

Биологические маркеры эффективности предоперационной химиолучевой терапии местно-распространенного рака прямой кишки

М.Ю. Федянин, А.А. Трякин, С.А. Тюляндин

Отделение клинической фармакологии и химиотерапии
ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Контакты: Михаил Юрьевич Федянин fedianinmu@mail.ru

Сочетание хирургического и предоперационного химиолучевого лечения является основой лечебной тактики больных местно-распространенным раком прямой кишки. Тем не менее у ряда пациентов не удается достигнуть ответа на лечение. В настоящее время широко проводится поиск биологических маркеров эффективности предоперационной химиолучевой терапии при местно-распространенном раке прямой кишки. Уделяется внимание компонентам различных сигнальных путей опухолевой клетки (EGFR-путь, Wnt-путь), клеточного цикла и апоптоза, стромы опухоли. Проведено несколько исследований с применением микрочипирования ДНК. В настоящей обзорной статье рассматривается предикторное значение данных биологических маркеров.

Ключевые слова: рак прямой кишки, предоперационная химиолучевая терапия, биомаркеры

Biological markers of rectal cancer neoadjuvant chemoradiotherapy efficacy

M. Yu. Fedyanin, A. A. Tryakin, S. A. Tjulandin

Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center,
Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Combination of neoadjuvant chemoradiotherapy and surgery is the basic treatment for locally advanced rectal tumors. Despite that, a subgroup of patients does not benefit from combined treatment. A wide search of biological markers predicting neoadjuvant chemoradiotherapy efficacy is currently conducted. Tumor cell signal pathways are investigated (EGFR, Wnt), cell cycle and apoptosis, tumor stroma. Several studies with DNA microarray analysis were conducted. Predictive value of these biological markers is reviewed in this article.

Key words: rectal cancer, preoperative chemoradiotherapy, biomarkers

Введение

Сочетание хирургического и предоперационного химиолучевого лечения является основой лечебной тактики больных местно-распространенным раком прямой кишки. В настоящее время комбинация предоперационной химиолучевой терапии (ХЛТ) с фторпиримидинами и хирургического лечения позволяет добиться полного лечебного патоморфоза у 15–25 % больных, а также значительно уменьшить частоту рецидивов. Тем не менее у ряда пациентов не удается достигнуть ответа на лечение. При этом введение новых химиопрепаратов в схему и изменение режима лучевого воздействия не привели к значимому улучшению получаемых результатов или находятся на этапе исследований. Поэтому в качестве альтернативного подхода к улучшению результатов лечения больных местно-распространенным раком прямой кишки можно рассматривать изучение маркеров эффективности предоперационной ХЛТ. Именно этому посвящена настоящая обзорная статья. Рассматривается предикторное значение компонентов различных сигнальных путей опухолевой клетки, клеточного цикла и апоптоза, стромы опухоли, результаты исследований микрочипирования ДНК.

Сигнальный путь EGFR-KRAS-MAPK

Сигнал через рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) передается через ряд внутриклеточных белковых молекул (RAS-RAF-МЕК-ERK и PI3K-Akt-mTOR) на геном клетки и оказывает влияние на такие клеточные процессы, как дифференцировка, пролиферация, миграция, ангиогенез, апоптоз, синтез белка. В 60–80 % случаев рака толстой кишки отмечена гиперэкспрессия EGFR, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [1]. В исследованиях *in vitro* показано, что опухолевые клетки с гиперэкспрессией EGFR проявляют резистентность к лучевой терапии (ЛТ) [2, 3]. Несмотря на это, в большинстве исследований не отмечена корреляция между экспрессией EGFR и эффективностью химиолучевого лечения больных раком прямой кишки. Следует отметить, что в этих ранних исследованиях проводилось деление экспрессии EGFR на отсутствие и наличие. Лишь в одном из них выявлена обратная корреляция между экспрессией EGFR и объективным эффектом ХЛТ. При разделении пациентов по интенсивности экспрессии EGFR также подтверждено, что у больных, чьи опухоли имели более 50 % клеток, экспрессирующих EGFR, отмечалось и более короткое время до прогресс-

сирования [4]. В более крупном исследовании ($n = 183$) выявлено, что гиперэкспрессия EGFR встречалась в 45 % опухолей с T3–4 стадией в сравнении с 31 % при опухолях T0–2. При многофакторном анализе отмечено, что низкая экспрессия EGFR статистически значимо предсказывает снижение показателя T после проведенного химиолучевого лечения [5]. Однако в современных исследованиях не доказано предикторное значение экспрессии EGFR в опухоли прямой кишки в отношении эффективности предоперационного химиолучевого лечения [6].

Интересным видится изучение полиморфизма гена *EGFR*. Так, было выявлено, что замена нуклеотида в промоторе гена *EGFR* может приводить к изменению экспрессии гена. У гомозигот GG на участке гена *EGFR* Sp1-216 выраженный ответ на предоперационное лечение наблюдался лишь у 33 % больных. Тогда как у гетерозигот GT или гомозигот TT частота выраженного ответа на лечение составила 64 % [7].

Мутации в гене *KRAS* являются одним из главных моментов в канцерогенезе рака толстой кишки. Такие мутации приводят к состоянию постоянной активации MAPK (mitogen-activated protein kinase) пути. Частота мутации гена при раке прямой кишки доходит до 48 % [8]. В некоторых предклинических работах отмечена радиорезистентность опухолевых клеток с мутацией в гене *KRAS* [9, 10]. В исследованиях, выполненных P. Luna-Perez и J. Garcia-Aguilar et al. у 37 и 132 больных раком прямой кишки, была показана большая эффективность предоперационной ХЛТ при диком типе гена [11, 12]. В то же время в другом исследовании ($n = 56$) статус гена *KRAS* не коррелировал с эффектом предоперационной терапии [13].

Таким образом, отсутствие общепринятой методики оценки экспрессии рецептора EGFR в опухоли у больных раком прямой кишки затрудняет его оценку как маркера, предсказывающего ответ на ХЛТ. Аналогичная роль мутации *KRAS* также остается неопределенной. Возможно, следует дифференцированно подходить к локализациям мутации в гене. Тем не менее результаты многочисленных исследований вторых фаз свидетельствуют, что введение ингибиторов EGFR (цетуксимаб или панитумумаб) в химиолучевой компонент лечения больных раком прямой кишки при диком типе гена не приводит к повышению частоты полных патоморфологических регрессий.

Тимидилатсинтетаза

Тимидилатсинтетаза является одним из ключевых ферментов, принимающих участие в синтезе пиримидинов для строительства ДНК, а именно в образовании дезоксиуридинтрифосфата из дезоксиуридинмонофосфата. В ряде работ было показано, что гиперэкспрессия тимидилатсинтетазы является неблагоприятным прогностическим фактором у больных раком толстой кишки и ассоциирована с резистентностью

к 5-фторурацилу [14, 15]. Тем не менее, суммируя данные всех работ, в настоящее время не рекомендуется использовать данные об активности тимидилатсинтетазы для определения прогноза течения болезни больных метастатическим раком толстой кишки или рассматривать ее в качестве предиктора эффективности фторпиримидинов.

