

Циркулирующие и диссеминированные опухолевые клетки как возможный фактор прогноза онкологических заболеваний

А.Д. Каприн¹, С.В. Зацаренко^{✉2}, С.А. Иванов², Л.Ю. Гривцова²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия;

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

Аннотация

Обоснование. Отдаленное метастазирование остается основной причиной гибели пациентов, несмотря на определенные успехи диагностики и лечения солидных опухолей. Это обосновывает актуальность изучения способов своевременной диагностики микрометастазов опухоли и роли опухолевых клеток, сохранившихся в периферической крови или диссеминированных по костному мозгу после лечения.

Цель. Обобщение данных, посвященных значимости и методологии определения циркулирующих в периферической крови и диссеминированных по костному мозгу опухолевых клеток при различных формах рака.

Материалы и методы. Проанализированы зарубежные и отечественные статьи по данной тематике, опубликованные в базах данных eLibrary, PubMed, Medline, Scopus.

Результаты. В литературном обзоре освещены современные методы определения, проанализирована значимость выявления циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток в качестве клинических предикторов для определенных нозологических форм рака.

Заключение. Оценка циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток может стать новым поколением скрининга и оценки эффективности терапии злокачественных опухолей. Однако необходима и актуальна отработка методологии их количественного и качественного выявления и методов оценки функциональной активности.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, диссеминированные опухолевые клетки, периферическая кровь, костный мозг, метастазирование, онкологические заболевания

Для цитирования: Каприн А.Д., Зацаренко С.В., Иванов С.А., Гривцова Л.Ю. Циркулирующие и диссеминированные опухолевые клетки как возможный фактор прогноза онкологических заболеваний. Современная Онкология. 2021; 23 (3): 490–495. DOI: 10.26442/18151434.2021.3.200945

Введение

Злокачественные опухоли – одна из самых значимых медицинских и социальных проблем в мире. Онкологические заболевания в России ежегодно уносят почти 300 тыс. жизней, а число заболевших за год приближается к 600 тыс. [1].

Более 100 лет изучается процесс метастазирования опухоли. С каждым годом диагностика и лечение пациентов с солидными опухолями достигают определенных успехов, несмотря на это, отдаленное метастазирование остается основной причиной гибели пациентов. После выхода из первичной опухоли часть опухолевых клеток оседает в костном мозге (КМ), создавая своеобразный опухолевый «резерв», сохраняющийся на протяжении длительного времени и опосредующий развитие отсроченных рецидивов болезни [2].

Факторы, определяющие длительность периода покоя диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) и развитие отдаленных метастазов, до конца не ясны. Диагностическое оборудование устанавливает наличие опухолевого узла, когда его диаметр уже превышает 3–5 мм. Поэтому на сегодняшний день является актуальным изучение способов своев-

ременной диагностики микрометастазов опухоли и роли опухолевых клеток, сохранившихся в периферической крови или единичных диссеминированных по КМ опухолевых клеток у онкологических больных после лечения.

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) и ДОК – это эпителиальные клетки, которые присутствуют у онкологических больных и определяются в минимальных количествах (1×10^{-6} – 1×10^{-8}) среди лейкоцитов (ЦОК) или миелокариоцитов (ДОК). Считается, что их наличие свидетельствует о гематогенной диссеминации опухоли [3]. Известно свойство гетерогенности ЦОК (экспрессия стволовых маркеров, маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, а также комбинация или отсутствие этих признаков), наличие рецепторов-мишеней таргетных препаратов (к примеру, HER2). Однако остается открытым вопрос о метастатических свойствах той или иной субпопуляции опухолевых клеток. Присутствие ЦОК и ДОК у радикально леченных больных относят к признакам резидуального рака, резистентного к проводимой терапии, для излечения которого необходима разработка новых эффективных методов. Выявление ЦОК и ДОК у нелеченных больных раком молочной

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]Зацаренко Светлана Валерьевна – науч. сотр. лаб. клинической иммунологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии». E-mail: vesper04@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6335-1401; SPIN-код: 7894-9405

Каприн Андрей Дмитриевич – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., ген. дир. ФГБУ «НМИЦ радиологии», дир. МНИОИ им. П.А. Герцена (филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»), гл. внештатный онколог Минздрава России. ORCID:0000-0001-8784-8415

Иванов Сергей Анатольевич – д-р мед. наук, проф. РАН, дир. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии». ORCID: 0000-0001-7689-6032

Гривцова Людмила Юрьевна – д-р биол. наук, зав. отд. лабораторной медицины МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии». E-mail: grivtsova@mail.ru; ORCID: 0000-0001-9103-9688; SPIN-код: 4423-6844

[✉]Svetlana V. Zatsarenko – Res. Officer, Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre. E-mail: vesper04@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6335-1401; SPIN code: 7894-9405

Andrei D. Kaprin – D. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS, National Medical Research Radiological Centre, Herzen Moscow Scientific Research Institute of Oncology – branch of the National Medical Research Center for Radiology. ORCID: 0000-0001-8784-8415

Sergei A. Ivanov – D. Sci. (Med.), Prof. RAS, Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre. ORCID: 0000-0001-7689-6032

Lyudmila Yu. Grivtsova – D. Sci. (Biol.), Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre. E-mail: grivtsova@mail.ru; ORCID: 0000-0001-9103-9688; SPIN code: 4423-6844

Circulating and disseminated tumor cells as a possible prognostic factor for oncological diseases

Andrei D. Kaprin¹, Svetlana V. Zatsarenko^{✉2}, Sergei A. Ivanov², Lyudmila Yu. Grivtsova²

¹National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia;

²Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russia

Abstract

Background. Distant metastasis remains the main cause of death for patients, despite some successes in the diagnosis and treatment of solid tumors. This demonstrates the significance to study the methods for the timely detection of tumor micrometastases and to find the role of tumor cells preserved in peripheral blood or disseminated tumor cells in bone marrow after the end of the treatment.

