

Циркулирующие опухолевые клетки: биология, методы выделения, клиническое значение при раке молочной железы

Ю.Н.Ненахова^{✉1}, В.К.Лядов^{1,2}, И.В.Поддубная^{1,3}

¹ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России.

125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1;

²ФГАУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России. 125367, Россия, Москва, Ивановское ш., д. 3;

³ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина Минздрава России.

115478, Россия, Москва, Каширское ш., д. 23

Рак молочной железы является наиболее распространенной женской онкопатологией в мире. Основная причина смертности больных – метастазирование. Современное состояние медицины позволяет излечивать первичную опухоль, но зачастую является недостаточно эффективным для контроля за развитием метастатической болезни. Важное значение в реализации метастатического каскада играют циркуляция и выживание в кровотоке опухолевых клеток. В этой статье мы постарались обобщить и представить данные литературы по изучению циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, метастазирование, предикторная значимость, прогноз заболевания, методы идентификации и исследования.

[✉]lyullikalya@mail.ru

Для цитирования: Ненахова Ю.Н., Лядов В.К., Поддубная И.В. Циркулирующие опухолевые клетки: биология, методы выделения, клиническое значение при раке молочной железы. Современная Онкология. 2016; 18 (3): 76–82.

Circulating tumor cell: biology, methods of isolation, clinical significance in breast cancer

Yu.N.Nenahova^{✉1}, V.K.Lyadov^{1,2}, I.V.Poddubnaya^{1,3}

¹Russian Medical Academy for Postgraduate Education of the Ministry of Health of the Russian Federation.

125993, Russian Federation, Moscow, ul. Barrikadnaia, d. 2/1;

²Medical and Rehabilitation Center of the Ministry of Health of the Russian Federation.

125367, Russian Federation, Moscow, Ivan'kovskoe sh., d. 3;

³N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation.

115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe sh., d. 23

Breast cancer is the most common female oncopathology in the world. The main cause of mortality in patients – metastases. The current state of medicine allows curing the primary tumor, but often is not effective enough to control the development of metastatic disease. Of great importance in the implementation of metastatic cascade plays circulation and survival of tumor cells in the peripheral blood. In this article we have tried to summarize and present the data in the literature on the study of circulating tumor cells in patients with breast cancer.

Key words: breast cancer, circulating tumor cells, epithelial-mesenchymal transition, metastasis, predictive significance, prognosis, methods of identification and research.

[✉]lyullikalya@mail.ru

For citation: Nenahova Yu.N., Lyadov V.K., Poddubnaya I.V. Circulating tumor cell: biology, methods of isolation, clinical significance in breast cancer. Journal of Modern Oncology. 2016; 18 (3): 76–82.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) устойчиво занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости у женщин. При этом у 32% впервые заболевших женщин в нашей стране диагностируется III или IV стадия РМЖ [1]. Тактика лечения РМЖ определяется степенью распространенности опухолевого процесса, т.е. стадией заболевания. Стандартными клиническими показателями стадии РМЖ являются размер первичной опухоли, состояние регионарных лимфатических узлов и наличие или отсутствие отдаленных метастазов. Однако, по данным литературы, приблизительно у 25% пациенток с первично-локализованным РМЖ без поражения регионарных лимфоузлов после успешно проведенного лечения выявляются отдаленные метастазы. В то же время почти у 30% больных с первоначальными метаста-

зами в подмышечные лимфоузлы после окончания лечения отмечается длительный безрецидивный период [2, 3].

В настоящее время активно изучаются биологические подтипы РМЖ. Молекулярные особенности РМЖ широко используются в рутинной клинической практике для определения тактики лечения. Одним из предикторов метастатического поражения и неблагоприятного отдаленного прогноза являются циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК). В то же время применение ЦОК в рутинной клинической практике затруднено в связи с недостаточной точностью разработанных диагностических систем и гетерогенностью популяций ЦОК [4]. Поэтому представляются актуальным изучение количественного и качественного состава опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови больных РМЖ, а также отработка методологии их выявления.

Впервые инвазию опухолевыми клетками вен и лимфатических сосудов у больного базально-клеточным раком кожи обнаружил Tirsch в 1865 г. В 1869 г. T.Ashworth сообщил о наличии опухолевых клеток в сосудах больного, умершего от метастатического рака: «...клетки, похожие на клоны клеток из первичной опухоли, будучи выявленными в периферической крови, могут проливать некоторый свет на способ происхождения множественных опухолей, существующих в том же самом человеке» [5]. В последнее десятилетие получают бурное развитие новые методы идентификации, подсчета и фенотипирования циркулирующих в крови опухолевых клеток.

