные проанализированы с использованием программы STATISTICA 8.0. Сравнительный анализ выполнен методом Пирсона χ^2 , точным методом Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ выживаемости проводили методом Каплана–Майера и с помощью Log-rank-теста.

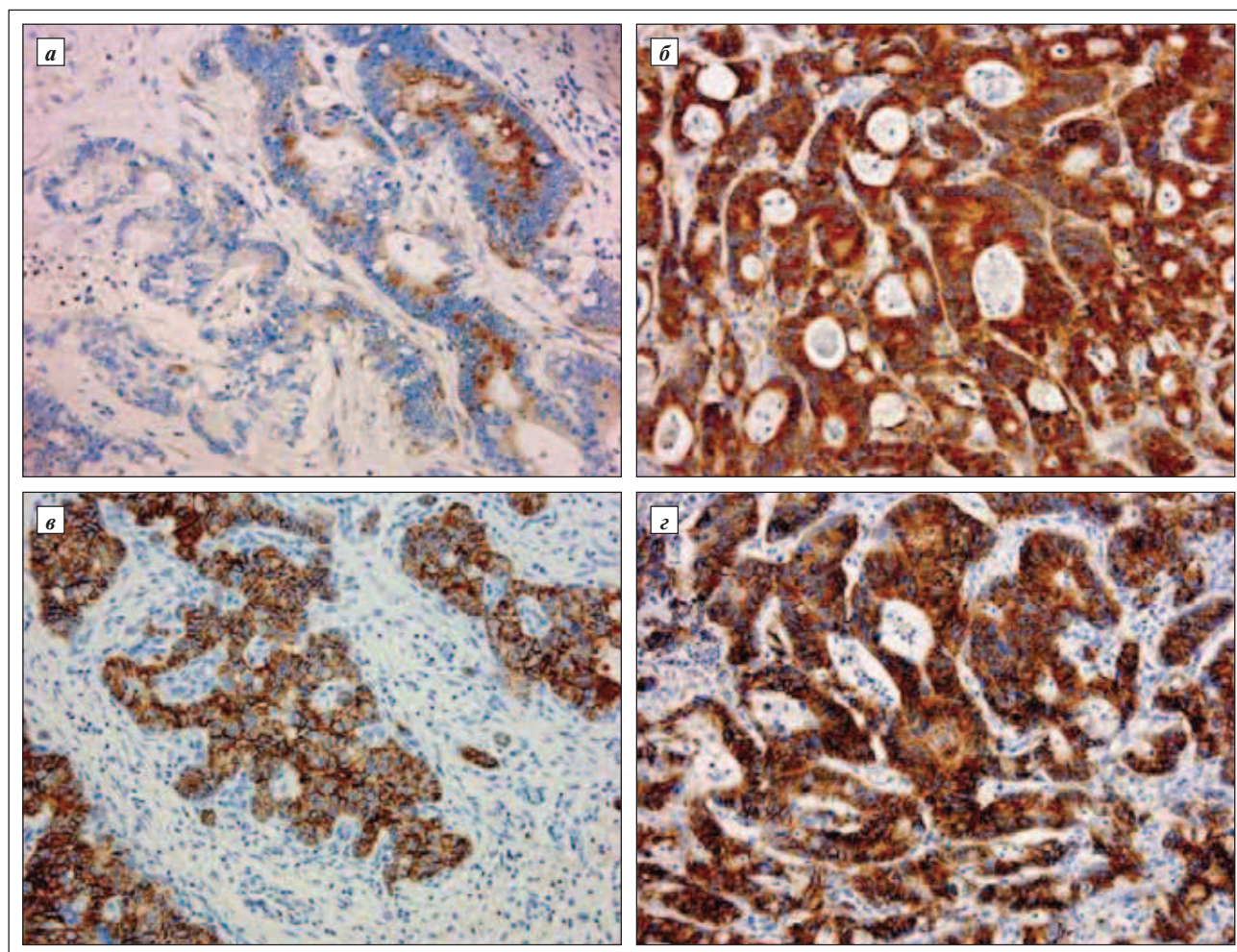


Рис. 1. Экспрессия амфирегулина и E-кадгерина в метастазах KPP в печени: а – слабая цитоплазматическая экспрессия амфирегулина у пациента, получавшего предоперационную химиотерапию, $\times 200$; б – выраженная цитоплазматическая экспрессия амфирегулина у пациента из контрольной группы, $\times 200$; в – умеренная мембранная экспрессия E-кадгерина у пациента, получавшего предоперационную химиотерапию, $\times 200$; г – выраженная мембранно-цитоплазматическая экспрессия E-кадгерина у пациента из контрольной группы, $\times 200$; а–г – ИГХ-окраска

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При ИГХ-исследовании лиганда рецептора эпидермального фактора роста ТФР α , определяющегося в цитоплазме опухолевых клеток, выявлено, что для него наиболее характерно отсутствие экспрессии как в метастазах в печени пациентов, получавших анти-EGFR-терапию, так и не проходивших лечение (соответственно у 78 и 63%), хотя в основной группе данный маркер отсутствовал чаще, чем в группе сравнения. В последней, напротив, ТФР α определялся у большего числа пациентов (соответственно у 37 и 22% больных) (см. таблицу). Достоверной разницы между группами не получено ($p=0,33$).

