

67. Lund F.E., Randall T.D. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 236–47.
68. Maun C., Ehrenstein M.R. The "short" history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 2008; 29: 34–40.
69. Evans J.G., Chavez-Rueda K.A., Eddaoudi A., Meyer-Bahlburg A., Rawlings D.J., Ehrenstein M.R., Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J. Immunol.* 2007; 178: 7868–78.
70. Martin S., Wolf-Eichbaum D., Duinkerken G., Scherbaum W.A., Kolb H., Noordzij J.G., Roep B.O. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 1036–40.
71. Young R.J., Duncan L.J., Paton L., Yap P.L. Development of insulin-dependent diabetes in adult-onset hypogammaglobulinaemia. *Br. Med. J.* 1981; 282: 1668.
72. Moffitt J.E., Guill M.F., Leffell M.S., Ades E.W., Burek C.L., Lobel S.A., Hoffman W.H. Type 1 diabetes in an adolescent with common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989; 84: 191–6.
73. Kendall P.L., Moore D.J., Hulbert C., Hoek K.L., Khan W.N., Thomas J.W. Reduced diabetes in btk-deficient nonobese diabetic mice and restoration of diabetes with provision of an anti-insulin IgH chain transgene. *J. Immunol.* 2009; 183: 6403–12.
74. Xiu Y., Wong C.P., Bouziz J.D., Hamaguchi Y., Wang Y., Pop S.M. et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody presents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J. Immunol.* 2008; 180: 2863–8.
75. O'Neill S.K., Liu E., Camber J.C. Change you can B(cell)eive in: recent progress confirms a critical role for B cells in type I diabetes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2009; 16: 293–8.
76. Pescovitz M.D., Greenbaum C.I., Krause-Steinrauf H., Becker D.J., Gitelman S.E., Goland R. et al. Type I Diabetes TrialNet Anti-CD20 Study Group. Rituximab, B-lymphocyte depletion and preservation of beta-cell function. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 2143–52.
77. Noorchashm H., Noorchashm N., Kern J., Rostami S.Y., Barker C.F., Naji A. B-cells are required for the initiation of insulin and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes.* 1997; 46: 941–6.
78. Bingley P.J. Clinical applications of diabetes antibody testing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 25–33.
79. Pinoker C., Gilliam L.K., Hampe C.S., Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes.* 2005; 54 (Suppl. 2): S52–61.
80. Nanto-Salonen K., Kupila A., Simell S., Siljander H., Salosaari T., Hekkala et al. Nasal insulin to prevent type I diabetes in children with HLA genotype and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomized controlled trial. *Lancet.* 2008; 372: 1746–55.
81. Ludvigsson J., Faresjo M., Hjorth M., Axelsson S., Cheramy M., Pihl M. et al. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type I diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008; 359: 1909–20.

Поступила 07.02.13

© Е.С. ЛИАНИДОУ, А. МАРКОУ, 2013

УДК 618.19-006.04-033.2:577.2.086

Е.С. Лианидоу, А. Маркоу¹

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ ОПУХОЛИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СИСТЕМЫ ОБНАРУЖЕНИЯ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОБЛЕМЫ БУДУЩИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

E.S. Lianidou, A. Markou. Laboratory of analytical chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Greece. *Clinical Chemistry.* 2011; 57 (9): 1242–1255. e-mail: lianidou@chem.uoa.gr

Основания. Анализ циркулирующих клеток опухоли (ЦКО) является новой многообещающей областью диагностики для оценки риска метастатического рецидива и прогрессирования метастазов у пациентов с раковой опухолью.

Содержание. Для изолирования и обнаружения ЦКО были разработаны различные аналитические системы, такие как иммунологические и биохимические тесты, чаще всего включающие стадии разделения по размеру или биологическим характеристикам, например, экспрессия эпителиальных или специфичных для опухоли маркеров. Новейшие технологические усовершенствования обнаружения и характеристики ЦКО состоят в применении методов, основанных на обратнотранскриптазной количественной ПЦР и подходах, основанных на выявлении, микрофилт্রে и микрочипных устройствах. Новые области исследований ЦКО ориентированы на молекулярную характеристику ЦКО. Для анализа ЦКО важен контроль качества; для включения ЦКО в проспективные клинические исследования их клинической полезности важна стандартизация методик детекции микрометастатических клеток и методологии их характеристики. Молекулярная характеристика ЦКО может дать важную информацию о молекулярной и биологической природе этих клеток, в том числе

о состоянии рецепторов гормонов и рецепторов эпидермальных и других членов семейства факторов роста и показателях характеристик стволовых клеток. Такая информация важна для идентификации терапевтических целей и механизмов резистентности ЦКО, а также для стратификации пациентов и мониторинга в реальном времени системного лечения.

Заключение. Анализ ЦКО может быть использован в форме жидкостной цитологии для целей прогноза и предсказания исхода при раке молочной железы и других формах рака. В данном обзоре рассматриваются лучшие платформы для изолирования, получения изображения и детекции; контроль качества анализа ЦКО и возникающие проблемы при молекулярной характеристике ЦКО.

Присутствие циркулирующих клеток было впервые описано в 1869 г. австрийским врачом Томасом Ашвортом [1]. Через 20 лет Стив Пейджет описал в первом выпуске *Lancet* "гипотезу семени и почвы", в соответствии с которой "метастазы зависят от общения между клетками рака (семена) и специфическим органом микроокружения (почва)"; эта гипотеза была пересмотрена через много лет I. Фидлером [2]. В настоящее время проблема циркуляции рака является очень острой темой в онкологических исследованиях [3].

¹Перевод статьи публикуется в соответствии с соглашением между редакциями журналов "Clinical Chemistry" и "Клиническая лабораторная диагностика".

Критическая роль, которую ЦКО играют в распространении метастазов при карциноме, в настоящее время широко признана [4–6]. Европейские группы исследователей ясно показали клиническое значение диссеминированных клеток опухоли (ДКО) в костном мозге больных раком молочной железы [7]. Детекция и подсчет ЦКО в раке молочной железы были установлены во многих клинических исследованиях, результаты которых показали корреляцию со снижением свободной прогрессии и общего выживания при операбельном раке молочной железы до [8–12] и после химиотерапии [13]. В 2004 г. М. Христофанилли и др. обнаружили важность детекции ЦКО для оценки прогрессирования болезни и выживания при метастатическом раке молочной железы [14].

Анализ ЦКО является многообещающей новой областью диагностики у пациентов с высокой стадией болезни. Однако, поскольку ЦКО имеются в малом количестве и объем доступной пробы очень ограничен, такой анализ связан с исключительно аналитическими и технологическими проблемами. Новейшие технические усовершенствования детекции и характеристики ЦКО включают методы, основанные на мультиплексной обратнo-транскриптазной количественной ПЦР (RT-qPCR), подходах, основанных на визуализации изображений и применении устройств с микрофильтрами и микрочипами. Платформы детекции ЦКО, обладающие высокой аналитической чувствительностью, позволяют проводить мониторинг болезни и эффективности лечения [15].

ЦКО являются новыми биомаркерами опухоли, по существу представляющими "жидкую" пробу биоптата и выполняющими мониторинг после многообещающего персонализированного лечения. Более того, ЦКО служат хорошо определенной целью для понимания биологии опухоли и рассеивания опухолевых клеток [16]. Молекулярная характеристика ЦКО представляет собой эффективный подход к лучшему пониманию биологии метастазирования и резистентности к принятым способам терапии. Новые терапевтические цели могут быть идентифицированы путем выяснения взаимоотношений между ЦКО и раковыми стволовыми клетками. Для более глубокого понимания биологии развития метастазирования у больных раком должны быть проведены дальнейшие исследования молекулярных характеристик ЦКО.

В данном обзоре внимание сосредоточено на рассмотрении лучших технологических платформ для получения изображений, детекции, и молекулярной характеристики ЦКО и описании новейших данных по молекулярной характеристике ЦКО и их значению в будущем для понимания молекулярных процессов и персонализированной медицины.

Аналитические технологии для изолирования, детекции и молекулярной характеристики ЦКО

ЦКО встречаются не часто и редко следуют распределению Пуассона [17]. Чтобы уверенно обнаружить эти клетки, абсолютно необходимо применить высокоэффективное исследование и высоко стандартизованный протокол подготовки препарата. Распределение Пуассона применимо в случаях, если распределенные случайным образом объекты (клетки) подсчитывают в определенном интервале или объеме [17]. Предел обнаружения в случае ЦКО ограничивается не добавлением идентифицирующих ЦКО средств или улучшением инструментов, а количеством крови, которая исследуется на предмет наличия ЦКО. Это ограничение следует принимать в расчет перед началом анализа, особенно на ранней стадии болезни. Была разработана модель, которая использует распределение Пуассона для сбора крови и описывает статистику различных этапов процесса, которые необходимы для изолирования и обнаружения ЦКО [17]. В большинстве случаев ЦКО обнаруживают при использовании комбинации из 2 этапов изолирования – обогащения и детекции. Основные аналитические подходы, используемые в настоящее время для анализа ЦКО, представлены в табл. 1.

