

## Детекция циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы I–III стадий

### Для корреспонденции:

Валерий Евгеньевич Пономарев,  
[ponomarev.v.e@staff.sechenov.ru](mailto:ponomarev.v.e@staff.sechenov.ru)

Поступила в редакцию 17 сентября 2020 г.  
Принята к печати 25 сентября 2020 г.

### Цитировать:

Пономарев В.Е., Чернышева О.А., Поликарпова С.Б., Богущ Е.А., Высоцкая И.В., Кирсанов В.Ю., Тупицын Н.Н. Детекция циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы I–III стадий. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2020;24(3):107-111. <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2020-3-107-111>

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн работы: С.Б. Поликарпова, Н.Н. Тупицын, О.А. Чернышова, В.Е. Пономарев, Е.А. Богущ, И.В. Высоцкая, В.Ю. Кирсанов

Сбор, анализ и интерпретация данных:

В.Е. Пономарев, О.А. Чернышова

Написание статьи: В.Е. Пономарев,

О.А. Чернышова

Статистическая обработка данных:

В.Е. Пономарев, О.А. Чернышова

Исправление статьи: С.Б. Поликарпова,

Н.Н. Тупицын, Е.А. Богущ, И.В. Высоцкая,

В.Ю. Кирсанов

Утверждение окончательного варианта статьи:

все авторы

### ORCID ID

В.Е. Пономарев,

<https://orcid.org/0000-0003-0153-3311>

© Пономарев В.Е., Чернышева О.А., Поликарпова С.Б., Богущ Е.А., Высоцкая И.В., Кирсанов В.Ю., Тупицын Н.Н., 2020

Статья открытого доступа, распространяется по лицензии [Creative Commons Attribution 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

В.Е. Пономарев<sup>1</sup>, О.А. Чернышева<sup>2</sup>, С.Б. Поликарпова<sup>1</sup>,  
Е.А. Богущ<sup>1</sup>, И.В. Высоцкая<sup>1</sup>, В.Ю. Кирсанов<sup>1</sup>,  
Н.Н. Тупицын<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

**Цель.** Повышение точности риск-стратификации больных раком молочной железы I–III стадий на основе определения циркулирующих опухолевых клеток.

**Методы.** В исследование вошли 47 больных раком молочной железы в возрасте от 28 до 77 лет (медиана — 51 год), которые находились на исследовании и лечении в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2015–2017 гг. Определение циркулирующих опухолевых клеток проводилось всем больным до лечения.

**Результаты.** Общая частота выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы I–III стадий составляла 85,1 % (40 из 47). Циркулирующие опухолевые клетки у больных первично-операбельными и местно-распространенными формами рака молочной железы выявлялись примерно с одинаковой частотой: у 23 из 26 (88,5 %) и у 17 из 21 больных (81,0 %) соответственно ( $p = 0,7$ ). Другим важным прогностическим фактором, имеющим тенденцию к достоверной связи с частотой обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, является степень злокачественности. Опухоли со степенью злокачественности G2 чаще определялись у больных позитивной группы циркулирующих опухолевых клеток — 77,5 % ( $p = 0,06$ ). С остальными клинико-морфологическими параметрами достоверной статистической значимости не выявлено.

**Выводы.** Обнаружение циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы показывает, что, несмотря на клиническую стадию процесса, при ранних и местно-распространенных формах рака молочной железы циркулирующие опухолевые клетки определяются примерно одинаково: 88,5 и 81,0 % соответственно. Однако ввиду малой выборки больных статистическая значимость не выявлена ( $p > 0,05$ ). Перспективно изучение взаимосвязи наличия циркулирующих опухолевых клеток с молекулярно-биологическими подтипами и степенью злокачественности, которые являются важными прогностическими факторами. Необходимы дальнейшие исследования для возможности использования циркулирующих опухолевых клеток в качестве дополнительного критерия или фактора прогноза при раке молочной железы.