Биологические особенности ЦОК

ЦОК являются ключом к пониманию биологии метастазов и биологическим маркером нового поколения, позволяющим неинвазивно изучать эволюцию генотипа опухоли во время ее прогрессии, в том числе под влиянием проводимого лечения. ЦОК представляют собой гетерогенную популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло. С цитопатологической точки зрения под данным термином подразумевается наличие разных типов опухолевых клеток, таких как эпителиальные опухолевые клетки, мезенхимальные опухолевые клетки, клетки с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, стволовые клетки и опухолевые микроэмболы [6].

Описаны 2 пути попадания эпителиальных и мезенхимальных опухолевых клеток в кровотоки. Первый – пассивный, связанный с разрушением базальной мембраны. Вероятно, клетки, попадающие таким образом в кровотоки, погибают и не дают метастазов. Второй путь – активный. Он связан с таким явлением, как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП). ЭМП определяется как элемент метастатического процесса, во время которого происходят морфологические трансформации клеток, проявляющиеся изменением размера и формы клеток, наблюдаются плеоморфизм клеток и ядер, гиперхроматизация и гиперплоидность, а также отмечается увеличение их митотической активности. Считается, что ЦОК являются ключевым звеном метастатического каскада – биологического феномена, который начинается с процесса ЭМП [7].

Феномен ЭМП впервые описан Elisabeth Hay и соавт. в 1995 г., исследовавшими его на куриных эмбрионах [8]. После активации протоонкогенов (Src, Ras) и фазы инициации в эпителиальных клетках активируются «скрытые» эмбриональные программы ЭМП, в результате чего клетка постепенно теряет набор эпителиальных антигенов (панци-токератины) и приобретает мезенхимальные признаки (экспрессия виментина, гладкомышечного актина, фибронектина). ЭМП встречается как в физиологических условиях (эмбриональный морфогенез, разные виды воспаления, формирование фиброза), так и в ходе канцерогенеза. Клетки при ЭМП приобретают свойства злокачественности и реализуют их в процессе метастазирования. А сам феномен ЭМП оказывает влияние на формирование гетерогенности ЦОК, которой обусловлены трудности обнаружения и фенотипирования клеток [6].

Эпителиальные клетки в кровотоке имеют очень низкую выживаемость: более 85% из них погибают, превращаясь в апоптотические тельца. Этому способствуют гемодинамический стресс и взаимодействие с клетками иммунной системы. Для того чтобы эпителиальные клетки смогли выйти в кровотоки и выжить там, необходимо два условия:

- 1) наличие мезенхимальных свойств, которые позволяют клетке проникать через базальную мембрану и попадать в кровотоки;
- 2) активация антиапоптотической программы.

Клетки с мезенхимальным фенотипом, в свою очередь, способны выживать только в преметастатической нише, в качестве которой могут выступать ткани висцеральных органов, костный мозг и первичная опухоль (феномен метастазирования «в себя») [6].

Экспериментально было установлено, что ежедневно из 1 г опухолевой ткани может поступать в кровотоки от нескольких тысяч до 4 млн опухолевых клеток. При этом лишь

1 клетка из 40 может достигнуть преметастатической ниши и не более 0,01% клеток реализуются в макromетастаз [6]. Некоторые клетки сохраняют способность циркулировать в кровотоке в течение длительного времени. Так, солитарные злокачественные клетки обнаруживаются в крови больных РМЖ через 10 лет и более после завершения радикального лечения [9].

Основные методики идентификации ЦОК

Изучение феномена ЦОК затруднено разнообразием и недостаточной эффективностью применяемых методик, поскольку речь идет о выявлении единичных клеток в среде, насчитывающей миллиарды обычных клеток крови. Так, в 1 мл крови единичные циркулирующие раковые клетки окружены 10 млн лейкоцитов и 5 млрд эритроцитов. Соответственно, в 10 мл крови солитарные опухолевые клетки смешиваются со 100 млн лейкоцитов и 50 млрд эритроцитов. Однако обнаружение и идентификация в кровотоке ЦОК представляются очень непростой задачей не только из-за малого количества эпителиальных клеток, окруженных многочисленными клетками крови, но и из-за гетерогенности опухолевых клеток [9]. Экспериментальные доказательства гетерогенности опухоли с точки зрения метастатического потенциала были представлены I.Fidler и M.Kripke в 1977 г. [10].

