

DOI: 10.15690/vramn833

Е.В. Кайгородова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Томск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Российская Федерация

## Циркулирующие опухолевые клетки: клиническое значение при раке молочной железы (обзор литературы)

Многие исследователи рассматривают циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) в качестве одного из вариантов материала для «жидкостной биопсии в реальном времени». В данном обзоре обсуждаются клиническое значение ЦОК при раке молочной железы и, в частности, их прогностическая и предиктивная значимость при ранних стадиях и при метастатическом раке молочной железы, а также патогенетическая роль ЦОК в венозной тромбоземболии. В настоящее время существует проблема широкого клинического использования детекции ЦОК в крови онкологических больных из-за отсутствия стандартизированных методов их обнаружения. Технологии, одобренные FDA, такие как CellSearch (Veridex, Warren, NJ, США), RCCT (Janssen Diagnostics, США), используют для детекции ЦОК в крови антитела к EpCam или к цитокератинам 8, 18 и 19. Недостатком данных технологий является отсутствие в панели маркеров стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток и их переходных состояний, а также маркеров, позволяющих выявлять атипичные субпопуляции ЦОК. Оценка различных характеристик ЦОК является перспективной для изучения новых биомаркеров и мишеней для таргетной терапии. Особое клиническое значение имеет определение гетерогенности ЦОК и, в частности, стволовой субпопуляции данных клеток, клеток с признаками эпителиально-мезенхимального перехода, без признаков стволовости и с сочетанием этих признаков. Следует отметить, что наличие опухолевых клеток в циркуляции и в местах метастазирования не является достаточным условием для развития макрометастаза. Процесс метастазирования определяется не только свойствами опухолевых клеток, но и условиями среды («почвы»), которые обеспечивают их выживание и пролиферацию в отдаленных органах и тканях.

**Ключевые слова:** циркулирующие опухолевые клетки, стволовые опухолевые клетки, рак молочной железы, жидкостная биопсия, венозная тромбоземболия, опухолевая гетерогенность.

(Для цитирования: Кайгородова Е.В. Циркулирующие опухолевые клетки: клиническое значение при раке молочной железы (обзор литературы). Вестник РАМН. 2017;72 (6):450–457. doi: 10.15690/vramn833)

450

### Актуальность

Принято считать, что циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) представляют собой популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло. Увеличивающийся объем данных свидетельствует о том,

что небольшая популяция ЦОК имеет характеристики стволовых опухолевых клеток [1–3]. Эти стволовые циркулирующие опухолевые клетки могут обладать специфическими особенностями, позволяющими им выживать в кровотоке и вызывать метастатические поражения [2].

Е.В. Kaigorodova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

## Circulating Tumor Cells: Clinical Significance in Breast Cancer (Review)

*Circulating tumor cells (CTCs) constitute a heterogeneous population. Some tumor cells are cancer stem cells (CSCs), while others are in the process of the epithelial-mesenchymal transition (EMT); however, most CTCs are neither stem cells nor participants in the EMT. There is increasing interest in the study of the molecular biological characteristics of CTCs. Many researchers consider circulating tumor cells (CTC) as one of the variants of «liquid biopsy in real time». In this review, we discuss the clinical significance of CTCs in breast cancer and in particular the prognostic and predictive significance both in early stage and metastatic breast cancer, as well as the pathogenetic role of CTCs in venous thromboembolism. Evaluation of various characteristics of CTCs is promising for the study of new biomarkers and targets for targeted therapies. The clinical importance involves the determination of the heterogeneity of the CTC and in particular of the stem subpopulation of these cells, cells with signs of EMT, with no evidence of stem cells, and with a combination of these features.*

**Key words:** circulating tumor cells (CTCs), cancer stem cells (CSCs), breast cancer, liquid biopsy in real time, venous thromboembolism, tumor heterogeneity.

(For citation: Kaigorodova EV. Circulating Tumor Cells: Clinical Significance in Breast Cancer (Review). *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72 (6):450–457. doi: 10.15690/vramn833)

**Таблица 1.** Маркеры стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток рака молочной железы

Маркеры стволовости		Маркеры EMT	
CD44+CD24-/low	[7–12]	TWIST1	[13, 14]
ALDH1	[11, 15]	Akt2	[16]
ANTXR1	[17]	PI3Ka	[16]
CD133	[18, 19]	Vimentin	[14]
Bmi1	[19]	N-cadherin	[20]
CD44	[21]	SNAIL1	[16]
-	-	ZEB1	[16]
-	-	TG2	[16]
-	-	Fibronectin	[16]
-	-	SLUG	[13, 16]

Примечание. EMT — эпителиально-мезенхимальный переход.

В настоящее время существуют две гипотезы в отношении происхождения стволовых ЦОК. Первая предполагает, что стволовые ЦОК образуются уже в первичной опухоли [4], вторая — что они могут на самом деле возникать из диссеминированных опухолевых клеток [5].

Популяции стволовых опухолевых клеток имеют ряд молекулярных маркеров, к которым относятся антигены CD44, CD24, CD133, CD166, фермент ALDH1 (альдегиддегидрогеназа 1), белки семейства ABC-транспортёров (ABCG2, ABCB5), адгезивная молекула эпителиоцитов EpCam (Epithelial cell adhesion molecule), корецептор CXCR4, белок Nestin [6].