Проводились работы по изучению предикторных и прогностических свойств уровня экспрессии тимидилатсинтетазы и при местно-распространенном раке прямой кишки. Их результаты также оказались противоречивы. В работе R.P. Saw et al. у больных с отсутствием экспрессии тимидилатсинтетазы в опухоли чаще достигалось снижение стадии после ХЛТ, но не после лучевого лечения [16]. В то же время в исследовании F.V. Negri et al., наоборот, больные с высокой экспрессией тимидилатсинтетазы в опухоли чаще отвечали на предоперационную ХЛТ (88 против 13 %) [17]. В небольшом исследовании K.L. Spindler et al. комбинация определенных полиморфизмов генов тимидилатсинтетазы, *EGFR* и *EGF* позволила в 41 % случаев предсказать наступление полного эффекта на ХЛТ, а в 90 % — неполного эффекта [7].

Все исследования включали в себя небольшое количество больных, применялись различные режимы химиотерапии, поэтому в настоящее время предикторные способности данного маркера не доказаны в отношении предоперационного химиолучевого лечения местно-распространенного рака прямой кишки.

Регуляторы клеточного цикла и апоптоза

Одним из хорошо изученных маркеров является индекс пролиферации Ki-67. В предклинических работах не обнаружено влияния данного параметра на чувствительность клеток аденокарциномы прямой кишки к химиотерапии или лучевому воздействию [18]. Результаты клинических исследований оказались противоречивы. В одной работе отмечено, что чем выше индекс пролиферации, тем чаще удавалось достигать объективного эффекта на ХЛТ [19]. В другой показано обратное — ответ на химиолучевое лечение чаще наблюдался в опухолях с низким Ki-67 [20]. Тем не менее в большинстве работ никаких корреляций обнаружено не было [21–28]. Таким образом, данный показатель не может применяться для прогнозирования эффекта предоперационной терапии при раке прямой кишки.

p53 — один из ключевых компонентов процессов регуляции клеточного цикла и апоптоза. Является одним из наиболее часто оцениваемых маркеров в исследованиях по прогнозированию эффекта ХЛТ при раке прямой кишки. В исследованиях применявшиеся методы определения состояния p53 можно разделить на 2 группы: определение мутации в гене *p53* (например, полимеразная цепная реакция) или определение экспрессии гена по уровню белка p53 (иммуногистохимия). В большинстве работ, в том

числе и наиболее крупных из них (H.J. Chang et al. [26] ($n = 130$) и F. Bertolini et al. [29] ($n = 91$)) не было обнаружено корреляции между наличием мутации гена *p53* или его экспрессией и результатами ХЛТ.

p21 – опухолевый супрессор, останавливающий клеточный цикл в ответ на повреждение ДНК. Однако в злокачественных клетках, при диком типе гена *p21* отмечается подавление апоптоза в ответ на химиолучевое воздействие [30–33]. А в опытах *in vitro* при мутированном типе гена *p21* или низкой экспрессии неизмененного p21 чувствительность клеток рака толстой кишки к ЛТ повышается [34]. Результаты предклинических работ были подтверждены лишь в 2 клинических исследованиях [23, 29], тогда как в других работах обнаружена обратная зависимость: при низкой экспрессии p21 реже достигался объективный ответ на предоперационное лечение рака прямой кишки и отмечалась низкая выживаемость в данной группе больных [22, 27]; или корреляции обнаружено не было [17, 24, 35]. Небольшие размеры выборок и различия в химиолучевом лечении являются возможным объяснением полученных противоречивых результатов. Требуется проведение крупных проспективных исследований для определения предикторных свойств p21.

Bax/bcl-2 – белки, вовлеченные в процессы апоптоза. При потере функции bax клетки рака толстой кишки становятся химиорезистентными, в том числе и к 5-фторурацилу [36, 37]. В большинстве клинических исследований роль bax в предсказании эффективности при химиолучевом лечении рака прямой кишки не подтвердилась [23, 27]. Только в исследовании H.J. Chang et al., включившем в анализ 130 больных, отмечено, что в группе с полным ответом на химиолучевое лечение чаще встречались опухоли с гиперэкспрессией bax (54 против 29 %) [26]. Гиперэкспрессия bcl-2 ассоциирована с резистентностью к химиотерапии и лучевому воздействию [38–40]. Роль bcl-2 в качестве предиктора предоперационного лечения местно-распространенного рака прямой кишки не подтвердилась в клинических исследованиях [41].

Сурвивин – белок, относящийся к семейству ингибиторов апоптоза, участвует в процессах клеточного деления, адаптации к стрессу и регуляции апоптоза [42]. В экспериментальных работах отмечена обратная корреляция экспрессии сурвивина с выраженностью апоптоза, индуцированного лучевым воздействием [43]. T. Sprenger et al. и F. Rödel et al. на данных 116 и 59 больных соответственно показали, что высокий уровень сурвивина в опухоли до начала лечения коррелировал с более высоким значением показателя T, стадией заболевания, низким индексом апоптотической активности и коротким временем до прогрессирования. Под действием ХЛТ уровень экспрессии сурвивина уменьшался. У больных с высокой экспрессией сурвивина в резидуальной опухоли после химиолучевого воздействия была выше частота рецидивов (26 против 6 %)

в исследовании F. Rödel [44] и частота развития метастазов (71 против 15 %) в исследовании T. Sprenger [45]. Предикторные свойства белка пока изучаются.

В настоящее время проводятся исследовательские работы по изучению роли таких регуляторов клеточного цикла и апоптоза, как PLK1, Aurora A, cyclin E, PCNA, XIAP, каспазы, DIABLO, Smac, в развитии резистентности к ХЛТ рака прямой кишки. Однако получаемые результаты не позволяют сделать однозначных выводов об их предикторных способностях.

Элементы стромы опухоли

Наряду с самими опухолевыми клетками большое влияние на свойства опухоли оказывает и микроокружение, и в первую очередь стромальный компонент новообразования. Фибробласты опухолевой ткани играют важную роль в поддержании пролиферации, инвазии и метастазирования опухолевых клеток [46–48]. Маркерами присутствия таких клеток являются белок, активирующий фибробласты (FAP- α), стромальный клеточный фактор (SDF-1), трансформирующий фактор роста β (TGF- β), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF).

