

## ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА ЗА РУБЕЖОМ

© Е. АЛИКС ПАНАБЬЕРЕС, К. ПАНТЕЛ, 2014

УДК 616-006.04-076.5

Е. Аликс Панабьерес, К. Пантел (Catherine Alix-Panabieres<sup>1-3</sup>, Klaus Pantel<sup>4</sup>)

### ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ: ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ РАКА

<sup>1</sup>Laboratory of Rare Human Circulating Cells, Institute of Research in Biotherapy, University Medical Centre, Saint-Eloi Hospital, Montpellier, France; <sup>2</sup>Laboratory of Cell and Hormonal Biology, University Medical Centre, Amaid de Villeneuve Hospital, Montpellier, France; <sup>3</sup>University Institute of Clinical Research UM1-EA2415-Epidemiology, Biostatistic and Public Health, Montpellier, France; <sup>4</sup>Department of Tumor Biology, Center of Experimental Medicine, University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

*За последние годы разработаны многообещающие методы обнаружения циркулирующих опухолевых клеток – ЦОК. Аналитическая специфичность и клиническая полезность этих методов должны быть продемонстрированы в широких проспективных многоцентровых исследованиях, чтобы достичь высокого уровня доказательности, необходимого для внедрения в клиническую практику.*

*C. Alix-Panabieres<sup>1,2,3</sup>, K. Pantel<sup>4</sup>*

THE CIRCULATING TUMOR CELLS: LIQUID BIOPSY OF CANCER

<sup>1</sup>Laboratory of rare human circulating cells of Institute of research in biotherapy of University medical center of Saint-Eloi hospital, Montpellier, France; <sup>2</sup>Laboratory of cell and hormonal biology of University medical center of Amaid de Villeneuve hospital, Montpellier, France; <sup>3</sup>University institute of clinical research in epidemiology, biostatistic and public health, Montpellier, France; <sup>4</sup>Center of experimental medicine of University cancer center Hamburg of University medical center of Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

*Recently, promising techniques of detection of circulating tumor cells have been developed. The analytical specificity and clinical practicality of these techniques are to be demonstrated in broad prospective multi-centric studies to achieve high level of validity needed for its implementation into clinical practice.*

**Основания.** Обнаружение и молекулярная характеристика циркулирующих опухолевых клеток опухоли (ЦОК) является одним из наиболее активно разрабатываемых разделов онкологии – более 400 клинических исследований рассматривают ЦОК в качестве биомаркера. Цель исследований ЦОК: а) оценка риска рецидива метастазов или прогрессирования метастазирования (прогностическая информация); б) стратификация и мониторинг в реальном времени лечения; в) идентификация терапевтических целей и механизмов резистентности; г) установление развития метастазов у большого раком.

**Содержание.** Настоящий обзор посвящен технологиям, применяемым для обогащения и обнаружения ЦОК. Рассматриваются и обсуждаются современные технологии, основанные на использовании физических и биологических свойств ЦОК. Недавно были разработаны многие инновационные технологии для улучшения методов обнаружения ЦОК, в том числе микрочипы ЦОК, устройства для фильтрации, количественная обратнo-транскриптазная ПЦР, автоматические системы для микроскопии. Исследования молекулярных характеристик показывают, что ЦОК весьма гетерогенны и необходимо применять мультиплексные системы, для того чтобы обнаружить все подгруппы искомым клеток. Рассматриваются проблемы обнаружения ЦОК, которые подвержены эпителиально-мезенхимальному переходу. Повышение

аналитической чувствительности может вести, однако, к снижению аналитической специфичности (например, за счет обнаружения нормальных эпителиальных клеток).

На ранних этапах образования и роста первичной опухоли (например, рака молочной железы, толстой кишки или предстательной железы) клетки отрываются от первичной опухоли и начинают циркулировать в кровотоке. Эти циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) можно сконцентрировать и обнаружить с помощью различных технологий, основанных на использовании их физических и биологических свойств. Анализ ЦОК рассматривается как «жидкостная биопсия» в реальном времени у больных раком.

Прогноз жизни пациентов с карциномой, даже при малых размерах первичной опухоли, в основном определяется распространением опухолевых клеток через кровоток из первичной опухоли в другие органы – костный мозг, печень легкие или мозг – и разрастанием опухоли в новом окружении [1]. Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) и микрометастазы могут многие годы оставаться в спящем состоянии после полного удаления первичной опухоли, до того как метастазы проявят свой рост [2]. ДОК, происходящие из таких метастазов, могут циркулировать в кровотоке и колонизировать другие органы, приводя к образованию вторичных метастазов. В экспериментах на животных показано, что ДОК, преобразованные в ЦОК, могут возвращаться в первичную опухоль (это называют «самоосеменением опухоли» или «перекрестным осеменением»), вызывая образование агрессивных вариантов метастазов [3]. Эти ЦОК обладают потенциалом для развития локальных рецидивов [3], хотя эта гипотеза нуждается в подтверждении исследованиями у больных раком.

Минимальная остаточная болезнь (например, присутствие ДОК) не может быть обнаружена высокоразрешающими визуальными технологиями, однако ДОК в настоящее

Адрес для связи: Department of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martini str, 52, 20246, Hamburg, Germany. Fax +49-40 7410-55374; e-mail pantel@uke.de  
Clinical Chemistry, 59:1, 110-118 (2013)

Перевод статьи публикуется в соответствии с договором о сотрудничестве между журналами «Clinical Chemistry» и «Клиническая лабораторная диагностика».