Aim. To generalize the data concerning the significance and methodology of the determining circulating tumor cells in peripheral blood and disseminated tumor cells in bone marrow in case of different types of cancer.

Materials and methods. Foreign and domestic articles concerning this topic, published in eLibrary, PubMed, Medline, Scopus databases have been analyzed.

Results. The literary review deals with the modern methods of determination, we have analyzed the importance of identification of circulating and disseminated tumor cells as the clinical predictors for specific nosological types of cancer.

Conclusion. The enumeration of circulating and disseminated tumor cells could be a new generation of screening and evaluation of the efficacy of cancer therapy. However, it is necessary and up to date to develop the methodology of their quantitative and qualitative identification and to find the methods for evaluating functional activity.

Keywords: circulating tumor cells, disseminated tumor cells, peripheral blood, bone marrow, metastasis, oncological diseases

For citation: Kaprin AD, Zatsarenko SV, Ivanov SA, Grivtsova LYu. Circulating and disseminated tumor cells as a possible prognostic factor for oncological diseases. *Journal of Modern Oncology*. 2021; 23 (3): 490–495. DOI: 10.26442/18151434.2021.3.200945

железы (ПМЖ), простаты, колоректальным раком (КРР) относят к неблагоприятным факторам прогноза. Современные исследования направлены на формирование доказательной базы для других нозологических форм рака. Для пациентов с солидными опухолями различных локализаций установлено, что ЦОК обнаруживаются в 20–45% случаев, частота выявления ДОК сопоставима и варьирует от 25 до 60% [4, 5]. В клинической практике определение ЦОК затруднительно по ряду причин: небольшое количество, гетерогенность популяции, недостаточная точность и специфичность диагностических тестов.

Методы определения ЦОК

Методы определения ЦОК представляют собой обширную панель технологий, способных определять различия в свойствах опухолевых и гемопоэтических клеток: физических (размер, плотность, деформируемость) и биологических (экспрессия белков на поверхности клеток, жизнеспособность). В настоящее время активно используются и разрабатываются иммуномагнитные, микропроточные, фильтрационные технологии [6].

Первой методикой определения ЦОК для клинического применения, которая получила одобрение Управления по контролю пищевых продуктов и лекарств в США, стала технология CellSearch (Janssen Diagnostics, Inc.). Методика полуавтоматическая и включает в себя иммунофлуоресценцию, иммуномагнитное разделение и проточную цитометрию. Метод изоляции ЦОК основан на применении антител против адгезивных молекул эпителиальных клеток. Образец периферической крови (7,5 мл) обогащается определенной фракцией клеток с использованием магнитных частиц. Определение ЦОК происходит с помощью антител к цитокератинам (СК8, СК18, СК19), лейкоцитарного антигена CD45, эпителиальной молекулы клеточной адгезии ЕpСAM и красителя клеточного ядра DAPI. В клинической практике методику разрешено применять при следующих локализациях злокачественных опухолей: ПМЖ, рак простаты и толстого кишечника.

Определены референсные значения для ПМЖ и рака простаты (<5 ЦОК в 7,5 мл крови), для КРР (<3 ЦОК); если уровень ЦОК выше, исследуемый образец положителен на на-

личие ЦОК [7]. Метод может быть легко стандартизован, однако существенным недостатком является высокая стоимость оборудования и расходных материалов.

Также применяют методы с использованием прямой визуализации клеток (иммуноцитохимия, иммуномагнитная сепарация CellSearch и Ariol, цифровая микроскопия ADM, оптоволоконное сканирование FAST и сканирующая лазерная цитометрия MAINTRAC).

Для более эффективного выявления редко встречающихся опухолевых клеток эпителиальной природы технологии FAST и ADM применяют совместно при анализе клеток крови, которые предварительно обработаны антителами к цитокератинам.

Лазерная цитометрия MAINTRAC выявляет ЦОК по экспрессии молекул ЕpСAM при отсутствии маркера CD45. Микропроточная система CTC-chip обладает высокой чувствительностью по улавливанию ЦОК из ламинарного потока крови, проходящей через чип с антителами к молекуле ЕpСAM. Метод применим для небольших объемов крови (2–3 мл) и считается высокочувствительным. Также отличается высокой чувствительностью метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на анализе нуклеиновых кислот для молекулярных исследований ЦОК. Анализ экспрессии генов в ЦОК важен и может не только установить наличие опухолевых клеток в крови, но и определить тип опухоли. Оценка уровня экспрессии нескольких генов увеличивает специфичность и чувствительность метода.

Используя фильтрационную методику ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells), ЦОК можно выделить при вакуумной фильтрации периферической крови через мембрану с известными размерами пор. Метод высокочувствителен и специфичен при оценке морфологии клеток [8]. Достаточно перспективным в отношении выявления ЦОК представляется использование проточной цитометрии, которая позволяет не только проводить оценку их количества, но и оценивать качественный состав, выявлять дополнительные мишени для молекулярно-прицельной терапии [9]. Данная методика отработана и реализована в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» (руководитель Н.Н. Тупицын).