В табл. 1 представлены маркеры стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода, определяемые в опухолевых клетках рака молочной железы.

Известно, что популяция ЦОК гетерогенна (рис.). Наличие ЦОК не всегда сопровождается формированием метастазов, по всей видимости, потому что не все опухолевые клетки, попавшие в кровеносное русло, обладают достаточными для формирования метастаза свойствами. Часть опухолевых клеток является стволовыми (Cancer stem cells), часть находится в состоянии эпителиально-ме-

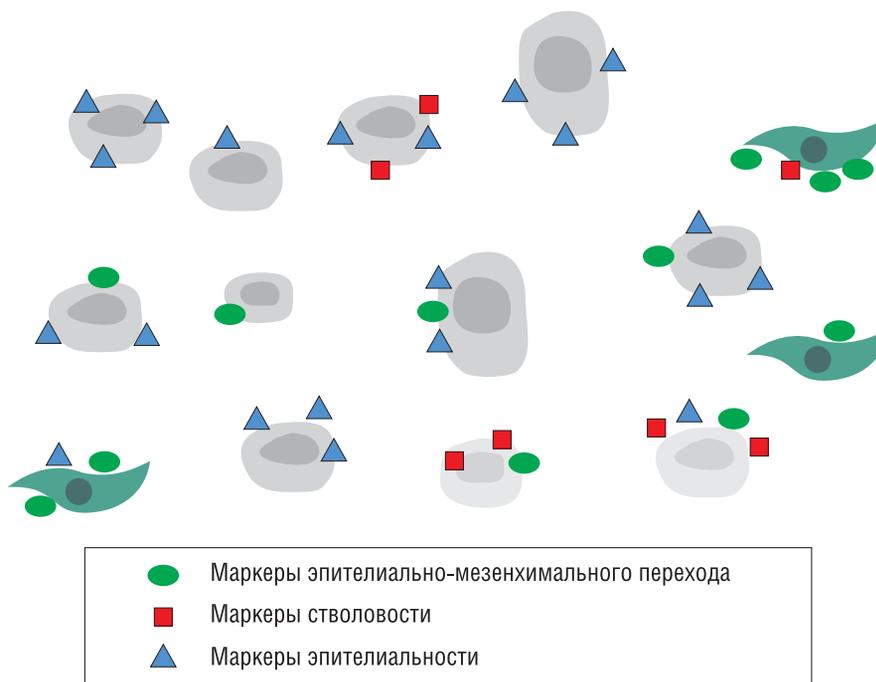
зэнхимального перехода (Epithelial-mesenchymal transition, EMT), и большая часть ЦОК не имеет признаков стволовости и EMT [3, 14]. Стволовые ЦОК могут быть в состоянии EMT [3, 14, 22], однако нет четких характеристик указанных субпопуляций, позволяющих судить об инвазивных свойствах и способности этих клеток образовывать метастазы. Предполагается, что именно стволовые опухолевые клетки являются основой для развития метастазов, не исключено также, что для развития метастазов в отдаленных органах важно сочетание свойств стволовости и EMT в одних и тех же клетках [23].

Отдельные исследователи рассматривают ЦОК в качестве нового многообещающего диагностического маркера, получившего название жидкостной биопсии в реальном времени [24, 25].

В настоящее время существуют различные подходы и методы для определения ЦОК в крови онкологических больных (на основе определения маркеров EpCam, цитокератинов, размера опухолевых клеток и т.п.), но, к сожалению, до сих пор нет унифицированных методов и стандартов для широкого применения их в клинической практике. В зависимости от используемых маркеров для детекции ЦОК отмечаются значительные колебания в их количестве при определении на одних и тех же стадиях развития опухоли [7, 24].

В процессе эпителиально-мезенхимального перехода клетки меняют свой эпителиальный фенотип (частично или полностью) на мезенхимальный [20]. Этот процесс, наблюдаемый в органогенезе и при заживлении ран, интенсивно изучается применительно к ЦОК. Высказано предположение, что эпителиально-мезенхимальный переход сочетается с агрессивностью рака и может повышать способность клеток к миграции [24]. Показано, что в RAS- или HER2-гиперэкспрессирующих опухолевых клетках субпопуляция с признаком стволовости CD44+/CD24- имеет повышенный потенциал к EMT [26, 27].

Также установлено, что в опухолевых клетках рака молочной железы (PMЖ) CD44+/CD24-/low определяется субтип с фенотипом claudin-low, для которого характерна экспрессия многих EMT-ассоциированных генов, таких как *FoxC2*, *Zeb* и *N-cadherin* [28, 29].



**Рис.** Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток

Экспрессия виментина — одного из маркеров мезенхимности — свидетельствует о неблагоприятном прогнозе безрецидивной и общей выживаемости больных с трижды негативным\* РМЖ [30].

Важно отметить, что индукторы ЕМТ могут обуславливать стволовые характеристики клеток [31, 32]. S. Mani и соавт. впервые показали, что ЕМТ может приводить к образованию популяции клеток с онкогенными и метастатическими свойствами [32].