Активирующий фибробласты белок (FAP- α), стромальный клеточный фактор (SDF-1)

FAP- α обладает ангиогенными свойствами, а SDF-1, известный также как хемокин CXCL12, ассоциирован с миграцией и способностью опухолевых клеток к метастазированию [49, 50]. При раке толстой кишки экспрессия SDF-1 ассоциирована с метастазированием опухоли и неблагоприятным прогнозом течения болезни [51, 52]. При изучении экспрессии мПНК и уровня белка обоих факторов в опухоли и сыворотке крови больных раком прямой кишки ($n = 56$) после предоперационного химиолучевого лечения было установлено, что в резидуальной опухоли экспрессия FAP- α наблюдается в 15,6 %, а SDF-1 – в 36,8 % случаев. Отмечается высокая корреляция между экспрессией FAP- α и SDF-1 в резидуальной опухоли. И если уровень экспрессии SDF-1 в опухоли коррелировал с уровнем аналогичного белка в сыворотке крови, то зависимости между экспрессией FAP- α в опухоли и уровнем FAP- α в сыворотке отмечено не было. Экспрессия обоих факторов в опухоли была ассоциирована с низкой выживаемостью, но не с патоморфологическим эффектом [53].

Рецептором к SDF-1 (CXCL12) является CXCR4. У 53 больных определяли экспрессию CXCR4 и SDF-1 в резидуальной опухоли прямой кишки после завершения предоперационного химиолучевого лечения. Среди пациентов с высокой экспрессией и SDF-1, и CXCR4 чаще развивались отдаленные метастазы. При этом наихудшие показатели безрецидивной выживаемости были в группе больных с высокой экспрессией одновременно обоих маркеров [54].

Тем не менее небольшое количество больных в исследованиях, определение маркеров после завершения ХЛТ и ретроспективный характер работы не позволяют делать однозначных выводов о роли FAP- α и SDF-1 в прогнозировании эффекта предоперационного лечения при раке прямой кишки [53].

Трансформирующий фактор роста β (TGF- β)

К функциям TGF- β относятся стимуляция ангиогенеза в опухоли, подавление иммунного ответа. Также этот белок способствует инвазии и метастазированию опухоли. Вырабатывается он как опухолевыми клетками, так и клетками стромы опухоли [55]. Выявлена более высокая экспрессия TGF- β в опухоли в сравнении с неизменным эпителием прямой кишки. При этом под действием предоперационной ЛТ экспрессия TGF- β значительно снижается [56]. Учитывая эти данные, TGF- β стал изучаться в качестве маркера эффективности предоперационной ХЛТ при раке прямой кишки. В исследовании E. Angenete et al. было включено 110 больных, 49 % проводилась предоперационная ЛТ. С эффектом ЛТ уровень TGF- β ни в резидуальной опухоли, ни в плазме крови не коррелировал. Однако он был выше у больных с синхронными отдаленными метастазами [57]. Возможно, уровень TGF- β , FAP- α , SDF-1 и CXCR4 могут служить маркерами наличия отдаленных метастазов рака прямой кишки.

Маркеры ангиогенеза

Ангиогенез является одним из основных условий опухолевого роста и метастазирования. Процесс ангиогенеза сложен и многокомпонентен, представляет собой баланс между ангиогенными и антиангиогенными факторами. В ряде исследований, проведенных в 1990-х годах, было показано, что уровень VEGF в сыворотке и в опухолевой ткани имеет прогностическое значение для больных раком толстой кишки [58]. В исследовании I. Zlobec et al. выявлена выраженная корреляция между достижением полного лечебного патоморфоза после ЛТ и отсутствием или низким уровнем экспрессии VEGF в опухоли прямой кишки [59]. Также в ряде работ отмечена связь между высокой экспрессией VEGF в опухоли и низкими показателями выживаемости после предоперационной ЛТ рака прямой кишки [60]. В работе турецких исследователей средний уровень VEGF был значительно ниже в группе больных с полным лечебным патоморфозом после ХЛТ [61]. Однако в других работах не было подтверждено ни предикторного, ни прогностического значения уровня VEGF в опухоли как до, так и после предоперационной ХЛТ [29].

Также противоречивы результаты работ по оценке предикторных способностей уровня экспрессии HIF-1 α (фактор, индуцируемый гипоксией) в отношении предоперационной терапии рака прямой кишки [62].

К компонентам ангиогенеза можно отнести и матриксные металлопротеиназы (MMP), образующиеся

при действии тромбоспондинов. MMP9 — матриксная металлопротеиназа 9, фермент, в основе действия которого лежит способность вызывать деградацию компонентов матрикса и тем самым способствовать процессам инвазии и метастазирования опухоли [61]. Под действием ХЛТ происходит снижение уровня MMP9 в опухоли прямой кишки. Однако если экспрессия MMP9 остается повышенной, то это ассоциировано с низкой эффективностью предоперационного лечения [61, 63].

Учитывая противоречивые результаты работ по маркерам ангиогенеза, возможно, необходимо оценивать экспрессию VEGF в совокупности с другими факторами. Например, опухоли с одновременной высокой экспрессией VEGF и EGFR обладали крайне высокой резистентностью к ХЛТ в исследовании I. Zlobec et al. [64].

Маркеры стволовых опухолевых клеток

Небольшая субпопуляция опухолевых клеток, обладающих способностью к самообновлению, дифференцировке и пролиферации, получила название стволовых опухолевых клеток, или иницирующих опухоль клеток. Эти клетки обладают не только опухоленными свойствами, но и способны выживать при химиолучевом воздействии [65, 66]. Наиболее часто в качестве маркеров таких клеток выступают CD-144, CD-24, CD-166, CD-44, OCT4, SOX2 и LGR5.

Одним из маркеров стволовых клеток рака толстой кишки является CD133 [67, 68]. CD133-положительные опухолевые клетки проявляют свою резистентность к ХЛТ посредством активации механизмов репарации ДНК, увеличения продукции цитокинов (интерлейкин 4) и повышения экспрессии генов с антиапоптотическими свойствами [69–71]. Экспрессия CD133 чаще встречается при раке прямой кишки, чем при раке ободочной кишки, достигая 80 %. При этом умеренная и выраженная экспрессия при аденокарциноме прямой кишки наблюдается практически у половины больных [72]. Также исследователи полагают, что только цитоплазматическая, а не апикальная и мембранная иммуногистохимическая окраска CD133 характерна для стволовых опухолевых клеток [73, 74].

В исследовании, проведенном H. Yasuda et al., одновременно оценивалась экспрессия EGFR, VEGF и CD133 в аденокарциноме прямой кишки до и после проведения предоперационного химиолучевого лечения. В образцах опухоли до ХЛТ отмечена выраженная позитивная корреляция между экспрессией CD133 и EGFR ($r = 0,774$). Корреляция между CD133 и VEGF, а также VEGF и EGFR была менее сильная ($r = 0,378$ и $0,39$). В образцах опухоли после ХЛТ такой корреляции не наблюдалось. Интересно, что после воздействия комбинации химиотерапии и ЛТ экспрессия CD133 значительно возрастала, а экспрессия VEGF и EGFR снижалась. Прогрессирование болезни чаще наблюда-

лось в группе с высокой экспрессией CD133 в резидуальной опухоли, но не VEGF или EGFR. Продолжительность жизни также была короче в группе больных с высокими значениями CD133 в резидуальной опухоли. Однако небольшое количество больных в исследовании ($n = 40$) и небольшое число прогрессирований ($n = 6$) позволили лишь рекомендовать данный маркер к дальнейшему изучению [73].