ЦОК при раке молочной железы

Многочисленные исследования посвящены прогностической способности ЦОК у пациенток с метастатическим РМЖ. Отмечено, что ЦОК почти не идентифицировали у здоровых женщин и при доброкачественных новообразованиях. М. Cristofanilli и соавт. показали, что пороговый уровень 5 ЦОК в 7,5 мл периферической крови является независимым прогностическим фактором общей (ОВ) и безрецидивной выживаемости [10]. Подобные результаты получены и в других исследованиях как при ранних, так и при метастатических формах РМЖ [11].

Исследование GeparQuattro, посвященное прогностическому значению ЦОК при местно-распространенном РМЖ для пациентов после неoadъювантной химиотерапии (ХТ), показало снижение частоты обнаружения ЦОК с 22 до 11% ($p=0,002$), а также снижение среднего количества опухолевых клеток. Корреляции между наличием и изменением числа ЦОК и клиническими характеристиками, а также первичным ответом опухоли на неoadъювантную терапию не обнаружено. Но у 11 (8%) из 133 пациентов после терапии отмечено появление ЦОК, хотя до нее клетки отсутствовали [12]. Однако наличие ЦОК коррелировало с показателями ОВ после неoadъювантной терапии. Исследователи отмечают, что обнаружение и характеристика ЦОК поможет лучше понять влияние неoadъювантной ХТ на распространение опухолевых клеток, что может значительно улучшить стратегию лечения.

T. Fehm и соавт. при участии 9 немецких университетских центров РМЖ провели проспективное исследование 254 пациенток с метастатическим РМЖ. Цель данного исследования состояла в том, чтобы определить HER2-статус ЦОК, используя методику CellSearch и AdnaTest Breast Cancer (высокоспецифичную иммуномагнитную систему). По результатам CellSearch определили, что 122 (50%) из 245 пациенток имели ≥ 5 ЦОК, и HER2-положительные ЦОК наблюдались у 50 (41%) из них. Аналогичные данные получены при использовании второй методики. Частота больных РМЖ с HER2-негативными первичными опухолями, но HER2-положительными ЦОК составила 32% (25 из 78) и 49% (28 из 57) по результатам 2 анализов соответственно. Можно предположить, что у пациентов с HER2-негативными первичными опухолями развиваются HER2-положительные ЦОК во время прогрессирования заболевания. Мониторинг экспрессии HER2 на ЦОК может быть полезен при исследованиях ответа на HER2-таргетную терапию [13].

В ретроспективном объединенном анализе данных 2436 пациенток с метастатическим РМЖ, проведенном М. Cristofanilli и соавт., изучали прогностическую способность ЦОК для стратификации пациентов с IV стадией заболевания. Пороговое значение 5 ЦОК на 7,5 мл крови использовали для стратификации пациентов, также принимая во внимание молекулярные подтипы, локализацию заболевания и предшествующее лечение. Все пациенты, уровень ЦОК которых был ниже порогового, имели более высокую медиану ОВ (36,3 мес против 16,0 мес, $p<0,0001$), аналогично для пациентов de novo (41,4 мес против 18,7 мес, $p<0,0001$) и пациентов с разными подтипами заболевания [14]. Исследование подтверждает прогностическую ценность уровня ЦОК.

В проспективном исследовании ФГБНУ «Томский НИМЦ» принимали участие 47 пациенток с первичным инвазивным РМЖ. Наличие ЦОК определяли с помощью проточного цитофлуориметра BDFACSCanto и моноклональных антител к CD45, CD44, CD24, EpCam, N-Cadherin. Выделено 6 разных фенотипов ЦОК. Значимое снижение 5-летней безметастатической выживаемости ($p<0,05$) наблюдалось в группах пациенток, у которых ЦОК обнаружены до лечения и имели следующие фенотипы: EpCam+CD45-CD44-CD24-Ncadherin+, EpCam+CD45-CD44+CD24-Ncadherin+, EpCam(m)-CD45-CD44+CD24-Ncadherin+, т.е. ЦОК с признаками эпителиально-мезенхимального перехода с маркерами, свойственными стволовым клеткам, или без них. Циркулирующие клетки с подобным фенотипом могут ис-

пользоваться для оценки риска гематогенного метастазирования, а также служить мишенью при подборе индивидуальной схемы терапии [15].

При проспективном исследовании клинико-морфологических характеристик пациенток с местно-распространенным и первично-операбельным РМЖ ЦОК выявлялись примерно с одинаковой частотой у 23 (88,5%) из 26 и 17 (81,0%) из 21 пациенток соответственно. Показатели безрецидивной выживаемости в группе с местно-распространенным РМЖ с позитивным статусом ЦОК были хуже, чем в группе с отрицательным статусом, однако разница между группами оказалась статистически незначима. У больных с положительным статусом ЦОК проанализирована степень злокачественности опухоли G2 (72,3%) и G3 (27,6%), отмечена тенденция к увеличению опухолей со степенью злокачественности G2. Оказалось, что у больных с люминарным В HER2-негативным подтипом ЦОК выявлялись значимо чаще ($p=0,05$), чем у больных с другими молекулярно-биологическими подтипами, что может позволить использование выявления ЦОК в качестве дополнительного критерия риск-стратификации больных при РМЖ [16].