Следует отметить, что ЕМТ возникает не спонтанно, а регулируется сигналами микроокружения. Контроль пластичности ЕМТ, скорее всего, зависит от нормальных клеток микроокружения опухоли (микроокружение опухоли — это клетки и структуры, простые химические вещества и сложные макромолекулы, окружающие опухолевые клетки), в том числе опухольассоциированных клеток стромы, таких как клетки иммунной системы, фибробласты и эндотелиальные клетки [33].

В целом, существует острая необходимость в комплексных исследованиях гетерогенности ЦОК и разработке более надежных методов их обнаружения, которые позволят выделять отдельные пулы ЦОК и выбирать для исследования конкретные субпопуляции.

452

#### Связь между циркулирующими и диссеминированными опухолевыми клетками

Исследования показали, что показатели конкордантности синхронного определения ЦОК в крови и диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у больных РМЖ достоверно коррелируют между собой — от 66 до 94% [34, 35].

Диссеминированные опухолевые клетки и микрометастазы могут многие годы оставаться в состоянии покоя (dormancy) после полного удаления первичной опухоли, до того как метастазы проявят свой рост [36]. Диссеминированные опухолевые клетки, происходящие из таких метастазов, могут циркулировать в кровотоке и колонизировать другие органы, приводя к образованию вторичных метастазов [36].

В экспериментах на животных показано, что диссеминированные опухолевые клетки, преобразованные в ЦОК, могут возвращаться в первичную опухоль (это называют самоосеменением опухоли, или перекрестным осеменением), вызывая образование агрессивных вариантов метастазов [37]. Такие ЦОК обладают потенциалом для развития локальных рецидивов [24, 37], хотя эта гипотеза нуждается в подтверждении у больных раком.

При раке молочной железы была установлена прямая связь между маркерами ЕМТ в первичных и диссеминированных опухолевых клетках костного мозга и агрессивным клиническим поведением опухоли [38, 39].

C. Vock и соавт. показали гетерогенность экспрессии маркеров стволовости (CD133) и ЕМТ (N-cadherin) на ЦОК, обнаруженных в образцах крови 26 пациенток с метастатическим РМЖ [40]. M. Meigo и соавт. в своих исследованиях обнаружили ЦОК с признаками ЕМТ у 26% пациентов с метастатическим раком молочной железы: высокий уровень экспрессии маркеров ЕМТ в этих слу-

чаях предсказывал короткий период выживаемости без прогрессирования [13].

Клетки, подвергающиеся ЕМТ, были обнаружены в крови 7% пациентов с негативным статусом ЦОК [7]. Аналогичные выводы для первичного рака молочной железы были представлены S. Kasimir-Bauer и соавт., показавшими наличие ЕМТ маркеров у 72% ЦОК-положительных и 18% ЦОК-отрицательных пациентов [8]. Эти данные свидетельствуют о том, что в дополнение к ЦОК, экспрессирующим эпителиальные антигены, может существовать фракция ЦОК с исключительно мезенхимальным фенотипом, и, таким образом, они остаются незаметными для анализов, основанных на эпителиальных маркерах этих клеток.

Процесс, обратный ЕМТ, называемый мезенхимально-эпителиальным переходом (МЕТ), как предполагают, играет фундаментальную роль в закреплении ЦОК в удаленном органе и образовании метастазов в новом микроокружении [41].

В связи с вышесказанным, имеется потребность в оптимизации методов обнаружения ЦОК, лишенных эпителиальных признаков в процессе выраженного ЕМТ, путем поиска маркеров, которые связаны с «эпителиальным прошлым» опухолевых клеток и не подавляются при ЕМТ.

#### Прогностическая роль ЦОК при ранних стадиях рака молочной железы

Показано, что даже локализованные опухоли без клинически видимых метастазов вызывают образование ЦОК [3, 42].

Клиническое значение определения ЦОК при раннем раке молочной железы противоречиво. Одни ученые обнаруживают связь наличия ЦОК в крови больных ранней формой РМЖ со снижением общей и безметастатической выживаемости, другие авторы не находят такой связи (табл. 2). В предоперационном периоде ЦОК обнаруживаются с частотой 5–29% [54, 55].

G. Kallergi и соавт. при исследовании ранних и метастатических форм РМЖ показали, что среди больных ранним РМЖ ЕМТ маркеры Vimentin и TWIST1 (Twist-related protein 1) встречались в 77 и 73% цитокератинположительных ЦОК, а у пациентов с метастатическим РМЖ оба варианта цитокератин+ЦОК встречались в 100% случаев [14]. Эти данные подтверждают значимость эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток в процессе метастазирования.

Показано, что наличие ЦОК служит предиктором раннего рецидива и снижения общей выживаемости на ранних стадиях рака молочной железы [55]. K. Rachmann и соавт. показали, что у пациентов с ранними стадиями рака молочной железы увеличение уровня ЦОК при адьювантной химиотерапии является предиктором рецидива [56].

При использовании лейкофереза в сочетании с тестом на циркулирующие опухолевые клетки (Circulating Tumor Cell Test, CellSearch), у 90% пациентов с ранними стадиями РМЖ уровень ЦОК коррелировал со стадией рака [57]: чем выше был уровень ЦОК в крови больных РМЖ, тем выше была стадия рака.