Изолирование и обогащение ЦКО

В большинстве широко используемых подходов для изолирования и обогащения ЦКО используется центрифугирование в градиенте плотности в присутствии фикола и имму-

номагнитное изолирование. Оба подхода представляют собой трудоемкие процедуры с переменной эффективностью. Методы обогащения также комбинируются, например, устройство для фильтрации с позитивным отбором с помощью антитела, направленного против антигена пан-эпителиальной дифференциации, молекулы адгезии эпителиальной клетки (EpCAM) или обогащение после позитивного электромагнитного изолирования. Однако во многих исследованиях была показана гетерогенная природа ЦКО и продемонстрировано, что все методы обогащения имеют смещения, поскольку не все ЦКО экспрессируют одинаковые антигены поверхности, такие как EpCAM [18–20]. Недавно были также разработаны микропроточные устройства и и фильтрация по размеру. Основные подходы для изолирования ЦКО представлены на рис. 1.

Иммуномагнитное обогащение. Большинство исследований для обнаружения ЦКО использует позитивную селекцию, основанную на экспрессии EpCAM на клетках опухоли. Эти технологии обогащения ЦКО связаны с антителами, направленными против EpCAM [18]. Однако некоторые опухолевые клетки экспрессируют мало EpCAM или совсем не экспрессируют этот антиген и поэтому EpCAM-негативные клетки не могут быть обнаружены зависящими от EpCAM методами обогащения. Оценка ЦКО в качестве прогностических маркеров должна включать как EpCAM-положительные, так и EpCAM-отрицательные субпопуляции [19]. Недавно сообщалось, что в отличие от других молекулярных подтипов рака молочной железы "по-видимому нормальные" линии клеток лишены экспрессии EpCAM и поэтому не захватываются, когда ЦКО связываются методом, основанным на EpCAM [20]. Отрицательная селекция ЦКО была также применена при удалении лейкоцитов с помощью анти-CD45 [15]. В. Mostert et al. недавно предложили комбинированное применение анти-CD146 и анти-EpCAM для улучшения детекции ЦКО у пациентов с раком молочной железы [21], а С. Schindlbeck et al. показали, что частота детекции клеток опухоли повышается при использовании анти-CD176 [22]. Описана высокая чувствительность и воспроизводимость метода обогащения, который основан на связывании с одним анти-СК или на комбинации анти-СК и анти-EpCAM. В этом методе используется Aiol® system (Genetix USA) для автоматизированного захвата изображения клеток и анализа ЦКО на стеклянных слайдах [23].

Микрофлюидные и фильтрационные устройства для селекции и обогащения ЦКО

Разработаны различные современные аналитические платформы, основанные на микрофлюидных и фильтрационных устройствах для захвата ЦКО. В обзоре приведены описания только фильтрационных устройств для ЦКО, которые были оценены при исследовании проб периферической крови от больных раком.

Системы для изолирования по размеру опухолевых эпителиальных клеток основаны на индивидуальном изолировании опухолевых эпителиальных клеток с помощью фильтрации, поскольку их наибольший размер сравним с размером лейкоцитов периферической крови. Для выполнения хромосомного анализа опухолевых клеток, собранных с помощью ISET, был использован метод FISH, а также генетический анализ, основанный на ПЦР, который был применен к клеткам, изолированным с помощью ISET [24].

Н. Лин и др. разработали портативное микроустройство, основанное на фильтре, которое служит платформой как для схватывания, так и для анализа, способное к мультиплексному выявлению изображения и генетическому анализу, пригодное для рутинного анализа ЦКО в клинических учреждениях для эффективного ведения больных раком [25]. Это устройство использует разницу в размере между ЦКО и клетками крови человека. Сообщалось о захвате ЦКО на фильтре примерно с 90% открытием в течение 10 мин. Та же группа авторов разработала и подтвердила работоспособность нового трехразмерного микрофильтровального устройства,

Таблица 1

Обзор аналитических технологий для обнаружения и молекулярной характеристики ЦКО

Система исследования	Обогащение	Обнаружение	Преимущества	Недостатки	Литература
Цитологические исследования					
Тест CellSearch ЦКО	Позитивная селекция: EpCAM антитела, связанные на феррожидкости	Специфические маркеры: ЦКО: CK19 Лейкоциты: CD45 Жизнеспособность клеток: DAPI	Одобрено FDA Визуальное подтверждение ЦКО Клиническая связь с метастатическим раком молочной железы	Зависимость от EpCAM-позитивности Ограниченное число маркеров	S. Riethdorf et al. [32]
Чип ЦКО	Позитивная селекция: EpCAM антитела, связанные на микропятнах	Положительные маркеры: CKs Отрицательные маркеры: CD45 Ядро: DAPI	Высокая частота детекции Визуальное подтверждение ЦКО	Субъективный анализ ЦКО Дальнейшее изучение специфичным тестом Зависимость от EpCAM-позитивности	S. Nagrath et al. [27], S. Stott et al. [28]
Тест EpiSpot	Негативная селекция: клетки CD45 ⁺	Иммунологическая селекция секретируемых белков: CK-19, муцин-1, катепсин D	Обнаружение только жизнеспособных клеток	Клиническая значимость не продемонстрирована	C. Alix-Panabieres et al. [46]
Система Ariol	Антитела с CK и антитела к EpCAM, связанные на микрошариках	Положительные маркеры: CKs Негативные маркеры: CD45 Ядро: DAPI	Выше частота детекции ЦКО, чем у CellSearch	Зависимость от EpCAM- и CK-19-позитивности	G. Deng et al. [23]
ЦКО-фильтрующее устройство	По размеру (фильтр)	Положительные маркеры: CKs	Платформа для захвата и анализа Мультиплексная визуализация и генетический анализ	Клетки опухоли могут быть различного размера	G. Vona et al. [24], H. Lin et al. [25], S. Zheng et al. [26]
Лазер-сканирующий цитометр	Позитивная селекция: EpCAM антитела связанные на колонке	Конъюгированное с флюорохромом антиэпителиальное антитело	Автоматизированная микроскопическая процедура для скрининга до 5 x 10 ⁴ клеток за подходящее время Обогащение до 10 000 раз Подсчет минимального числа опухолевых клеток	Зависимость от EpCAM-позитивности	K. Pachmann et al. [31]
Технология DyLight	Фильтрующее устройство	Множество антител: цитокератин, HER2/neu, ALDH1, CD44, CD24	Мультимаркерный анализ изображений	Применение на линиях клеток	M. Balic et al. [33]
Молекулярные исследования					
RT-PCR	Центрифугация в градиенте фикола	CK-19, HER2, h-MAM, CEA, maspin, GABA A, B726P	Высокая чувствительность Прогностическое значение при ранней стадии болезни Обнаруживает только жизнеспособные клетки	Нет морфологического анализа	M. Slade et al. [35], M. Reinholz et al. [41]
RT-qPCR	Центрифугация в градиенте фикола	CK-19, BST1, PTPRC	Высокая чувствительность Количественное определение Обнаруживает только жизнеспособные клетки Нет EpCAM -зависимости	Нет морфологического анализа	A. Stathopoulou et al. [36], A. Stathopoulou et al. [37], A. Sieuwerts et al. [44]
RT-qPCR	Обогащение с помощью OncoQuick и преамплификация РНК	CCNE2, DKFZp762E1312, EMP2, MAL2, PPIC и SLC6A8, hMAM и EpCAM	Высокая чувствительность Количественное определение Обнаруживает только жизнеспособные клетки	Нет морфологического анализа	E. Obermayr et al. [40]
Множественная RT-PCR AdnaTest Breast Cancer	EpCAM антитела и MUC1 антитела, связанные на феррожидкости	Мультиплексная ПЦР для: муцина-1, HER2, EpCAM, актина	Высокая чувствительность Обнаруживает только жизнеспособные клетки Уменьшение объема пробы, расхода времени, экономия стоимости	Нет морфологического анализа	B. Aktas et al. [42]
Жидкий капельный зонд	Центрифугирование в градиенте фикола и положительная селекция с EpCAM-антителами, связанными с феррожидкостью	Мультиплексная ПЦР для CK-19, HER2, MAGE-A3, hMAM, PBGD, TWIST-1	Уменьшение объема пробы, расхода времени, экономия стоимости Одновременное определение 6 маркеров на ЦКО Обнаруживает только жизнеспособные клетки	Нет морфологического анализа Зависимость от EpCAM-позитивности ПЦР конечной точки	A. Markou et al. [45]

Примечание. hMAM – человеческий MAM; CEA – раково-эмбриональный антиген; GABA – гамма-аминомасляная кислота; PTPRC – белок тирозинфосфатаза, рецептор типа C; CCNE2 – циклин E2; EMP 2 – белок 2 мембраны эпителия; MAL2 – миелин и лимфоцит 2; PPIC – пептидилпролилизомераза C; SLC6A8 – раствор переносчика семейства 6 (переносчик нейротрансмиттера, креатин) член 8; BST – антиген клеток стромы костного мозга; MAGE – антиген, ассоциированный с меланомой; PBGD – порфибилиногендезаминаза.

