

УДК 618.19-006.6-039:612.1-07

ОПЫТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА АППАРАТЕ VERYDEX II CELL SEARCH™ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЗ ОТДАЛЕННЫХ МЕТАСТАЗОВ

**Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А., Бахтин А.В.,
Никипелова Е.А., Габараева В.М.**

*ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: rnoi@list.ru, shat5@rambler.ru*

Циркулирующие опухолевые клетки определялись системой Verydex II Cell Search™ у 11 больных не-метастатическим раком молочной железы до операции и через сутки после. У двух из них выявлены циркулирующие опухолевые клетки, что составило 18,1%. При этом если у одной пациентки уровень циркулирующих опухолевых клеток после операции не менялся, то у второй он увеличился. У двух пациенток исследование проводилось однократно до начала полихимиотерапии после нерадикального оперативного лечения. У обеих определялись циркулирующие опухолевые клетки. Это подтверждает тот факт, что операция может способствовать выбросу опухолевых клеток в кровеносное русло. И детекция циркулирующих опухолевых клеток у этих пациенток будет играть важную роль для выбора тактики дальнейшего лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки, Cell Search™ Veridex II

CIRCULATING TUMOR CELL DETECTION BY CELL SEARCH™ VERIDEX II IN NON-METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS

Kit O.I., Shatova Y.S., Novikova I.A., Bakhtin A.V., Nikipelova E.A., Gabaraeva V.M.

Federal state budget-funded institution of the Ministry of Health of Russia «Rostov scientific and research institute of oncology», Rostov-on-Don, e-mail: rnoi@list.ru, shat5@rambler.ru

Circulating tumor cells were detected by Cell Search™ Veridex II among the 11 patients with non-metastatic breast cancer before operation and the day after. Circulating tumor cells were founded in two of them (18,1%). Moreover, the first patient's level didn't change after the operation, but the seconds increased. The tests among two patients after nonradical operations but before the chemotherapy were performed at once. Both of them had circulating tumor cells. It proves the fact, that the operation can conduce the tumor cells emission in blood. And the detection of the circulating tumor cells among these patients will play the important role for the further treatment planning.

Keywords: breast cancer, circulating tumor cells, Cell Search™ Veridex II

РМЖ – рак молочной железы;
ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки.

Общеизвестно, что тактика лечения РМЖ, как и любого другого онкологического процесса, определяется степенью распространенности опухолевого процесса, т.е. стадией заболевания. Стандартными клиническими показателями являются размер первичной опухоли, состояние регионарных лимфатических узлов и наличие или отсутствие отдаленных метастазов. Однако, по данным литературы приблизительно 25% пациенток с первично локализованным РМЖ без поражения регионарных лимфоузлов выявляются отдаленные метастазы после успешно проведенного лечения. Тогда как почти 30% больных с первоначальными метастазами в подмышечные лимфоузлы наблюдаются без признаков рецидива заболевания в течение 5–10 лет [11; 7]. Таким образом, для назначения адекватной терапии рака молочной железы на различных стадиях заболевания и на разных этапах лечения, в том числе после удаления основной опухоли, необходим анализ, кото-

рый позволил бы выявить единичные циркулирующие в крови опухолевые клетки.

Технология анализа в системе Cell Search™ основана на иммуномагнитном обогащении клеток при помощи металлических наночастиц, покрытых полимерным слоем, содержащим антитела к ЕрСАМ молекулам (маркеры эпителиальных клеток), и иммунофлуоресцентной идентификации собранных в магнитном поле клеток. Процесс анализа состоит из нескольких этапов. Первый этап проводится на системе пробоподготовки – CellTracks®AutoPrep®. Максимальная разрешающая способность системы – детекция одной клетки в 7,5 мл крови. Уникальность предлагаемой технологии состоит в том, что система не только детализирует результаты мониторинга пациентов с метастазирующими формами рака без каких-либо инвазивных и болезненных процедур (все тесты проводятся на цельной крови), что позволяет проводить такие тесты регулярно, определяет генетические и фенотипические изменения опухоли, но и делает возможным количественную оценку единичных метастазных

клеток после того, как основная опухоль была удалена.