F. Bidard и соавт. показали, что у пациентов, перенесших неоадьювантную химиотерапию, обнаружение ЦОК является независимым прогностическим фактором снижения безметастатической и общей выживаемости [58].

\* Трижды негативный РМЖ считается агрессивным подтипом, на долю которого приходится 10–15% всех случаев рака молочной железы. Термин «трижды негативный» означает, что опухоль в минимальном количестве продуцирует 3 рецептора — эстроген, прогестерон и эпидермальный фактор роста.

Таблица 2. Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы

Показатель и наличие значимости с уровнем ЦОК		Ранние формы РМЖ		Метастатический РМЖ	
		Объем выборки (n), молекулярный тип РМЖ	Источник	Объем выборки (n), молекулярный тип РМЖ	Источник
Безметастатическая выживаемость	Есть значимости	n=57, ТНР	[43]	n=177, все типы	[44]
		n=52, HER2-положительный РМЖ	[45]	n=185, все типы	[46]
		n=115, все типы	[47]	n=468, все типы	[48]
		n=63, все молекулярные типы РМЖ	[49]	n=236, все типы	[50]
		n=115, все типы			
	Нет значимости	n=95, все молекулярные типы РМЖ	[51]	n=65, все молекулярные типы РМЖ	[52]
		n=77, все молекулярные типы РМЖ	[53]	-	-
Общая выживаемость	Есть значимости	n=57, ТНР	[43]	n=177, все молекулярные типы РМЖ	[44]
		n=52, HER2-положительный РМЖ	[45]	n=185, все молекулярные типы РМЖ	[46]
		n=115, все молекулярные типы РМЖ	[47]	n=468, все молекулярные типы РМЖ	[48]
		-	-	n=236, все молекулярные типы РМЖ	[50]
	Нет значимости	n=77, все молекулярные типы РМЖ	[53]	n=65, все молекулярные типы РМЖ	[52]
		n=63, все молекулярные типы РМЖ	[49]	-	-

Примечание. ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки, РМЖ — рак молочной железы, ТНР — трижды негативный рак молочной железы.

Исследования с использованием технологии CellSearch, одобренной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA, США), не выявили никакой связи наличия ЦОК с ответом на терапию [47, 59, 60], что является достаточно необычным результатом. Так, логично предположить, что при наличии ответа на неoadъювантную химиотерапию уровень ЦОК в крови должен уменьшаться и, наоборот, увеличиваться или не изменяться при отсутствии ответа на нее. Следует отметить, что система CellSearch не учитывает гетерогенность ЦОК, она не позволяет выделять отдельные пулы ЦОК с признаками ЕМТ или стволовые циркулирующие опухолевые клетки.

В исследованиях, проведенных с использованием цитологической системы детекции ЦОК Maintrack, показаны высокие концентрации ЦОК в крови больных неметастатическим РМЖ (до 100 ЦОК в мм<sup>3</sup> крови), которые соизмеримы с количеством моноцитов. Данные исследования продемонстрировали, что снижение уровня ЦОК при неoadъювантной химиотерапии были связаны с полным патологическим ответом [56].

Результаты исследования, полученные при адъювантной химиотерапии РМЖ, также свидетельствуют о значимой прогностической роли определения ЦОК с помощью CellSearch. Так, мультицентровое исследование в Германии (SUCCESS) с участием более чем 2000 пациентов, у которых проводилась адъювантная химиотерапия, показало, что 21,5% случаев выявления ЦОК до начала лечения (у 435 из 2026 участников) были связаны со статусом лимфатических узлов (у 136 из 692, 19,7%, и у 299 из 1334, 22,4%, при отсутствии и наличии лимфогенных метастазов соответственно). С другими характеристиками опухоли связи не обнаружено. По завершении адъювантной химиотерапии в 22,1% случаев (у 330 из 1493) были выявлены уровни ЦОК, аналогичные их ис-

ходному уровню до лечения [61]. ЦОК-позитивность до химиотерапии была предложена в качестве независимого прогностического маркера для общей выживаемости при данном заболевании. В другом исследовании с участием 304 больных неметастатическим РМЖ уровень обнаружения ЦОК составил 24%, и также была показана значимая связь ЦОК-позитивности со снижением уровня общей выживаемости и ранним рецидивированием [55].

Важно отметить, что значение уровня ЦОК после терапии как маркера оценки индивидуального риска рецидивирования и смертности больных РМЖ не уступает обычным прогностическим факторам, применяемым в настоящее время (размер опухоли, стадия, распространение, вовлеченность лимфатических узлов). Уровень ЦОК имеет независимое прогностическое значение как до, так и после адъювантной химиотерапии, что было показано в большом проспективном исследовании пациентов с первичным раком молочной железы [61].

Результаты исследования J. Pierga и соавт. с участием 52 пациенток с HER2-положительным РМЖ показали 68% уровень трехлетней безметастатической выживаемости, который был тесно связан с уровнем ЦОК до начала терапии. ЦОК-отрицательные пациентки до начала неoadъювантной химиотерапии имели высокую трехлетнюю безметастатическую выживаемость. Изменение уровня ЦОК во время лечения не имело прогностического значения [45].