При ИГХ-исследовании амфирегулина в основной группе (анти-EGFR-терапия) выявлена его умеренная или выраженная цитоплазматическая экспрессия у 3 (33%) больных, отсутствие либо слабая цитоплазматическая экспрессия — у 6 (67%); в контрольной группе отмечалась обратная картина: умеренная/выраженная цитоплазматическая экспрессия — у 22 (63%), отсутствие либо слабая цитоплазматическая экспрессия — у 13 (37%) больных. Анализ экспрессии амфирегулина показал тенденцию к отличию между двумя группами (разница недостоверна; $p=0,11$): в группе леченых пациентов преобладали отсутствие или слабая экспрессия (68% больных), в контрольной — умеренная или выраженная (63% больных) (см. таблицу; рис. 1 а, б).

При сравнении содержания молекулы межклеточной адгезии Е-кадгерина показано достоверное отличие между 2 группами ($p=0,002$). В группе пациентов, получавших химиотерапевтическое лечение, чаще встречалась мембранная локализация данного маркера (78% случаев). В группе сравнения преобладала аномальная мембранно-цитоплазматическая локализация Е-кадгерина (75% случаев) (см. таблицу; рис. 1 в, г).

Мы проанализировали изменение под действием таргетной терапии экспрессии 2 лигандов EGFR — ТФР α и амфирегулина, играющих значительную роль в пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток [4, 15]. Анализ экспрессии ТФР α не выявил различий между группой пациентов, получавших анти-EGFR-терапию, и группой сравнения, возможно, вследствие недостаточного количества пациентов в основной группе. Однако в целом содержание ТФР α (как и амфирегулина) было ниже в группе леченых пациентов. Более низкая экспрессия ТФР α и амфирегулина у пациентов, получавших таргетную терапию, может свидетельствовать об уменьшении их продукции под действием препарата и, как результат, ингибировании роста опухолевых клеток [15, 16].

Межклеточная адгезивная молекула Е-кадгерин в опухолях теряет свою мембранную локализацию и приобретает аномальную мембранно-цитоплазматическую или цитоплазматическую

локализацию, нарушая, таким образом, контакты между эпителиальными клетками и играя значительную роль в прогрессии и метастазировании опухолей [12].

Изменение содержания Е-кадгерина после химиотерапии практически не изучено. Лишь в одной работе [13] мы нашли данные об отсутствии разницы в экспрессии данного маркера в метастазах в печени пациентов, получавших химиотерапевтическое лечение до операции и не получавших его. Нами же в метастатических очагах пациентов, получавших предоперационное химиотерапевтическое лечение, отмечено появление нормальной мембранной экспрессии Е-кадгерина (в отличие от патологической экспрессии у нелеченых пациентов), что свидетельствует о положительном влиянии терапии FOLFOX6 в сочетании с панитумумабом на адгезивные свойства опухолевых клеток.

При анализе общей выживаемости пациентов, не получавших химиотерапевтического лечения, в зависимости от экспрессии эндогенных лигандов EGFR ТФР α и амфирегулина, достоверных ассоциаций не получено. Однако при умеренной и выраженной экспрессии амфирегулина в метастазах в печени выживаемость была больше (медиана 66 мес), чем при слабой экспрессии или ее отсутствии (медиана 30 мес) (рис. 2).

Рядом исследователей установлено, что повышенная экспрессия амфирегулина, эпирегулина и ТФР α в метастазах КРР в печени ассоциирована

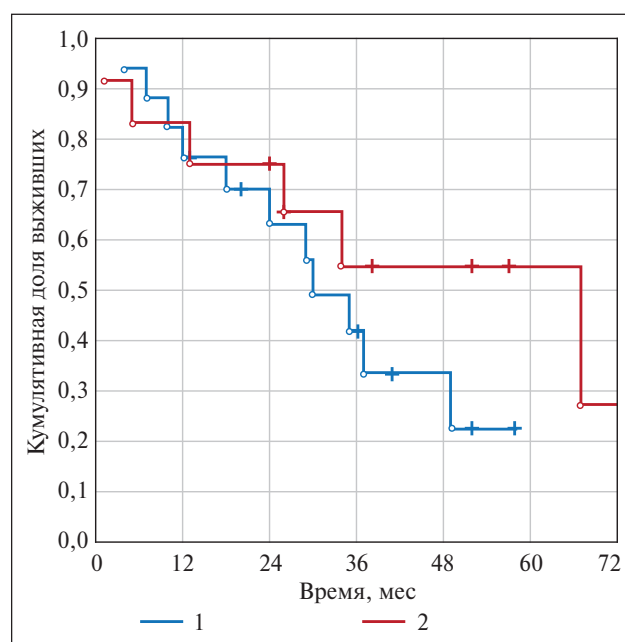


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов, не получавших химиотерапевтического лечения, в зависимости от экспрессии амфирегулина: 1 — отсутствие или слабая интенсивность иммунопероксидазного окрашивания; 2 — умеренная или выраженная его интенсивность