Это обстоятельство требует использования методов идентификации, характеризующихся как исключительно высокой чувствительностью, так и высокой точностью и специфичностью. Наиболее распространенные на сегодняшний день иммунные и молекулярно-генетические методики выявления и анализа ЦОК высокочувствительны, однако недостаточно специфичны и не позволяют изучать морфологические особенности ЦОК [11].

Приступая к обсуждению методов выделения и оценки ЦОК, необходимо уточнить, чем эти клетки отличаются от обычных клеток крови. В настоящее время известно, что ЦОК в большинстве случаев несколько больше по размеру, чем обычные клетки крови [12], а также экспрессируют на своей поверхности эпителиальные молекулы клеточной адгезии (ЕpCAM). ЕpCAM является специфичным для опухолевых клеток маркером, поэтому исследователи чаще всего используют именно его для выявления ЦОК. При РМЖ в качестве маркеров ЦОК в крови могут применяться цитоцератин 19, эпителиальный муцин (MUC1 и MUC2) или маммаглобин [13]. Учитывая тот факт, что некоторые эпителиальные маркеры подавляются во время ЭМП, современные подходы к выделению ЦОК должны включать одновременное использование нескольких маркеров.

На сегодняшний день существует множество способов и технологий для выделения и обогащения ЦОК. Наиболее часто применяют: иммуномагнитные, фильтрационные (основанные на размере и других физических свойствах клеток) технологии, в которых используются портативные чипы и фильтрационные микроустройства.

Среди систем обнаружения ЦОК заметную роль играют методики, подразумевающие прямую визуализацию клеток, например: иммуноцитохимические методы, иммуномагнитная сепарация CellSearshR system, система Ariol, автоматическая цифровая микроскопия (FAST+ADM) и лазерная сканирующая цитометрия (MAINTRAC). Наиболее популярны в настоящее время: технология автоматической цифровой микроскопии (ADM) и массивное оптоволоконное сканирование (FAST). Использование FAST и ADM совместно помогает выявить очень редкие эпителиальные клетки из всего образца крови после предварительной обработки флуоресцентно-мечеными антителами к цитоцератинам. Другой метод обнаружения циркулирующих эпителиальных клеток из цельной крови – MAINTRAC – заключается в использовании сканирующей лазерной цитометрии образцов крови, окрашенных антителами против клеток, экспрессирующих ЕpCAM и не обладающих лейкоцитарным маркером CD45. Применяются молекулярные исследования, основанные на анализе нуклеиновых кислот, в том числе высокочувствительные методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, мультиплексные

обратно-транскриптные ПЦР-исследования. Разработан метод, основанный на обнаружении белка, высвобождаемого ЦОК, – EpiSpot. Фенотипирование и определение индивидуальных биологических характеристик клеток проводится после их идентификации [13].

Иммуномагнитные методы основаны на взаимодействии опухолевых клеток с антителами против маркеров ЦОК с конъюгированными магнитными частицами – CellSearch, Ariol и др. Многие исследователи при определении ЦОК в крови пациентов больных РМЖ использовали систему CellSearch® компании Veridex. Данная технология получила одобрение Управления по контролю за продуктами питания и медицинскими изделиями США (Food and Drug Administration, FDA) для выявления уровней ЦОК у пациентов с метастазами РМЖ, простаты, толстой кишки. Система позволяет выявить циркулирующие EPCAM(+), CD45(-) клетки. При использовании данной технологии образец крови помещается в аппарат, где обогащается магнитными частицами. Идентификация клеток осуществляется с помощью флюоресцентно-меченых к EPCAM антител, лейкоцитарному антигену CD45 и ядерному красителю DAPI. В результате реакции опухолевые клетки взаимодействуют с намагниченными к EPCAM (зеленая метка) и CD45 (красная метка) антителами. Далее под воздействием магнитного поля опухолевые клетки остаются на поверхности и автоматический счетчик считает количество клеток, исключая лейкоциты (CD45+). Таким образом, система позволяет не только отделить лейкоциты от циркулирующих эпителиальных клеток, но и подсчитать последние. По данным некоторых исследователей, чувствительность данного прибора составляет около 5 ЦОК на 7,5 мл крови. Подобный принцип работы реализован в еще одной системе под названием Ariol (Genetix) [13].