время могут быть обнаружены в костном мозге, лимфатических узлах или периферической крови с помощью чувствительных и специфичных исследований [4]. Аспират костного мозга получают во время пункции иглой крыла подвздошной кости. Костный мозг играет важную роль как индикатор минимальной остаточной болезни [5]. Он рассматривается как обычный орган, в котором содержатся ДОК, происходящие из различных органов, а также как резервуар ДОК, способных вновь внедриться в отдаленные органы [6].

Для пациентов, страдающих раком, последовательные анализы имеют кардинальное значение. Поскольку получение аспириатов костного мозга является более инвазивной процедурой, чем взятие образца периферической крови, группы исследователей в настоящее время занимаются оценкой клинической полезности тестирования опухолевых клеток в периферической крови вместо костного мозга для оценки прогноза и мониторинга системной терапии [4].

Возможность обнаружить ЦОК в периферической крови у больных раком является многообещающей перспективой, и за последние годы были разработаны многие технологии. Обнаружение ЦОК остается технической проблемой. ЦОК содержатся в крови в минимальной концентрации порядка одна клетка опухоли на 1 млн клеток крови. Для того чтобы их идентифицировать и охарактеризовать, необходимы методы, обладающие чрезвычайно высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, которые обычно сочетают процедуры обогащения и обнаружения. В данном обзоре обсуждаются некоторые ключевые технологии для обнаружения ЦОК и рассматриваются проблемы, которые следует решить, для того чтобы ввести анализ ЦОК в клиническую практику.

*Стратегии обогащения ЦОК.* Подходы к обогащению ЦОК включают в себя обширную панель технологий, основанных на различных свойствах ЦОК, которые отличают их от окружающих нормальных гематопозитических стволовых клеток, в том числе физических (размер, плотность, электрический заряд, деформируемость) и биологических (экспрессия белков на поверхности клеток, жизнеспособность). Современные стратегии обогащения ЦОК приведены на рис. 1 (см. обложку).

*Физические свойства.* Преимущество физических свойств состоит в том, что они позволяют отделить ЦОК без метки. Методы, основанные на физических свойствах, включают центрифугирование в градиенте плотности [фикола, OncoQuick (Greiner bio-one)]; фильтрацию через специальные фильтры (например, фильтр ISET (изоляция по размеру эпителиальных клеток опухоли) или новейший микрофильтр в трех измерениях); новый гибкий микрочип без метки, в котором используется уникальное различие в размере и деформируемости опухолевых клеток (больше размером и менее гибкие, чем клетки крови); фотоакустический проточный цитометр; микропроточное устройство, в котором комбинируются разделение при прохождении через множество отверстий и технология разделения клеток с помощью диэлектрофореза; устройство для фракционирования с помощью проточно-полевого диэлектрофореза, которое позволяет изолировать жизнеспособные ЦОК по отличию их реакции на диэлектрофорез вследствие их различий по размеру и свойствам мембраны [7, 8].

*Биологические свойства. Иммунологические исследования.* В этих методиках обычно используются иммунологические процедуры с антителами к антигенам, ассоциированным с опухолью (позитивное выделение), или против общих антигенов лейкоцитов CD45 (негативное выделение). Иммуномагнитное исследование имеет целью захватить антиген с помощью антитела, связанного с магнитным шариком; комплекс антиген-антитело затем изолируется под воздействием магнитного поля. Позитивное выделение обычно осуществляется с помощью антител против молекул адгезии эпителиальных клеток (ErCAM). ЦОК затем обнаруживают иммуноцитологически с помощью антител против цитокератинов (СК), промежуточных волокон филаментов эпителиальных клеток [7]. Среди современных технологий, основанных на ErCAM, си-

стема Cell-Search® (Veridex), одобренная FDA (США), привлекает широкое внимание на протяжении 7 лет [4] и служит золотым стандартом для всех новых методов обнаружения ЦОК. Другим примером является MagSweeper, который позитивно обогащает для ЦОК экспрессию ErCAM и позволяет провести в последующем их молекулярный анализ. Путем использования трехмерного наноструктурированного субстрата – нано «flu rareg» технологии, которая представляет силиконовый нановолоконный зонд, покрытый антителами против ErCAM, – ЦОК также могут быть эффективно захвачены [7].

*Микроустройства.* В настоящее время наибольшее внимание привлечено к разработке микропроточных устройств (чипов), в которых могут использоваться очень небольшие объемы крови. Первый чип для ЦОК представлял собой зонд из микропоров, покрытых антителами против ErCAM, затем был разработан чип для ЦОК, имеющий колосовидную структуру. Недавно был предложен еще один чип для ЦОК, названный Ephesia, в котором используются колонки биофункциональных супермагнитных шариков, самособирающихся в микропроточные каналы в зонде магнитных ловушек, а также другая микропроточная система, осуществляющая высокопроизводительный отбор, подсчет и электромагнитическую манипуляцию с немногочисленными ЦОК [7]. Новый микро-Hall-детектор, основанный на микропроточном чипе, может непосредственно измерять в пробе цельной крови одиночные ЦОК, меченные магнитными наночастицами [9]. Для захвата ЦОК с недостаточной экспрессией ErCAM используют коктейль антител против различных других антигенов поверхности эпителиальных клеток (рецептор 2 человеческого эпидермального фактора роста – HER2, муцин-1 MUC1, рецептор эпидермального фактора роста – EGFR, рецептор белка, связанного с фолатом, TROP 1) и против антигенов мезенхимальных или стволовых клеток (с-MET, N-кадгерин, CD318 и антиген мезенхимальных стволовых клеток) [10]. Немедленный и прямой микроскопический анализ одиночных клеток без всяких манипуляций с клетками возможен в настоящее время благодаря прозрачным микроканалам. Могут быть обнаружены СК<sup>+</sup> и СК<sup>-</sup> ЦОК, а также комплекс анеуплоидных СК<sup>-</sup> ЦОК, которые, будучи выделены из клинических проб, могут представлять ЦОК, образованные при эпителиально-мезенхимальном переходе.