Следует заметить, что работ по изучению ЦОК при ранних формах РМЖ значительно меньше, чем число аналогичных исследований при метастатических формах РМЖ, при этом большинство из них основаны на оценке общего количества ЦОК без учета их гетерогенности. Факт обнаружения ЦОК при ранних формах РМЖ свидетельствует в пользу гипотезы, что наличие опухолевых клеток в циркуляции и в местах метастазирования не является достаточным условием для развития макрометастаза.

### Прогностическая роль ЦОК при метастатическом раке молочной железы

Большие многоцентровые проспективные исследования демонстрируют, что оценка ЦОК при метастатическом раке молочной железы может служить независимым предиктором безметастатической и общей выживаемости [46, 48]. В исследовании М. Cristofanilli и соавт. использовали технологию CellSearch у 177 пациентов: оценивали тип терапии, ее линию (первую или последующую), время появления метастазов, рецепторный статус (ER и HER2) и ЦОК-позитивность: последняя была самым сильным предиктором безметастатической и общей выживаемости. Количество ЦОК >5 в 7,5 мл крови оказалось предиктором неблагоприятного прогноза [44].

Проспективное многоцентровое исследование с участием 468 пациенток с метастатическим раком молочной железы показало, что ЦОК-позитивность наблюдается достоверно чаще у ER-положительных, чем ER-негативных больных. ЦОК-позитивность отмечалась в 46% ER-положительных, 37% Her2-положительных и 36% случаев трижды негативного РМЖ [48].

Пациенты с одновременными метастазами в кости и висцеральные органы имели более высокий уровень ЦОК по сравнению с теми, у которых наблюдались единичные метастазы только в кости или только в висцеральные органы [62].

ЦОК также может играть определенную роль в ранней прогрессии. Так, М. Liu и соавт. при помощи рентгенографии показали, что у пациенток с метастатическим РМЖ количество ЦОК связано с прогрессированием заболевания: повышение уровня ЦОК предсказывало прогрессирование заболевания за 7–9 нед до появления его визуальных признаков [62].

Номограммы, которые сочетают в себе уровень ЦОК с другими прогностическими переменными, такими как возраст, опухолевый фенотип, наличие висцеральных метастазов и общее состояние, предлагаются для оценки выживаемости пациентов с метастатическим РМЖ [50].

Количество ЦОК может иметь прогностическое значение при оценке ответа на лечение. Например, при метастатическом раке молочной железы ЦОК являются сильным прогностическим индикатором у пациентов, получающих гормоно- или химиотерапию: в обеих группах высокий уровень ЦОК был связан с плохим исходом, особенно у пациентов, получающих гормонотерапию. При ЦОК <5 медиана выживаемости без прогрессирования составляла 14,1 против 3,5 мес для пациентов с уровнем ЦОК ≥5. Однако в других исследованиях (при назначении таксанов или бевацизумаба) уровень ЦОК не был связан с выживаемостью [63].

Определение уровня ЦОК может быть использовано для выбора стратегии индивидуализированной терапии. В настоящее время только FDA одобрило систему CellSearch как медицинское устройство для определения ЦОК в клинической практике, в частности для оценки ответа на лечение при метастатическом раке молочной железы [50].

Многие исследования показывают, что ЦОК с признаками ЕМТ коррелируют с высокой агрессивностью РМЖ, а ЦОК с признаками стволовости и ЕМТ ассоциированы с устойчивостью к химиотерапии [64, 65].

L. Zhang и соавт. показали, что ЦОК с молекулярным фенотипом EpCAM-/ALDH1+ / HER2+ / EGFR+ / HPSE+ / Notch1+ способны метастазировать в головной мозг [66], а I. Vascelli и соавт. в своих исследованиях утверждают, что ЦОК с фенотипом EpCam+ / CD44+ /

CD47+ / MET+ способны инициировать метастазирование, и их уровень коррелирует с низкой общей выживаемостью [67].

Показано, что ЦОК, экспрессирующие TWIST1 и Vimentin, наиболее часто выявляются у больных РМЖ с метастазами, чем у пациентов с ранней стадией болезни [14].

M. Yu и соавт. выделили пять категорий ЦОК по количественной экспрессии эпителиальных [keratins — 5, 7, 8, 18 и 19; EpCAM; CDH1 (cadherin 1)] и мезенхимальных [FN1 (fibronectin 1), CDH2 (cadherin 2), SERPINE1/PAI1 (serpin peptidase inhibitor, clade E)] маркеров [68]. Это ЦОК, экспрессирующие только эпителиальные маркеры (E), промежуточные формы (E>M, E=M, M>E) и исключительно мезенхимальные (M). У 41% пациентов с метастатическим РМЖ наблюдались ЦОК с признаками ЕМТ, у пациентов с трижды негативным РМЖ — в основном ЦОК с мезенхимальными маркерами [68].

Таким образом, существующая противоречивость данных о прогностической значимости ЦОК (см. табл. 2) в крови больных РМЖ связана как с отсутствием унифицированных методов их обнаружения, так и подходов, которые определяют (качественно или количественно) циркулирующие опухолевые клетки по одному или двум маркерам без учета их гетерогенности.