ЦОК при раке предстательной железы

В исследовании ЦОК методикой CellSearch D. Danila и соавт. выявили более 5 ЦОК у 57% из 120 пациентов с метастатическим раком предстательной железы (РПЖ). Больше количество ЦОК зарегистрировано у первичных пациентов с метастазами в кость, чем в мягкие ткани. После проведения ХТ отмечено, что ОВ значимо выше у пациентов, чей уровень ЦОК составил менее 5 клеток в 7,5 мл периферической крови [17].

В работе F. Resel и соавт. также отмечено значимое снижение ОВ и выживаемости без прогрессирования – ВБП (безрецидивной выживаемости) при превышении порогового уровня ЦОК (более 4 клеток) у 30 пациентов с локализованным (местно-распространенным) и 30 пациентов с метастатическим гормоночувствительным РПЖ. Обнаружена значимая положительная корреляция между уровнем ЦОК и маркерами опухолевой нагрузки (простат-специфический антиген, стадии T, N, M; $p<0,001$) за исключением показателя Глисона [18]. Таким образом, в случае рака простаты определение уровня ЦОК может быть рассмотрено в качестве индивидуального фактора при определении схемы лечения пациента и иметь значение при оценке прогноза метастатического гормоночувствительного РПЖ.

W. Cieřlikowski и соавт. провели межгрупповое сравнение количества ЦОК системами CellSearch, EPISPOT и GILUPI CellCollector (устройства для обнаружения ЦОК in vivo) для 104 пациентов: 19 – с метастатическим и 85 – местно-распространенным РПЖ. С помощью системы CellSearch установлено значительно более высокое количество ЦОК по сравнению с другими методиками. Показатель ≥ 4 ЦОК был чувствительным предиктором метастатической болезни [чувствительность 0,500; специфичность 0,900; AUC (95% доверительный интервал) 0,760 (0,613–0,908)]. При включении клинических данных пациента (уровень простат-специфического антигена в сыворотке, балл по Глисона, клиническая стадия) получены следующие показатели: чувствительность 0,611, специфичность 0,971, AUC (95% доверительный интервал) 0,901 (0,810–0,993). Эти результаты позволяют предположить, что большое количество ЦОК может способствовать идентификации пациентов с высоким риском метастатического поражения на момент постановки диагноза [19].

ЦОК при колоректальном раке

В проспективном многоцентровом исследовании S. Cohen и соавт. у 430 пациентов с метастатическим КРП методом CellSearch определен порог неблагоприятного прогноза >3 ЦОК в 7,5 мл периферической крови. ЦОК определяли до лечения, а также после 1, 2 и 3-го курсов терапии. Выявлено, что медианы ОВ и ВБП значимо ниже для пациентов с

неблагоприятным прогнозом [20]. К подобному выводу пришли J. Toi и соавт. после обследования 467 пациентов, у которых определяли исходный уровень ЦОК и их количество в разные моменты времени во время лечения. У 29% пациентов с исходно высоким уровнем ЦОК (3 и более в 7,5 мл крови) наблюдались значительно сниженные ВБП и ОВ. Во время лечения разница оставалась статистически значимой. Контроль уровня ЦОК до и во время лечения позволяет прогнозировать ВБП и ОВ у пациентов с распространенным КРР, получавших ХТ и таргетные агенты [21].

К выводу, что наличие ЦОК в крови может стать многообещающим биомаркером диагностики, мониторинга и прогнозирования выживаемости при КРР, пришли Y. Tan и соавт. после проведенного метаанализа, включавшего 15 опубликованных исследований с участием 3129 пациентов. Анализ разных подгрупп, которые отличались методикой обнаружения ЦОК, средним временем наблюдения, пороговым значением, показал, что у ЦОК-положительных пациентов снижена ОВ и наблюдалось прогрессирование заболевания [22].

Исследование ЦОК при раке других локализаций

M. Krebs и соавт., используя систему CellSearch, провели исследование по определению прогностической значимости ЦОК при немелкоклеточном раке легкого – НМРЛ (III–IV стадии). У 101 пациента определяли исходный уровень опухолевых клеток и уровень после 1-го цикла стандартной ХТ. Наибольшее количество ЦОК обнаружено у пациентов с IV стадией заболевания (0–146), при IIIВ стадии (0–3), при IIIА стадии ЦОК не обнаружено. ВБП и ОВ значительно снижались у пациентов с уровнем ЦОК больше 5 на 7,5 мл крови [23].

ЦОК при раке яичников (РЯ) исследованы A. Poveda и соавт. с применением CellSearch у 216 пациентов. Референсный диапазон составил <2 ЦОК в 7,5 мл крови. В группе с превышением выбранного диапазона наблюдали статистически значимое снижение ВБП и ОВ. Присутствие опухолевых клеток EpCAM+ в крови можно рассматривать в качестве неблагоприятного прогноза. Предполагается, что малое число пациентов с наличием ЦОК обусловлено тем, что метастазирование не является гематогенным. Возможно, в данном случае снижена экспрессия маркера EpCAM (или он потерян) при эпителиально-мезенхимальном переходе [24]. Это обосновывает необходимость поиска других, более чувствительных подходов для выявления опухолевых клеток при РЯ.

В проспективном исследовании пациентов с меланомой L. Khoja и соавт. установили, что ОВ значимо снижается при превышении порогового уровня ЦОК, который составил 2 на 7,5 мл крови [25].