Фильтрация, основанная на размере клеток, удобна, но ее эффективность ограничена, поскольку на мембране остается много лейкоцитов, а более мелкие ЦОК проходят через нее. Это ограничение обусловлено широким диапазоном размеров ЦОК (от 4 до 30 мкм) даже у одного и того же пациента. Идея M. Lin и соавт. состоит в том, чтобы увеличить размер ЦОК путем связывания их с большим числом микрочастиц размером 3 мкм, связанных с антителами против ErCAM, с помощью мешалки Taylor-Gortler с последующим специфическим выделением их на микропроточном фильтрационном устройстве [11].

*Стратегии для обнаружения ЦОК.* После обогащения фракция ЦОК обычно содержит значительное число лейкоцитов, и ЦОК должны быть идентифицированы на уровне одиночных клеток с помощью метода, который может отличать опухолевые клетки от нормальных клеток крови.

*Стратегии, основанные на белках.* Система CellSearch и многие другие тесты для ЦОК используют один и тот же этап идентификации: клетки окрашиваются флюоресцентным красителем для цитокератина (положительный маркер), для общего лейкоцитарного антигена CD45 (отрицательный маркер) и ядерным красителем (4',6-диамидино-2-фенилиндолом или DAPI). Путем анализа многоцветных изображений с помощью флюоресцентного микроскопа ЦОК определяют как клетки СК<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/DAPI<sup>+</sup>.

Ключевым является вопрос: жизнеспособны ли клетки или подверглись апоптозу, поскольку только жизнеспособные клетки могут участвовать в образовании метастазов. Для обнаружения только жизнеспособных ЦОК используется функциональный тест EPISPOT (Epithelial ImmunoSPOT), который может быть дополнительно введен на любом этапе обогащения. Эта технология избегает прямого контакта с целевыми клетками

и оценивает присутствие ЦОК на основе секретируемых, отбрасываемых, выделяемых белков в процессе 24–48-часового краткосрочного культивирования [12]. Тест EPISPOT был использован для оценки проб крови и костного мозга у пациентов с раковой опухолью молочной железы, простаты и толстой кишки и позволил впервые получить клинические данные и доказательства клинической значимости жизнеспособных ЦОК, обнаруживаемых с помощью этого теста [13, 14].

Поскольку этапы обогащения могут приводить к смещению в отборе ЦОК, была разработана высокоскоростная цифровая микроскопия, использующая технологию сканирования оптико-волоконным зондом, для обнаружения ЦОК, меченных антителами с флуоресцентными конъюгатами [15]. Для обнаружения ЦОК были введены основанные на слайдах автоматические сканирующие микроскопы, но их многообещающие результаты еще нуждаются в подтверждении в широких клинических исследованиях [16].

*Стратегии, основанные на мРНК.* Исследования, основанные на определении специфической мРНК для обнаружения жизнеспособных ЦОК, получили широкое распространение и рассматриваются как альтернатива иммунологическим исследованиям для идентификации ЦОК. При раке молочной железы мРНК, кодирующая SK19, часто используется в клинических исследованиях [17], однако многие транскрипты (например, кодирующие SK18, SK19, SK20, MUC1, простатический специфический антиген и раково-эмбриональный антиген) также образуются в малых концентрациях в клетках нормальной крови и костного мозга [17, 18]. Для решения этой проблемы требуется применять количественные обратнотранскриптазные ПЦР-исследования с подтвержденным порогом разрешения. Более того, транскрипция гена может быть затруднена в ЦОК, например в процессе ЕМТ [19], вследствие чего могут потребоваться мультимаркерные варианты обратнотранскриптазной ПЦР. Недавно Markou и соавт. описали гибридационный тест с жидкостным шариковым зондом, в процессе которого мРНК, изолированная из обогащенных иммуномагнитным способом ЦОК, подвергается мультиплексной ПЦР для одновременного измерения экспрессии 6 генов в ЦОК [20]. Основанный на РНК коммерческий тест на ЦОК (AdnaTest<sup>TM</sup>, AdnaGen), использующий неколичественную обратнотранскриптазную ПЦР для идентификации клеток, которые экспрессируют предполагаемые транскрипты, специфичных для опухолей генов после иммуномагнитного захвата MUC1<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup>/ErCAM-клеток [21]. Следует учитывать ограничения, обусловленные фактом экспрессии MUC1 активированными Т-лимфоцитами [22].