В наиболее крупное исследование по оценке предикторных и прогностических свойств CD133 при предоперационной ХЛТ местно-распространенного рака прямой кишки было включено 126 больных. Перед началом лечения экспрессия CD133 была отмечена в 69 % опухолей, высокая же экспрессия (> 40 % клеток) выявлена в 48 %. В резидуальной опухоли высокая экспрессия CD133 выявлена уже у 61 % больных. Ни один из клинико-патоморфологических параметров, а также развитие прогрессирования болезни не были ассоциированы с высокой экспрессией CD133 (> 40 % клеток) ни в материале до лечения, ни в резидуальной опухоли. Тем не менее в группе пациентов, у которых отмечено увеличение экспрессии CD133 (более медианы), в процессе терапии чаще развивались рецидивы и метастазы, а выживаемость была ниже независимо от характера химиотерапевтического компонента (с оксалиплатином или без него) [75]. В других, менее крупных исследованиях также подтверждена прогностическая роль CD133. Выявлено, что для муцинозного гистотипа опухолей прямой кишки не характерна высокая экспрессия CD133 ни до, ни после ХЛТ [76]. Отмечена обратная корреляция между экспрессией CD133 и фактора, индуцированного гипоксией (HIF-2 α), в резидуальной опухоли после завершения ХЛТ, но не перед началом лечения [77].

Однако S.V. Shmelkov et al. показали, что для выделения стволовых опухолевых клеток недостаточно ориентироваться только на CD133 [78]. Оказалось, что только 1 из 262 клеток аденокарциномы прямой кишки, экспрессирующих CD133, обладает способностью к развитию опухоли, т. е. является стволовой опухолевой клеткой, или опухоль-иницирующей клеткой [68].

В качестве других маркеров стволовых опухолевых клеток рассматриваются OCT4 и SOX2. Эти белки являются транскрипционными факторами, необходимыми для поддержания и функционирования нормальных клеток-предшественниц. Активация генов OCT4 и SOX2 приводит к формированию у фибробластов фенотипа, подобного эмбриональным стволовым клеткам [79, 80]. Японские авторы оценили экспрессию генов CD133, OCT4 и SOX2 в опухоли прямой кишки до и после ХЛТ. Интересно, что перед началом терапии экспрессия OCT4 сильно коррелировала с экспрессией SOX2 ($r = 0,991$), при этом корреляции между CD133 и OCT4, а также между CD133 и SOX2 выявлено не было. Как и в других работах, ХЛТ приводила к увеличению экспрессии CD133, но снижению OCT4

и SOX2. Экспрессия этих 3 генов не была ассоциирована с патоморфологическим ответом, однако у больных с прогрессированием заболевания отмечались более высокие исходные показатели всех маркеров [81].

Еще одним маркером, отражающим стволовые свойства клетки, является CD24. CD24 вовлечен в процессы клеточной адгезии, а также, взаимодействуя с Р-селектином на эндотелиальных клетках и тромбоцитах, способствует процессу метастазирования опухоли [82, 83]. При анализе эффективности предоперационного лечения 50 больных раком прямой кишки (11 – только ЛТ и 39 – химиолучевое лечение) было оценено предикторное значение коэкспрессии маркеров CD133 и CD24. Опухоли с высокой коэкспрессией маркеров оказались менее чувствительными к ХЛТ. В этом же исследовании изучалось предикторное значение и других молекулярных маркеров: HER-2/neu, EGFR, VEGF, MIF, p53, p21, Ki-67, Bcl-1, Bcl-2, APAF-1. Экспрессия ни одного из них не была ассоциирована с ответом на предоперационное лечение [84].

Было предложено использовать в качестве маркера стволовых опухолевых клеток трансмембранный гликопротеин CD44, вовлеченный в процессы роста, выживания, дифференцировки и подвижности клеток. При анализе коэкспрессии CD133 и CD44 было обнаружено, что зачастую маркеры выявляются в различных клетках опухоли, а их коэкспрессия – событие достаточно редкое. Однако клетки, экспрессирующие CD44, обладают высокой туморогенностью [85]. При изучении прогностической роли CD44-позитивных клеток при раке толстой кишки получены противоречивые результаты [86, 87]. Так, у больных раком прямой кишки после только хирургического лечения экспрессия ни CD133, ни CD44 не была ассоциирована с развитием в дальнейшем рецидива. Однако на выживаемость влияла экспрессия CD133, но не CD44 [88]. В работе, посвященной оценке прогностической роли CD133 и CD44 в резидуальной опухоли после завершения ХЛТ местно-распространенного рака прямой кишки, выявлено, что экспрессия CD133 ассоциирована с низкой выживаемостью пациентов. В то же время экспрессия CD44, как и в предыдущем исследовании, не влияла на отдаленные результаты лечения [89]. А. Kawamoto et al. изучили динамику изменения экспрессии CD133 и CD44 до и после предоперационного химиолучевого лечения больных раком прямой кишки. Выявлено, что экспрессия CD133 увеличивается в 1,4 раза на каждые 5 Гр ЛТ, а CD44 – снижается независимо от дозы лучевого воздействия. При этом уровень экспрессии CD133 до предоперационного лечения не влиял на прогноз заболевания, тогда как при высокой экспрессии CD133 в резидуальной опухоли отмечалась статистически значимо более низкая выживаемость. Как и в других работах, уровень экспрессии CD44 ни до, ни после ХЛТ не влиял на результаты лечения больных [90].

Работ, посвященных роли CD166 при раке именно прямой кишки, найти не удалось. Однако известны работы о негативном прогностическом значении экспрессии данного маркера стволовых опухолевых клеток при раке толстой кишки [87].

Таким образом, выделение маркеров стволовых клеток имеет обнадеживающий характер, особенно это касается таких маркеров, как CD133, CD44 в строме опухоли, CD24.

Сигнальный путь LGR5-Wnt- β -catenin-TCF4

Сигнальный путь Wnt является одним из ключевых в канцерогенезе рака толстой кишки. Поэтому большое внимание в исследованиях уделяется молекулам, составляющим этот путь.