K. Gorges и соавт. пытались преодолеть такое непростое препятствие, как гетерогенность меланомы, при разработке биомаркеров прогнозирования и мониторинга терапии, используя комбинированный анализ количества ЦОК и циркулирующей опухолевой ДНК. Мутации в генах *BRAF*, *NRAS* первичной опухоли обнаружены в ЦОК и циркулирующих опухолевых ДНК в 47,6–70,6% всех случаев. Частные мутации, которые не обнаружены в первичной опухоли одного и того же пациента, обнаружены в ЦОК и циркулирующих опухолевых ДНК в 29,4–52,4% всех образцов. Исследование продемонстрировало преимущество такого анализа, который предоставляет комплексную информацию, включающую данные по количеству ЦОК и данные о мутационном статусе помимо биомаркеров LDH, S100 и прогнозирования опухолевой нагрузки. Такой прогностический подход может помочь персонализировать таргетную терапию и иммунотерапию для пациентов с меланомой [26].

Представленные исследования демонстрируют, что ЦОК являются независимым прогностическим фактором эффективности проводимой терапии, прогноза ОВ и ВБП. Также показано, что уровень ЦОК – специфичный и чувствительный показатель опухолевой гематогенной диссеминации.

Большинство имеющихся исследований демонстрируют различия количества ЦОК в качестве критерия прогноза.

Дальнейшие исследования повышения значимости ЦОК в качестве критерия прогноза должны быть направлены на оценку их жизнеспособности, изучение механизмов эпителиально-мезенхимального перехода (при котором происходит частичная или полная потеря эпителиального фенотипа), а также мезенхимально-эпителиального транзита. Необходима оценка возможных отличий мембранного профиля ЦОК от фенотипа клеток первичной опухоли и метастатических очагов. Это обосновано исследованиями пациентов с НМРЛ [27] и карциномой уротелия [28], в которых продемонстрирована важность экспрессии PDL1 на ЦОК, отличающая их от первичной опухоли. Подобные исследования открывают новые возможности проведения иммунотерапии с целью эрадикации минимального рака. Также в контексте ЦОК важно детальное изучение их иммунофенотипа и оценка возможной пропорции опухолевых стволовых клеток в пределах данной популяции.

Методы определения ДОК

Исследование ДОК возможно несколькими методами – иммуногистохимии, флуоресцентной микроскопии, однако приоритетным можно обозначить многоцветную проточную цитометрию высокого разрешения. Наиболее важное открытие в исследовании метастазов – доказательство распространения опухолевых клеток с так называемой стадии *in situ*, задолго до обнаружения первичной опухоли. От 10 до 20% всех случаев диссеминированного рака – это опухоли без выявленного первичного очага, где метастатическое поражение обнаруживается до первичной опухоли, которая иногда остается невыявленной.

В исследовании протоковой карциномы РМЖ *in situ* [29] продемонстрировано, что у 21% больных выявлены ДОК, а при микроинвазии частота таких случаев возрастает до 57%. Исследования на большем клиническом материале подтвердили данную тенденцию [30].

Однако очень важным моментом является контроль чистоты образца КМ, т.е. отсутствие разбавления образца клетками периферической крови, что соблюдается при условии набора не более 1 мл КМ. Также возможна поправка на гемодилуцию на основании способа, предложенного M. Loken и адаптированного в России [31].

При исследовании ДОК и ЦОК оценка их жизнеспособности и функциональной активности является одним из важных моментов, поскольку только жизнеспособные клетки способны к дальнейшему метастазированию. Метод EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT), разработанный C. Alix-Panabieres (Франция), идентифицирует ЦОК и ДОК по секретиремым опухолеспецифическим белкам и определяет жизнеспособность клеток. При помощи специальной мембраны, покрытой антителами, опухолевые клетки обогащаются негативной селекцией, с удалением гемопоэтических клеток. Далее с помощью флуоресцентно меченных антител происходит детекция секретиремых белков.

Часто для определения ДОК в КМ используется метод ПЦР. Чувствительность ПЦР при выявлении опухолевых клеток составляет 1 на 10^5 – 10^6 нормальных клеток КМ. Обнаружение в образцах тканей заданной матричной РНК производится модифицированным методом ПЦР с обратной транскрипцией. Выявление матричной РНК опухолевых антигенов (цитокератина, маммоглобина, ракового эмбрионального антигена), экспрессируемых опухолевыми клетками, свидетельствует о присутствии опухолевых клеток в крови и КМ [32].

Методика определения ДОК на высокоскоростном проточном цитофлуориметре Attun отработана в ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина». Клетки опухолевой линии РМЖ MCF-7 добавлены в пробы нормального КМ и четко определялись с помощью антител CD326PE/CD45FITC. Также показана возможность определения ДОК после обогащения магнитными частицами с анти-CD326 (MylytenyiBiotech, USA). Про-

точная цитофлуориметрия применена для детекции ДОК в КМ 65 пациенток с операбельным РМЖ (в 23% случаев выявлены ДОК). Авторы рекомендуют проводить оценку качественного состава КМ (миелограмма, клеточность) при каждом исследовании [33]. Применяя подобную методику, исследован КМ 38 первичных больных РМЖ. Единичные эпителиальные клетки обнаружены у 92,1%, микрометастазы – у 28,9%. Авторами обращается внимание, что большей чувствительностью для детекции ДОК и определения степени гематогенной диссеминации при РМЖ обладает проточная цитофлуориметрия, чем морфологические методы [34].