Наконец, недавно было описано применение теломераз-специфичных реплика-избирательных аденовирусов для обнаружения ЦОК при раке молочной железы [23]. Результаты, полученные этим методом, сопоставимы с результатами, которые дает система Cell-Search в отношении частоты обнаружения ЦОК как у пациентов с метастатическим раком молочной железы, так и при ранних стадиях этого рака, однако нет совпадения результатов, получаемых этими методами у пациентов с наличием ЦОК. Эта новая технология может выявлять ЦОК с биологическими характеристиками, отличающимися от таковых ЦОК, обнаруживаемых системой Cell-Search. Другая причина расхождений может состоять в том, что гематопэтические стволовые клетки, циркулирующие в периферической крови, могут повышать концентрацию теломеразы, что может объяснять ложноположительные результаты.

*Повышение выхода ЦОК.* Выбор соответствующего маркера ЦОК, ограниченный объем пробы крови, которая может быть взята у больных раком, затрудняют обнаружение такого редкого явления, как ЦОК, особенно в тех ситуациях, когда при наличии ограниченной опухоли отсутствуют отдаленные метастазы и число ЦОК очень мало.

Эlegantным способом преодоления этого ограничения является обнаружение ЦОК *in vivo*. Такой подход в настоящее время реализуется с помощью нанодетектора GILUPI<sup>®</sup>. За 30 минут применения этого устройства в локтевой вене до 1,5 л крови (содержащей ЦОК) проходит через функцио-

нирующую зону нанодетектора размером 2 см, что позволяет обнаружить большое число ЦОК, содержащих антитела анти-ErCAM [24]. Поверхность нанодетектора может быть покрыта дополнительными антителами, и ЦОК могут быть захвачены из крови для последующего иммуноцитохимического или основанного на ПЦР анализа. Клинические исследования у больных раком молочной железы и легкого показали, что нанодетектор GILUPI<sup>®</sup> может обнаружить большее число ЦОК, чем система Cell-Search [24]. Кроме того, нанодетектор обнаруживает хорошую биосовместимость и не дает побочных эффектов. Этот новый нанодетектор испытан на небольшом числе проб от пациентов и нуждается в валидации при многоцентровых исследованиях для того, чтобы подтвердить его клиническую приемлемость по сравнению с другими технологиями обнаружения ЦОК.

Альтернативный подход состоит в использовании лейкофереза, декантировании для последующего анализа ЦОК *ex vivo* с использованием проточной цитометрии и ПЦР в реальном времени для молекулярной характеристики [25]. Eiffler и соавт. показали, что лейкоферез собирает  $13,5 \cdot 10^9$  одноклеточных клеток с эффективностью 87%. Хотя этот подход может дать значительное число ЦОК для молекулярного анализа, он должен быть адаптирован к условиям минимального причинения стресса пациентам и к требованиям клинической практики, чтобы найти в будущем клиническое применение.

*Эпителиально-мезенхимальный переход как проблема для обнаружения ЦОК.* Термин «пластичность клетки» относится к способности некоторых клеток, особенно стволовых, приобретать характеристики других клеток в организме. Эпителиально-мезенхимальный переход является сложным процессом, который ведет к дедифференциации клетки и повышению подвижности и перестройке соединений контактов клеток и в конечном счете к потере адгезии клеток. В процессе этого перехода клетки меняют свой эпителиальный фенотип (частично или полностью) на мезенхимальный. Этот механизм, который обычно действует в процессе органогенеза и при заживлении ран, еще недостаточно изучен применительно к рассеиванию раковых клеток и его влияние на технологии идентификации ЦОК в крови неизвестно. Было высказано предположение, что эпителиально-мезенхимальный переход сочетается с агрессивностью рака и может повышать способность клеток мигрировать [26]. Обратный процесс, называемый мезенхимально-эпителиальным переходом, как предполагают, играет фундаментальную роль в закреплении ЦОК в удаленном органе и образовании метастазов в новом микроокружении. Недостаточно сведений о тех триггерах, которые контролируют тонкий баланс между двумя разнонаправленными процессами в каскаде метастазов [27].

Принципиально важная популяция мезенхимально-подобных раковых клеток, представленных в кровотоке больных при раке, вероятно, игнорируется при обычной процедуре обнаружения ЦОК, основанной на таких эпителиальных маркерах, как ErCAM и цитокератины. Хотя еще продолжается обсуждение значения эпителиально-мезенхимального перехода у больных раком (в противоположность данным экспериментальных исследований в модельных системах) [28], недавние работы позволяют предполагать, что эпителиально-мезенхимальный переход может особенно повлиять на опухолевые клетки, подобные стволовым клеткам [19]. Поэтому проявляется большой интерес к исследованию маркеров эпителиально-мезенхимального перехода у ЦОК, а недавние исследования позволяют предполагать, что исследования, основанные на эпителиальных антигенах, могут игнорировать наиболее агрессивные субпопуляции ЦОК [27]. Следовательно, имеется острая потребность оптимизации методов обнаружения ЦОК за счет включения маркеров, которые не подавляются при эпителиально-мезенхимальном переходе, но которые позволяют осуществлять анализ, различая ЦОК среди окружающих клеток крови. Например, виментин, мезенхимальный промежуточный филамент, часто экспрессируемый клетками карциномы, которые подвергались эпителиально-мезенхимальному переходу, также экспрессируется клетками крови и поэтому не может использоваться в

качестве единственного маркера ЦОК; виментин должен комбинироваться с молекулярным маркером, идентифицирующим опухолевые клетки [29].