LGR5 представляет собой член подсемейства гликопротеиновых гормональных рецепторов, являющихся мишенью в сигнальном пути Wnt. Кроме того, он рассматривается в качестве потенциального маркера стволовых клеток эпителия толстой кишки [91, 92]. Проведен анализ экспрессии LGR5 и CD44 в опухоли 52 больных раком прямой кишки, получавших предоперационную ХЛТ [93]. Экспрессия белка LGR5 была ассоциирована с высокой дифференцировкой резидуальных опухолей, а высокий уровень мРНК LGR5, но не белка, был ассоциирован как с низкой степенью лечебного патоморфоза, так и с непродолжительной выживаемостью больных. Матричная РНК CD44 была выявлена в 30,8 % резидуальных опухолей. При этом экспрессия белка CD44 в опухолевых клетках не была ассоциирована с результатами лечения. А экспрессия белка CD44 в строме резидуальной опухоли коррелировала с низкой степенью лечебного патоморфоза и развитием рецидива болезни. Высокая экспрессия мРНК CD44, но не белка, в опухолевых клетках и в строме опухоли была ассоциирована с непродолжительной общей выживаемостью. При многофакторном анализе признаков, влияющих на общую выживаемость, негативное прогностическое значение экспрессии CD44 в строме опухоли было подтверждено. Этими же авторами на этой же популяции больных было показано наличие положительной корреляции между экспрессией мРНК LGR5 и мРНК LKB1 в резидуальной опухоли прямой кишки после завершения ХЛТ. Гиперэкспрессия обоих генов была ассоциирована с меньшей частотой патоморфологических эффектов [94]. Печеночная киназа B1 (LKB1), также известная как STK11, вовлечена в процессы регуляции клеточного цикла, пролиферации, метаболизма, необходима для дифференцировки клеток аденокарциномы толстой кишки, жизнедеятельности гемопоэтических стволовых клеток [95–97].

TCF4 – транскрипционный фактор, активирующийся при передаче сигнала с сигнального пути WNT, принимает участие в процессах эмбрионального развития и поддержания гомеостаза. В исследованиях

на клеточных линиях рака прямой кишки было показано, что отсутствие экспрессии TCF4 ассоциировано с более высокой чувствительностью опухолевых клеток к лучевому воздействию [98]. Полученные данные были подтверждены при определении профиля экспрессии генов для предсказания чувствительности опухоли к ХЛТ в клиническом исследовании. Один из гиперэкспрессированных генов в группе больных с резистентной к ХЛТ опухолью был TCF4 [99].

Таким образом, экспрессия LGR5 и TCF4 представляется перспективным потенциальным предиктором эффекта предоперационной ХЛТ. В настоящее время проводятся исследования по изучению роли других составляющих Wnt-пути, в том числе и β -catenin.

Эпигенетические маркеры

Рассмотрим роль двух основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов при раке прямой кишки: модификация гистонов – белков, участвующих в формировании хроматина, и действие микроРНК, отвечающих за посттранскрипционное подавление экспрессии генов. Одним из маркеров модификации гистонов может служить Rsf-1 – фактор, ремодулирующий хроматин. Высокий уровень экспрессии Rsf-1 в опухоли прямой кишки как до, так и после ХЛТ был ассоциирован со значением Т3–4, низким патоморфологическим эффектом лечения, а также низкими показателями выживаемости. При этом при многофакторном анализе данный маркер сохранил свое влияние на выживаемость [100].

Примером маркера среди микроРНК с предикторными способностями в отношении предоперационной ХЛТ является микроРНК-135b. Данная микроРНК снижает экспрессию белка APC, тем самым приводит к активации сигнального пути Wnt- β -catenin-TCF4. При изучении профиля микроРНК больных с местно-распространенным раком прямой кишки, получавших ХЛТ, было выделено 49 микроРНК, экспрессия которых отличалась от неизменного эпителия кишки. Однако только высокая экспрессия микроРНК-135b была ассоциирована с низкой безрецидивной и общей выживаемостью [101].

Таким образом, применение одного-единственного маркера не позволяет в достаточной степени прогнозировать эффект предоперационной ХЛТ при местно-распространенном раке прямой кишки. Поэтому следующим этапом в изучении данного вопроса стало проведение микрочипирования ДНК для определения профиля экспрессии генов в качестве предикторов химиолучевого воздействия.

Микрочипирование ДНК (microarray analysis)

Микрочипирование ДНК направлено на определение профиля мРНК в опухоли, по которому можно определить различия в экспрессии генов между раз-

личными группами больных или воспроизвести сеть сигнальных путей в опухолевой клетке. Все работы при раке прямой кишки можно разделить в зависимости от субстрата, на котором выполнялось микрочипирование ДНК: на клеточных линиях или на образцах опухоли больных раком прямой кишки. Полученные данные значительно разнятся, поэтому в нашей статье мы представим результаты работ, выполненных только на материале опухоли больных.

В исследование, проведенное В.М. Ghadimi et al., было включено 23 больных. С помощью микрочипирования ДНК были выявлены различия в экспрессии 54 генов между ответившими и не ответившими на химиолучевое лечение опухолями, если оценивать эффект терапии по снижению показателя Т. Наибольший интерес представляли гены, которые вовлечены в механизмы репарации ДНК, такие как SMC1, и в организацию микротрубочек клетки: calmin, dystrophin, cdc42BPA, filamin B, villin и kinectin 1. Если же оценивать по достижению лечебного патоморфоза, то различий между экспрессией генов получено не было [99]. Небольшое число больных в исследовании и в валидационной когорте является недостатком данной работы. В дальнейшем данная генная сигнатура была валидирована в исследовании, включившем более 200 больных, которые принимали участие в исследовании CAO/ARO/AIO-04. Предварительный анализ подтвердил способность данного генного профиля предсказывать эффект предоперационной ХЛТ местно-распространенного рака прямой кишки [63].

Эти же авторы провели микрочипирование ДНК на опухолевом материале 30 больных, принимавших участие в том же исследовании CAO/ARO/AIO-04. Однако эффект предоперационной терапии оценивался по развитию рецидива или прогрессирования. Различия в экспрессии отмечены среди 20 генов. Модель эффективно предсказывала и развитие рецидива, и безрецидивную выживаемость [102]. При этом 7 генов совпали с предыдущей сигнатурой [99].

Следующей работой, опубликованной по данной теме, была статья японских авторов. В исследование было включено 52 пациента, которым проводилась предоперационная ЛТ. Выявлено 33 гена, экспрессия которых различалась между ответившими и не ответившими на ЛТ пациентами. В данном исследовании ответ расценивался как достижение патоморфологической регрессии опухоли. Точность предсказания эффекта по данной модели составила 88,6 %. Среди ответивших на предоперационную ЛТ 20 генов имело повышенную экспрессию, а 13 генов сниженную экспрессию в сравнении с группой пациентов, не ответивших на терапию. Среди этих 33 генов следует отметить гены – регуляторы апоптоза (*LUM*, *THBS2*, *LGALS1*, *CYPD* и *GPX2*), гены, продукты которых участвуют в трансдукции внутриклеточного сигнала (*TYRO3*), клеточной адгезии (*THBS2*), клеточной пролиферации (*PSPHL*), ростовые

факторы (*TDGF3*). При этом индукторы апоптоза (*lumican (LUM)*, *thrombospondin 2 (THBS2)*, *galectin-1 (LGALS1)*) экспрессированы в опухолях, ответивших на предоперационную ЛТ. В то же время гены – ингибиторы апоптоза (*cyclophilin 40 (CYPD)* и *glutathione peroxidase 2 (GPX2)*) активны в резистентных опухолях [103]. Это еще раз подчеркивает необходимость оценивать сразу несколько составляющих того или иного клеточного процесса с целью определения чувствительных к предоперационному лечению опухолей.