с лучшим ответом на анти-EGFR-терапию и более длительной общей выживаемостью после проведенного лечения [8, 10, 11, 17]. Возможно, ситуация аналогична и для больных, не получающих химиотерапевтического лечения, однако нам не удалось получить данные о связи экспрессии этих лигандов EGFR с выживаемостью таких пациентов. Наши данные требуют подтверждения при исследовании большего числа пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИГХ-исследование продемонстрировало положительное влияние сочетанной терапии метастатического KPP цитотоксическими и таргетными препаратами на адгезивные свойства опухолевых клеток, а также эффективное воздействие анти-EGFR-лечения на опухолевые клетки, заключающееся в ингибировании их роста. В метастатических очагах пациентов, получавших предоперационное

химиотерапевтическое лечение (FOLFOX6 в сочетании с панитумумабом), отмечалось появление нормальной мембранной экспрессии E-кадгерина (в отличие от патологической экспрессии у нелеченых пациентов). Мы проанализировали изменение под действием таргетной анти-EGFR-терапии экспрессии 2 эндогенных лигандов EGFR – ТФРа и амфирегулина. Выявлена более низкая их экспрессия у пациентов, получавших таргетную терапию, по сравнению с нелечеными больными (разница статистически недостоверна).

Анализ ассоциации общей выживаемости пациентов, не получавших химиотерапевтического лечения, с экспрессией ТФРа и амфирегулина в метастазах KPP в печени не выявил достоверных ассоциаций. Однако при повышенной экспрессии амфирегулина выживаемость была выше. Эти данные требуют дальнейшего изучения на большем числе пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baker J., Dutta D., Watson D. et al. Tumor gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer // *British J. Cancer.* – 2011; 104: 488–495.
2. Barbier A., Domont J., Magné N. Coexpression of biological key modulators in primary colorectal carcinomas and related metastatic sites: implications for treatment with cetuximab // *Bull. Cancer vol.* – 2010; 97 (2): 9–15.
3. Benvenuti S., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F. et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancer to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies // *Cancer Res.* – 2007; 67: 2643–48.
4. Chang M., Ahn H., Lee J. et al. Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors // *Cancer.* – 2011; 117: 143–51.
5. Herbst R., Shin D. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors. A new paradigm for cancer therapy // *Cancer.* – 2002; 94 (5): 1593–611.
6. Jacobs B., De Roock W., Plesseaux H. et al. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab // *J. Clin. Oncol.* – 2009; 27: 5068–74.
7. Jonker D., Karapetis C., Harbison C. et al. High epiregulin (EREG) gene expression plus *K-ras* wild-type (WT) status as predictors of cetuximab benefit in the treatment of advanced colorectal cancer (ACRC): results from NCIC CTG.CO.17 – A phase III trial of cetuximab versus best supportive care (BSC) // *ASCO Ann. Meeting Proc.* Chicago, IL. – 2009. – Abstract 4016.
8. Khambata-Ford S., Garrett C., Meropol N. et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and *K-ras* mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab // *J. Clin. Oncol.* – 2007; 25 (22): 3230–7.
9. Merla A., Sanjay G. Novel drugs targeting the epidermal growth factor receptor and its downstream pathways in the treatment of colorectal cancer: a systemic review // *Chemother. Res. Practice.* – 2012; 2012.
10. Pentheroudakis G., Kotoula V., De Roock W. et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes // *BMC Cancer.* – 2013; 13: 49.
11. Saridaki Z., Tzardi M., Papadaki C. et al. Impact of *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* mutations, *PTEN*, *AREG*, *EREG* expression and skin rash in $\geq 2^{\text{nd}}$ line Cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients // *PLoS ONE.* – 2011; 6 (1): 15980.
12. Tsanou E., Peschos D., Batistatou A. et al. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach // *Anticancer Res.* – 2008; 28: 3815–26.
13. Van Damme N., Demetter P., De Bock W. et al. Limited influences of chemotherapy on healthy and metastatic liver parenchyma // *World J. Gastroenterol.* – 2005; 11 (34): 5322–6.
14. Venook A. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma // *Cancer.* – 2005; 103: 2435–46.
15. Yamada M., Ichikawa Y., Yamagishi S. et al. Amphiregulin is a promising prognostic marker for liver metastases of colorectal cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2008; 14: 2351–6.
16. Yonesaka K., Zejnullahu K., Lindeman N. et al. Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both Gefitinib and Cetuximab in EGFR wild-type cancers // *Clin. Cancer Res.* – 2008; 14 (21): 6963–73.
17. Yoshida M., Shimura T., Sato M. et al. A novel predictive strategy by immunohistochemical analyses of four EGFR ligands in metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR antibodies // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 2013; 139 (3): 367–78.