ДОК при раке молочной железы, желудка и яичников

Наличие ДОК в КМ при солидных опухолях изучается по нескольким направлениям – в качестве фактора прогноза рецидива и продолжительности жизни, а также потенциального маркера, позволяющего оценить эффективность проводимой терапии. Начинаясь изучение ДОК КМ, как и в случае с ЦОК, с анализа их количества и клинической значимости при РМЖ.

Результаты анализа данных 4703 пациенток из 9 исследований, подтверждающие связь между наличием микрометастазов в КМ во время диагностики РМЖ и плохим прогнозом, опубликованы S. Braun и соавт. в 2005 г. [35]. Одним из недостатков данной работы является большой объем образца КМ (более 1 мл). G. Gebauer и соавт. изучали аспираты КМ у 393 пациенток с РМЖ во время первичной операции методом иммуноцитохимического окрашивания эпителиальных клеток. ДОК детектировали у 166 пациенток. Многофакторное моделирование выявило, что присутствие ДОК в КМ коррелировало с неблагоприятным прогнозом (особенно это касается пациенток с метастазами в регионарные лимфатические узлы). Но наличие ДОК не является достаточным параметром для прогнозирования метастазирования. Установлено, что после 5-летнего наблюдения 65% пациенток, у которых обнаружены микрометастазы в КМ на момент постановки диагноза, живы без признаков прогрессирования, т.е. диссеминация процесса в КМ в период первичного оперативного лечения не обязательно приводит к развитию отдаленных метастазов [36].

В результате анализа КМ 726 пациенток с диагнозом РМЖ в университетских клиниках Осло, Мюнхена и Тюбингена (интервал наблюдения составил 31,7 мес после первичной диагностики РМЖ) микрометастазы в КМ обнаружены в 15,4% случаев ($n=112$). Безрецидивная и ОВ пациенток без микрометастазов составила 164 и 166 мес, а при их наличии – 105 и 103 мес ($p<0,0001$). Сохранение ДОК после первичного лечения может стать показанием для назначения длительной адъювантной терапии. До сих пор клиническое значение обнаружения ДОК при солидных опухолях, в частности при РМЖ, не подтверждено [37]. Выявление ДОК в КМ является одним из важнейших подходов для ранней диагностики метастазирования и улучшения результатов лечения РМЖ.

В ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова» (Республика Беларусь) с 2008 по 2014 г. проведено исследование адъювантной ХТ больных операбельным РМЖ промежуточной и высокой групп риска с микрометастазами в КМ (290 пациенток с I–III стадиями РМЖ). Трехлетняя безрецидивная выживаемость составила 88,7% (КМ не поражен), 69,3% (КМ поражен); $p<0,01$. ОВ составила 90,9%, а именно 96,4% (КМ не поражен), 79,7% (КМ поражен); $p=0,006$. Результаты исследования позволили считать наличие ДОК в КМ неблагоприятным прогностическим признаком. Разработан метод адъювантной ХТ с использованием паклитаксела отечественного производства. В результате его применения у пациенток с исходно пораженным КМ 3-летняя безрецидивная выживаемость практически перестала отличаться от группы пациенток с непораженным КМ: 81,6 и 88,7% ($p=0,29$) [32].

Следует отметить, что факт поражения КМ при РМЖ внесен в клинические рекомендации некоммерческим альянсом ведущих центров лечения рака NCCN с 2010 г. Определена

новая стадия заболевания M0 (i+), отражающая наличие микрометастазов, в том числе и в случае обнаружения опухолевых клеток в КМ или циркулирующей крови пациентов без признаков метастазирования [38].

При исследовании клинического значения определения ДОК в КМ при раке желудка китайскими учеными сделан вывод, что присутствие ДОК свидетельствует о плохом прогнозе. Также обнаружена значимая корреляция количества ДОК и стадии TNM ($p=0,038$). Корреляция с полом, возрастом, гистологической дифференцировкой и наличием метастазов в лимфатических узлах не выявлена [39].

Показана клиническая значимость оценки ДОК КМ при РЯ. Обнаружение ДОК можно считать неблагоприятным прогностическим признаком, при 3-летнем наблюдении показатели ОВ при наличии ДОК были значимо более низкими, чем при их отсутствии ($p=0,02$) [3].

При изучении 62 образцов КМ пациенток с НМРЛ ДОК детектировали в 43,5% случаев (в том числе при локализованном процессе). Частота обнаружения ДОК коррелировала со степенью дифференцирования опухоли. Корреляции с размером опухоли, статусом лимфоузлов, стадией опухолевого процесса не выявлено. ДОК выявляли методами проточной цитофлуориметрии (FACSCanto II) по экспрессии EPCAM или KL-1 и отсутствию экспрессии CD45 среди 20 млн миелокариоцитов (положительный случай – 1 ДОК на 10 млн миелокариоцитов) [40].

Наличие ДОК характеризует уровень поражения КМ во время диагностики и после лечения онкологического заболевания, что может быть полезным для уточнения степени диссеминации опухолевого процесса, а также в качестве маркера ответа на лечение. Это подтверждает целесообразность изучения КМ в качестве информативного диагностического органа.