Перспективная с клинической точки зрения технология CTC-chip, основанная на микропроточной системе, позволяет с высокой специфичностью количественно определить наличие ЦОК в образце крови при помощи связывания клеток с антителами против EPCAM, которыми покрыты ячейки чипа. Через чип пускается образец крови в строго определенных условиях ламинарного течения. Авторы методики демонстрируют чувствительность 99% при анализе достаточно малых объемов крови (2–3 мл) [13].

Для обнаружения жизнеспособных клеток используется функциональный тест EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT). Жизнеспособность клеток считается очень важным признаком, поскольку эти клетки могут участвовать в образовании метастазов. Данная технология оценивает присутствие ЦОК на основе выделяемых ими белков в процессе 24–48-часового культивирования. Тест EPISPOT позволил впервые получить подтверждение клинической значимости жизнеспособных ЦОК при РМЖ [14].

Исследования, основанные на определении специфической для обнаружения жизнеспособных ЦОК матричной РНК также получили широкое распространение и рассматриваются как альтернатива иммунологическим исследованиям для идентификации ЦОК. Основанный на определении РНК коммерческий тест AdnaTest™ (AdnaGen) использует неколичественную обратно-транскриптную ПЦР для идентификации клеток, которые экспрессируют специфичные для опухолей транскрипты генов.

Метод разделения по градиенту плотности при помощи центрифугирования (Ficoll-Нураке GE Healthcare) и последующего выделения технологией OncoQuick также позволяет получить ЦОК, но образующиеся клеточные фракции не обладают достаточной степенью чистоты, поэтому разработка данного метода продолжается [13].

Наконец, довольно широко используются фильтрационные методики. В последние годы в мире внедряется основанная на вакуумной фильтрации технология выделения ЦОК по размеру (ISET), которая характеризуется как исключительно высокой чувствительностью, так и достаточной для оценки морфологии клеток специфичностью. Методика основана на фильтрации крови пациентов через мембрану с заданными размерами пор (ISET – Isolation by Size of Tumor cells). Впервые в мировой литературе методика выделения, а также дальнейшей иммуноморфологической и молекуляр-

но-генетической характеристики ЦОК ISET была описана коллективом авторов под руководством профессора P.Paterlini-Bréchet. Для анализа используется кровь пациентов в количестве от 1 до 10 мл, которая фильтруется через поликарбонатную мембрану с калиброванными цилиндрическими порами диаметром 8 мкм. После фильтрации мембрана высушивается, промывается и окрашивается. Окрашенные препараты анализируются врачом-цитологом с помощью светового микроскопа. Для установления злокачественной природы клетки требуется наличие не менее 4 из следующих 5 критериев: анизонуклеоз (отношение более 0,5), размер ядра более 16 мкм, нерегулярность ядерного контура, наличие клеточных комплексов, высокое нуклеарно-цитоплазматическое отношение. При отсутствии одного либо нескольких критериев клетка признается атипичной [15, 16].

ЦОК при РМЖ

В 1990-е годы было показано, что ЦОК в крови у больных ранним (N0) РМЖ обнаруживаются в 30% случаев, больных местно-распространенным (N+) раком – 36%, у больных метастатическим раком – в 70% случаев. Выявление клеток в периферической крови не зависит от возраста, менструальной функции, стадии, гистологического типа опухоли, уровня экспрессии рецепторов прогестерона, c-erbB2, p53 и Ki67. Было продемонстрировано, что ЦОК являются прогностическим маркером раннего рецидива. Содержание ЦОК в крови изменяется в зависимости от эффективности проводимой терапии (были изучены режимы CMF, FEC, оценена эффективность доцетаксела, тамоксифена, летрозоло). Получены данные, что оценка наличия/отсутствия ЦОК в крови может быть использована для мониторинга у больных, получающих системную химиотерапию. После завершения адъювантной химиотерапии в крови больных РМЖ I и II стадий в 30% определяются циркулирующие SK19(+) клетки. У этих больных риск рецидива оказался выше в 3,8 раза, а безрецидивный интервал короче – ожидаемая частота рецидива составила 70% [6, 17]. Рядом исследователей также было показано, что содержание ЦОК в периферической крови изменяется в зависимости от эффективности проводимой химио- или гормонотерапии. В работе N.Xenidis и соавт. изучали наличие ЦОК (экспрессирующих матричную РНК SK-19) у 119 больных ранним РМЖ на фоне применения адъювантной химиотерапии и гормонотерапии (тамоксифен) [18]. После завершения адъювантной химиотерапии у 22 (18,5%) человек определялись ЦОК, причем у 15 из них терапия тамоксифеном не привела к элиминации ЦОК. Из этих 15 ЦОК-положительных больных рецидив РМЖ возник у 7 (46,7%), тогда как среди 68 больных без ЦОК на обоих этапах лечения – только у 6 (8,8%). Персистенция ЦОК коррелировала с более низкой медианой безрецидивной и общей выживаемости. При многофакторном анализе выявлено, что обнаружение ЦОК во время лечения тамоксифеном ассоциировано с повышенным риском рецидива. В другом исследовании ЦОК в периферической крови определялись более чем у 1/2 больных распространенным РМЖ, а их количество изменялось в зависимости от эффективности проводимой химио- или гормонотерапии (были изучены схемы CMF, FEC, таксотер, тамоксифен, анастрозол) [19].