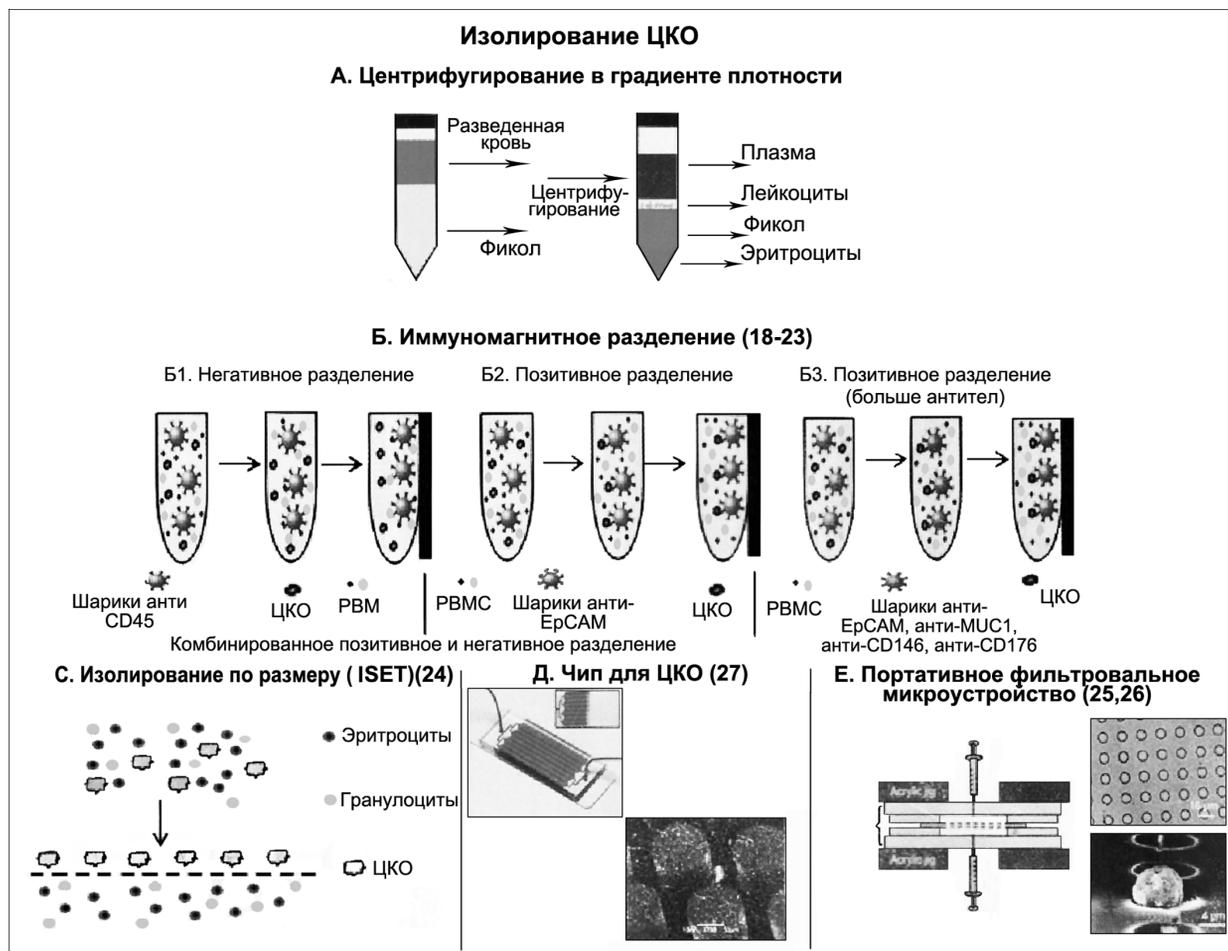


Рис. 1. Основные подходы к изолированию-обогащению ЦКО.

А – обогащение с применением центрифугирования в градиенте плотности в присутствии фикола. Б – иммуномагнитное разделение (Fehm et al. [18], Konigsberg et al. [19], Sieuwerts et al. [20], Mostert et al. [21], Schindlbeck et al. [22], Deng et al. [23]). Б1 – негативная селекция путем удаления лейкоцитов с применением анти-CD45; Б2 – позитивная селекция с помощью антител против антигена пан-эпителиальной дифференциации ЕpСAM; Б3 – комбинированное применение антител против маркеров поверхности ЦКО (анти-CD146, анти-CD176; анти-СК-19 и других). С – система ISET (Vona et al. [24]). Д – микропроточное устройство: захватывающий ЦКО чип захватывает в периферической крови клетки, экспрессирующие ЕpСAM с помощью покрытых антителами к ЕpСAM пятнами (Nagrath et al. [27]). Е – портативное, основанное на фильтре микроустройство, использующее разницу размеров ЦКО и клеток крови человека (Lin et al. [25], Zheng et al. [26]). РВМС – одноядерные клетки периферической крови; PDMS – полидиметилсилоксан.

способного обогащать жизнеспособные циркулирующие опухолевые клетки из крови. Устройство представляет собой эффективное средство для оценки и характеристики жизнеспособных обогащенных опухолевых клеток как в исследовательских, так и в клинических целях [26].

Микропроточное устройство, называемое чипом ЦКО, было разработано для захвата экспрессирующих ЕpСAM клеток из крови с помощью покрытых антителами микропостов [27]. Позднее та же группа разработала высокопроизводительное микропроточное смешивающее устройство, чип в виде колоса, которое служит усиливающей платформой для изолирования ЦКО [28]. Конструкция чипа в виде колоса позволяет пассивное прохождение клеток крови через микрополости для существенного повышения числа взаимодействий между искомыми ЦКО и покрытой антителами поверхностью чипа. Эффективность захвата опухолевых клеток была подтверждена путем добавления определенного числа раковых клеток в контрольную кровь. Клиническая полезность применения устройства была продемонстрирована на образцах от пациентов, больных раком предстательной железы и продолжает изучаться. Было показано, что другое новое микропроточное устройство способно избирательно и специфично изолировать чрезвычайно малое число ЦКО с использовани-

ем процесса, опосредованного моноклональными антителами при пропускании большого объема цельной крови непосредственно за короткий промежуток времени [29]. ЦКО были сконцентрированы в небольших объемах (190 нл) и число клеток было подсчитано без метки с использованием сенсора интегрированной проводимости после высвобождения с поверхности захвата. Высвобожденные клетки подсчитывались на устройстве с помощью нового, без метки раствора датчика проводимости, способного обнаружить единственную опухолевую клетку, проходящую через электроды детектора. Недавно был разработан новый метод спектроскопии Рамана на усиленной поверхности (SERS) для прямого измерения искомым ЦКО в присутствии лейкоцитов [30]. Наночастицы SERS с пептидным эпидермальным фактором роста в качестве лиганда мишени успешно идентифицируют ЦКО в периферической крови пациента.

Системы детекции ЦКО

Последние технические усовершенствования детекции ЦКО и их характеристики включают:

- а) основанные на визуализации подходы, типа иммуноцитохимии, разрешенная FDA CellSearch® system (Veridex), система Ariol и лазерная сканирующая цитометрия;
- б) молекулярные исследования, основанные на анализе ну-