В другой работе, в которую было включено 43 больных, были выявлены различия в экспрессии 43 генов между ответившими и не ответившими на предоперационное лечение, что оценивалось по достижению лечебного патоморфоза. Большинство генов кодировали транскрипционные факторы (*ETS2*), или были ассоциированы с транспортной функцией (*SLC35E1*), или участвовали в регуляции апоптоза (*caspase-1*). Валидация полученного профиля генов была проведена только на 5 пациентах [104].

В исследовании I.J. Kim et al. выявлены различия в экспрессии 261 гена между 20 пациентами с частичной патоморфологической регрессией и 11 больными с полной патоморфологической регрессией. Однако для дальнейшей работы было отобрано 95 генов с наибольшими различиями в экспрессии. Валидация полученного генного профиля была проведена лишь на 15 больных, с предикторной точностью метода 84 %. В данном исследовании в группе пациентов с полным патоморфологическим ответом отмечалась гиперэкспрессия гена тимидилатсинтетазы и низкая экспрессия *RAD23B* – продукт гена принимает участие в процессах репарации ДНК. Также заслуживают внимание гены *RAP1A*, *LMNB2* и *MLF2*. *RAP1A* – член семейства онкогенов *RAS*, вовлечен в процессы негативной регуляции клеточного цикла, гиперэкспрессирован в опухолях с частичным ответом на ХЛТ. *MLF2* (myeloid leukemia factor 2) – индуцирует p53-зависимую остановку клеточного цикла. *LMNB2* (lamin B2) – обеспечивает связь цитоскелета с оболочкой ядра. Оба гена гиперэкспрессированы в опухолях с полным ответом на предоперационное лечение [105].

В 2012 г. было опубликовано исследование японских авторов. Оценивался профиль экспрессии 20 генов (*PCNA*, *MKI67*, *CDKN1A (p21Cip1)*, *CDK2*, *CHEK1*, *PDRG1*, *LGR5*, *PROM1 (CD133)*, *CD44*, *SOX2*, *POU5F1 (OCT4)*, *LKB1*, *VEGF*, *EGFR*, *HGF*, *MET*, *HIF1*, *GLUT1*, *BAX* и *BCL2*) в материале резидуальной опухоли прямой кишки после завершения ХЛТ. В исследование было включено 52 пациента. Повышенная экспрессия таких генов, как *LGR5*, *PDRG1*, *GLUT1* и *MKI67*, была ассоциирована с низкой степенью лечебного патоморфоза. А высокая экспрессия гена *bax* – с высокой степенью. Описанные гены участвуют в процессах пролиферации, поддержания свойств стволовых опухолевых клеток и устойчивости к гипоксии [6].

К.Н. Brettingham-Moore et al. провели микрочипирование ДНК в образцах опухоли 51 больного местнораспространенным раком прямой кишки до проведения им предоперационного химиолучевого лечения. Чувствительность и специфичность полученной генной сигнатуры в отношении предсказания эффекта химиолучевого лечения составила 82 и 89 % соответственно. Работа замечательна тем, что авторы попытались валидировать ранее представленные в литературе прогностические модели [99, 104, 105], основанные на микрочипировании ДНК. Однако эти модели не работали [106]. В исследование было включено 67 больных. В качестве ответа на лечение рассматривались патоморфологическая регрессия опухоли, метаболический ответ и снижение стадии болезни. При этом генные сигнатуры для каждого варианта оценки эффективности терапии различались. Авторы заметили, что нужно осторожно относиться к результатам микрочипирования ДНК, ведь только треть полученных предикторных моделей удастся валидировать. Таким образом, необходимо учитывать не весь профиль генов, а составляющие активных сигнальных путей в опухолевой клетке. Сопоставив генные профили 3 исследований, авторы обнаружили, что они совпадают только по одному гену – *TNF* (фактор некроза опухоли). Эффектором сигнального пути *TNF* является транскрипционный фактор *NF-κB*, именно активность пути *TNF/NF-κB* авторы предлагают рассматривать в качестве предиктора резистентности рака прямой кишки к ХЛТ.

Данное предположение косвенно подтверждается в исследовании R.D. Petty et al. Был выполнен иммуногистохимический анализ белка APRIL (TNFSF13) – одного из представителя семейства *TNF* – у 234 больных местнораспространенным раком прямой кишки, которым проводилась предоперационная ХЛТ или ЛТ. Экспрессия данного маркера была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом течения болезни, низкой выживаемостью. При этом наиболее значимым влиянием обладала экспрессия APRIL в строме опухоли [107].

Тем не менее ко всем данным по микрочипированию ДНК при раке прямой кишки нужно относиться с осторожностью. Во-первых, все исследования включали небольшое количество больных, а в некоторых исследованиях даже не проводилась валидация полученной предикторной модели. Во-вторых, рекоменду-

ется подтверждать полученные данные с помощью количественных методов оценки экспрессии генов, например с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)) [108]. Ряд исследований показал, что RT-PCR анализ небольшого набора отобранных генов более эффективно предсказывает эффект терапии [6, 109]. Кроме этого, проблемой является и несовпадение профиля генов в различных исследованиях. Это может быть обусловлено различиями в применяемых химиолучевых режимах, характеристиках опухолей, различиями в платформах для микрочипирования, критериях эффективности терапии, математическом анализе получаемых результатов. Поэтому в настоящее время нельзя рекомендовать к применению ни один генный профиль в предсказании эффекта предоперационной ХЛТ рака прямой кишки.

Заключение

В настоящее время продолжаются поиски биологических маркеров эффективности предоперационной ХЛТ при местнораспространенном раке прямой кишки. Выделение маркеров стромы опухоли и стволовых клеток имеет обнадеживающий характер, особенно это касается таких маркеров, как *CD133*, *CD44*, *CD24* и *LGR5*. Ряд эпигенетических маркеров также имеют большой потенциал в предсказании эффекта ХЛТ. Однако появление работ с негативными данными показывает, во-первых, что опухоли отличаются друг от друга, а во-вторых, необходимо учитывать экспрессию нескольких маркеров для правильной оценки чувствительности новообразования к лечению. Поэтому следующим этапом в изучении данного вопроса стало проведение микрочипирования ДНК для определения профиля экспрессии генов в качестве предикторов химиолучевого воздействия.

Исследования с микрочипированием ДНК помогают определить, какие сигнальные пути активны в клетках рака прямой кишки, какие пути необходимы клетке для преодоления химиолучевого воздействия, какова гетерогенность опухолей прямой кишки. Поэтому именно на основании данных микрочипирования ДНК исследователи могут оценивать роль отдельных генов в резистентности к ХЛТ и отбирать больных, у которых не нужно проводить ХЛТ и которым необходимо усиливать химиолучевое воздействие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goldstein N.S., Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001;92:1331–46.