*Циркулирующие эпителиальные клетки у пациентов с доброкачественными заболеваниями.*

Кардинальное исследование 2004 г., которое Cristofanilli и соавт. провели у больных пациентов с раком молочной железы, показало, что циркулирующие эпителиальные клетки, обнаруженные системой Cell-Search, были редки у здоровых женщин ( $n = 145$ ; средняя (SD) 0,1 (0,2) клетки на 7,5 мл цельной крови) и у пациентов с доброкачественным заболеванием молочной железы ( $n = 200$ ; средняя (SD) 0,1 (0,9) клетки на 7,5 мл цельной крови) [30]. Ни у кого из здоровых лиц контрольной группы не было двух и более таких клеток на 7,5 мл крови.

Удивительно, что положительные результаты, отвечающие критериям для «клеток опухоли», были обнаружены у пациентов с доброкачественным заболеванием толстой кишки с помощью как системы Cell-Search (11,3 %), так и теста на CK19 EPISPOT (18,9%), тогда как не получено у здоровых волонтеров положительных результатов [31]. Положительные результаты более часто отмечались у пациентов с дивертикулезом и болезнью Крона, при этом не было развития рака толстой кишки в течение трехлетнего периода наблюдения. При всех положительных результатах была недостаточная экспрессия CD45, общего лейкоцитарного антигена. Эти результаты показывают, что у всех пациентов с доброкачественными воспалительными заболеваниями толстой кишки могут быть обнаружены жизнеспособные циркулирующие эпителиальные клетки при применении обычных тестов обнаружения ЦОК.

Интересные данные были обнаружены в группе из 25 человек с повышенной концентрацией простатического специфического антигена, у которых были отрицательные результаты биопсии предстательной железы при подозрении на рак простаты [32]. Неожиданно у 8% лиц контрольной группы обнаружено  $\geq 3$  ЦОК на 22,5 мл; однако срок наблюдения был слишком краток, чтобы исключить возможность подтверждения в последующем диагноза рака простаты при повторной биопсии.

Результаты, полученные на мышинной модели, показали, что клетки поджелудочной железы с мезенхимальным фенотипом и свойствами стволовых клеток циркулируют в крови и обсеменяют печень до того момента, когда была обнаружена первичная опухоль [33].

Эти данные не только указывают на необходимость в дальнейшем молекулярной характеристики циркулирующих эпителиальных клеток, они также имеют важное значение для использования теста на ЦОК [31, 34].

*Анализ ЦОК с помощью жидкостная биопсии в реальном времени.* Жидкостная биопсия может быть определена как исследование крови, обладающее такой чувствительностью, что способно обнаружить одиночную клетку опухоли, затерянную среди миллиарда нормальных гематопоэтических клеток. Этот новый вид биопсии выполняется в реальном времени и позволяет получить характеристику специфической субпопуляции ЦОК; он способен революционизировать диагностику и лечение рака (рис. 2, см. обложку).

В настоящее время выбор таргетной терапии для отдельного пациента осуществляется после анализа первичной опухоли на экспрессию и/или геномный статус специфической молекулярной мишени; однако осуществление такого выбора часто затрудняется гетерогенностью и пластичностью индивидуальных опухолевых клеток в данной ткани [35]. Многочисленные исследования показали, что клетки метастазов могут иметь фенотипические и генотипические характеристики, отличающиеся от таковых основной массы клеток первичной опухоли [36]. Эти характеристики могут быть объяснены тем, что: а) метастатический субклон в первичной опухоли немногочислен и ускользает от обнаружения; б) метастатические клетки со временем обретают дополнительные геномные характеристики и развиваются независимо от первичной опухоли [37]. Таким образом, прямой анализ метастатических клеток может дать дополнительную важную информацию, прежде чем

пациенту будет назначено дорогостоящее лечение, которое может оказать значительное побочное действие. Например, информация, относящаяся к экспрессии рецептора эстрогена или онкогена HER2\* на ЦОК, может быть полезна для стратификации и мониторинга эндокринной терапии или лечения трастузумабом (человеческие антитела против HER2). Многочисленные сообщения указывают на расхождения между статусом первичной опухоли и ЦОК в экспрессии этих мишеней у одних и тех же пациентов [38, 39]. Кроме того, ЦОК у отдельных пациентов обнаруживают поразительную гетерогенность в отношении генов, экспрессирующих такие терапевтические мишени, как HER2 или EGFR [38, 40, 41]. Степень влияния этой гетерогенности на уклонение метастатических опухолевых клеток от таргетной терапии – предмет будущих клинических исследований. В такой анализ могут также включаться понижающие компоненты в путях передачи сигналов, которые влияют на новые средства таргетной терапии (например, KRAS (гомолог вирусного онкогена v-Ki-ras2 крысиной Kirsten саркомы); мутации в EGFR-таргетной терапии или PIK3CA (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа, каталитическая субъединица альфа; прежде именовался P13K); мутации в HER2-таргетной терапии). Кроме того, введение трастузумаба может исключить резистентные к химиотерапии СК19 мРНК-позитивные ЦОК, снижает риск рецидива болезни и удлиняет срок периода выживания, свободного от проявлений болезни [42]. Поэтому внедрение анализа ЦОК с помощью жидкостной биопсии способно позволить по-новому взглянуть на сложный механизм резистентности к лекарствам.