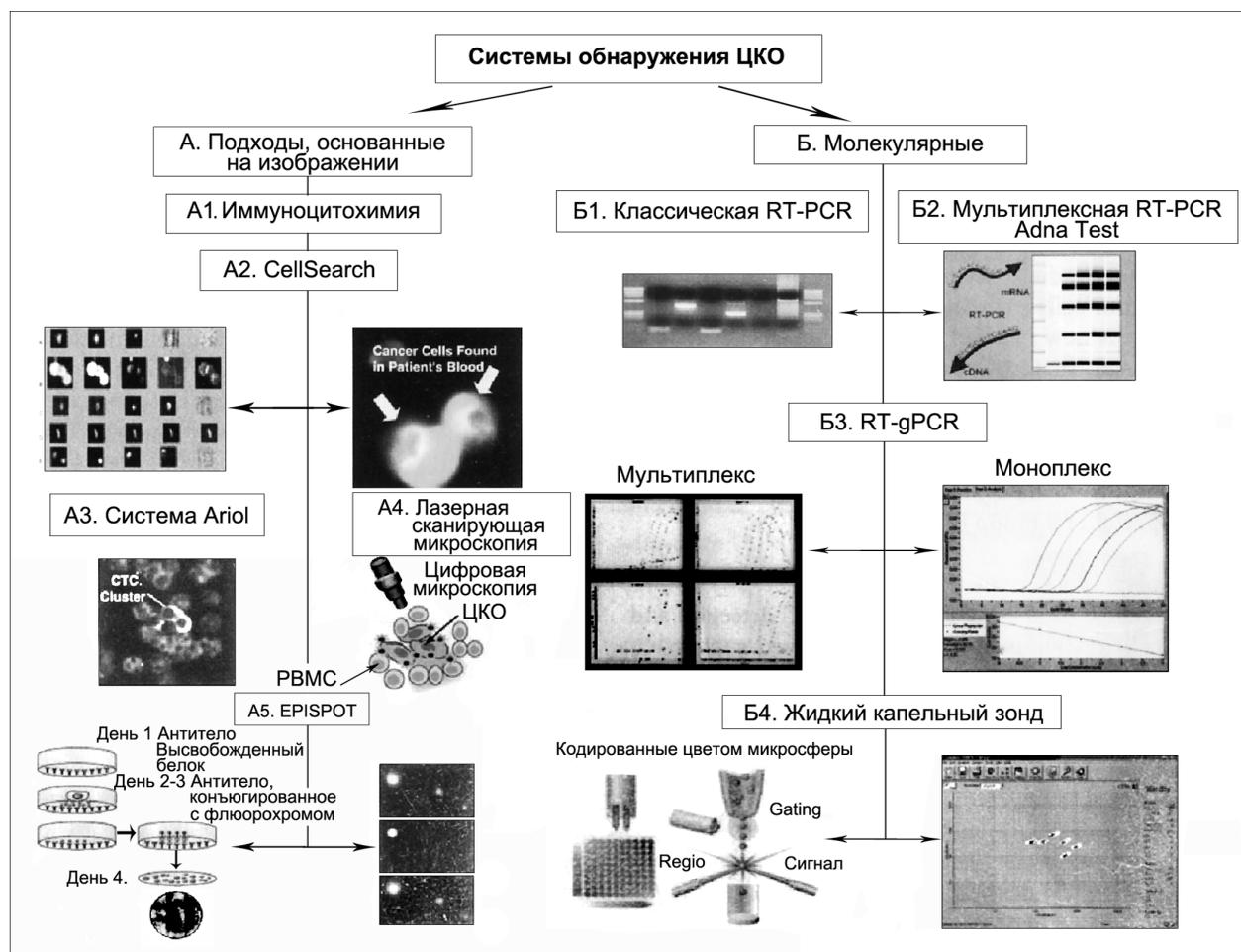


Рис. 2. Основные подходы к обнаружению и молекулярной характеристике ЦКО.

А – подходы, основанные на изображениях: А1 – классическая иммуноцитохимия; А2 – система CellSearch (одобрена FDA); А3 – система Ariol; А4 – лазер-сканирующая цитометрия; А5 – исследование EPISPOT (обнаружение опухолеспецифичных белков, выделяемых ЦКО); Б – молекулярное исследование, основанное на анализе нуклеиновой кислоты в ЦКО; Б1 – классическая RT-PCR; Б2 – мультиплексная RT-PCR, AdnaTest Breast Cancer; Б3 – RT-qPCR; Б4 – жидкий капельный зонд.

кислот ЦКО. В том числе высокочувствительные методы RT-qPCR, мультиплексные обратнo-транскриптазные ПЦР (RT-PCR) исследования или комбинация молекулярных методов и способов визуализации и

с) основанные на белке исследования типа EpiSpot, которые обнаруживают специфичные для опухоли белки, высвобождаемые из ЦКО.

Обнаружение с применением антицитокератиновых антител является в настоящее время наиболее хорошо подтвержденным и стандартизированным подходом, позволяющим морфологическую интерпретацию положительных событий.

Перечисленные подходы различаются, в основном, способом детекции ЦКО (рис. 2). Подходы с получением изображений основаны на характеристике изолированных клеток как ЦКО с помощью меченых флуоресцентным красителем антител в основном против эпителиальных антигенов, таких, как СК-19. Ограниченное число других белковых маркеров было также использовано по этой причине. Напротив, молекулярные исследования основаны, преимущественно, на анализе экспрессии гена в ЦКО. С применением этого подхода присутствие малого числа ЦКО может быть показано путем высокочувствительной детекции эпителиальных маркеров типа СК-19 в присутствии миллионов одноядерных клеток периферической крови. Молекулярные исследования не могут быть использованы, чтобы точно оценить число ЦКО, присутствующих в пробе; однако, многие молекулярные маркеры (напри-

мер, экспрессия гена, мутации ДНК) могут быть обнаружены в ЦКО, позволяя осуществить их молекулярную характеристику. Эти подходы могут дополнить друг друга, поскольку они дают различную информацию относительно ЦКО.

Подходы, основанные на изображении. Детекция диссеминированных опухолевых клеток путем применения классических иммуноцитохимических методов, обычно выполняемых опытными патологами путем визуального наблюдения окрашенных СК-положительных эпителиальных ЦКО, очень трудоемка, требует многих часов, если не дней, при исследовании многих проб. К. Pachman и соавт. подсчитывали минимальное число опухолевых клеток, используя лазерный сканирующий цитометр, быструю количественную автоматизированную процедуру микроскопии, которая позволяет осуществить обогащение до 10 000 раз [31].

Допущенная FDA система CellSearch (Veridex) [14], основанная на комбинации иммуноцитохимии и иммунофлуоресценции, использует такие специфические маркеры ЦКО, как СК (преимущественно СК-19), лейкоцитов (CD45) и жизнеспособности клеток (4'-диамидино-2-фенилиндол, DAPI, положительная реакция, окраска ядер). Система CellSearch для детекции циркулирующих клеток была валидирована с помощью строгой программы клинического тестирования [32]. Эта технология дает наибольшее количество клинических данных относительно клинического значения ЦКО для прогноза при раке молочной железы. Недавно А. Steuwer и соавт. исследо-

вали, идентифицируются ли системой CellSearch 5 подтипов клеток рака молочной железы человека, определенные путем глобального профилирования экспрессии гена [подобные нормальным, базальные, положительные по рецептору 2 человеческого эпидермального фактора роста (HER2), люминальные A и B]. Эти исследователи обнаружили, что метод изолирования в CellSearch, использующий EpCAM на поверхности циркулирующих опухолевых клеток, не распознает, в частности, подобные нормальным клетки рака молочной железы, которые обычно проявляют агрессивность [20]. A. Steuwerts и соавт. сделали заключение, что необходимы новые тесты, с использованием антител, распознающие подобные нормальным клетки рака молочной железы, но не клетки гематопозитического происхождения.

M. Balic и соавт. недавно разработали метод для мультимаркерного анализа изображений для ЦКО, используя новую технологию DyLight [33]. Этот подход к анализу изображений основан на применении множественных антител [например, против CK, Her2/neu, альдегиддегидрогеназы 1 (ALDH1), CD44 и CD24], меченых флюорохромами различного цвета и спектральном анализе изображений для разделения различных цветов спектра. Этот новейший метод облегчит детекцию и фенотипическую характеристику диссеминированных клеток опухолей и с помощью дополнительных маркеров позволит различить субпопуляции, которые могут экспрессировать отдельные терапевтические цели.

Молекулярные исследования для детекции и молекулярной характеристики ЦКО

Молекулярные исследования для детекции и подсчета ЦКО обладают преимуществами чрезвычайной аналитической чувствительности и специфичности ПЦР. Эти исследования имеют высокую производительность и легко выполняются, поскольку они основаны на изолировании общей РНК из жизнеспособных ЦКО и последующей обратнотранскриптазной ПЦР-амплификации мишеней, специфичных для опухоли и эпителия. Важно, что RT-PCR исследования легко могут быть автоматизированы и их результаты могут быть оценены с помощью внутрिलाбораторного контроля и внешней оценки качества [34].

Учитывая состав циркулирующих клеток, возможно, необходимо обнаружить 1 раковую клетку в присутствии более чем 10^6 лейкоцитов. Хотя RT-PCR потенциально обладает достаточной аналитической чувствительностью и специфичностью, чтобы решить эту задачу, для успеха необходимо использовать соответствующие маркеры mRNA. Единственным недостатком этого подхода является то, что он не позволяет точно определить число ЦКО, представленных в пробе, поскольку разное число транскриптов может быть экспрессировано различными клетками, и может быть установлено только число транскриптов мишеней. Основным преимуществом молекулярных методов является их гибкость, особенно при мультиплексных методах, что снижает требуемые объемы проб, время и стоимость исследования.

Почти 22 года назад M. Slade и соавт. разработали методологию RT-PCR для обнаружения микрометастазов у пациентов с раком молочной железы, основанную на определении числа транскриптов гена кератина 19 (KRT 19, также известный как СК-19) в пробах крови и костного мозга [35]. Авторы статьи разработали исследование RT-qPCR для KRT19 mRNA [36, 37] и оценили его аналитическую и диагностическую чувствительность и клинический потенциал для молекулярного обнаружения скрытых опухолевых клеток в периферической крови пациентов с раком молочной железы [10–13].