2. Akimoto T., Hunter N.R., Buchmiller L. et al. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2884–90.

3. Liang K., Ang K.K., Milas L. et al. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:246–54.
4. Giralt J., de las Heras M., Cerezo L. et al. The expression of epidermal growth factor

- receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: A multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005;74:101–8.
5. Kim J.S., Kim J.M., Li S. et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:195–200.
 6. Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y. et al. Gene expression profiles of tumor regression grade in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Oncol Rep* 2012;28(3):855–61. doi: 10.3892/or.2012.1863.
 7. Spindler K.L., Nielsen J.N., Lindebjerg J. et al. Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1363–9.
 8. Gaedcke J., Grade M., Jung K. et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 2010;94(1):76–81.
 9. Bernhard E.J., McKenna W.G., Hamilton A.D. et al. Inhibiting Ras prenylation increases the radiosensitivity of human tumor cell lines with activating mutations of ras oncogenes. *Cancer Res* 1998;58(8):1754–61.
 10. Gupta A.K., Bakanauskas V.J., Cerniglia G.J. et al. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* 2001;61(10):4278–82.
 11. Luna-Perez P., Segura J., Alvarado I. et al. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000;7(10):727–31.
 12. Garcia-Aguilar J., Chen Z., Smith D.D. et al. Identification of a biomarker profile associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2011;254(3):486–92.
 13. Zauber N.P., Marotta S.P., Berman E. et al. Molecular genetic changes associated with colorectal carcinogenesis are not prognostic for tumor regression following preoperative chemoradiation of rectal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;94(1):76–81.
 14. Salonga D., Danenberg K.D., Johnson M. et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000;6:1322–7.
 15. Lenz H.J., Danenberg K.D., Leichman C.G. et al. p53 and thymidylate synthase expression in untreated stage II colon cancer: Associations with recurrence, survival, and site. *Clin Cancer Res* 1998;4:1227–34.
 16. Saw R.P., Morgan M., Koorey D. et al. p53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2003;46:192–202.
 17. Negri F.V., Campanini N., Camisa R. et al. Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiochemotherapy. *Br J Cancer* 2008;98:143–7.
 18. Brown D.C., Gatter K.C. Ki67 protein: The immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2–11.
 19. Kim N.K., Park J.K., Lee K.Y. et al. p53, BCL-2, and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001;8:418–24.
 20. Jakob C., Liersch T., Meyer W. et al. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: Correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2008;14:1060–6.
 21. Smith F.M., Reynolds J.V., Kay E.W. et al. COX-2 overexpression in pretreatment biopsies predicts response of rectal cancers to neoadjuvant radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:466–72.
 22. Charara M., Edmonston T.B., Burkholder S. et al. Microsatellite status and cell cycle associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 2004;24:3161–7.
 23. Reerink O., Karrenbeld A., Plukker J.T. et al. Molecular prognostic factors in locally irresectable rectal cancer treated preoperatively by chemo-radiotherapy. *Anticancer Res* 2004;24:1217–21.
 24. Kudrimoti M., Lee E.Y., Kang Y. et al. Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *J Ky Med Assoc* 2007;105:18–22.
 25. Rödel C., Grabenbauer G.G., Papadopoulos T. et al. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:294–303.
 26. Chang H.J., Jung K.H., Kim D.Y. et al. Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36:364–71.
 27. Rau B., Sturm I., Lage H. et al. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol* 2003;21:3391–401.
 28. Debuquoy A., Libbrecht L., Roobrouck V. et al. Morphological features and molecular markers in rectal cancer from 95 patients included in the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 22921 trial: Prognostic value and effects of preoperative radio (chemo) therapy. *Eur J Cancer* 2008;44:791–7.
 29. Bertolini F., Bengala C., Losi L. et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:1455–61.
 30. el-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169–74.
 31. Lu Y., Yamagishi N., Yagi T., Takebe H. Mutated p21(WAF1/CIP1/SD11) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 1998;16:705–12.
 32. Waldman T., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996;381:713–6.
 33. Wouters B.G., Giaccia A.J., Denko N.C., Brown J.M. Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res* 1997;57:4703–6.
 34. Tian H., Wittmack E.K., Jorgensen T.J. p21WAF1/CIP1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:679–84.
 35. Lin L.C., Lee H.H., Hwang W.S. et al. p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy. *Surg Oncol* 2006;15:211–6.
 36. Yamaguchi H., Bhalla K., Wang H.G. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/Htra2 release from mitochondria. *Cancer Res* 2003;63:1483–9.
 37. Wägener C., Bargou R.C., Daniel P.T. et al. Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer* 1996;67:138–41.
 38. Walton M.I., Whysong D., O'Connor P.M. et al. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53:1853–61.
 39. Miyashita T., Reed J.C. bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI2.3 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992;52:5407–11.
 40. Fukunaga-Johnson N., Ryan J.J., Wicha M. et al. Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and -independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis* 1995;16:1761–7.
 41. Kuremsky J.G., Tepper J.E. and McLeod H.L. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;74(3):673–88.