В 2004 г. M.Cristofanilli и соавт. провели основополагающее исследование у больных РМЖ. Было показано, что циркулирующие эпителиальные клетки, обнаруженные с помощью CellSearch, практически не встречались у здоровых женщин и у пациентов с доброкачественным заболеванием молочной железы. Был также установлен пороговый уровень ЦОК в крови, имеющий прогностическое значение при диссеминированном РМЖ. Больные диссеминированным РМЖ с количеством ЦОК менее 5 на 7,5 мл крови имели большую общую продолжительность жизни (18 и 10,1 мес) и более длительный безрецидивный интервал (7,0 и 2,7 мес) по сравнению с больными, у которых число ЦОК было больше [20]. J.Gafforio и соавт. было выполнено исследование ЦОК в периферической крови у больных РМЖ до начала химиотерапии, определена корреляция между выявленными опухолевыми клетками, экспрессией рецепторов к эстрогенам и статусом регионарных лимфатических узлов [21].

Результаты клинических исследований, посвященных анализу ЦОК при РМЖ				
Авторы, название работы	Год	Метод	Число больных, стадия заболевания	Результаты
Mikulová V., Cabiňáková M., Janatková I. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy	2014	AdnaGen AG	54, ранний РМЖ	ЦОК обнаружены у 31% первичных больных, у 7% больных ЦОК сохранялись после адъювантной терапии. Не выявлено корреляции между ЦОК и размером опухоли, гистологическим типом и рецепторным статусом
Aktas B., Kasimir-Bauer S., Müller V. Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients	2016	AdnaTest CellSearch	84, IV стадия	У 43% (36/84) женщин были обнаружены ЦОК методикой AdnaTest. У 53% (42/79) – с помощью CellSearch. Провели сравнение HER2/ER/PR в первичной опухоли, метастатических очагах и ЦОК. Обнаружение гиперэкспрессии HER2 в ЦОК является предиктором HER2-статуса метастазов. Сравнение статуса рецепторов эстрогена и прогестерона в ЦОК и образцах ткани требует дальнейшего изучения
Lu Y.J., Wang P., Wang X. The significant prognostic value of circulating tumor cells in triple-negative breast cancer: a meta-analysis	2016	Метаанализ	642, тройной негативный РМЖ	Выявление ЦОК у больных тройным негативным раком является неблагоприятным фактором прогноза заболевания
Li L., Liu Y., Zhang S. Detection of circulating tumor cells and its clinical value for different stages and various subtypes of breast cancer	2014	Immunomagnetic separation, immunofluorescent staining	240 – IV стадия, 26 – ранний РМЖ	ЦОК выявлены у 57,5% (138/240) больных метастатическим РМЖ, у 23,1% (6/26) – ранним РМЖ. В 99 случаях метастатического РМЖ экспрессия HER2 ЦОК и первичной опухолью отличались. Обнаружение актуально при наличии метастатического поражения костей, а также может быть предиктором рецидива заболевания при раннем РМЖ
Giuliano M., Giordano A. Circulating tumor cells as early predictors of metastatic spread in breast cancer patients with limited metastatic dissemination	2014	CellSearch	492, IV стадия	Уровень ЦОК $\geq$ 5 CTCs/7,5 мл ассоциировался с уменьшением времени до появления новых очагов, худшим прогнозом заболевания. ЦОК – ранний предиктор оценки метастатического потенциала
Alix-Panabieres C., Pantel K., Ramirez J.M. Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients	2014	EPISPOT	254, IV стадия	ЦОК обнаружены у 59% больных метастатическим РМЖ
Sawada T., Araki J., Yamashita T. Prognostic Impact of Circulating Tumor Cell Detected Using a Novel Fluidic Cell Microarray Chip System in Patients with Breast Cancer	2016	Fluidic cell microarray chip system, FCMC	20 здоровых пациенток, 22 больных РМЖ	Более высокий уровень обнаружения ЦОК в сравнении с методикой CellSearch