Идентификация специфических подтипов ЦКО, основанных на экспрессии различных генов, может дать информацию относительно биологии метастазов и улучшить лечение пациентов. Чтобы быть эффективным, метод, используемый для идентификации ЦКО, должен обнаруживать все типы клеток опухоли. Однако, к сожалению, то, что ЦКО встречаются весьма редко, а доступный объем пробы очень ограничен, вызывает значительные аналитические и технические

проблемы [38, 39]. Используя RT-qPCR, E. Oberbauer и соавт. показали, что панель из 6 генов была представлена EpCAM и секретоглобулином, семейством A, членом 2 (SCGB2A2, также известным как маммаглобин и hMAM) для детекции ЦКО при раке молочной железы и что эти гены могут служить потенциальными маркерами для ЦКО, происходящих также из раковых опухолей эндометрия, шейки матки и яичников [40]. M. Reinholz и соавт. показали, что молекулярная характеристика циркулирующих эпителиальных клеток с использованием SCGB2A2 (маммаглобин) и B305D-C дают возможность раннего обнаружения инвазивного рака молочной железы [41]. Позднее B. Aktas и соавт., используя доступный коммерческий набор реагентов (AdnaTest Breast Cancer, AdnaGen AG), обнаружили транскрипты EpCAM, муцина (MUC1) и HER2 в ЦКО и обнаружили, что большая часть ЦКО у пациентов с метастатическим раком молочной железы обнаруживают переход эпителиальных в мезенхимальные (EMT) клетки и характеристики опухолевых стволовых клеток [42]. Интересно, что в случае, если с помощью RT-PCR в ЦКО определены рецептор эстрогенов (ER) и рецептор прогестерона (PR), распространение ЦКО было главным образом обнаружено в трижды негативных опухолях и ЦКО обычно обнаруживались преимущественно несмотря на трижды отрицательный статус по ER, PR и HER2 в первичной опухоли [43]. Метод профилирования количественной экспрессии генов, основанный на RT-qPCR, для обнаружения одной ЦКО был выполнен с применением генов, которые не экспрессируют или экспрессируют в малой степени лейкоциты [44]. Для детекции ЦКО, основанной на RT-PCR, применяют многие маркеры mRNA. Количественное определение этих mRNA имеет существенное значение для того, чтобы отличить нормальную экспрессию в крови от экспрессии, вызванной присутствием ЦКО. Лишь немногие маркеры обладают адекватной индивидуальной чувствительностью, но комбинированное применение маркеров может улучшить обнаружение ЦКО. Используя мультимаркерное RT-PCR исследование для обнаружения ЦКО на ранних стадиях рака молочной железы, авторы показали, что ЦКО, положительные для KRT19; SCGB2A2 (маммаглобин) и *y-erb-b2* гомолога 2 вирусного онкогена эритробластной лейкемии, нейро/глиобластомы, вызываемой гомологом онкогена (avian) (ERBB2, также известного как HER2) сочетаются с более коротким периодом выживаемости [11].

Авторы недавно разработали мультиплексно сочетанный с PCR жидкостный капельный зонд для обнаружения экспрессии множественных генов в ЦКО [45]. С использованием этого подхода 6 установленных генов-мишеней в ЦКО [ERBB2; SCGB2A2 (маммаглобин); KRT19; антиген меланомы семейства A, 1 (прямая экспрессия антигена MZ2-E) (MAGEA 1); скрученный гомолог 1 (Дрозофила) (TWIST-1); и гидроксиметилбилансинтаза (HMBS также известная как PBGD)] были одновременно амплифицированы и обнаружены в той же реакции в очень ограниченной по объему пробе ЦКО, тем самым сохраняя дорогую пробу и снижая стоимость и расход времени на анализ. Это исследование образует эффективную основу для мультиплексного подхода к исследованию до 100 генов в ЦКО.

Исследование эписпот. Исследование EPISPOT (Эпителиальное ИммуноSPOT), адаптация исследования ELISPOT (Autoimmunity Diagnostics) было разработано для обнаружения опухолеспецифичных белков, высвобождаемых из ЦКО. Согласно результатам этого исследования СК-19 полной длины может высвобождаться из жизнеспособных эпителиальных опухолевых клеток, и клетки, выделяющие СК-19, могут составлять биологически активную подгруппу клеток опухоли молочной железы с высокой способностью метастазировать [46].

Контроль качества в системах детекции ЦКО: сравнение различных методологий

Клинические результаты анализа ЦКО в высокой степени зависят от использованной технологии. Несмотря на то, что большинство этих методов являются аналитически чувстви-

Таблица 2

Сравнительное исследование одних и тех же клинических проб в разных лабораториях и разными методами

Сравниваемые методы	Пациенты, число, тип рака молочной железы	Степень соответствия	Литература
CellSearch и Adnatest	245, метастатический	50%	T. Fehm et al. [48]
CellSearch и Adnatest и RT-PCR	79, метастатический	CellSearch и Adnatest: 81% CellSearch RT-PCR: 57% RT-PCR Adnatest: 50%	Van der Auwera et al. [53]
OncoQuick и CellSearch	61, метастатический	33/61 (54,1%)	I. Balic et al. [50]
RT-PCR и ICC (DTCs сравнены)	385	280/385 (73%)	S. Becker et al. [52]
CellSearch	6 (14 независимых лабораторий)	Между лабораториями CV 45–65% Между инструментами > 20% Между тестами > 12 %	J. Kraan et al. [49]
CellSearch	91 (3 независимых лабораторий)		S. Riethdorf et al. [32]

тельными и специфичными, не проводилось экстенсивного изучения, специфично направленного на сравнение эффективности методов обнаружения при анализе одних и тех же клинических проб. Это важное обстоятельство для их клинического применения, поскольку, особенно в ранней стадии болезни, различие в аналитической чувствительности между этими методами играет критическую роль. Так, стандартизация обнаружения и характеристики метастатических клеток важна для включения ЦКО в клинические проспективные наблюдения с целью изучения их клинической полезности. Результаты многих наблюдений, проведенных в отдельных учреждениях, позволяют предполагать, что ЦКО играют важную роль в стратификации риска и мониторинге терапевтической эффективности. Эти данные должны быть оценены в многоцентровых исследованиях, чтобы подтвердить принципы этой концепции в клинических условиях.

Американская ассоциация изучения рака – сотрудничество биомаркеров рака Национального института рака недавно опубликовали отчет о валидации и/или стандартизации тестов на новые биомаркеры [47]. Рекомендации, описанные в этом отчете, направлены на ускорение использования этих биомаркеров для реализации связанных с ними ожиданий в развитии персонализированной медицины. С этой точки зрения, стандартизовать обнаружение ЦКО абсолютно необходимо. К критическим условиям относятся: а) стандартизация преаналитической фазы, в том числе самого взятия пробы (например, объем пробы, предотвращение одновременного взятия эпидермальных эпителиальных клеток в случаях использования для детекции ЦКО таких эпителиальных маркеров, как СК-19), транспортировки пробы (стабильность ЦКО в различных условиях) и условия хранения (использование консервантов или антикоагулянтов); б) стандартизация изолирования ЦКО путем использования контролей в периферической крови; в) стандартизация систем обнаружения ЦКО и д) внутрилабораторные и межлабораторные сравнения на одинаковых пробах. Разработка международных стандартов подсчета и характеристики ЦКО также очень важна, особенно для систем детекции по изображениям, которые зависят

от наблюдателя. В табл. 2 суммированы исследования сравнения между различными методологиями, использованными для детекции ЦКО.

В сравнении исследований, проведенном T. Fehm и соавт., между тестом CellSearch и молекулярным тестом AdnaTest Breast Cancer получены совпадающие результаты в отношении положительной реакции на HER2 у 50% пациентов [48]. Авторы делают вывод, что универсальный внутренний и внешний контроль качества для обнаружения и подсчета ЦКО совершенно необходимы перед их использованием в клинике. В другом исследовании пригодность внешней оценки качества всей методики CellSearch от взятия крови до интерпретации результатов была изучена с использованием проб от 6 больных раком, которые были исследованы в 14 независимых лабораториях для изучения вариаций между лабораториями, тестами и инструментами. Кроме того, вариабельность между операторами была оценена путем интерпретации изображений всех проб крови, представленных на сайте в Интернете. Эти многоцентровые исследования показали пригодность программы внешней оценки качества для обнаружения ЦКО в пробах пациентов и важность продолжения такой программы для подсчета ЦКО [49]. Для контроля качества допущенной FDA системы CellSearch при метастатическом раке молочной железы проспективное многоцентровое исследование было проведено в 3 независимых лабораториях с использованием проб от 92 пациентов с метастатическим раком молочной железы. Были протестированы вариации внутри- и между исследованиями, полученные с использованием контролей, содержащих определенное число клеток, стабильность клетки с учетом различных условий хранения и транспортировки, прецизионность открытия из проб, дополненных 4–12 опухолевыми клетками, межинструментальная вариабельность и позитивность проб, взятых у больных метастатическим раком молочной железы [32]. Соответственно результатам этого исследования, система CellSearch способна надежно обнаруживать ЦКО в крови и подходит для рутинной оценки в клинической лаборатории проб крови от больных метастатическим раком молочной железы. Пробы крови следует транспортировать при комнатной температуре, число ЦКО стабильно по крайней мере 72 ч.

M. Balic и соавт. сравнили 2 метода для подсчета ЦКО, OncoQuick (Greiner Bio One) и систему CellSearch, и сообщили, что система CellSearch более точна и аналитически чувствительнее, чем OncoQuick, для подсчета ЦКО [50]. Используя добавленные клетки опухоли, E. Punpoose и соавт. оценили эффективность захвата ЦКО на различных технологических платформах, включая CellSearch и 2 платформах-биоципах и использовали изолированные ЦКО для разработки и оптимизации тестов для молекулярной характеристики ЦКО. Они сообщили об одинаковых аналитических характеристиках для захвата ЦКО различными изученными платформами и нашли, что эффективность захвата в высокой степени зависит от уровня экспрессии ErCAM. В соответствии с результатами этого исследования, добавление антител к мезенхимальным маркерам могло бы повысить эффективность захвата ЦКО при анализе биомаркеров ЦКО в рутинных условиях [51].