**Ключевые слова:** жидкостная биопсия; молекулярно-биологический подтип рака молочной железы; рак молочной железы; циркулирующая опухолевая клетка

## Введение

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) определяются в периферической крови больных раком молочной железы, простаты, колоректального рака и легких [1–4]. Для воспроизводимого измерения ЦОК на низких частотах и в небольших объемах крови используются иммуномагнитные платформы [5]. Однако в большинстве стран применяются и другие методы. Достаточно распространенным и универсальным методом детекции ЦОК является проточная цитофлуориметрия. ЦОК редко встречаются у здоровых людей или пациентов с доброкачественными заболеваниями [6]. В исследовании M. Shihui и соавт. [1] доказано, что обнаружение ЦОК в периферической крови больных имеет большое значение для ранней диагностики, прогноза и лечения рака молочной железы (РМЖ), а изучение его молекулярного профиля необходимо для возможного применения таргетной терапии. В работе F.C. Bidard и соавт. [7] показано, что высокое значение ЦОК коррелировало с худшим прогнозом у больных метастатическим РМЖ. При низком риске развития местных рецидивов и висцерального метастазирования, независимо от относительно благополучного статуса клинико-морфологических параметров у больных первично-операбельным РМЖ, иногда наблюдается прогрессирование основного заболевания, даже после специального лечения. Вопрос о том, случайно ли появление ЦОК в системном кровотоке или предопределено конкретной биологической программой, является предметом споров [8].

Цель данного исследования — повышение точности риск-стратификации больных РМЖ I–III стадий на основе определения циркулирующих опухолевых клеток.

## Методы

В исследовании изучены клинические и морфологические параметры 47 больных РМЖ I–III стадий, которые проходили обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2015–2018 гг. ЦОК определялись у больных до лечения. Анализ ЦОК проводился в 7,5 мл периферической крови с использованием антитела к CD45, молекуле EpCam (CD326) и Cam5.2 (Becton Dickinson, США). Для подсчета ЦОК исполь-

зовался проточный цитометр FACS Canto-2 (Becton Dickinson, США). Статистическая обработка данных производилась с помощью программы Excel. Для анализа категоризованных переменных использовали таблицы сопряженности и  $\chi^2$ . При проверке нулевых гипотез критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 0,05.

## Результаты

Согласно дизайну исследования, больные были распределены на негативную группу ЦОК (в периферической крови нет ЦОК) и позитивную группу ЦОК (в периферической крови 1 и более циркулирующих опухолевых клеток).

Средний возраст больных составил 51,3 года (от 28 до 77 лет), медиана — 51 год. В группу больных до 50 лет вошли 22 (46,8%) пациента, старше 50 лет — 25 (53,2%).

По клиническим стадиям больные распределились следующим образом: IA — 1 (2,1 %), IB — 1 (2,1 %), IIA — 12 (25,5 %), IIB — 12 (25,5 %), IIIA — 6 (12,8 %), IIIB — 8 (17,0 %), IIIC — 7 (15,0 %).

Клинико-морфологические параметры групп больных I–III стадий РМЖ представлены в *таблице*.

Учитывая, что молекулярно-биологический подтип является важным прогностическим фактором у больных РМЖ, провели подгрупповой анализ и выявили, что у 25 (53,2 %) больных с люминальным раком молочной железы В Her2- частота ЦОК была выше, чем с другими молекулярно-биологическими подтипами РМЖ ( $p = 0,05$ ).

Важным прогностическим фактором, который с достоверной связью имеет тенденцию к частоте ЦОК, является степень злокачественности. Опухоли со степенью злокачественности G2 чаще определялись у больных позитивной группы ЦОК — 77,5 % ( $p = 0,06$ ). Частота опухолей со степенью злокачественности G3 в этой же группе составила 22,5 % ( $p = 0,08$ ).