Заключение

Представленный обзор наглядно демонстрирует необходимость более детального изучения ЦОК и ДОК у пациентов с различными нозологическими формами. Наличие опухолевых клеток в периферической крови и КМ после лечения ассоциируется с неблагоприятным отдаленным прогнозом (меньшими безрецидивной и ОВ), является одним из независимых критериев эффективности проводимой терапии, а также предиктором метастатического поражения. Клиническое значение ЦОК и ДОК при ряде форм опухолей еще окончательно не установлено. Также отсутствуют стандартизованные подходы количественной оценки единичных опухолевых клеток, что делает сложным контроль эффективности воздействия на микрометастазы лекарственной терапии. Некоторые свойства опухолевых клеток существенно затрудняют их идентификацию и выделение: малочисленность, гетерогенность, способность метастатических диссеминированных клеток оставаться «дремлющими» неопределенное время и возобновлять пролиферацию после различных сроков, устойчивости к ХТ, пластичность, т.е. способность к эпителиально-мезенхимальному и обратному переходам. Поэтому для современных клинических исследований актуальна отработка методологии выявления опухолевых клеток, циркулирующих в периферической крови и оседающих в КМ, в качестве маркеров прогноза. Важнейшей задачей является разработка высокоточных методик и расширение панели маркеров для идентификации, обогащения и характеристики ЦОК и ДОК.