Молекулярные методы, основанные на применении RT-qPCR могут быть использованы в рутинной клинической лаборатории, поскольку они могут быть стандартизованы в соответствии с недавно описанными характеристиками качества: значения цикло-количественного определения, предела обнаружения и открытия [34]. Прямое сравнение уровней обнаружения диссеминированных клеток опухоли в пробах от большой когорты из 385 больных, исследованных с использованием стандартизованной иммуноцитохимической методики и протокола RT-PCR в реальном времени выявило существенную корреляцию между иммуноцитохимической методикой и RT-PCR ($P > 0,01$) и результаты обоих методов согласуются в 73% случаев (280/385) [52]. В другом недавнем изучении методов обнаружения ЦКО, пробы крови, взятые у

76 пациентов с метастатическим раком молочной железы и у 20 здоровых контрольных лиц были исследованы со сравнением 3 технологий: система CellSearch для ЦКО, AdnaTest Breast Cancer Select/Direct и ранее описанный тест RT-qPCR в реальном времени для обнаружения СК-19 и SCGB2A2 (маммаглобин) транскрипты [53]. Наблюдалась существенная вариация частоты обнаружения ЦКО в крови пациентов, измеренных с использованием 3 различных технологий. Наибольшая частота положительных проб наблюдалась при использовании комбинированного подхода RT-qPCR для СК-19 SCGB2A2 (маммаглобин), что позволяет предполагать, что этот подход в настоящее время является наиболее аналитически чувствительной технологией для обнаружения ЦКО. Стандартизация набора реагентов AdnaTest Breast Cancer и прямое сравнение с другими установленными технологиями обогащения и детекции ЦКО рака молочной железы еще отсутствуют, но крайне необходимы.

Молекулярная характеристика ЦКО и индивидуализированное лечение рака

Молекулярная характеристика ЦКО может быть использована для понимания биологии метастазирования, для улучшения лечения пациента и для содействия идентификации новых терапевтических мишеней в целях предупреждения рецидивов метастазирования. Роль ЦКО в неэффективности лечения и прогрессировании болезни можно объяснить их связью с такими биологическими процессами, как эпителиально-мезенхимальный переход и "спячка" опухоли [54]. Идентификация метастатических стволовых клеток с помощью молекулярной характеристики популяции ЦКО может привести к разработке новых терапевтических концепций.

ЦКО обладают высокой гетерогенностью [4], как это было показано с помощью иммунофлюоресценции [33], конфокальной лазер-сканирующей микроскопии [55] и молекулярных методов: RT-PCR [42, 55], RT-qPCR [44] и жидких капельных зондов [45]. Демонстрация гетерогенности осо-

бенно важна в тех случаях, когда терапевтические мишени экспрессируются в ЦКО, но отсутствуют в первичной опухоли. Однако в полной мере важность гетерогенности ЦКО еще не используется клинически. В табл. 3 суммированы данные исследований по молекулярной характеристике ЦКО при раке молочной железы.

Рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста

Анализ HER2 в ЦКО может иметь клиническое значение для терапии, ориентированной на HER2, поскольку HER2-позитивные ЦКО и диссеминированные опухолевые клетки могут быть обнаружены у пациентов с HER2-негативными первичными опухолями, которые в настоящее время не доступны нацеленной на HER2 терапии [48, 56–63]. В настоящее время имеются все доказательства того, что HER2-статус может меняться в периоды прогрессирования или ремиссии у больных раком молочной железы. На основе этих данных изменение оценки статуса HER2 по результатам изучения экспрессии HER2 в ЦКО рассматривается как стратегия для потенциального клинического применения [48, 56–63]. Количественный анализ на основе применения конфокальной микроскопии для оценки экспрессии HER2 в индивидуальных клетках опухоли показал, что имеется существенная положительная корреляция между сверхэкспрессией HER2 и амплификацией гена в отдельных ЦКО [60].

HER2-позитивные ЦКО были обнаружены у пациентов с HER2-негативными опухолями. Тем не менее, их присутствие обычно наблюдается у женщин с HER2-позитивной болезнью [61]. Такие пациенты могут иметь положительный эффект от (вторичной) нацеленной на HER2 терапии в адьювантном варианте. На резистентные к лечению KRT 19 mRNA-позитивные клетки в периферической крови может эффективно воздействовать трастуцумаб [58]. Кроме того, обнаружение ERBB2 mRNA-позитивных ЦКО после завершения адьювантной терапии может дать клинически полезную информацию относительно эффективности лечения и

Таблица 3

Молекулярная характеристика ЦКО

Маркеры, экспрессируемые в ЦКО	Тип рака молочной железы	Число пациентов (экспрессируемый маркер, %)	Аналитическая технология	Литература
HER2	Операбельный, после адьювантной химиотерапии	214 (21)	Гнездовая RT-PCR	S. Apostolaki et al. [62]
hMAM	Операбельный	101 (13,9)	Гнездовая RT-PCR	M. Ntoulia et al. [67]
СК-19, hMAM, HER2	Ранняя стадия	175 (СК-19: 26,6; hMAM: 8; HER2: 28,6)	Мультимаркерная RT-PCR	M. Ignatiadis et al. [11]
СК-19, HER2, MAGE-A3, hMAM, TWIST-1	Ранняя стадия	64 (СК-19: 26,6; HER2: 12,5; MAGE-A3: 18,7; hMAM: 10,9; TWIST-1: 31,2)	Жидкий капельный зонд	A. Markou et al. [45]
СК-19	Ранняя стадия	179 (41)	RT-PCR в реальном времени	N. Xenidis et al. [13]
ER/PR	Ранняя стадия	48 (ER: 25; PR: 4)	RT-PCR	T. Fehm et al. [43]
HER2	Ранняя стадия	30 (33)	Конфокальная микроскопия	S. Cao et al. [60]
СК-19, HER2	Пациенты вне химиотерапии	30 (СК-19: 33; HER2: 83,3)	RT-PCR	V. Bozionellou et al. [58]
HER2	Неоадьювант	213 (24)	Система CellSearch	S. Riethdorf et al. [59]
HER2	Метастатический	45 (18)	Система CellSearch	E. Munzone et al. [64]
HER2	Метастатический	257 (50 CellSearch и 39 AdnaTest)	Система CellSearch и AdnaTest	T. Fehm et al. [48]
EpCAM, MUC1, HER2, ER, PR	Метастатический	42 (EpCAM: 86; MUC1: 86; HER2: 32; ER: 35; PR: 12)	AdnaTest	M. Tewes et al. [56]
VEGF, VEGF-2, HIF-1α, pFAK	Метастатический	34 (VEGF: 62; VEGF-2: 47; HIF-1α: 76; pFAK: 92)	Лазерная сканирующая микроскопия	G. Kallergi et al. [55]

Примечание. hMAM – человеческий MAM; MAGE – антиген меланомы; HIF – фактор, индуцируемый гипоксией; pFAK – фосфорилированная киназа фокальной адгезии.

прогноза у больных с операбельным раком молочной железы [62]. Сообщалось также об изменении HER2-статуса ЦКО по сравнению с первичной опухолью во время лечения больных с прогрессирующим раком молочной железы [62, 63].

Для оценки активности HER2-нацеленной терапии у пациентов с приобретенной сверхэкспрессией HER2 в ЦКО необходимы широкие клинические исследования. В недавних проспективных многоцентровых исследованиях статус HER2 в ЦКО у пациентов с метастатическим раком молочной железы был определен путем сравнения двух методов исследования ЦКО: CellSearch и AdnaTest Breast Cancer [48]. В этом исследовании HER2-позитивные ЦКО были обнаружены в значительном числе у пациентов с HER2-негативными первичными опухолями. Более того, отмечена обязательная корреляция зависящего от вида исследования статуса HER2 с клиническим эффектом от нацеленной на HER2 терапии.

Рецепторы эстрогенов и прогестерона

t. Fehm и соавт. сообщили, что в случаях, если экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в ЦКО оценивалась с помощью RT-PCR, распространение ЦКО было преимущественно обнаружено с трижды негативных опухолей и что ЦКО главным образом обнаруживали при трижды негативном статусе HER2, ER и PR первичной опухоли [43]. Эти исследователи установили, что: а) клинически важным может быть различие, вызванное слабым сходством между ЦКО и диссеминированными клетками опухоли, б) биология первичной опухоли, кажется, управляет распространением ЦКО, с) поскольку профили экспрессии в ЦКО и первичной опухоли различны, последствия для выбора адьювантной терапии должны быть специально оценены.

Маркеры ангиогенеза: рецептор эпидермального фактора роста и МАМ

Используя эксперименты с двойным окрашиванием и конфокальную лазер-сканирующую микроскопию, G. Kallergi и соавт. показали, что экспрессия pFAK (фосфорилированная – фокусной адгезии киназа), HIF-1 α (вызываемый гипоксией фактор α), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и VEGF2 в ЦКО у пациентов с метастатическим раком молочной железы могли бы объяснить метастатический потенциал этих клеток и указать терапевтические мишени для их устранения [55]. Исследования экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) при раке молочной железы дали неоднозначные результаты из-за больших различий методов исследования. Поэтому в исследованиях лечения анти-EGFR часто не используют отбор пациентов. R. Payne и соавт. использовали систему CellSearch для подсчета и измерения во времени экспрессии EGFR на поверхности ЦКО периферической крови лиц с метастатическим раком молочной железы [65]. Хотя доказательства клинического значения циркуляции EGFR-позитивных опухолевых клеток в настоящее время отсутствуют, экспрессия EGFR может предсказать реакцию на применение терапии, основанной на лапатинибе, как в случае, недавно представленном Z. Liu и соавт. [66]. Сообщалось также об экспрессии ЦКО маммаглобина [11, 41, 67].

Циркулирующие опухолевые клетки, раковые стволовые клетки и эпителиально-мезенхимальный переход

Гипотеза раковых стволовых клеток предполагает, что рак возникает в стволовых/прогениторных клетках в результате нарушения регуляции путей самообновления, формирования опухолей, которые стимулируются компонентом "опухоль-иницирующих клеток", сохраняющих свойства стволовых клеток. Растущая база доказательств свидетельствует, что субпопуляция раковых стволовых клеток (РСК) увеличивает и поддерживает многие типы злокачественных заболеваний человека [68]. Резистентность к терапии, лежащая в основе рецидивов злокачественности и отсутствие эффективного лечения при метастатической болезни ставит вопрос о том, в какой мере современная противораковая терапия направлена против нужных клеток. Действительно, терапия может не влиять на РСК, которые резистентны к многим современным видам лечения рака, включая химиотерапию и радиационную

терапию. Эти данные важны для того, чтобы разрабатывать и оценивать онкологическую терапию и представить возможность потенциального достижения исхода для пациента [68]. Одной из причин не подвергать РСК антипролиферативной терапии является их относительное "состояние спячки" [69].

Поскольку РСК выживают при проведении стандартной противораковой терапии и теоретически могут регенерировать рост опухоли даже при полном подавлении опухолевых клеток, могут потребоваться стратегии лечения, эффективные в отношении устранения РСК. Сигнальные пути, которые поддерживают РСК, могут стать привлекательной целью для такого способа лечения. H. Korcaуа и соавт. недавно продемонстрировали, что сверхэкспрессия HER2 усиливает канцерогенез в молочной железе, рост опухоли и ее инвазию через ее влияние на нормальные и злокачественные стволовые клетки в молочной железе [70]. По данным этого исследования, сверхэкспрессия HER2 в ряде линий клеток карциномы молочной железы увеличивала долю РСК, экспрессирующих ALDH, что проявляется повышением экспрессии регуляторных генов стволовых клеток, увеличением инвазии *in vitro* и повышением опухолегенеза у мышей NOD/SCID (нетучные диабетические/с тяжелым комбинированным иммунодефицитом). Влияние сверхэкспрессии HER2 в РСК при раке молочной железы блокируется трастуцумабом в чувствительных, но не в резистентных линиях клеток; эффект опосредуется путем PI3 киназа/Akt. Эти данные поддерживают гипотезу РСК, поскольку эти результаты позволяют предполагать, что эффекты амплификации HER2 на канцерогенез, опухолегенез и инвазию могут быть связаны с влиянием сверхэкспрессии HER2 на нормальные и злокачественные стволовые/прогениторные клетки молочной железы. Кроме того, клиническая эффективность трастуцумаба может быть связана с его способностью влиять на популяцию РСК в HER2-амплифицированных опухолях.

Явление эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) наделяет эпителиальные клетки усилением миграционного и инвазивного потенциала и таким образом включает их во многие физиологические и патологические процессы, требующие миграции и инвазии клеток. Недавно было показано, что индукция ЭМП не только позволяет раковым клеткам распространяться из первичной опухоли, но и усиливает их способность к самообновлению [71]. Кроме того, экспрессия маркеров стволовых клеток и ЭМП в ЦКО сочетается с резистентностью к обычной противораковой терапии и неэффективностью лечения, что поднимает вопрос о необходимости средств обнаружения и устранения минимальной остаточной болезни [71]. Хотя взаимоотношения между ЭИП и ЦКО остаются малоизученными, недавно рассматривались данные, подтверждающие участие процесса ЭМП в образовании ЦКО. Эксперименты на животных моделях с трансплантируемыми клетками опухоли молочной железы человека помогут изучить взаимоотношения ЭМП/ЦКО [71].

Действительно, результаты многих исследований показали, что субпопуляция ЦКО имеет предположительный фенотип стволовой клетки рака молочной железы и экспрессирует маркеры ЭМП. Первое свидетельство существования предположительного фенотипа, подобного стволовой клетке, среди диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у пациентов с раком молочной железы в ранней стадии, было получено M. Balic и соавт. [72]. Экспрессия таких маркеров РСК, как CD44, CD24 ALDH1, была показана в ЦКО и молекулярными методами [42], и при анализе изображений [73]. A. Magnifico и соавт. недавно представили доказательства терапевтической эффективности трастуцумаба в отношении опухоль-иницирующих клеток HER2-экспрессирующих опухолей. Эти авторы также предположили, что сигнальная система Notch регулирует экспрессию HER2, представляя критический путь выживания опухоль-иницирующих клеток [74].

Соображения для будущего

В соответствии с недавно предложенной С. Klein [75] моделью параллельного прогрессирования, параллельное независимое прогрессирование метастазов возникает из ранее диссеминированных опухолевых клеток. Данные относительно течения болезни, скорости роста опухоли, результаты аутопсии, клинические исследования, молекулярный генетический анализ первичных и диссеминированных клеток опухоли, ведут к выяснению прямой диагностики патологии при системном раке [75]. Молекулярная характеристика ЦКО предоставляет важную информацию для идентификации терапевтических целей и выяснения резистентности к терапии. Дальнейшие исследования молекулярной характеристики ЦКО будут способствовать лучшему пониманию биологии развития метастазирования у больных раком.

ЛИТЕРАТУРА

- Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Med. J. Australia*. 1869; 14: 146–7.
- Fidler I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3: 453–8.
- Kaiser J. Cancer's circulation problem. *Science (Wash DC)*. 2010; 327: 1072–4.
- Pantel K., Alix-Panabieres C., Riethdorf C. Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009; 6: 339–51.
- Hayes D.F., Smerage J.R. Is there a role for circulating tumor cells in the management of resectable cancer? *Lin. Cancer Res.* 2008; 14: 3646–50.
- Kasimir-Bauer S. Circulating tumor cells as markers for cancer risk assessment and treatment monitoring. *Mol. Diagn. Ther.* 2009; 13: 209–15.
- Braun S., Vogl F.D., Naume B., Janni W., Osborne M.P., Coombes R.C. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 793–802.
- Stathopoulou A., Mavroudis D., Perraki M., Apostolaki S., Vlachonikolis I., Lianidou E., Georgoulas V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 3404–12.
- Xenidis N., Vlachonikolis I., Mavroudis D., Perraki M., Stathopoulou A., Lianidou E. et al. Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer. *Ann. Oncol.* 2003; 14: 648–55.
- Xenidis N., Perraki M., Kafopsi M., Apostolaki S., Lianidou E., Georgoulas V. et al. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 3756–62.
- Ignatidis M., Kallergi G., Ntoulia M., Lianidou E., Georgoulas V., Mavroudis D. et al. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin-19, mammaglobin A and HER2 in early-stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 2593–600.
- Ignatidis M., Xenidis N., Perraki M., Lianidou E., Sotiriou C., Georgoulas V. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 5194–202.
- Xenidis N., Ignatidis M., Apostolaki S., Perraki M., Georgoulas V., Mavroudis D. et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 2177–84.
- Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J., Allard W.J., Terstappen L.W., Hayes D.F. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 781–91.
- Mostert B., Sleijfer S., Foekens J.A., Gratama J.W. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2009; 35: 463–74.
- Lianidou E., Mavroudis D., Sotiroulou G., Agelaki S., Pantel K. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Res.* 2010; 12: 307.
- Tibbe A.G., Miller M.C., Terstappen L.W. Statistical considerations for enumeration of circulating tumor cells. *Cytometry A.* 2007; 71: 154–62.
- Fehm T., Solomayer E.F., Meng S., Tucker T., Lane N., Wang et al. Methods for isolation circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy.* 2005; 7: 171–85.
- Konigsberg R., Obermayr E., Bises G., Pfeiler G., Gneist M., Wrba F. et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011; 50: 700–10.
- Siewwerts A.M., Kraan J., Bolt J., van der Spoel P., Elstrodt F., Schutte M. et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009; 101: 61–6.
- Mostert B., Bolt de Vries J., van der Spoel P., Siewwerts A.M., Schutte M. et al. Detection of circulating tumor cells of breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 127: 33–41.
- Schindlbeck C., Stellwagen J., Jeschke U., Karsten U., Rack B., Janni B. et al. Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich-Antigen. *Clin. Exp. Metastasis.* 2008; 25: 233–40.
- Deng G., Herrier M., Burgess D., Manna E., Krag D., Burke J.F. Enrichment with anti-cytokeratin alone and combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2008; 10: R69.
- Vona G., Sabile A., Louha M., Sitruk V., Romana S., Schutze K. 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: 57–63.
- Lin H.K., Zheng S., Williams A.J., Balic M., Groshen S., Sher H.I. et al. Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 5011–8.
- Zheng S., Lin H.K., Lu B., Williams A.J., Datar R., Cote R.J., Tai Y.C. 3D microfilter device for viable circulating tumor cells (CTCs) enrichment from blood. *Biomed. Microdevices.* 2011; 13: 203–13.
- Nagrath S., Sequist L.V., Maheswaran S., Bell D.W., Irimia D., Utkus L. et al. Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007; Dec 20; 450: 1235–9.
- Stott S.L., Hsu C.H., Tsukrov D.I., Yu M., Miyamoto D.T., Waltman B.A. et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107: 18392–7.
- Adams A.A., Okagbare P.I., Feng J., Hupert M.L., Patterson D., Gortert J. et al. Highly efficient circulating tumor cells isolation from whole blood and label-free enumeration using polymer-based microfluidics with an integrated conductivity sensor. *J. Am. Chem. Soc.* 2008; 130: 8633–41.
- Wang X., Qian X., Beitler J.J., Chen Z.G., Khuri F.R., Lewis M.M. et al. Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced raman scattering nanoparticles. *Cancer Res.* 2011; 71: 1526–32.
- Pachmann K., Clement J.H., Schneider C.P., Willen B., Camara O., Pachmann U. et al. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2005; 43: 617–27.
- Riethdorf S., Fritsche H., Muller V., Rau T., Schindlbeck C., Rack B. et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of CellSearch system. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 920–8.
- Balic M., Rapp N., Stanzer S., Lin H., Strutz J., Szkanera J. et al. Novel immunofluorescence protocol for multimarker assessment of putative disseminating breast cancer stem cells. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2011; 19: 33–40.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiment. *Clin. Chem.* 2009; 55: 611–22.
- Slade M.J., Smith B.M., Sinnett H.D., Cross N.C., Coombes R.C. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 870–9.
- Stathopoulou A., Gizi A., Perraki M., Apostolaki S., Malamos N., Mavroudis D. et al. Real time quantification of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of breast cancer patients using lightcycler system. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 5145–51.
- Stathopoulou A., Ntoulia M., Perraki M., Apostolaki S., Mavroudis D., Malamos N. et al. A highly specific real time RT-PCR method for the quantitative determination of CK-19 mRNA-positive cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer. *Int. J. Cancer.* 2006; 119: 1654–9.