При анализе ЦОК у больных первично-операбельными и местно-распространенными формами РМЖ статистических различий не выявлено: 17 из 21 (81,0 %) и 23 из 26 пациентов (88,5 %) соответственно ( $\chi^2 = 0,42$ ;  $p > 0,05$ ). Однако учитывая высокую частоту встречаемости в условно благоприятной группе пациентов, возможно предположить на-

## Клинико-морфологические параметры больных I–III стадий рака молочной железы

Показатель		n	Негативная группа ЦОК, n (%)	Позитивная группа ЦОК, n (%)	$\chi^2$	p
Возраст	< 50 лет	22	3 (42,9)	19 (47,5)	0,05	0,8
	≥ 50 лет	25	4 (57,1)	21 (52,5)		
Менструальный статус	Пременопауза	25	7 (100,0)	18 (45,0)	7,2	0,008
	Менопауза	22	0	22 (55,0)		
Мультицентрическая форма роста	Нет	40	17 (94,4)	23 (79,3)	2,0	0,16
	Есть	7	1 (5,6)	6 (20,7)		
Размер первичной опухоли	< 2 см	8	0	8 (20,0)	1,85	0,4
	2–5 см	30	5 (71,4)	25 (62,5)		
	> 5 см	9	2 (28,6)	7 (17,5)		
Гистологический тип	ИДР	8	1 (14,3)	7 (17,5)	0,35	0,63
	ИР НСТ	29	5 (71,4)	24 (60,0)		
	ИР НСТ + рак <i>in situ</i>	10	1 (14,3)	9 (22,5)		
Степень злокачественности опухоли	G2	34	3 (42,8)	31 (77,5)	3,57	0,06
	G3	13	4 (57,2)	9 (22,5)		
Ангиолимфатическая инвазия	Нет	41	6 (85,7)	35 (87,5)	1,4	0,2
	Есть	6	1 (14,3)	5 (12,5)		
Метастазы в лимфоузлах	Нет	18	3 (42,8)	15 (37,5)	0,07	0,78
	Есть	29	4 (57,2)	25 (62,5)		
Молекулярный подтип	Люминальный А	7	1 (14,3)	6 (15,0)	1,88	0,6
	Люминальный В Her2-	25	3 (42,8)	22 (55,0)		
	Люминальный В Her2+	6	2 (28,6)	4 (10,0)		
	ТНР	9	1 (14,3)	8 (20,0)		
Ki-67	< 20%	7	0	7 (17,5)	1,4	0,2
	≥ 20%	40	7 (100,0)	33 (82,5)		

*Примечание.* ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки; ИДР — инфильтративно-дольковый рак, ИР НСТ — инфильтративный рак неспецифического типа, ТНР — трижды негативный рак

личие первично-диссеминированного процесса. Данная группа больных должна находиться под регулярным динамическим наблюдением, даже после окончания адъювантного лечения, как группа повышенного риска.

### Обсуждение

По данным многих исследований, ЦОК в периферической крови являются независимым предиктором прогноза заболевания у больных РМЖ. В исследовании M. Shihui и соавт. [1] показано, что существует корреляция ЦОК у больных РМЖ с такими параметрами, как стадия, размер опухоли, ангиолимфатическая инвазия, уровень Ki-67 и молекулярно-биологический подтип. Данное исследование выполнено с использованием метода проточной цитофлуориметрии при большей выборке

пациентов (187 больных). Корреляция подтверждена статистически только со степенью злокачественностью опухоли ( $p = 0,06$ ) и молекулярно-биологическим подтипом ( $p = 0,05$ ).

В исследовании M. Banys-Paluchowski и соавт. [9] показано, что прогностическая значимость ЦОК самая высокая у больных метастатическим люминальным РМЖ Her2-, что подтвердилось в нашем исследовании.

По данным литературы, наряду с количественной оценкой ЦОК изучается роль диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге. Наличие диссеминированных опухолевых клеток у больных РМЖ коррелирует с риском развития отдаленных метастазов и местных рецидивов [10]. Будущие сравнительные геномные анализы циркулирующих и диссеминированных опухолевых клеток первич-

ных и метастатических очагов у одних и тех же пациентов могут дать больше информации о прогностическом значении данных маркеров.

Необходимость определения и интерпретация ЦОК являются предметом дискуссий. Отсутствие технической стандартизации для их детекции, а также ограниченные данные об их клеточных и молекулярных характеристиках — значительные препятствия для признания клинической применимости этого диагностического маркера. Несмотря на это, диагностическое значение ЦОК обладает большим потенциалом [11]. Выявление минимальной остаточной болезни является неудовлетворенной клинической потребностью, а жидкостная биопсия может быть решением этой проблемы. Жидкостную биопсию можно использовать у больных РМЖ для диагностики, мониторинга раннего рецидива, терапевтической эффективности, а также выбора целевых препаратов [12–14].