*Заключения и перспективы.* В последние годы разработано немало многообещающих технологий обнаружения ЦОК и они продолжают совершенствоваться. Эти новые подходы нуждаются в валидации в многоцентровых клинических исследованиях с определенными порогами решений, такими как свобода от проявлений болезни или полное выздоровление. Кроме того, следует дифференцировать наиболее агрессивные субфракции ЦОК, которые служат иницирующими метастазы клетками [43]. Поэтому необходимо разработать более эффективные стратегии, которые способны также изолировать и идентифицировать субпопуляции опухолевых клеток с понижающей экспрессией эпителиальных белков. Кроме того, может появиться возможность идентифицировать ткань источника ЦОК, используя профилирование экспрессии, чтобы обнаружить специфичные для органа метастатические клеточные признаки ЦОК. Это может помочь в обнаружении малых, скрытых метастатических поражений и указать путь дальнейшим диагностическим и лечебным стратегиям.

Вне зависимости от использованного технологического подхода ключевым вопросом для клинических испытаний является определение того, как оценка ЦОК может привести лечение к наиболее эффективному удалению метастатических клеток. Способность обнаружить и удалить метастатические клетки в наиболее ранний срок определяет потенциальную возможность снизить смертность от рака.

Еще более интересно изучить ДНК опухоли, свободной от метастатических клеток, параллельно с ЦОК [44, 45]. Возникновение мутаций KRAS является медиатором резистентности к блокаде EGFR и эти мутации – подобно молекулярной характеристике ЦОК – могут быть обнаружены непосредственно неинвазивным путем в сыворотке больных раком. Анализ ЦОК и ДНК, свободных от клеток, может объяснить синергичный путь, по которому у солидных опухолей развивается резистентность к таргетной терапии.

\*Гены человека: HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (современные, апробированные HUGO термин и наименование: ERBB2, гомолог 2 av-erb-b2 эритробластного лейкоэмического вирусного онкогена, гомолог производного нейро/глиобластомы онкогена (avian)); KRAS, гомолог вирусного онкогена v-Ki-ras2 крысиной Kirsten саркомы; PIK3CA (прежде именовался P13K), фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназа, каталитическая субъединица альфа.

В целом имеются доказательства того, что ЦОК отражают прогрессирование опухоли в реальном времени и что эта информация может помочь в отношении системной терапии. В будущем характеристики ЦОК, как ожидается, будут использоваться при управлении таргетной терапией, чтобы определять популяции пациентов, больных раком, в пределах определенного терапевтического окна, которое служит критерием для персонализированной медицины.