38. Ring A.E., Zabaglo I., Ormerod M.G., Smith I.E., Dowsett M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer. Comparison of three techniques. *Br. J. Cancer.* 2005; 92: 906–12.
39. Fehm T., Braun S., Muller V., Janni W., Naume B., Pantel K. et al. A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer.* 2006; 107: 885–92.
40. Obermayr E., Sanchez-Cabo F., Tea M.K., Singer C.F., Krainer M., Fisher M.B. et al. Assessment of six gene panel for the molecular detection of circulating tumor cells in the blood of female cancer patients. *BMC Cancer.* 2010; 10: 666.
41. Reinholz M.M., Nibbe A., Jonart L.M., Joughton R., Zehentner B., Roche P.C. et al. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating tumor cells in women with suspected breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3722–32.
42. Aktas B., Tewes M., Fehm T., Hauch S., Kimmig R., Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: R46.
43. Fehm T., Hoffmann O., Aktas B., Becker S., Solomayer E.F., Wallwiener D. et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Cancer Res.* 2009; 11: R59.
44. Siewerts A.M., Kraan J., Bolt de Vries J., van der Spoel P., Mostert B., Martens J.W. et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leucocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009; 118: 455–68.
45. Markou A., Strati J., Malamos N., Georgioulas V., Lianidou E.S. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin. Chem.* 2011; 57: 421–30.
46. Alix-Panabieres C., Vendrell J.P., Slijper M., Pelle O., Barbotte E., Mercier G. et al. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in progression of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: R39.
47. Khleif S.N., Doroshow J.H., Hait W.N. AACR-FDA-NCI Cancer Biomarker Collaborative. AACR-FDA-NCI Cancer Biomarker Collaborative consensus report: advancing the use of biomarkers in cancer drug development. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3299–318.
48. Fehm T., Muller V., Aktas B., Janni W., Schneeweiss A., Stickeler E. 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.
49. Kraan J., Sleijfer S., Stribos M.H., Ignatiadis M., Peeters D., Pierga J.Y. et al. External quality assurance of circulating tumor cells enumeration using the CellSearch® system: a feasibility study. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2011; 80: 112–8.
50. Balic M., Dandachi N., Hofmann G., Samonigg H., Loibner H., Obwallner A. et al. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2005; 68: 25–30.
51. Punnoose E.A., Atwal S.K., Spoerker J.M., Savage H., Pandita A., Yeh R.F. et al. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS One.* 2010; 5: e12517.
52. Becker S., Becker-Pergola G., Banys M., Krawczyk N., Wallwiener D., Solomayer E. et al. Evaluation of a RT-PCR-based routine screening tool for the detection of disseminated epithelial cells in the bone marrow of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009; 117: 227–33.
53. Van der Auwera I., Peeters D., Benoy I.H., Elst H.J., Van Laere S.J., Prove A. et al. Circulating tumor cells detection: a direct comparison between the CellSearch system, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2010; 202: 276–84.
54. Mego M., Mani S.A., Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010; 7: 693701.
55. Kallergi G., Markomanolaki H., Giannoukaraki V., Papadaki M.A., Strati A., Lianidou E.S. et al. Hypoxia-inducible-factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: R84.
56. Tewes M., Aktas B., Welt A., Mueller S., Hauch S., Kimmig R. et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009; 115: 581–90.
57. Meng S., Tripathy D., Shete S., Ashfaq R., Haley B., Uhr J. et al. HER2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 9393–8.
58. Bozionellou V., Mavroudis D., Perraki M., Stathopoulou A., Lianidou E.S., Georgoulas V. et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 8185–94.
59. Riethdorf S., Muller V., Zhang L., Rau T., Loibl S., Komor M. et al. Detection and HER2 expression in circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuatro trial. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 2634–45.
60. Cao S., Li Y., Li J., Li C., Zhang W., Yang Z.Q. et al. Quantitative determination of HER2 expression by confocal microscopy assay in CTCs of breast cancer. *Oncol. Rep.* 2010; 23: 423–8.
61. Ignatiadis M., Rothe F., Chaboteaux C., Durbecq V., Rouas G., Criscitello C. et al. HER2-positive circulating tumor cells in breast cancer. *PLoS One.* 2011; 6: e15624.
62. Apostolaki S., Perraki M., Pallis A., Bozionellou V., Agelaki M., Kanellou P. et al. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and I 1/2 breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann. Oncol.* 2007; 18: 851–8.
63. Flores L.M., Kindelberger D.W., Ligon A.H., Capelletti M., Fiorentino M., Llodra M. et al. Improving the yield of circulating tumor cells facilitates molecular characterization and recognition of discordant HER2 amplification in breast cancer. *Br. J. Oncol.* 2010; 102: 1495–502.
64. Munzone E., Nole F., Goldhirsch A., Botteri E., Esposito A., Zorzino L. et al. Changes of HER2 status of circulating tumor cells compared with the primary tumor during treatment for advanced breast cancer. *Clin. Breast Cancer.* 2010; 10: 392–7.
65. Payne R.E., Yague E., Slade M.J., Apostolopoulos C., Jiao L.R., Ward B. et al. Measurements of EGFR expression on circulating tumor cells are reproducible over time in metastatic breast cancer patients. *Pharmacogenomics.* 2009; 10: 51–7.
66. Liu Z., Fusi A., Schmittel A., Tinhofer I., Schneider A., Keilholz U. Eradication of EGFR-positive circulating tumor cells and objective tumor response with lapatinib and capecitabine. *Cancer Biol. Ther.* 2010; 10: 860–4.
67. Ntoulia M., Stathopoulou A., Ignatiadis M., Malamos N., Mavroudis D., Georgoulas V. et al. Detection of Mammaglobin mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clin. Biochem.* 2006; 39: 879–87.
68. Diehn M., Cho R.W., Clarke M.F. Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin. Radiat. Oncol.* 2009; 19: 78–86.
69. Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P., Shete S., Naftalis E.Z., Huth J.F. et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 8152–62.
70. Korkaya H., Paulson A., Iovino F., Wicha M.S. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene.* 2008; 27: 6120–30.
71. Bonnomet A., Brysse A., Tachsidis A., Waltham M., Thompson E.W., Polette M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and circulating tumor cells. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 2010; 15: 261–73.
72. Balic M., Lin H., Young L., Hawes D., Gullano A., McNamara G. et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 5615–21.
73. Theodoropoulos P.A., Polioudaki H., Agelaki S., Kallergi G., Saridaki Z., Mavroudis D. et al. Circulating tumor cells with a putative breast cancer stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2010; 288: 99–106.
74. Magnifico A., Albano I., Campaner S., Delia D., Castiglioni P. et al. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 2010–21.
75. Klein C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer.* 2009; 9: 302–12.