### ЦОК и венозная тромбоэмболия

Венозная тромбоэмболия, которая включает глубокий тромбоз вен и тромбоэмболию легочной артерии, является частым осложнением у пациентов со злокачественными заболеваниями и, в частности, РМЖ. Появляется все больше доказательств тесной взаимосвязи между ЦОК и системой гемостаза. Опухолевые клетки способствуют гиперкоагуляции, в частности за счет избыточной экспрессии основного инициатора — тканевого фактора.

У 290 пациентов с метастатическим раком молочной железы было показано, что наличие ЦОК привело более чем к четырехкратному увеличению заболеваемости венозной тромбоэмболией по сравнению с теми, у которых ЦОК обнаружены не были. При раке предстательной железы количество ЦОК коррелирует с уровнем D-димера плазмы — конечного продукта и маркера активации свертывания крови [69].

Взаимосвязь между раком и гемостатической системой имеет сложный характер. Тканевый фактор обеспечивает выживание ЦОК путем ингибирования апоптоза (anoikis) через PI3K/Akt путь, способствуя ЕМТ. Тромбин индуцирует ЕМТ, возможно, путем индукции экспрессии TWIST1, а прямое взаимодействие опухолевых клеток с тромбоцитами индуцирует ЕМТ путем позитивной регуляции транскрипционных факторов Snail и виментин [70].

Лиганды, экспрессируемые активированными тромбоцитами, непосредственно взаимодействуют с опухолевыми клетками. Тромбоцитарный интегрин αIIbβ3 связывается с рецептором опухолевых клеток, таким как avb3. CD44, экспрессирующийся на опухолевых клетках, связывается с фибрином и усиливает опухольтромбоцитарное взаимодействие, которое способствует адгезии к эндотелию [71]. Было показано, что активация тромбоцитов и образование фибрина способствуют формированию защитной «тромбоцитарной площадки», которая ограждает ЦОК от естественных киллеров и может способствовать задержке ЦОК в микрососудах, облегчая таким образом экстравазацию [72].

Взаимодействие ЦОК с системой свертывания крови приводит к возможности использования ряда антикоагулянтов в комплексной терапии рака: так, на мышинных моделях показано, что ингибиторы тканевого фактора и тромбина снижают вероятность возникновения метастазов рака молочной железы [73].

Гепарин также снижает риск возникновения метастазов у мышей путем ингибирования тромбоцитарно-эндотелиального взаимодействия. С 2012 года моноклональное антитело ALТ-836 против тканевого фактора проходит фазу клинических испытаний при местных (локальных) и метастатических солидных опухолях [74].

### Существующие проблемы

В настоящее время в клинической онкологии существуют множество проблем и нерешенных вопросов. Процесс метастазирования — многофакторный и многоступенчатый, и лишь небольшое подмножество ЦОК способно давать метастазы. Выделяют небольшую популяцию ЦОК, которая имеет свойства стволовых опухолевых клеток и высокую инвазивность. На сегодняшний день данные об этих клетках очень скудны.

Кроме того, существует проблема широкого клинического использования детекции ЦОК в крови онкологических больных из-за отсутствия стандартизированных методов их обнаружения. Технологии, одобренные FDA, такие как CellSearch (Veridex, Warren, NJ, США), RCST (Janssen Diagnostics, США), используют для детекции ЦОК в крови антитела к EpCam или к цитокератинам 8, 18 и 19. Недостатком данных технологий является отсутствие в панели маркеров стволовости и EMT опухолевых клеток и их переходных состояний, а также маркеров, позволяющих выявлять атипичные субпопуляции ЦОК, присутствие которых подробно описано в работе M. Lustberg и соавт. [75].

### Заключение

Таким образом, оценка различных характеристик ЦОК является перспективным направлением для поиска новых

биомаркеров наличия опухоли, вероятности развития гематогенных метастазов и мишеней для таргетной терапии. Особое клиническое значение имеет определение гетерогенности ЦОК и, в частности, стволовой субпопуляции данных клеток, клеток с признаками EMT и их сочетания.

Циркулирующие опухолевые клетки — важные, но не единственно необходимые элементы метастазирования. Следует отметить, что наличие опухолевых клеток в циркуляции и в местах метастазирования не является достаточным условием для реализации макрометастаза. Процесс метастазирования определяется не только свойствами опухолевых клеток, но и условиями среды, которые обеспечивают их подвижность, миграцию и выживание.

Такие основные направления исследований клинической значимости ЦОК, как оценка риска метастазов, стратификация и мониторинг в реальном времени лечения, идентификация терапевтических мишеней и механизмов резистентности, предупреждение венозной тромбоэмболии, требуют дальнейших исследований и проверки высказываемых предположений.

### Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа проведена при поддержке гранта Российского научного фонда (грант РНФ № 16-15-10221).

### Конфликт интересов

Автор данной статьи подтвердила отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### Выражение признательности

Автор выражает благодарность профессору В.М. Перельмутеру за консультацию в написании данного обзора.