## ЛИТЕРАТУРА

- Hanahan D., Weinberg R.A. *Hallmarks of cancer : the next generation*. *Cell* 2011; 144: 646–74.
- Uhr J.W., Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 12396–400.
- Kim M.Y., Oskarsson T., Acharyya S., Nguyen D.X., Zhang X.H., Norton L., Massague J. *Tumor self-seeding by circulating cancer cells*. *Cell*. 2009; 139: 1315–26.
- Pantel K., Alix-Panabieres C., Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009; 6: 339–51.
- 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.
- Pantel K., Brakenhoff R.H. Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 448–56.
- Alix-Panabieres C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu. Rev. Med.* 2012; 63: 199–215.
- Parkinson D.R., Dracopoli N., Gumbs Petty B., Compton C., Cristofanilli M., Deisseroth A. et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 138.
- Issadore D., Chung J., Shao H., Liang M., Ghazani A.A., Castro C.M., et al. Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a micro-Hall detector. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 141.
- Pecot C.V., Bischoff F.Z., Mayer J.A., Wong K.L., Pham T., Bofford-Miller J. et al. A novel platform for the detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov* 2011; 1: 580–6.
- Lin M.X., Huyn K.A., Moon H.S., Sim T.S., Lee J.G., Park J.C. et al. Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation. *Biosens. Bioelectron.* 2013; 40: 63–7.
- Alix-Panabieres C., EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients. *Recent Results Cancer Res.* 2012; 195: 69–76.
- 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 metastatic progression of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: R39.
- Alix-Panabieres C., Vendrell J.P., Pelle O., Rebillard X., Riethdorf S., Muller V. et al. Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients. *Clin. Chem.* 2007; 53: 537–9.
- Somlo G., Lau S.K., Frankel P., Hsieh H.B., Liu X., Yang L. Multiple biomarker expression on circulating tumor cells in comparison to tumor tissues from primary and metastatic sites in patients with locally advanced/inflammatory, and stage IV breast cancer, using a novel detection technology. *Breast. Cancer Res. Treat.* 2011; 128: 155–63.
- Ntourouplis T.G., Ashraf S.Q., McGregor S.B., Turney B.W., Seppo A., Kim Y. et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescent microscope. *Br. J. Cancer.* 2008; 99: 789–95.
- Pantel K., Brakenhoff R.H., Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumor cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2008; 8: 329–40.
- Lianidou E.S., Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization and future challenges. *Clin. Chem.* 2011; 57: 1242–57.
- Mani S., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y. et al. The epithelial-mesenchymal transition generate cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008; 133: 704–15.
- Markou A., Strati A., Malamos N., Georgoulas 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.
- Andreopoulou E., Yang L.Y., Rangel K.M., Reuben J.M., Hsu L., Krishnamurthy S. et al. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): AdnaGen Adna Test BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *Int. J. Cancer.* 2012; 130: 1590–7.
- Agrawal B., Krantz M.J., Parker J., Longenecker B.M. DExpression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res.* 1998; 58: 4079–81.
- Kim S.J., Masago A., Tamaki Y., Akazawa K., Tsukamoto F., Sato J. et al. A novel approach using telomerase-specific replication-selective adenovirus for detection of circulating tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 128: 765–73.
- Saucedo-Zeni N., Mewes S., Niestroj R., Casiorowski L., Murawa D., Nowaczyk P., et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int. J. Oncol.* 2012; 16.
- Eiffler R.L., Lind J., Falkenhagen D., Weber V., Fischer M.B., Zeilinger R., Enrichment of circulating tumor cells from a large blood volume using leukapheresis and elutriation: proof of concept. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2011; 80: 100–11.
- Thompson E.W., Haviv I. The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat. Med.* 2011; 17: 1048–9.
- Bednarz-Knoll N., Alix-Panabieres C., Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31: 673–87.
- Ledford H. Cancer theory faces doubts. *Nature.* 2011; 472: 273.
- Bednarz N., Eltze E., Semjonow A., Rink M., Andreas A., Mulder L. et al. BRCA1 loss preexisting in small subpopulations of prostate cancer is associated with advanced disease and metastatic spread to lymph nodes and peripheral blood. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3340–8.
- Cristofanilli M., Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 781–91.
- Pantel K, Deneve E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, et al. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin. Chem.* 2012; 58: 936–40.
- Davis J.W., Nakanishi H., Kumar V.S., Bhadkamkar V.A., McCormack R., Fische H.A. et al. tumor cells in peripheral blood samples from patients with increased serum prostate specific antigen: initial results in early prostate cancer. *J. Urol.* 2008; 179: 2187–91, discussion 2191.
- Rhim A.D., Mirek E.T., Aiello N.M., Maitra A., Bailey J.M., McAllister F., et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012; 148: 349–61.
- Lianidou E.S. Circulating tumor cells – new challenges ahead. *Clin. Chem.* 2012; 58: 805–7.
- Stoecklein NH, Klein CA. Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *Int. J. Cancer.* 2010; 126: 589–98.
- Pantel K., Alix-Panabieres C. . Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* 2010; 16: 398–406.
- Klein C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer.* 2009; 9: 302–12.
- Riethdorf S., Muller V., Zhang L., Rau T., Loibl S., Komor M. et al. Detection and HER2 expression of circulating tumour cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 2634–45.
- Wulfing P., Borchard J., Buerger H., Heidi S., Zanker K.S., Kiesel L., Brandt B. HER2 positive circulating tumour cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 1715–20.
- Ignatiadis M., Rothe F., Chaboteaux C., Durbaq V., Rouas G., Cristofanilli C. et al. HER2 positive circulating tumour cells in breast cancer. *PLoS One.* 2011; 6 e15624.
- Hannemann J., Meyer-Staeckling S., Kemming D., Alpers I., Joosse S.A., Pospisil H. et al. Quantitative high-resolution genomic analysis of single cancer cells. *PLoS One.* 2011; 6 e26362.
- Georgoulas V., Bozionelou V., Agelaki S., Perraki M., Apostolaki S., Kallergi G. et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy resistant. CK19mRNA-positive. circulating tumour cells: results of a randomized phase II study. *Ann. Oncol.* 2012; 23: 1744–50.
- Wicha M.S., Hayes D.F. Circulating tumour cells: Not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 1508–1.
- Diaz L.A.Jr, Williams R.T., Wu J., Kinde I., Hecht J.R., Berlin J. et al. The molecular evolution of acquired resistance in targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature.* 2012; 486: 537–40.
- Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K. Cell-free nucleus acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* 2001; 1: 426–37.