42. Altieri D.C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008;8(1):61–70.
43. Rödel C., Haas J., Groth A. et al. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(5):1341–7.
44. Rödel F., Hoffmann J., Distel L. et al. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005;65(11):4881–7.
45. Sprenger T., Rödel F., Beissbarth T. et al. Failure of down-regulation of survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. *Clin Cancer Res* 2011 Mar 15;17(6):1623–31.
46. Ostman A., Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth – bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19:67–73.
47. Sund M., Kalluri R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:177–83.
48. Orimo A., Weinberg R.A. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 2006;5:1597–601.
49. Huang Y., Wang S., Kelly T. Sepsis promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:2712–6.
50. Orimo A., Gupta P.B., Sgroi D.C. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335–48.
51. Matsusue R., Kubo H., Hisamori S. et al. Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2645–53.
52. Yoshitake N., Fukui H., Yamagishi H. et al. Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;98:1682–9.
53. Saigusa S., Toiyama Y., Tanaka K. et al. Cancer-associated fibroblasts correlate with poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Int J Oncol* 2011;38:655–63.
54. Saigusa S., Toiyama Y., Tanaka K. et al. Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2010;17:2051–8.
55. Kong F.-M., Anscher M.S., Murase T. et al. Elevated plasma transforming growth factor beta1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 1995;222:155–62.
56. Richter K.K., Fink L.M., Hughes B.M. et al. Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *Am J Surg* 1998;176:642–7.
57. Angenete E., Langenskiöld M., Palmgren I. et al. Transforming growth factor beta-1 in rectal tumour, mucosa and plasma in relation to radiotherapy and clinical outcome in rectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:1331–8.
58. Jubb A.M., Harris A.L. Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. *Lancet Oncol* 2010;11:1172–83.
59. Zlobec I., Steele R., Compton C.C. VEGF as a predictive marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy. *Cancer* 2005;104:2517–21.
60. Peng Y., Wang L., Du C., Gu J. Expression of vascular endothelial growth factor can predict distant metastasis and disease-free survival for clinical stage III rectal cancer following 30-Gy/10-f preoperative radiotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2012;27:1555–60.
61. Kurt A., Yanar F., Asoglu O. et al. Low Mmp 9 and VEGF levels predict good oncologic outcome in mid and low rectal cancer patients with neoadjuvant chemoradiation. *BMC Clin Pathol* 2012;12:27.
62. Grade M., Wolff H.A., Gaedcke J., Ghadimi B.M. The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies. *Langenbecks Arch Surg* 2012;397:543–55.
63. Unsal Kilic D., Uner A., Akyürek N. et al. Matrix metalloproteinase-9 expression correlated with tumor response in patients with locally advanced rectal cancer undergoing preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol* 2003;33:186–91.
64. Zlobec I., Vuong T., Compton C.C. et al. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer* 2008 Jan 29;98(2):450–6.
65. Shipitsin M., Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* 2008;88:459–63.
66. Eyer C.E., Rich J.N. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2008;26:2839–45.
67. Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111–5.
68. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106–10.
69. Bao S., Wu Q., McLendon R.E. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756–60.
70. Rich J.N. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 2007;67:8980–4.
71. Todaro M., Alea M.P., Di Stefano A.B. et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007;1:389–402.
72. Mia-Jan K., Jung S.Y., Kim I.Y. et al. CD133 expression is not an independent prognostic factor in stage II and III colorectal cancer but may predict the better outcome in patients with adjuvant therapy. *BMC Cancer* 2013;13:166.
73. Yasuda H., Tanaka K., Saigusa S. et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2009;22:709–17.
74. Jao S.W., Chen S.F., Lin Y.S. et al. Cytoplasmic CD133 expression is a reliable prognostic indicator of tumor regression after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:3432–40.
75. Sprenger T., Conradi L.C., Beissbarth T. et al. Enrichment of CD133-expressing cells in rectal cancers treated with preoperative radiochemotherapy is an independent marker for metastasis and survival. *Cancer* 2012 Jan 1;119(1):26–35. doi: 10.1002/cncr.27703.
76. Lin C.H., Chen W.T., Liu C.H. et al. Increased CD133 expression after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancers other than mucin-rich tumors. *Virchows Arch* 2012;460:447–53.
77. Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y. et al. Clinical significance of CD133 and hypoxia inducible factor-1a gene expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2011;23:323–32.
78. Shmelkov S.V., Butler J.M., Hooper A.T. et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 2008;118:2111–20.
79. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448(7151):318–24.
80. Ben-Porath I., Thomson M.W., Carey V.J. et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008;40(5):499–507.
81. Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y. et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2009;16:3488–98.
82. Kristiansen G., Sammar M., Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol* 2004;35(3):255–62.
83. Aigner S., Ruppert M., Hubbe M. et al. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int Immunol* 1995;7(10):1557–65.
84. Hiroishi K., Inomata M., Kashima K. et al. Cancer stem cell-related factors are associated with the efficacy of pre-operative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Exp Ther Med* 2011;2(3):465–70.

85. Du L., Wang H., He L. et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6751–60.
86. Huh J.W., Kim H.R., Kim Y.J. et al. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. *Pathol Int* 2009;59:241–6.
87. Horst D., Kriegl L., Engel J. et al. Prognostic significance of the cancer stem cell markers CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 2009;27:844–50.
88. Nagata T., Sakakura C., Komiyama S. et al. Expression of cancer stem cell markers CD133 and CD44 in locoregional recurrence of rectal cancer. *Anticancer Res* 2011;31:495–500.
89. Kojima M., Ishii G., Atsumi N. et al. CD133 expression in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Sci* 2010;101:906–12.
90. Kawamoto A., Tanaka K., Saigusa S. et al. Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy. *Exp Ther Med* 2012;3:403–9.
91. Barker N., van Es J.H., Kuipers J. et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007;449:1003–7.
92. Becker L., Huang Q., Mashimo H. Immunostaining of *Lgr5*, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *Sci World J* 2008;8:1168–76.
93. Saigusa S., Inoue Y., Tanaka K. et al. Clinical significance of *LGR5* and *CD44* expression in locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Int J Oncol* 2012;41:1643–52.
94. Saigusa S., Inoue Y., Tanaka K. et al. Significant correlation between *LKB1* and *LGR5* gene expression and the association with poor recurrence-free survival in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:131–8.
95. Jansen M., Ten Klooster J.P., Offerhaus G.J., Clevers H. *LKB1* and *AMPK* family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol Rev* 2009;89:777–98.
96. Gurumurthy S., Xie S.Z., Alagesan B. et al. The *Lkb1* metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* 2011;468:659–63.
97. Nakada D., Saunders T.L., Morrison S.J. *Lkb1* regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* 2010;468:653–8.
98. Kendziorra E., Ahlborn K., Spitzner M. et al. Silencing of the Wnt transcription factor *TCF4* sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* 2011 Dec;32(12):1824–31.
99. Ghadimi B.M., Grade M., Difiilippantonio M.J. et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:1826–38.
100. Lin C.Y., Tian Y.F., Wu L.C. et al. *Rsf-1* expression in rectal cancer: with special emphasis on the independent prognostic value after neoadjuvant chemoradiation. *J Clin Pathol* 2012;65:687–92.
101. Gaedcke J., Grade M., Camps J. et al. The rectal cancer microRNAome – microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clin Cancer Res* 2012;18:4919–30.
102. Liersch T., Grade M., Gaedcke J. et al. Preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: correlation of a gene expression-based response signature with recurrence. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;190(2):57–65.
103. Watanabe T., Komuro Y., Kiyomatsu T. et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006;66(7):3370–4.
104. Rimkus C., Friederichs J., Boulesteix A.L. et al. Microarray based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:53–61.
105. Kim I.J., Lim S.B., Kang H.C. et al. Microarray gene expression profiling for predicting complete response to preoperative chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007;50(9):1342–53.
106. Brettingham-Moore K.H., Duong C.P., Greenawalt D.M. et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(9):3039–47.
107. Petty R.D., Samuel L.M., Murray G.I. et al. *APRIL* is a novel clinical chemo-resistance biomarker in colorectal adenocarcinoma identified by gene expression profiling. *BMC Cancer* 2009;9:434.
108. Watanabe T., Kobunai T., Yamamoto Y. et al. Differential gene expression signatures between colorectal cancers with and without *KRAS* mutations: crosstalk between the *KRAS* pathway and other signalling pathways. *Eur J Cancer* 2011;47:1946–54.
109. Chen H.Y., Yu S.L., Chen C.H. et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007;356:11–20.