Российскими исследователями под руководством профессора С.А.Тюляндина показано, что ЦОК выявляются у 41,3% больных распространенным РМЖ в количестве не менее 1 клетки на 1 млн. Количество ЦОК не зависит от локализации и количества метастазов, а также от рецепторного статуса первичной опухоли молочной железы. ЦОК чаще выявляются у больных в менопаузе, чем в пременопаузе (47,8 и 26,7%, $p=0,044$). У больных инфильтративно-дольковым РМЖ ЦОК обнаруживаются достоверно чаще, чем у больных инфильтративно-протоковым РМЖ (69,2 и 31%, $p=0,02$) [22].

Особый интерес представляют работы по изучению ЦОК в крови на ранних стадиях рака. Обнаружение клеток у таких больных может привести к существенному изменению тактики лечения. S.Apostolaki и соавт. в 2007 г. проанализировали клиническое значение ЦОК у 214 больных операбельным РМЖ I–II стадии на фоне адъювантной химиотерапии. Элиминация ЦОК после адъювантной химиотерапии наблюдалась только у 30,2% больных. Обнаружение ЦОК после химиотерапии коррелировало с уменьшением безрецидивной выживаемости и служило независимым фактором неблагоприятного прогноза [23]. F.Bidard и соавт. провели исследование ЦОК у больных ранним РМЖ. Наличие одной и более ЦОК в 7,5 мл крови (по методике CellSearch) являлось независимым фактором неблагоприятного прогноза. Авторы отметили, что наиболее значимую прогностическую роль играет определение ЦОК до проведения неoadъювантной химиотерапии [24].

Интересны исследования по определению ЦОК в крови больных операбельным РМЖ в процессе неoadъювантной

химиотерапии. Наиболее крупные из них: GEPARQUINTO, GeparQuattro, REMAGUS02, Gunma Hospital, BEVERLY01, NEOAVA, NEOZOTAC, NEOALLTO [25].

В исследовании GeparQuattro получены данные, свидетельствующие о том, что современные схемы химиотерапии не могут обеспечить полную элиминацию ЦОК у больных операбельным раком. Было продемонстрировано, что частота определения ЦОК после проведения неoadъювантной химиотерапии снижается с 22 до 11%. Также отмечено уменьшение количества клеток в 7,5 мл на фоне проводимой химиотерапии. [26].

Вместе с тем выявление ЦОК в периферической крови больных РМЖ перед началом химиотерапии коррелирует как с безрецидивной, так и с общей продолжительностью жизни. O.Samaga и соавт. проанализировали значение ЦОК для оценки эффективности проводимой неoadъювантной химиотерапии у больных РМЖ. После проведения первых циклов химиотерапии ЦОК определялись у подавляющего большинства больных независимо от схемы лечения, тогда как количество ЦОК уменьшалось при добавлении схемы CMF (циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил). Плохой ответ опухоли коррелировал с ранним развитием рецидива [27].

Ни одно из исследований ЦОК в процессе неoadъювантной химиотерапии не показало корреляции со степенью патоморфологического ответа [25].

На протяжении 20 лет I.Alpers и B.Brandt изучали прогностическое значение HER2-положительных ЦОК у больных РМЖ, используя метод, основанный на градиенте плотно-

сти и иммуномагнитной сепарации с последующим проведением иммуноцитохимического анализа. Примерно у 50% больных РМЖ без макрометастазов было выявлено от 1 до 8 кластеров ЦОК, у первичных метастатических больных и женщин с инфильтративно-отечной формой рака HER2-положительные ЦОК обнаруживались в 100% случаев. Наличие и частота HER2-положительных ЦОК коррелировали с достоверным снижением безрецидивной и общей выживаемости. Авторы предположили существование вероятности того, что высокие уровни HER2-положительных ЦОК отражают активность опухоли и могут служить прогностическим фактором эффективности трастузумаба. Они показали статистически достоверную связь наличия HER-положительных ЦОК с большим размером опухоли (показатель pT), отрицательным статусом эстрогеновых рецепторов, более низкой степенью дифференцировки и инвазией лимфатических сосудов, отсутствие статистически значимых корреляций со статусом лимфоузлов (показатель pN), статусом рецепторов прогестерона и индексом пролиферации (Ki67). Наличие HER2-положительных ЦОК у больных РМЖ без метастазов может быть специфическим индикатором микрометастазов, выявление HER2-положительных ЦОК позволит проводить оценку статуса HER2 в режиме реального времени на протяжении всего клинического течения болезни [28].