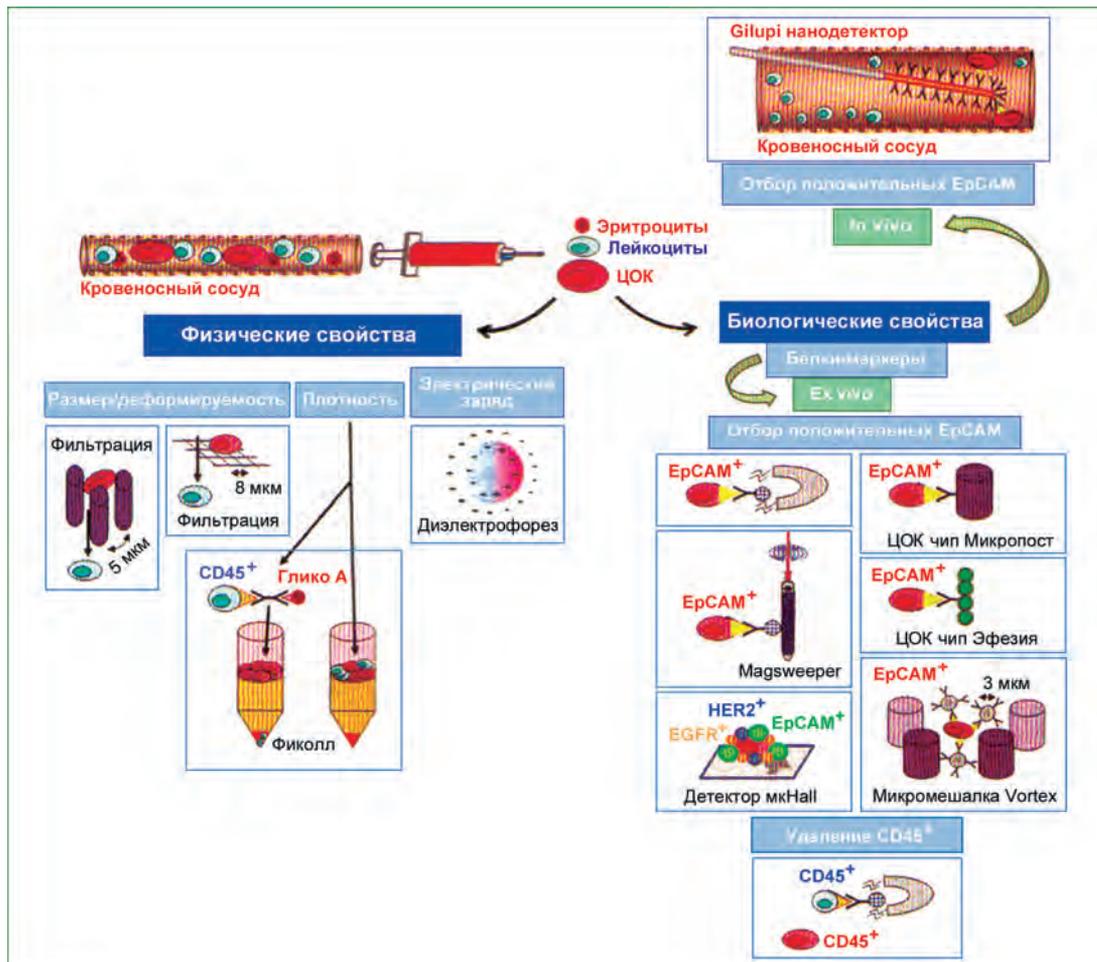


Рис. 1. Обогащение циркулирующих клеток опухоли из периферической крови больных раком, основанное на физических и биологических свойствах ЦОК. Физические свойства включают размер (устройство с мембранным фильтром), деформируемость (микропроточная система в чипе), плотность (центрифугирование в фиколле) и электрический заряд (дieleктрофорез). Биологические свойства основаны на следующем: экспрессия маркеров мембраны клетки, включая молекулы адгезии эпителиальной клетки (EpCAM) для позитивной селекции и CD45 для негативной селекции; анти-EpCAM и анти-CD45 антитела, конъюгированные с магнитными шариками в магнитном поле; антитела анти-EpCAM на микропостах или колонках наночастиц; антитела анти-EpCAM, конъюгированные с шариками размером 3 мкм для увеличения размера ЦОК перед фильтрацией; антитела анти-EpCAM, анти-HER2/neu, анти-EGFR на различного размера наночастицах для захвата и обнаружения различных ЦОК. Все эти технологии были использованы для проб крови *ex vivo*. Недавно, однако, предложена новая технология *in vivo* (вверху справа), способная проводить обогащение ЦОК непосредственно в вене предплечья пациента, используя до 1,5 л крови. С помощью этой технологии может быть собрано большое количество ЦОК [24].

Глико А, гликофорин А – белок из 131 аминокислотного остатка на внеклеточной поверхности эритроцитов. Модифицировано с разрешения авторов [7].

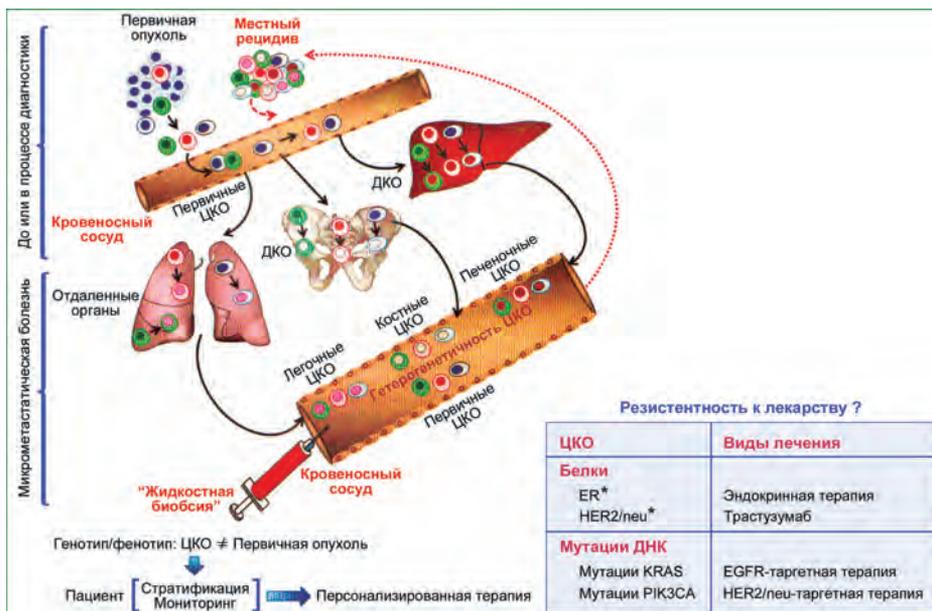


Рис. 2. ЦОК с помощью жидкостной биопсии в реальном времени.

ЦОК могут образоваться из различных источников (например, из первичной опухоли или органов с метастазами, таких как печень, легкие или костный мозг) в зависимости от стадии болезни. Анализ ЦОК – "жидкостная биопсия" у больных раком, позволяющая получить информацию о терапевтических мишенях и/или механизмах резистентности; в будущем может быть использована для стратификации пациентов по таким терапевтическим мишеням, как торможение EGFR/HER2 или эндокринная терапия, для мониторинга эффективности лечения и развития резистентности в реальном времени.

ER+ – позитивный рецептор эстрогенов. Модифицировано с разрешения авторов [7].