### ЛИТЕРАТУРА

- Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2010;288(1):99–106. doi: 10.1016/j.canlet.2009.06.027.
- Scatena R, Bottoni P, Giardina B. Circulating tumour cells and cancer stem cells: a role for proteomics in defining the interrelationships between function, phenotype and differentiation with potential clinical applications. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(2):129–143. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.12.002.
- Kaigorodova EV, Tarabanovskaya NA, Staheeva MN, et al. Effect of small and radical surgical injury on the level of different populations of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients. *Neoplasma.* 2017;64(3):437–443. doi: 10.4149/neo\_2017\_315.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007;1(3):313–323. doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002.
- Oskarsson T, Battle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell.* 2014;14(3):306–321. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.002.
- Liao WT, Ye YP, Deng YJ, et al. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *Am J Stem Cells.* 2014;3(2):46–62.
- Aktas B, Tewes M, Fehm T, et al. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R46. doi: 10.1186/bcr2333.
- Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R15. doi: 10.1186/bcr3099.
- Chekun SV, Zadvornyy TV, Tymovska YO, et al. CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Exp Oncol.* 2015;37(1):58–63.
- Balic M, Lin H, Young L, 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(19):5615–5621. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-06-0169.
- Reuben JM, Lee BN, Gao H, et al. Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and

- CD44(+)/CD24(lo) cancer stem cell phenotype. *Eur J Cancer*. 2011;47(10):1527–1536. doi: 10.1016/j.ejca.2011.01.011.
12. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44(+)/CD24(-/low) cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1154–1159.
  13. Mego M, Gao H, Lee BN, et al. Prognostic value of EMT-circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients undergoing high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer*. 2012;3:369–380. doi: 10.7150/jca.5111.
  14. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, et al. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13(3):R59. doi: 10.1186/bcr2896.
  15. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130(2):449–455. doi: 10.1007/s10549-011-1373-x.
  16. Liu F, Gu LN, Shan BE, et al. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: an update. *Oncol Lett*. 2016;12(6):4869–4876. doi: 10.3892/ol.2016.5369.
  17. Barriere G, Tartary M, Rigaud M. Epithelial mesenchymal transition: a new insight into the detection of circulating tumor cells. *ISRN Oncol*. 2012;2012:382010. doi: 10.5402/2012/382010.
  18. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res*. 2011;9(8):997–1007. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0490.
  19. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(6):732–740. doi: 10.1038/aps.2013.27.
  20. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871–890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
  21. Senbanjo LT, Chelliah MA. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:18. doi: 10.3389/fcell.2017.00018.
  22. Broersen LH, van Pelt GW, Tollenaar RA, Mesker WE. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)*. 2014;37(1):9–15. doi: 10.1007/s13402-013-0160-6.
  23. Bonnomet A, Syne L, Brysse A, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene*. 2012;31(33):3741–3753. doi: 10.1038/onc.2011.540.
  24. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*. 2013;59(1):110–118. doi: 10.1373/clinchem.2012.194258.
  25. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012;12:178. doi: 10.1186/1471-2407-12-178.
  26. Thompson EW, Haviv I. The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nat Med*. 2011;17(9):1048–1049. doi: 10.1038/nm.2437.
  27. Wang KH, Kao AP, Lin TC, et al. Promotion of epithelial-mesenchymal transition and tumor growth by 17 beta-estradiol in an ER+/HER2(+) cell line derived from human breast epithelial stem cells. *Biotechnol Appl Biochem*. 2012;59(3):262–267. doi: 10.1002/bab.1022.
  28. Bhat-Nakshatri P, Goswami CP, Badve S, et al. Identification of FDA-approved drugs targeting breast cancer stem cells along with biomarkers of sensitivity. *Sci Rep*. 2013;3:2530. doi: 10.1038/srep02530.
  29. Klefstrom J, Morel A-P, Lièvre M, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008;3(8):e2888. doi: 10.1371/journal.pone.0002888.
  30. Creighton CJ, Li XX, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13820–13825. doi: 10.1073/pnas.0905718106.
  31. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, et al. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(5):739–746. doi: 10.1007/s00432-013-1376-6.
  32. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
  33. Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, et al. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res*. 2011;71(13):4707–4719. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4554.
  34. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
  35. Schindlbeck C, Andergassen U, Hofmann S, et al. Comparison of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood and disseminated tumor cells in the bone marrow (DTC-BM) of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(6):1055–1062. doi: 10.1007/s00432-013-1418-0.
  36. Bidard FC, Proudhon C, Pierga JY. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol*. 2016;10(3):418–430. doi: 10.1016/j.molonc.2016.01.001.
  37. Uhr JW, Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(30):12396–12400. doi: 10.1073/pnas.1106613108.
  38. Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell*. 2009;139(7):1315–1326. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.025.
  39. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002;21(20):3241–3246. doi: 10.1038/sj.onc.1205416.
  40. Bock C, Rack B, Huober J, et al. Distinct expression of cytokeratin, N-cadherin and CD133 in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Future Oncol*. 2014;10(10):1751–1765. doi: 10.2217/fon.14.58.
  41. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabieres C, Pantel K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(3–4):673–687. doi: 10.1007/s10555-012-9370-z.
  42. Yang MH, Imrali A, Heeschen C. Circulating cancer stem cells: the importance to select. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(5):437–449. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.08.
  43. Hall C, Karhade M, Laubacher B, et al. Circulating tumor cells after neoadjuvant chemotherapy in stage I-III triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22 Suppl 3:552–558. doi: 10.1245/s10434-015-4600-6.
  44. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(8):781–791. doi: 10.1056/NEJMoa040766.
  45. Pierga JY, Petit T, Lévy C, et al. Pathological response and circulating tumor cell count identifies treated HER2+ inflammatory breast cancer patients with excellent prognosis: BEVERLY-2 survival data. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1298–1304. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1705.
  46. 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):2422–2430. doi: 10.1002/cncr.23852.
  47. Bidard FC, Belin L, Delaloge S, et al. Time-dependent prognostic impact of circulating tumor cells detection in non-metastatic breast cancer: 70-month analysis of the REMAGUS02 study. *Int J Breast Cancer*. 2013;2013:130470. doi: 10.1155/2013/130470.
  48. Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, et al. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;137(2):503–510. doi: 10.1007/s10549-012-2382-0.