## Выводы

Популяция ЦОК несомненно отражает общебиологические процессы в первичной опухоли. Определение содержания ЦОК у больных РМЖ в нашем исследовании показывает, что, несмотря на клиническую стадию процесса, у больных ранними и местно-распространенными формами РМЖ циркулирующие опухолевые клетки выявляются примерно с одинаковой частотой: 81,0 и 88,5 % соответственно. Однако ввиду малой выборки больных, статистической значимости не выявлено ( $p < 0,05$ ). Перспективно изучение взаимосвязи наличия ЦОК с молекулярно-биологическими подтипами и степенью злокачественности, которые являются важными прогностическими факторами. Необходимы дальнейшие исследования для возможности использования ЦОК в качестве дополнительного критерия или фактора прогноза при раке молочной железы.

## Список литературы / References

- Shihui M., Ling F., Gui A., Chen S., Sun Y., Li Zh. Predictive value of circulating tumor cells for evaluating short- and long-term efficacy of chemotherapy for breast cancer. *Med Sci Mon.* 2017;23:4808-4816. PMID: 28986517, PMCID: PMC5642643. <https://dx.doi.org/10.12659/msm.903736>
- Li J., Gregory S.G., Garcia-Blanco M.A., Armstrong A.J. Using circulating tumor cells to inform on prostate cancer biology and clinical utility. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015;52(4):191-210. PMID: 26079252. <https://dx.doi.org/10.3109/10408363.2015.1023430>
- Yang C., Zhuang W., Hu Y., Zhu L. Clinical significance of peripheral circulating tumor cell counts in colorectal polyps and non-metastatic colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2018;16(1):13. PMID: 29357895, PMCID: PMC5778777. <https://dx.doi.org/10.1186/s12957-017-1305-2>
- Gallo M., De Luca A., Maiello M.R., D'Alessio A., Esposito C., Chicchinelli N., Forgiione L., Piccirillo M.C., Rocco G., Morabito A., Botti G., Normanno N. Clinical utility of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6(4):486-498. PMID: 28904891, PMCID: PMC5583074. <https://dx.doi.org/10.21037/tlcr.2017.05.07>
- Neumann M.H., Schneck H., Decker Y., Schömer S., Franken A., Endris V., Pfarr N., Weichert W., Niederacher D., Fehm T., Neubauer H. Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch® system and the CellCelector™. *Biotechnol Prog.* 2017;33(1):125-132. PMID: 27126369. <https://dx.doi.org/10.1002/btpr.2294>
- Krishnamurthy S. The emerging role of circulating tumor cells in breast cancer. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(3):161-166. PMID: 22275137. <https://dx.doi.org/10.1002/cncy.20207>
- Bidard F.C., Mathiot C., Delaloge S., Brain E., Giachetti S., de Cremoux P., Marty M., Pierga J.-Y. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(4):729-733. PMID: 19850639. <https://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdp391>
- Kang Y., Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell.* 2013;23(5):573-581. PMID: 23680145, PMCID: PMC3667710. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.017>
- Banys-Paluchowski M., Schneck H., Blassl C., Schultz S., Meier-Stiegen F., Niederacher D., Krawczyk N., Ruckhaeberle E., Fehm T., Neubauer H. Prognostic relevance of circulating tumor cells in molecular subtypes of breast cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2015;75(3):232-237. <https://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1545788>
- Braun S., Vogl F.D., Naume B., Janni W., Osborne M.P., Coombes R.C., Schlimok G., Diel I.J., Gerber B., Gebauer G., Pierga J.Y., Marth C., Oruzio D., Wiedswang G., Solomayer E.F., Kundt G., Strobl B., Fehm T., Wong G.Y., Bliss J., Vincent-Salomon A., Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(8):793-802. <https://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa050434>
- Alix-Panabieres C., Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov.* 2016;6(5):479-491. PMID: 26969689. <https://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1483>
- Joose S.A., Gorges T.M., Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2014;7(1):1-11. PMID: 25398926, PMCID: PMC4309663. <https://dx.doi.org/10.15252/emmm.201303698>
- Pantel K., Alix-Panabieres C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: Fact or fiction? *Cancer Res.* 2013;73(21):6384-6388. PMID: 24145355. <https://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2030>
- Maltoni R., Gallerani G., Fici P., Rocca A., Fabbri F. CTCs in early breast cancer: A path worth taking. *Cancer Lett.* 2016;376(2):205-210. PMID: 27060205. <https://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.051>

## Detection of circulating tumour cells in patients with Stage I–III breast cancer

Valeriy E. Ponomarev<sup>1</sup>, Olga A. Chernysheva<sup>2</sup>, Svetlana B. Polikarpova<sup>1</sup>, Elena A. Bogush<sup>1</sup>, Irina V. Vysotskaya<sup>1</sup>, Vladislav Yu. Kirsanov<sup>1</sup>, Nikolay N. Tupitsyn<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Corresponding author.** Valeriy E. Ponomarev, [ponomarev\\_v\\_e@staff.sechenov.ru](mailto:ponomarev_v_e@staff.sechenov.ru)

**Aim.** To increase the accuracy of risk stratification of breast cancer Stage I–III patients based on circulating tumour cell (CTC) determination.

**Methods.** Forty-seven breast cancer patients aged 28–77 years (median, 51 years) who were examined and treated at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology between 2015 and 2017 were enrolled in the study. The presence of CTCs was evaluated for all patients before treatment.

**Results.** CTCs were detected in 85.1% (40 out of 47) of the patients. The CTC detection rate in patients with early and locally-advanced breast cancer was approximately the same, 88.5% (23 of 26) and 81% (17 of 21), respectively ( $p = 0.7$ ). Another important prognostic factor, which tended to be reliably linked to the frequency of CTC detection, was the grade of malignancy. Grade 2 tumours were more often observed in CTC-positive patients (77.5%) than in CTC-negative patients (22.5%,  $p = 0.06$ ). None of the remaining clinical and morphological parameters were statistically associated with CTC positivity.

**Conclusion.** This study demonstrated that regardless of the clinical stage, CTCs were detected with approximately equal frequency in patients with early and locally-advanced breast cancer (88.5% and 81%, respectively). However, owing to the small number of patients studied, none of the differences were found to be statistically significant. Nevertheless, investigations on the relationship between the presence of CTCs, molecular-biological subtypes and grade of malignancy are important to evaluate their use as independent prognostic factors. Further studies are needed to assess the use of CTCs as an additional criterion or prognostic factor in breast cancer management.

**Keywords:** breast cancer; circulating tumour cells; liquid biopsy; molecular-biological subtypes of breast cancer

Received 17 September 2020. Accepted 25 September 2020.

**Funding:** The study did not have sponsorship.

**Conflict of interest:** Authors declare no conflict of interest.

### Author contributions

Conception and design: S.B. Polikarpova, N.N. Tupitsyn, O.A. Chernyshova, V.E. Ponomarev, E.A. Bogush, I.V. Vysotskaya, V.Yu. Kirsanov

Data collection: V.E. Ponomarev, O.A. Chernyshova

Data analysis: V.E. Ponomarev, O.A. Chernyshova

Drafting the article: V.E. Ponomarev, O.A. Chernyshova

Critical revision of the article: S.B. Polikarpova, N.N. Tupitsyn, E.A. Bogush, I.V. Vysotskaya, V.Yu. Kirsanov

Final approval of the version to be published: V.E. Ponomarev, O.A. Chernysheva, S.B. Polikarpova, E.A. Bogush, I.V. Vysotskaya, V.Yu. Kirsanov, N.N. Tupitsyn

### ORCID ID

V.E. Ponomarev, <https://orcid.org/0000-0003-0153-3311>

**Copyright:** © 2020 Ponomarev et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

**How to cite:** V.E. Ponomarev, O.A. Chernysheva, S.B. Polikarpova, E.A. Bogush, I.V. Vysotskaya, V.Yu. Kirsanov, N.N. Tupitsyn. Detection of circulating tumor cells in patients with Stage I–III breast cancer. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2020;24(3):107-111. (In Russ.) <http://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2020-3-107-111>