Определение ЦОК является новым независимым прогностическим фактором прогноза РМЖ [3; 6; 10]. Прогностическая ценность выявления ЦОК была подтверждена в ряде исследований [5; 15]. Особо значимая корреляция с прогнозом заболевания была отмечена при РМЖ [12; 13]. При этом проведенные исследования показали информативность метода как при метастатическом РМЖ [4] так и при неметастатическом [9]. При этом частота выявления ЦОК у больных РМЖ без отдаленных метастазов колеблется от 10 до 60% при различных методиках Cell Search (Veridex, Raritan, NJ) [2; 13; 14], и даже при ранних РМЖ (T1-T2) составляет 31% [8]. Несмотря на то, что диагностически значимым уровнем является 5 клеток на 7,5 мл, проведенные исследования показали, что наличие даже одной ЦОК ухудшает показатели бессобытийной и общей выживаемости больных неметастатическим РМЖ. Более того, показано, что увеличение количества ЦОК до 3 клеток и более прогрессивно ухудшает эти показатели. При этом никакой корреляции количества ЦОК с поражением подмышечных лимфоузлов выявлено не было [9]. Собственные исследования показали, что по всей вероятности при начальных стадиях заболевания порог позитивности определения циркулирующих опухолевых клеток, в частности при раке молочной железы, может быть снижен до 3–4 клеток, что в дальнейшем может служить маркером опухолевой прогрессии и потребует более тщательного наблюдения больных [1].

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 13 пациенток, получавших лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ по поводу верифицированного рака молочной железы различных стадий. У 11 пациенток анализ выполнялся на этапе оперативного лечения (IIa-IIIa стадии). Этим больным анализ выполнялся дважды: до операции и на первые сутки после. У других 2 пациенток детекция ЦОК проводилась однократно до начала неoadьювантной полихимиотерапии после проведенного неадьювантного хирургического лечения в других медицинских учреждениях. Отсутствие отдаленных метастазов у всех пациенток, которым выполнялось исследование, подтверждалось при СРКТ органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза и головного мозга. Все исследования выполнялись после письменного согласия больных на передачу биологического материала и обработку персональных данных. Кровь в объеме 8–10 мл забиралась в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт ЭДТА, а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Для отделения клеток крови и опухолевых от плазмы кровь смешивалась с рабочим буфером из набора

реагентов CellSearch® CTC kit и центрифугировалась при ускорении 800g в течение 10 минут. После этого образцы переносились в аппарат CellTracks® AutoPrep® System, который в автоматическом режиме, удаляя плазму крови и форменные элементы, иммуномагнитно обогащал образец микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинам 8, 18, 19. Качество работы системы оценивали с использованием стандартного контроля CTC control kit. Материал сканировался в анализаторе CellTracks® Analyzer II®. С учетом морфологических характеристик и экспрессии маркеров регистрировались циркулирующие опухолевые клетки. Общее число выявленных опухолевых клеток являлось конечным результатом.

Результаты исследования и их обсуждение

Среди пациенток, у которых детекция ЦОК определялась на этапе хирургического лечения, у 8 женщин степень распространенности заболевания соответствовала стадии T2N0M0, у 1 – стадии T2N1M0 и у 2 – стадии T2N2M0. Кроме одной пациентки с центральным расположением опухоли у всех больных локализация – верхне-наружный квадрант. До операции у двух больных выявлены ЦОК, что составило 18,1% от общего числа. Обе пациентки имели стадию T2N0M0 (IIa), в возрасте 66 и 73 лет находились в постменопаузе и локализацию опухоли в верхне-наружном квадранте. У одной пациентки была инфильтрирующая карцинома, а у другой сочетание инфильтрирующей карциномы и тубулярного рака. При этом, если у одной пациентки уровень ЦОК – 1 клетка оставался таковым и после операции, то у второй он увеличился с 2 клеток до 4. У обеих пациенток, которым детекция ЦОК проводилась до начала неoadьювантной полихимиотерапии после неадьювантного оперативного лечения, первоначальная локализация опухоли была на границе наружных квадрантов и гистологическая структура соответствовала инфильтрирующей карциноме. Одна пациентка 34 лет имела стадию заболевания IIa, T2N0M0, тройной негативный рак. У нее определялось 2 ЦОК. У второй больной 49 лет, находящейся в перименопаузе и имеющей стадию заболевания T3N2M0 определялись 3 ЦОК.