Имеются сообщения о том, что у значительного процента больных с HER2-отрицательными первичными опухолями в процессе прогрессирования заболевания в сыворотке определяются высокие уровни HER2, что подтверждает возможность появления генной амплификации в ходе развития заболевания [29, 30].

Обнаружение микрометастазов в костном мозге и периферической крови у больных РМЖ достоверно коррелирует с меньшей безрецидивной и общей выживаемостью, а также

с ранним рецидивом, причем при увеличении содержания опухолевых клеток риск рецидива возрастает. Исследование ЦОК может способствовать обнаружению новых мишеней для таргетной терапии, а также мониторингу эффективности проводимой лекарственной терапии в режиме реального времени [31].

Результаты некоторых клинических исследований, посвященных анализу ЦОК при РМЖ, приведены в таблице.

Заключение

Клинические результаты анализа ЦОК у больных РМЖ в высокой степени зависят от использованной технологии. На сегодняшний день не существует единой стандартизированной методики анализа ЦОК. Наиболее часто применяются иммуномагнитные и иммунофлуоресцентные методики. Перспективны флуоресцентные методы выделения ЦОК и методика EPISPOT.

Наличие ЦОК в крови свидетельствует о приобретении опухолью принципиально новых качеств – инвазивности и способности к метастазированию. Мы считаем, что ЦОК – это не только ключ к пониманию биологии метастазов, но и прогностический и предиктивный онкомаркер нового поколения.

Выявление ЦОК при раннем РМЖ является независимым прогностическим фактором рецидива заболевания. ЦОК могут использоваться для мониторинга эффективности нео- и адъювантной терапии, являться маркером дискордантности первичной опухоли и возникающих в случае прогрессирования заболевания метастатических очагов.

Определение ЦОК при метастатическом РМЖ, возможно, вытеснит из клинической практики повторные инвазивные биопсии с целью верификации иммунофенотипа новых очагов заболевания, приведет к расширению возможностей использования таргетной терапии.

Литература/References

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. 2014. / Davydov M.I., Akse' E.M. Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2012 g. 2014. [in Russian]
2. Mirza AN, Mirza NG, Vlastos G et al. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 2002; 235: 10–26.
3. Fisher B, Anderson S, Bryant J et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1233–41.
4. Febm T, Solomayer EF, Meng S et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7 (2): 171–85.
5. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869; 14: 146–9.
6. Ковалев А.А., Грудинская Т.А., Кузнецова Т.П. и др. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток. *Онкология*. 2012; 14 (2): 126–9. / Kovalev AA, Grudinskaya TA, Kuznetsova TP. i dr. Geterogenost' tsirkuliruiushchikh opukholevykh kletok. *Onkologiya*. 2012; 14 (2): 126–9. [in Russian]
7. Пучинская М.В. Эпителиально-мезенхимальный переход в норме и патологии. *Арх. патологии*. 2015; 1: 75–83. / Puchinskaya MV. Epitelial'no-mezenchimal'nyi perekhod v norme i patologii. *Arkh. patologii*. 2015; 1: 75–83. [in Russian]
8. Hay ED. An overview of epithelial-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995; 154: 8–20.
9. Ковалев А.А. Циркулирующие опухолевые клетки. *Здоровье Украины*. 2012; июнь: 36–7. / Kovalev AA. Tsirkuliruiushchie opukholevy kletki. *Zdorov'e Ukrainy*. 2012; iun': 36–7. [in Russian]
10. Fidler I, Kripke M. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977; 197: 893–5.
11. Febm T, Solomayer E, Meng S. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7 (2): 171–85.
12. Vona G, Sabile A, Loubat M et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000; 156 (1): 57–63.
13. Зубцов Д.А., Зубцова Ж.И., Лавров А.В. и др. Циркулирующие опухолевые клетки при раке молочной железы (ЦОК): прогностическая значимость и методы выделения. *Труды МФТИ*. 2012; 4 (3): 18–26. / Zubtsov DA, Zubtsova Zh.I., Lavrov AV. i dr. Tsirkuliruiushchie opukholevy kletki pri rake molochnoi zhelezy (TSOK): prognosticheskaya znachimost' i metody vydeleniya. *Trudy MFTI*. 2012; 4 (3): 18–26. [in Russian]
14. Alix-Panabieres C. EPISPOT assay: detection of viable CTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res* 2012; 195: 69–76.
15. Лядов В.К., Скряпкина М.А., Попова О.П. Выделение циркулирующих в крови опухолевых клеток методом «изоляции по размеру» (ISET)» (обзор). *Вопр. онкологии*. 2014; 60 (5): 548–52. / Liadov V.K., Skrypnikova MA, Popova OP. Vydelenie tsirkuliruiushchikh v krovi opukholevykh kletok metodom «izoliatzii po razmeru» (ISET)» (obzor). *Vopr. onkologii*. 2014; 60 (5): 548–52. [in Russian]
16. Исмаилова Г., Laget S, Paterlini-Bréchet P. Диагностика циркулирующих опухолевых клеток с помощью технологии ISET и их молекулярная характеристика для жидкостной биопсии. *Клин. медицина Казахстана*. 2015; 1 (35): 15–20. / Ismailova G., Laget S, Paterlini-Bréchet P. Diagnostika tsirkuliruiushchikh opukholevykh kletok s pomoshch'yu tekhnologii ISET i ikh molekuliarnaya kharakteristika dlia zhidkostnoi biopsii. *Klin. meditsina Kazakhstana*. 2015; 1 (35): 15–20. [in Russian]
17. Бжадуг О.Б., Тулицын Н.Н., Тюляндин С.А. Значение выявления микрометастазов в крови и костном мозге у больных раком молочной железы. *Современная Онкология*. 2004; 6 (4): 149–54. / Bzbadug OB, Tupitsyn NN, Tyulandin SA. Znachenie vyivleniya mikrometastazov v krovi i kostnom mozge u bo'nykh rakom molochnoi zhelezy. *Journal of Modern Oncology*. 2004; 6 (4): 149–54. [in Russian]
18. Xenidis N, Markos V, Apostolaki S et al. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 10: 1623–31.