Зарубежный и отечественный опыт свидетельствует, что ЦОК являются признаками прогрессирования опухолевого процесса, а выявление клеток опухоли в КМ может служить признаком ранней диссеминации. Методичная стандартизованная оценка ДОК в будущем, возможно, изменит подходы к стадированию некоторых видов рака. Идентификацию ЦОК и ДОК следует отнести к новому поколению методов скрининга и мониторинга злокачественных опухолей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Тюляндин С.А., Жуков Н.В. Правда о российской онкологии: проблемы и возможные решения. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии». М., 2018 [Tyulyandin SA, Zhukov NV. The truth about Russian oncology: problems and possible solutions. All-Russian public organization "Russian Society of Clinical Oncology". Moscow, 2018 (in Russian)].
- Шляхтунов Е.А. Минимальная остаточная болезнь при солидных опухолях – современное состояние проблемы. *Новости хирургии*. 2014;22(6):735–42 [Shlyakhtunov EA. Minimal residual disease in solid tumors is the current state of the problem. *Novosti khirurgii*. 2014;22(6):735–42 (in Russian)].
- Тупицын Н.Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников. *Онкогинекология*. 2013;1:12–8 [Tupitsyn NN. Circulating and disseminated cancer cells in breast and ovarian cancer. *Onkogineko-logiia*. 2013;1:12–8 (in Russian)].
- Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(6):339–51. DOI:10.1038/nrclinonc.2009.44
- Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating Tumor cells and circulating tumor DNA. *Ann Rev Med*. 2012;63:199–215. DOI:10.1146/annurev-med-062310-094219
- Али́кс Панабье́рес Е., Пантел К. Циркулирующие опухолевые клетки: жидкостная биопсия рака. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014;59(4):60–4 [Alix-Panabieres C, Pantel K. The circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Klinicheskaya laboratornaia diagnostika*. 2014;59(4):60–4 (in Russian)].
- Кит О.И., Новикова И.А., Никипелова Е.А., и др. Циркулирующие опухолевые клетки как высокоспецифичный прогностический фактор. Обзор литературы. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014;12(2):252–7 [Kit OI, Novikova IA, Nikipelova EA, et al. Circulating tumor cells as a highly specific prognostic factor. Literature review. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy*. 2014;12(2):252–7 (in Russian)].
- 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 [Nenakhova YuN, Lyadov VK, Poddubnaya IV. Circulating tumor cells: biology, isolation methods, clinical significance in breast cancer. *Journal of Modern Oncology*. 2016;18(3):76–82 (in Russian)].
- Бжадуг О.Б., Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н., и др. Циркулирующие опухолевые клетки в крови больных местнораспространенным и диссеминированным раком молочной железы. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2007;18(2):19–22 [Bzhadug OB, Grivtsova LYu, Tupitsyn NN, et al. Circulating tumor cells in the blood of patients with locally advanced and disseminated breast cancer. *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS*. 2007;18(2):19–22 (in Russian)].
- Cristofanilli M, Budd G, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:781–91. DOI:10.1056/NEJMoa040766
- Zhang L, Riethdorf S, Wu G, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5701–10. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-1587
- Riethdorf S, Muller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro Trial. *Clin Cancer Res*. 2010;16(9):2634–45. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-09-2042
- Fehm T, Müller V, Aktas B, et al. HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124:403–12. DOI:10.1007/s10549-010-1163-x
- Cristofanilli M, Pierga JY, Reuben J, et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;134:39–45. DOI:10.1016/j.critrevonc.2018.12.004
- Кайгородова Е.В., Тарабановская Н.А., Суркова П.В., и др. Наличие в крови различных популяций циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы до лечения: связь с пятилетней безметастатической выживаемостью. *Сибирский онкологический журнал*. 2020;19(6):57–65 [Kaigorodova EV, Tarabanovskaya NA, Surkova PV, et al. The presence of various populations of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients before treatment: association with five-year metastasis-free survival. *Siberian Journal of Oncology*. 2020;19(6):57–65 (in Russian)]. DOI:10.21294/1814-4861-2020-19-6-57-65
- Пономарев В.Е. Значение поражения лимфатических узлов и наличия циркулирующих опухолевых клеток при первично-операльном раке молочной железы: дис. ... канд. мед. наук. М., 2020. Режим доступа: <https://www.ronc.ru/>. Ссылка активна на 15.08.2020 [Ponomarev VE. Znachenie porazheniia limfaticheskikh uzlov i nalichii tsirkuliruiushchikh opukholevykh kletok pri pervichno-operabel'nom rake molochnoi zhelezy: dis. ... kand. med. nauk. Moscow, 2020. Available at: <https://www.ronc.ru/>. Accessed: 15.08.2020 (in Russian)].
- Danila DC, Heller G, Gignac GA, et al. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7053–58. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-1506
- Resel FL, San JML, Galante RI, et al. Prognostic significance of circulating tumor cell count in patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *Urology*. 2012;80(6):1328–32. DOI:10.1016/j.urology.2012.09.001
- Cieślakowski WA, Budna-Tukan J, Świerczewska M, et al. Circulating Tumor Cells as a Marker of Disseminated Disease in Patients with Newly Diagnosed High-Risk Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):160. DOI:10.3390/cancers12010160
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(19):3213–21. DOI:10.1200/JCO.2007.15.8923
- Tol J, Koopman M, Miller MC, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol*. 2010;21(15):1006–12. DOI:10.1093/annonc/mdp463
- Tan Y, Wu H. The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Curr Probl Cancer*. 2018;42(1):95–106. DOI:10.1016/j.currprobcancer.2017.11.002
- Krebs MG, Sloane R, Pries L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(12):1556–63. DOI:10.1200/JCO.2010.28.7045
- Poveda A, Kaye SB, McCormack R, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011;122(3):567–72. DOI:10.1016/j.ygyno.2011.05.028
- Khoja L, Lorigan P, Zhou C, et al. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013;133(6):1582–90. DOI:10.1038/jid.2012.468
- Gorges K, Wiltfang L, Gorges TM, et al. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11):1685. DOI:10.3390/cancers11111685
- Guibert N, Delaunay M, Lusque A, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer*. 2018;120:108–12. DOI:10.1016/j.lungcan.2018.04.001
- Bergmann S, Coym A, Ott L, et al. Evaluation of PD-L1 expression on circulating tumor cells (CTCs) in patients with advanced urothelial carcinoma (UC). *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1738–98. DOI:10.1080/2162402X.2020.1738798
- Sänger N, Effenberger KE, Riethdorf S, et al. Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma in situ. *Int J Cancer*. 2011;129(10):2522–6. DOI:10.1002/ijc.25895
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(1):58–68. DOI:10.1016/j.ccr.2007.12.003
- Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Иммунологическая оценка гемодилюции костного мозга при лабораторных исследованиях (на основании теста М. Локен). *Медицинский алфавит*. 2015;4(18):67–70 [Grivtsova LYu, Tupitsyn NN. Immunological assessment of bone marrow hemodilution in laboratory studies (based on the M. Loken test). *Medical Alphabet*. 2015;4(18):67–70 (in Russian)].
- Козловская С.П., Антоненкова Н.Н., Жаврид Э.А. Современное состояние проблемы лечения пациенток с микрометастазами в костном мозге. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 2016;12(1):12–8 [Kozlovskaya SP, Antonenkova NN, Zhavrid EA. The current state of the problem of treating patients with bone marrow micrometastases. *Tumors of Female Reproductive System*. 2016;12(1):12–8 (in Russian)].
- Давыдов М.И., Тупицын Н.Н., Григорьева Т.А., и др. Метод проточной цитометрии в оценке минимального поражения костного мозга у больных раком. *Иммунология гематология*. 2014;2(1):8–17 [Davydov MI, Tupitsyn NN, Grigor'eva TA, et al. Flow cytometry method for assessing minimal bone marrow damage in cancer patients. *Hematopoiesis Immunology*. 2014;2(1):8–17 (in Russian)].
- Родионов В.В., Богомолова О.А., Кометова В.В. Метод проточной цитометрии в диагностике диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у больных раком молочной железы. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2013;1:77–82 [Rodionov VV, Bogomolova OA, Kometova VV. Flow cytometry method in the diagnosis of disseminated tumor cells in the bone marrow in patients with breast cancer. *Ulyanovsk Medico-Biological Journal*. 2013;1:77–82 (in Russian)].
- Braun S, Vogl FD, Naume B, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(8):793–802. DOI:10.1056/NEJMoa050434
- Gebauer G, Fehm T, Merkle E, et al. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery. Clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3669–74. DOI:10.1200/JCO.2001.19.16.3669
- Janni W, Rack B, Kasprowitz N, et al. DTCs in breast cancer: clinical research and practice. *Recent Results Cancer Res*. 2012;195:173–8. DOI:10.1007/978-3-642-28160-0_15
- NCCN Guidelines. Version 1.2021. Breast Cancer NCCN Evidence Blocks™. 2021 Jan 15:M53.
- Wang F, Wang S, Li Y, et al. Clinical study of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(122):273–6. DOI:10.5754/hge12599
- Джуманазаров Т.М., Чулкова С.В., Тупицын Н.Н., и др. Детекция диссеминированных опухолевых клеток и их взаимосвязь с популяцией костномозговых лимфоцитов у больных немелкоклеточным раком легкого. *Современная Онкология*. 2020;22(3):94–9 [Djumanazarov TM, Chulkova SV, Tupitsyn NN, et al. Detection of disseminated tumor cells and their relationship with a population of bone marrow lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Modern Oncology*. 2020;22(3):94–9 (in Russian)]. DOI:10.26442/18151434.2020.3.200137

Статья поступила в редакцию /

The article received: 19.10.2020

Статья принята к печати /

The article approved for publication: 08.10.2021



OMNIDOCTOR.RU