Несмотря на небольшое количество наблюдений, наше исследование показывает, что ЦОК могут определяться у больных РМЖ и не имеющих признаков генерализации. Полученные нами результаты согласуются с заявленными ранее в литературе. Интересным, на наш взгляд, является повышение уровня ЦОК у одной больной через сутки после операции по сравнению

с исходным уровнем. Это подтверждает тот факт, что операция сама по себе может способствовать выбросу опухолевых клеток в кровеносное русло. Об этом же свидетельствует и обнаружение ЦОК у больных после нерадикально выполненных оперативных вмешательств. Конечно, необходимы дальнейшие исследования, которые бы показали прогностическую значимость повышения уровня ЦОК после операции. Возможно, что именно факт детекции ЦОК у этих пациенток будет играть важную роль для выбора тактики дальнейшего лечения.

Список литературы/References

1. Kit O.I., Novikova I. A., Bakhtin A.V., Nikipelova E.A., Shatova Yu.S., Gabaraeva V.M., Nistratova O.V. Perviy opyt detektsii tsirkuliruyuschih opuholevyh kletok v perifericheskoy krovi // *Mezhdunarodnyy zhurnal eksperimentalnogo obrazovaniya*. – 2013. – № 11. – P. 37–39.
2. Bidard F.C, Mathiot C, Delalogue S, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2009, 21. 729–33.
3. Budd G.T, Cristofanilli M, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells versus imaging – predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006, 12. 6403–9.
4. Cristofallini M., Budd GT., Ellis MJ. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl J Med*. 2004, 351, 781–91.
5. Cristofallini M., Hayes DF., Budd GT., Ellis MJ., Stopeck A., Reuben JM. et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005, 23. 1420–30.
6. Dawood S, Broglio K, Valero V, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer*. 2008, 113(9). 2422–30.
7. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl Med*. 2002, 347. 1233–41.
8. Krishnamurthy S., Cristofanilli M, Singh B. et al. Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer*. 2010, 116. 3330–37.
9. Lucci A., Hall C.S., Lodhi A.K., Bhattacharyya A., Anderson A.E., Xiao L., Bedrosian I., Kuerer H.M., Krishnamurthy S. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2012, 13. 688–95.
10. Ly A., Lester S.C., Dillon D. Prognostic factors for patients with breast cancer: traditional and new. *Surgical pathology*. 2012, 5. 775–785.
11. Mirza A.N., Mirza N.Q., Vlastos G., Singletary S.E. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*. 2002, 235. 10–26.
12. Pachmann K., Camara O., Kavallaris A., et al. Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol*. 2008, 26. 1208–15.
13. Pierga J.Y., Bidard F.C., Mathiot C., et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *Clin Cancer Res*. 2008, 14. 7004–10.
14. Rack B.K., Schndlebeck C., Andergassen U., et al. Prognostic relevance of circulating tumor cells in the peripheral blood of primary breast cancer patients. 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; San Antonio, TX, USA; Dec 8–12, 2010. Abstract 503.
15. Smerage J.B., Hayes D.F. The prognostic implications of circulating tumor cells in patients with breast cancer. *Cancer Invest*. 2008, 26. 109–14.

Рецензенты:

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону;

Шихлярова А.И., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Южного научного центра РАН, г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 06.03.2014.