49. Hall CS, Karhade M, Laubacher BA, et al. Circulating tumor cells and recurrence after primary systemic therapy in stage III inflammatory breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(11):djv250. doi: 10.1093/jnci/djv250.
50. Giordano A, Egleston BL, Hajage D, et al. Establishment and validation of circulating tumor cell-based prognostic nomograms in first-line metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(6):1596–1602. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3137.
51. Horiguchi J, Takata D, Rokutanda N, et al. Change of circulating tumor cells before and after neoadjuvant chemotherapy in patients with primary breast cancer. *Cancer Res.* 2012;72(24 Suppl):P3-06-29. doi: 10.1158/0008-5472.SABCS12-P3-06-29.
52. Бжадуг О.Б., Тюляндин С.А., Гривцова Л.Ю., и др. Клиническое значение определения циркулирующих опухолевых клеток в крови больных распространенным раком молочной железы // *Иммунология гемопоза.* — 2007. — №2 — С. 72–101. [Bzhadug OB, Tyulyandin SA, Gritsova LY, et al. Die klinische bedeutung derbestimmung von den zirkulierendentumorzellen bei den patienten mit demdisseminierten mammakarzinom. *Immunologiya gemopoeza.* 2007;(2):72–101. (In Russ).]
53. Mego M, Giordano A, De Giorgi U, et al. Circulating tumor cells in newly diagnosed inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015;17:2. doi: 10.1186/s13058-014-0507-6.
54. Sandri MT, Zorzino L, Cassatella MC, et al. Changes in circulating tumor cell detection in patients with localized breast cancer before and after surgery. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1539–1545. doi: 10.1245/s10434-010-0918-2.
55. Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2012;13(7):688–695 doi: 10.1016/S1470-2045(12)70209-7.
56. 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(8):1208–1215. doi: 10.1200/JCO.2007.13.6523.
57. Fischer JC, Niederacher D, Topp SA, et al. Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(41):16580–16585. doi: 10.1073/pnas.1313594110.
58. Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(4):729–733. doi: 10.1093/annonc/mdp391.
59. Pierga JY, Bidard FC, 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(21):7004–7010. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0030.
60. Onstenk W, Kraan J, Mostert B, et al. Improved circulating tumor cell detection by a combined EpCAM and MCAM CellSearch enrichment approach in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(3):821–827. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0653.
61. Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(5):dju066. doi: 10.1093/jnci/dju066.
62. Liu MC, Shields PG, Warren RD, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5153–5159. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6664.
63. Giuliano M, Giordano A, Jackson S, et al. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res.* 2011;13(3):R67. doi: 10.1186/bcr2907.
64. Ansieau S. EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Lett.* 2013;338(1):63–68. doi: 10.1016/j.canlet.2012.05.014.
65. Dave B, Mittal V, Tan NM, Chang JC. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):202. doi: 10.1186/bcr2938.
66. Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci Transl Med.* 2013;5(180):180ra48. doi: 10.1126/scitranslmed.3005109.
67. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol.* 2013;31(6):539–544. doi: 10.1038/nbt.2576.
68. Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 2013;339(6119):580–584. doi: 10.1126/science.1228522.
69. Khoury JD, Adcock DM, Chan F, et al. Increases in quantitative D-dimer levels correlate with progressive disease better than circulating tumor cell counts in patients with refractory prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(6):964–969. doi: 10.1309/AJCPH92SXYLIKKT5.
70. Zhong YC, Zhang T, Di W, Li WP. Thrombin promotes epithelial ovarian cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. *J Gynecol Oncol.* 2013;24(3):265–272. doi: 10.3802/jgo.2013.24.3.265.
71. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(2):123–134. doi: 10.1038/nrc3004.
72. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood.* 2007;110(1):133–141. doi: 10.1182/blood-2007-01-065995.
73. Defeo K, Hayes C, Chernick M, Ryn JV, Gilmour SK. Use of dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(10):1001–1008. doi: 10.4161/cbt.10.10.13236.
74. Hong H, Zhang Y, Nayak TR, et al. Immuno-PET of tissue factor in pancreatic cancer. *J Nucl Med.* 2012;53(11):1748–1754. doi: 10.2967/jnumed.112.105460.
75. Lustberg MB, Balasubramanian P, Miller B, et al. Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):R23. doi: 10.1186/bcr3622.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Кайгородова Евгения Викторовна**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Адрес: 634050, Томск, пер. Кооперативный, д. 5, e-mail: kaigorodova@oncology.tomsk.ru,

SPIN-код: 8286-3757, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4378-6915>