19. Smith BM, Slade MJ, English J et al. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol* 2000; 7: 1432–9.
20. Cristofanilli M, Budd G, Ellis M et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast. *Cancer Semin Oncol* 2006; 33: 9–14.
21. Gafforio JJ, Serrano MJ, Sanches-Rovira P et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 2003; 107 (6): 984–90.
22. Бжадуг О.Б., Гривцова Л.Ю., Тутицын Н.Н. и др. Циркулирующие опухолевые клетки в крови больных местно-распространенным и диссеминированным раком молочной железы. *Вестн. РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН*. 2007; 3: 19–22. / Bzbadug O.B., Grivtsova L.Yu., Tuptitsyn N.N. i dr. Tsirkuliruiuschie opukbolevye kletki v krovi bol'nykh mestno-rasprostranennym i disseminirovannym rakom molochnoi zhelezy. *Vestn. RONTs im. N.N.Blokhina RAMN*. 2007; 3: 19–22. [in Russian]
23. Apostolaki S, Perraki M, Pallis A et al. Circulating HER2 mRNA positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol* 2007; 18 (5): 851–8.
24. Bidard FC, Matiot C, Delaloge S et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 4 (2): 729–33.
25. Bidard FC, Proudbona C, Pierga J. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol* 2016; 10: 418–30.
26. Rietdorf S, Muller V, Zhang L et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring of breast cancer patient treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (9): 79–93.
27. Camara O, Rengsberger M, Egbe A et al. The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2007; 9: 1484–92.
28. Alpers I, Brandt B. Minimal Residual Disease (MRD) in cancer of solid tumors. *Haemopoiesis Immunology* 2007; 4: 14–37.
29. Meng S, Tripathy D, Sbeite S et al. HER2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (25): 9393–8.
30. Pestrin M, Bessi S, Galardi F et al. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118 (3): 523–30.
31. Alix-Panabières C, Muller V, Pantel K. Current status in human breast cancer micrometastasis. *Curr Opin Oncol* 2007; 6: 558–63.

Сведения об авторах

Ненахова Юлия Николаевна – аспирант каф. онкологии ФГБОУ ДПО РМАПО. E-mail: lyullikalya@mail.ru

Лядов Владимир Константинович – канд. мед. наук, зав. отд. онкологии хирургического профиля ФГАУ ЛРЦ, ассистент каф. онкологии ФГБОУ ДПО РМАПО

Поддубная Ирина Владимировна – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. онкологии ФГБОУ ДПО РМАПО, ФГБУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина