

УДК 618.19: 616–006–07

ББК 53.57+55.6

Ш 70

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме и любыми средствами без письменного разрешения владельцев авторских прав.

Автор, редакторы и издатели приложили все усилия, чтобы обеспечить точность приведенных в данной книге показаний, побочных реакций, рекомендуемых доз лекарств, а также схем применения технических средств. Однако эти сведения могут изменяться. Внимательно изучайте сопроводительные инструкции изготовителя по применению лекарственных и технических средств.

В оформлении обложки использованы авторские микрофотографии А.А.Ковалева

Рецензенты:

директор Института биофизии и клеточной инженерии Национальной Академии Наук Республики Беларусь, кандидат медицинских наук, доцент А. Е. Гончаров; профессор кафедры онкологии Гродненского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук, профессор К. Н. Угляница.

Шляхтунов Е.А.

Ш70 Циркулирующие опухолевые клетки: характеристика, клиническое и прогностическое значение при раке молочной железы. / Е.А. Шляхтунов. — Издатели Чернин и Плешков, Витебск, 2021. — 168 с.: ил.

ISBN 978-985-6333-63-0

Монография суммирует современные данные о циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы. В работе детально раскрыты механизмы метастазирования с учетом характеристик циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток, их протеома и транскриптома. Также изложены современные способы поиска, выделения и идентификации циркулирующих опухолевых клеток. В монографии представлены собственные результаты фундаментальных исследований молекулярно-генетических характеристик циркулирующих опухолевых клеток, в том числе и микроРНК. В научном труде изложен опыт клинического применения и значения циркулирующих опухолевых клетках на этапах специального лечения резектабельного рака молочной железы с целью мониторинга и контроля эффективности противоопухолевой терапии, а также оценена прогностическая и предиктивная значимость патологических клеток. Предложены новые методы диагностики и лечения рака молочной железы с учетом циркулирующих опухолевых клеток с обоснованием экономической эффективности. Монография рассчитана на специалистов медицинского и биологического профилей — онкологов, маммологов, хирургов, радиологов, химиотерапевтов, патологов и может быть использована как учебное пособие для студентов медицинских вузов, интернов, клинических ординаторов и курсантов на кафедрах онкологии ФПК.

Сайт издательства: www.medlit.biz

УДК 618.19: 616–006–07

ББК 53.57+55.6

ISBN 978-985-6333-63-0

© изд. Плешков Ф. И., изд. Чернин Б. И., 2022

© Шляхтунов Е. А., 2022

Оглавление

Оглавление	iii	1.14 Механизмы выживания: тромбоциты, иммунитет и циркулирующие опухолевые микроэмболы	23
Список сокращений	iii	1.14.1 Слияние тромбоцитов	23
Предисловие	iii	1.14.2 Невосприимчивость	23
Глава 1		1.14.3 Циркулирующие опухолевые микроэмболы	24
Циркулирующая опухолевая клетка — ключевая фигура метастатического процесса	1	1.15 Роль микроРНК в патогенезе опухолевой прогрессии	24
1.1 Метастатический каскад	2	1.16 Терапевтические подходы к лечению минимальной остаточной болезни	29
1.2 Гипотеза семян и почвы	3	1.17 Выводы	30
1.3 Местные механизмы рецидива заболевания	4	Глава 2	
1.3.1 Опухолевая «самопосадка»	4	Мета-анализ опубликованной литературы	31
1.3.2 Терапевтически устойчивые клетки	5	Глава 3	
1.3.3 Механизмы терапевтической резистентности	5	Поиск циркулирующих опухолевых клеток — как найти иголку в стоге сена	40
1.3.3.1 Множественная лекарственная устойчивость	5	3.1. Обогащение, выделение и идентификация циркулирующих опухолевых клеток	40
1.3.3.2 Пан-резистентность	6	3.2 Проблемы исследования ЦОК в качестве маркера заболевания	43
1.4 Эпителиально-мезенхимальный переход	7	3.3 Размер и вероятность выборки	43
1.5 Эпителиально-мезенхимальный переход и минимальная остаточная болезнь	8	3.4 Циркулирующие опухолевые микроэмболы	45
1.6 Мезенхимально-эпителиальный переход и минимальная остаточная болезнь	10	3.5 Циркулирующие опухолевые материалы	47
1.7 Доказательства того, что циркулирующие опухолевые клетки являются злокачественными	11	3.6 Активность теломеразы и обнаружение ЦОК	48
1.8 Рак в стадии прогрессии и в состоянии покоя	12	3.7 Аптамер-технологии в обнаружении ЦОК	48
1.9 Циркулирующие и диссеминированные опухолевые клетки и протоковая карцинома in situ	14	3.8 Функциональное исследование ЦОК	49
1.10 Минимальная остаточная болезнь и фенотип стволовой опухолевой клетки	14	3.9 Математическое моделирование	50
1.11 Характеристика циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток	16	Глава 4	
1.12 Гормонорецепторный статус и минимальная остаточная болезнь	19	Разработка и клиническая оценка тест-систем для определения транскриптов генов и идентификации циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы	53
1.13 Статус HER2-neu первичной опухоли, минимальная остаточная болезнь и отдаленные метастазы	21	4.1 Разработка тест-систем для определения транскриптов генов BIRC5, HER2-neu и c-ABL на основе ОТ–ПЦР в режиме реального времени	53

4.2 Клиническая апробация оценки экспрессии генов сурвивина BIRC5 и рецептора эпидермального роста HER2-neu в биоптатах рака молочной железы с использованием разработанных оригинальных тест-систем	60
4.2.1 Экспрессия антиапоптотического протеина сурвивина в первичной карциноме молочной железы	60
4.2.2 Экспрессия гена сурвивина BIRC5 в первичной карциноме молочной железы	61
4.2.3 Экспрессия гена HER2-neu рецептора эпидермального фактора роста в первичной карциноме молочной железы	61
4.3 Клиническая апробация оценки экспрессии генов сурвивина BIRC5 и рецептора эпидермального роста HER2-neu в циркулирующих опухолевых клетках с целью их идентификации с использованием разработанных оригинальных тест-систем	64
4.4 Обсуждение	68
4.5 Выводы	70
Глава 4	
Генетический профиль циркулирующих опухолевых клеток при первичном нематастатическом раке молочной железы	71
5.1 Экспрессия гена HER2-neu и BIRC5 в циркулирующих опухолевых клетках при первичном раке молочной железы	73
5.2 Экспрессия генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и маркера стволовой клетки в циркулирующих опухолевых клетках при первичном раке молочной железы	73
5.3 Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости ABC-транспортеров в циркулирующих опухолевых клетках при первичном раке молочной железы	75
5.4 Транскрипционный фенотип циркулирующих опухолевых клеток при первичном нематастатическом раке молочной железы	79
5.5 Обсуждение	82
5.6 Выводы	84

Глава 6	
Профиль микроРНК циркулирующих опухолевых клеток при первичном нематастатическом раке молочной железы	85
6.1. Методология исследования	85
6.2. Профиль микроРНК и мРНК	87
6.3 Обсуждение	90
6.4 Выводы	90
Глава 7	
Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток при первичном нематастатическом раке молочной железы	92
7.1 Дизайн и характеристика исследования	92
7.1.1 Критерии включения и исключения пациентов	92
7.1.2 Характеристика сплошного проспективного нерандомизированного исследования	93
7.1.3 Характеристика пациентов, включенных в сплошное проспективное нерандомизированное исследование	93
7.1.4 Лечение пациентов, включенных в сплошное проспективное нерандомизированное исследование	95
7.1.5 Методы исследования	96
7.2 Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток при хирургическом лечении рака молочной железы	98
7.2.1 Объем хирургического лечения и минимальная остаточная болезнь	98
7.2.2 Стадия опухолевого процесса и циркулирующие опухолевые клетки при хирургическом лечении рака молочной железы	99
7.2.3 Патоморфологические и молекулярно-биологические характеристики первичной опухоли и циркулирующие опухолевые клетки при раке молочной железы	100
7.3 Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток при адъювантном химиотерапевтическом лечении рака молочной железы	100
7.3.1 Адъювантная полихимиотерапия рака молочной железы в режиме циклофосфан + доксорубин/эпирубицин + фторурацил (CAF/CEF)	101

7.3.2 Адъювантная полихимиотерапия рака молочной железы в режиме доксорубин/эпирубицин + циклофосфан (АС/ЕС)	102
7.3.3 Адъювантная полихимиотерапия рака молочной железы в режиме доксорубин + циклофосфан + паклитаксел (АС+Т)	103
7.3.4 Адъювантная полихимиотерапия рака молочной железы в режиме паклитаксел + трастузумаб (Т+Траст)	104
7.4 Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток при адъювантной лучевой терапии рака молочной железы	105
7.5 Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток при адъювантной гормонотерапии рака молочной железы	105
7.6 Эффективность адъювантной лекарственной терапии в отношении эрадикации циркулирующих опухолевых клеток	107
7.7 Эффективность протоколов терапии в отношении эрадикации циркулирующих опухолевых клеток	109
7.8 Обсуждение	109
7.9 Выводы	111
Глава 8	
Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток в отношении выживаемости пациентов, страдающих раком молочной железы	113
8.1 Общая и безрецидивная опухолеспецифическая выживаемость пациентов сплошного проспективного нерандомизированного исследования	113

8.2 Транскрипционный фенотип циркулирующих опухолевых клеток и общая и безрецидивная опухолеспецифическая выживаемость	117
8.3 Обсуждение	121
8.4 Выводы	123
Глава 9	
Адъювантная ЦОК-ориентированная терапия пациентов с нематастатическим раком молочной железы	124
9.1 Дизайн и характеристика исследования	125
9.2. Адъювантная цитостатическая терапия минимальной остаточной болезни у пациентов, страдающих раком молочной железы	127
9.3 Выживаемость пациентов при оптимизации протокола адъювантного лечения рака молочной железы с учетом МОБ	129
9.4 Экономическая эффективность применения метода оценки минимальной остаточной болезни в процессе противоопухолевого лечения	129
9.5 Обсуждение	131
9.6 Выводы	134
Библиографический список	135

*«Я чувствую себя мятежной раковой клеткой
в отлаженном и однообразном кровотоке
метрополитена, но слиться воедино с людьми
у меня уже не получается, да и не хочется.
Не бойтесь, я проедусь и выйду,
размножась в опухоль не буду...»*

Святослав Элис, из книги «Двери 520»

Предисловие

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в диагностике и лечении злокачественных заболеваний, рак молочной железы (РМЖ) приобрел характер эпидемии у женщин старше 40 лет как в экономически развитых странах, так и в странах с низким уровнем медицинского обслуживания. РМЖ — одна из самых частых онкологических патологий. РМЖ занимает первое место среди злокачественных новообразований у женщин.

По данным Международного интернационального агентства по изучению рака IARC–EUCAN (2015 г.) скорректированная по возрасту ежегодная частота возникновения (заболеваемость) РМЖ в 2012 году в 40 европейских странах достигла 94,2 %, а смертность — 23,1 %.¹ По данным этого же источника, до 30 % РМЖ приходится на возраст моложе 50 лет, а зарегистрированная 5-летняя распространенность РМЖ равнялась почти 2 млн случаев в 2012 г. В Республике Беларусь в 2020 году было зарегистрировано 4,8 тыс. новых случаев РМЖ. Пятилетняя выживаемость пациентов с впервые установленным диагнозом РМЖ составила в целом чуть более 70 %. Среди женщин с I и II стадией заболевания она оказалась равной 85,6 %, с III — 58,8 %, с IV — 14,6 %.²

В большинстве западных стран в последние годы снизились показатели смертности от РМЖ, особенно в более молодых возрастных группах, благодаря улучшению лечения и раннему выявлению заболевания.¹ Тем не менее РМЖ остается все еще ведущей причиной смерти среди всех причин онкологической смертности европейских женщин.

Установлено, что при резектабельном раннем нематастатическом РМЖ после проведенного радикального лечения метастазирование наступает почти у половины пациентов в течение первых пяти лет, независимо от поражения регионарных лимфатических узлов.^{3, 4} В настоящее время метастатический РМЖ неизлечим, а метастазы приводят большинство пациентов, страдающих раком, к смерти.

В данном контексте на первый план выходит проблема возможного рецидива, что, в свою очередь, подчеркивает важность минимальной остаточной болезни (МОБ).

Хорошо известно, что метастатический процесс весьма сложен. К настоящему времени предложено множество гипотетических моделей, которые объясняют события метастатического каскада, базирующиеся на различных характеристиках злокачественных клеток первичной опухоли и метастатических очагов.^{5, 6} Несмотря на обширность знаний относительно метастатического каскада, тонкие механизмы и детали полностью не выяснены.^{7, 8}

В настоящее время представляет большой интерес область исследований, направленная на изучение характеристик клеток, способных выходить из первичной опухоли и выживать в периферической крови, таких как циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), или в костном мозге — диссеминированные опухолевые клетки (ДОК), а также изучение механизмов, с помощью которых реализуются эти процессы. Следует обратить внимание, что именно описанные выше ЦОК и ДОК предложено отнести к категории так называемой МОБ.⁹

Изучение динамики опухолевого процесса

позволило многим ученым сделать заключение о том, что РМЖ — это изначально диссеминированный опухолевый процесс, даже на доклинической стадии, который не может быть диагностирован традиционными методами обследования. А ЦОК являются непосредственным субстратом отдаленных метастазов.¹⁰

Учитывая тот факт, что ЦОК могут сохраняться после радикального хирургического лечения, актуальным является вопрос о дополнительной адъювантной системной противоопухолевой терапии, направленной на эти клет-

ки. Но, к сожалению, адъювантная химио- и гормонотерапия не всегда достаточно эффективны в отношении ЦОК, что обусловлено их гетерогенностью и развитием резистентности к химиотерапии.¹¹

Принципиально важным является разработка метода эффективной терапии МОБ при РМЖ с учетом гетерогенности и чувствительности ЦОК, а разработка эффективных, но менее дорогих диагностикумов и видов лечения становится важным приоритетом современной онкологии.¹²

ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ОПУХОЛЕВАЯ КЛЕТКА – КЛЮЧЕВАЯ ФИГУРА МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым раком женского населения как в Республике Беларусь, так и во всем мире, за исключением рака кожи. РМЖ — это первая причина смертности от рака у женщин.¹ Однако и доля женщин, переживших РМЖ, является наибольшей и составляет почти половину всех выживших после рака.^{2, 4}

В 1968 году Бернард Фишер выдвинул гипотезу, а в последующем сформулировал теорию, согласно которой РМЖ следует рассматривать не как локальное заболевание, а как системное, имея в виду возможность ранней диссеминации опухолевых клеток даже на начальных стадиях заболевания.

В данном контексте на первый план выходит проблема возможного рецидива и, в свою очередь, подчеркивается важность минимальной остаточной болезни (МОБ). Термин «МОБ» (MRD — minimal residual disease от англ.) обозначает присутствие опухолевых клеток в организме, которые не могут быть обнаружены на основе использования современных рутинных диагностических методов, применяющихся для установления стадии опухолевого процесса у онкологических пациентов после хирургического удаления первичной опухоли. Данное понятие в онкологию солидных опухолей пришло из онкогематологии. Также в настоящее время широко используется термин «минимальный остаточный (резидуальный) рак», который подразумевает наличие у радикально пролеченных пациентов циркулирующих или диссеминированных опухолевых клеток.

Раннее распространение опухолевых клеток из первичной опухоли обнаружить обычно не представляется возможным даже с помощью современных методов визуализации (МРТ,

ПЭТ), что препятствует началу своевременного и потенциально эффективного лечения.

В настоящее время метастатический РМЖ неизлечим, а метастазы приводят к смерти большинства пациентов, страдающих раком.

Хорошо известно, что метастатический процесс весьма сложен. Сегодня предложено множество гипотетических моделей, которые объясняют события метастатического каскада, базирующиеся на различных характеристиках злокачественных клеток первичной опухоли и метастатических очагах.^{13, 14} Несмотря на обширность знаний относительно метастатического каскада, «тонкие» механизмы и детали до сих пор еще не выяснены.

Метастазы РМЖ встречаются преимущественно в определенных, «излюбленных» местах человеческого организма, таких как кости и висцеральные органы (печень, легкие, головной мозг).¹⁵ Возврат болезни может возникнуть в месте первичной опухоли даже после полной резекции опухоли с морфологически подтвержденными чистыми краями хирургической резекции. Рецидивы или метастазы могут появляться через много лет: например, женщины с люминальным А молекулярным подтипом РМЖ с положительным гормональным рецепторным статусом, хотя и имеют относительно благоприятный общий прогноз, все же находятся в зоне риска прогрессирования в течение многих лет.¹⁶ Базальный, или «трижды негативный» РМЖ, лишенный гормональных рецепторов и рецептора эпидермального фактора роста человека (HER2-neu), как правило, имеет меньше вариантов лечения и более высокий потенциал метастазирования, а следовательно, худший прогноз и результаты лечения.¹⁷

Большинство рецидивов возникает в первые 5 лет после постановки диагноза и проведения специального лечения, поэтому долгие живущие женщины будут считаться «вылеченными». Это следует рассматривать в контексте того факта, что исследование аутопсийного материала продемонстрировало наличие у людей рака, который при жизни не был диагностирован¹⁸, а также что у пациентов с РМЖ были обнаружены скрытые метастазы, не диагностируемые обычными методами визуализации.¹⁹ Это, наряду с пониманием метастатического процесса, является фундаментальной основой для изучения МОБ при РМЖ.

В настоящее время представляет большой интерес область исследований, направленная на анализ характеристик клеток, которые способны выходить из первичной опухоли и выживать в периферической крови — циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), или в костном мозге — диссеминированные опухолевые клетки (ДОК), а также изучение механизмов, с помощью которых реализуются эти процессы. На опухолевой модели было продемонстрировано, что около миллиона клеток на один грамм первичной опухолевой ткани карциномы молочной железы «выходят» из нее каждый день, но почти все они очень эффективно удаляются из кровотока в течение нескольких минут.²⁰ Однако на животных моделях было показано, что примерно 2,5 % клеток, которые «выходят» из опухоли, способны выжить в виде микрометастазов и примерно 0,01 % могут прогрессировать с образованием макрометастазов.^{21, 22} Поэтому важно знать, какие факторы дают этому очень маленькому числу клеток способность выжить и в конечном итоге привести к смерти пациента.

В аналитическом обзоре литературы рассматриваются механизмы метастазирования и соответствующая роль ЦОК и ДОК при РМЖ, который сам по себе не является однородным заболеванием, что отражается в молекулярно-биологической классификации.^{23, 24} При РМЖ существуют механизмы, отличные от других опухолей, в том числе связанные с ЦОК и ДОК. Важным моментом является рассмотрение особенностей этих клеток, позволяющих им распространяться, выживать и пролиферировать из очень маленькой субпопуляции раковых клеток, которые в конечном итоге способны образовывать метастазы.

1.1 Метастатический каскад

Установлено, что опухолевые клетки в пределах одной опухоли гетерогенны. Этот факт был продемонстрирован *in vitro* и *in vivo* путем определения как молекулярных^{25, 26, 27, 28}, так и протеомических характеристик клеток^{29, 30, 31} и подтверждает фенотипическую гетерогенность рака. Например, даже в одном и том же случае РМЖ и в случае метастазирования, по-видимому, имеется подмножество раковых стволовых клеток, которые по своей природе обладают высокой устойчивостью к химиотерапии и/или лучевой терапии и участвуют в определяющем этапе диссеминации рака.^{32, 33, 34} Эта гетерогенность подкрепляется общепринятой теорией эволюции клонов в раке, описывающей последовательное накопление мутаций с течением времени, которые могут явиться либо ключевым фактором, либо потенциально полезным «пассажем» при прогрессировании рака.

Кроме рассмотренной выше теории стволовых опухолевых клеток, в недавнем исследовании представлена новая идея на примере колоректального рака, которая может применяться для других карцином. А. Sottoriva и соавт.³⁵ предложили модель «Большого взрыва», которая объясняет внутриопухольную гетерогенность как следствие множества клональных, так и более изолированных субклональных мутаций внутри опухоли во время раннего ее развития. Понимание этого процесса, возникающего на ранней стадии, имеет немалое значение в отношении внутриопухольной гетерогенности, так как предполагается, что субклональные мутации больше склонны «смешиваться», а затем пространственно распространяться по мере роста опухоли. Таким образом, важным в этой модели считается время, поскольку распространенность подобных субклональных мутаций в данной опухоли определяется временем, когда они возникли. На примере колоректального рака эта идея многих субклональных мутаций, встречающихся параллельно вначале, имеет смысл, учитывая обилие и высокую активность пролиферирующих клеток в криптах Либеркюна, однако для других тканей подобная архитектура не свойственна, поэтому применимость модели Большого взрыва для других форм рака еще предстоит выяснить. Общепринято и понятно, что существует ряд событий, которые должны произойти в первичной опухоли РМЖ,

чтобы начался процесс метастазирования и опухолевая клетка смогла образовать новый метастатический очаг. Первоначально происходит активация сигнальных путей, контролирующей динамику цитоскелета опухоли и приводящих к нарушению межклеточного взаимодействия, в том числе и с матриксом, а затем активируется миграция опухолевых клеток в окружающую ткань.³⁶ Злокачественные клетки должны далее попасть в кровеносные или лимфатические сосуды, проникнуть через базальную мембрану и эндотелиальные стенки сосудов, выжить во время циркуляции, укрыться от иммунной защиты и других механизмов клеточной смерти, таких как апоптоз, и «доплыть» до нового места.^{37, 38, 39} В этот момент они должны экстравазировать в новую ткань и восстановить или улучшить свои клеточные характеристики, позволяющие закрепиться, выжить и адаптироваться в новом микроокружении, в свою очередь, активировать механизмы, дающие возможность размножиться опухолевым клеткам, которые в конечном итоге сформируют явный макрометастаз.³⁹

1.2 Гипотеза семян и почвы

ЦОК являются «транзитными» раковыми клетками, возникающими первоначально из первичной опухоли, позднее они образуются как из микрометастазов, так и из явных макрометастазов. ЦОК в периферическом кровотоке были впервые обнаружены и изучены в 1869 году австралийским врачом Т. R. Ashworth.⁴⁰ Вскоре после этого, в 1889 году, S. Paget заметил, что процесс метастазирования, по-видимому, происходит не случайно, и предложил гипотезу «семян и почвы».⁴¹ «Семена», или ЦОК, как в настоящее время известно, могли бы «прорасти» и создать новую опухоль только в том случае, если бы они смогли найти подходящую «почву» для своего роста. S. Paget основывал эту гипотезу на посмертном исследовании 735 пациентов с РМЖ, где он отметил, что предпочтение отдается метастатическим местам, таким как кости и отдельные висцеральные органы.⁴¹

Гипотеза клеток-«семян» впоследствии неоднократно находила подтверждение при различной локализации злокачественных новообразований, когда в зависимости от происхождения первичной опухоли имеются свои излюбленные места для метастазирования, так называемая предпочитаемая «почва».^{42, 43} Считается, что

опухолевые клетки могут экспрессировать конкретные белки, такие как пептид, связанный с паратиреоидным гормоном (PTHrP)⁴⁴, или хемокиновые рецепторы CXС 7 типа (CXСR7)⁴⁵ и CXС 4 типа (CXСR4)⁴⁶, которые помогают направлять опухолевые клетки к определенным участкам человеческого организма, например, таким, как кость. Кроме того, выживание и распространение опухолевых клеток на новом месте могут определяться хемокинами, продуцируемыми непосредственно в месте распространения.³²

У. Husemann и соавт.⁴⁷ продемонстрировали раннее распространение раковых клеток периферической крови и в костный мозг у пациентов с протоковой карциномой *in situ* (DCIS) молочной железы и на модели атипичной протоковой гиперплазии, причем в последнем случае данный факт оказался неожиданным, поскольку диссеминация при атипичной протоковой гиперплазии не наблюдается у пациентов. Ученые предположили, что хирургическое удаление первичной опухоли в очень ранний период времени может лишить такие ЦОК системно действующих факторов, важных для роста, и, следовательно, объяснить состояние покоя таких клеток. Исследователи также выдвинули гипотезу о том, что первичные опухоли могут выделять факторы, которые готовят предметастатическую нишу («почву») и способствуют ранней опухолевой колонизации. Это было продемонстрировано R. N. Kaplan и соавт. Они установили, что специфические опухолевые предметастатические участки содержат клетки гемопоэтических клеток-предшественников, экспрессирующих рецептор роста эндотелия сосудов (VEGF) 1 (VEGFR1).^{48, 49} Работа G. Kallergi и соавт.⁵⁰ показала, что ЦОК у большинства пациентов с метастатическими опухолями проявляют повышенную регуляцию VEGF. Как отмечалось ранее, одна и та же группа исследователей впоследствии обнаружила, что опосредуемый TWIST эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) также стимулирует регуляцию VEGF.⁵¹ Поэтому присутствие VEGFR1 на предметастатическом участке может быть решающим фактором при нахождении ЦОК в костном мозге и возможном создании «депозитов» ДОК. Это подтверждается R. N. Kaplan и соавт.⁴⁸, которые продемонстрировали, что опосредуемое антителом ингибирование функции VEGFR1

ПОИСК ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК – КАК НАЙТИ ИГОЛКУ В СТОГЕ СЕНА

3.1. Обогащение, выделение и идентификация циркулирующих опухолевых клеток

Более 90 % случаев смерти у онкологических пациентов обусловлены метастазированием.^{358, 359} Рак может считаться локализованным заболеванием лишь на ранней стадии. Правильнее сказать, что болезнь носит системный характер, с течением времени прогрессирует и обнаруживается с помощью имеющихся в настоящее время методов визуализации (МРТ, КТ, ПЭТ или ультразвуковое исследование).³⁶⁰ В настоящее время существует все больше доказательств того, что опухолевые клетки, «вышедшие» из первичной опухоли, находятся в кровяном русле до презентации клинических симптомов.³⁶¹ ЦОК могут, наконец, колонизировать в отдаленных местах и образовывать метастазы (рисунок 3.1).

О присутствии ЦОК в периферической крови впервые было сообщено около 140 лет назад.³⁶² Тем не менее, данный вопрос не был широко распространенной темой в исследованиях до недавнего времени. Это было обусловлено прежде всего тем, что обнаружение ЦОК является ультра-редким событием, с количеством одна опухолевая клетка на 10^6 – 10^9 лейкоцитов периферической крови страдающих раком, а обогащение и исследование ЦОК было крайне сложным. Многие исследователи данные поиски сравнивали с поиском «иголки в стогу сена», пока в 2004 году не была введена система CellSearch (Veridex, Raritan, Нью-Джерси), которая является единственным медицинским устройством, в настоящее время

одобренным Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для отбора ЦОК и их подсчета.

Тем не менее, исследователи по-прежнему сталкиваются с различными проблемами, в том числе методологическими ограничениями, налагаемыми CellSearch приборами, с различными вопросами оценки физических показателей и статистической обработки данных³⁶³, а также с трансляционными вопросами³⁶⁴, тем самым ограничивая широкое клиническое внедрение идентификации ЦОК. Требования, предъявляемые в настоящее время к многоступенчатому процессу выделения клеточного материала из биологического образца для обнаружения ЦОК, могут привести к повреждению опухолевых клеток и в итоге к их потере, а также оказать негативное влияние на точность анализа.

Большинство методов обнаружения ЦОК основано на работе стационарных систем определения, таких как цитометров^{365,366,367}, CellSearch системы³⁶⁸, с использованием сканирующей флуоресцентной микроскопии высокого разрешения³⁶⁹ и лазерного сканирования.^{370,371} Кроме того, применяется волоконно-оптическая технология сканирования (FAST)^{372,373}, изоляция эпителиальных опухолевых клеток по размеру (ISET).^{374,375} Некоторые методы сочетают в себе как вышеперечисленные технологии, так и дополнительные системы анализа, такие как Ficoll³⁷⁶, OncoQuick³⁷⁷ и ОТ–ПЦР.^{378, 379} Интересно, что в микроустройствах для определения ЦОК использован другой подход, представленный миниатюрной структурой с интегрированными процессами микрожидкостных кинетических реакций.^{380–385} По сравнению со стационарными устройствами, микроустройства про-

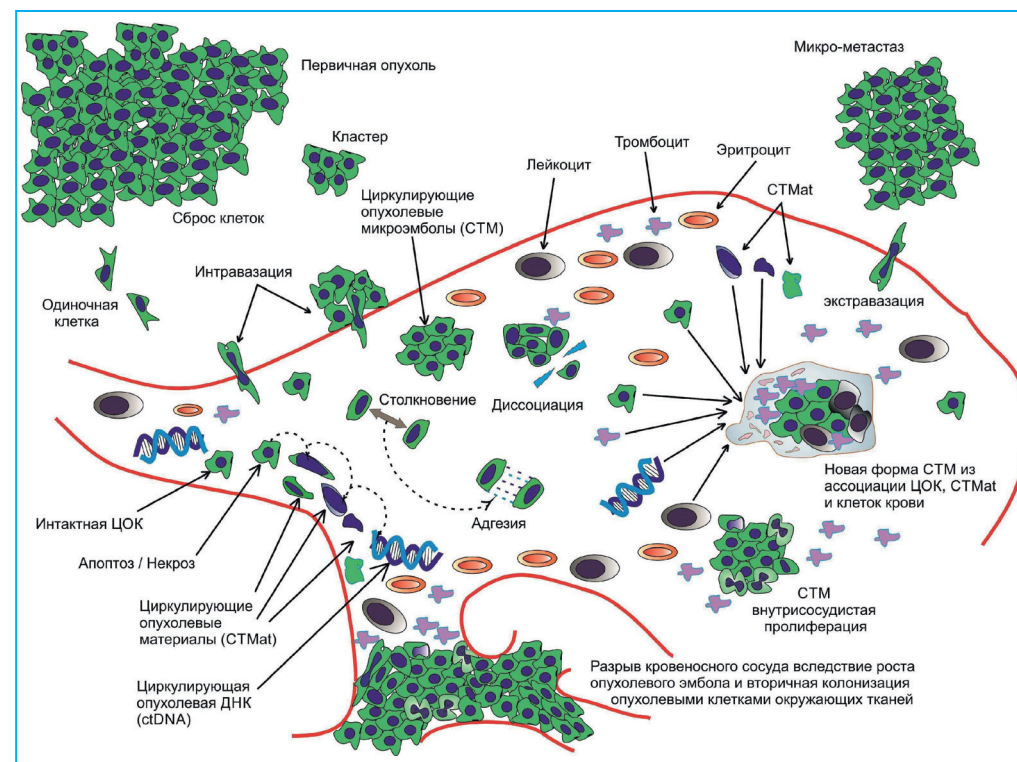


Рисунок 3.1. Метастатический процесс.

демонстрировали высокую чувствительность, улучшенное выделение опухолевых клеток высокой чистоты, усиление обогащения клетками и сравнительно низкую стоимость.^{380–386} Более важно, что микроустройства для обнаружения ЦОК идеально подходят для тестирования в обычных онкологических клиниках.^{382, 387, 388}

Поскольку ЦОК в основном идентифицируются по морфологии и иммунному окрашиванию, основным препятствием для их обнаружения является их гетерогенность. Так, например, ЦОК, полученные из различных видов тканей, значительно отличаются друг от друга по размерам, форме и иммунофенотипическому профилю. Тем не менее, существуют широкие морфологические и иммунофенотипические вариации в пределах ЦОК, полученных из одной и той же ткани. Во время эпителиально-мезенхимального перехода экспрессия эпителиальных маркеров на ЦОК, таких как молекулы адгезии эпителиальных клеток (ЕрСАМ) и цитокератин (СК), может быть снижена, а соответственно опухолевые

клетки могут остаться незамеченными.^{359, 368} Таким образом, точное обнаружение ЦОК на основе морфологического и иммунофенотипического профилирования до сих пор оспаривается многими учеными. Кроме того, ЦОК могут быть повреждены и фрагментированы в естественных и/или в лабораторных условиях в результате многоступенчатых процессов клеточного выделения, что затрудняет интерпретацию полученных данных. В дополнение к значительной гетерогенности, биология самих ЦОК создает дополнительные проблемы о которых можно только догадываться. Важно также отметить, что простое перечисление ЦОК не будет в значительной мере способствовать разработке улучшенных и более персонализированных методов лечения рака. Важно понимание этой клеточной популяции. С технической точки зрения, почти все анализы на ЦОК имеют три основных шага.

Шаг 1. Подготовка проб и выделение опухолевых клеток: образцы крови могут быть предварительно обработаны для того, чтобы