

УДК 612.112.1-07:616-006.6

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ДЕТЕКЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

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

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

У 30 онкологических больных в периферической крови определяли циркулирующие опухолевые клетки (CTCs) системой CellSearch™ Veridex. Отмечена тенденция к повышению количества опухолевых клеток после проведения радикального оперативного вмешательства с 1 до 4 клеток у больных раком молочной железы II стадии, вероятно связанная с травматичностью хирургического вмешательства и как следствие, выходом в кровяное русло единичных опухолевых клеток. У всех больных раком толстой кишки III стадии не был превышен порог рефересных значений циркулирующие опухолевых клеток в 3 клетки для рака толстой кишки. У больных раком предстательной железы с диагностированными метастазами в кости и печень в 57% случаев были выявлены CTCs в периферической крови.

Ключевые слова: рак толстой кишки, рак простаты, рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки

THE FIRST EXPERIENCE OF DETECTION CIRCULATING TUMOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD

**Kit O.I., Novikova I.A., Bakhtin A.V., Nikipelova E.A., Shatova Y.S., Gabareva V.M.,
Nistratova O.V.**

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

In 30 cancer patients circulating tumor cells (CTCs) were detected with system CellSearch™ Veridex in peripheral blood. The tendency of increasing of the number of tumor cells from 1 to 4 has been shown after radical surgery in patients with breast cancer stage II, probably it relates to traumatic surgery and as a result, the single tumor cells come in the blood stream. In all patients with stage III colon the threshold of circulating tumor cells of the 3 cells for colon cancer was not exceeded. In prostate cancer patients with diagnosed bone and liver metastases, and CTCs were detected in the peripheral blood in 57% cases.

Keywords: colon cancer, prostate cancer, breast cancer, circulating tumor cells

Проблема заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований – одна из наиболее актуальных в современной медицине. На сегодняшний день колоректальный рак, рак простаты и молочной железы в совокупности составляют подавляющее большинство злокачественных новообразований у населения РФ. Среди женского населения рак молочной железы и колоректальный рак суммарно занимают первое место по встречаемости, у мужского населения на рак простаты и колоректальный рак приходится 22,9% всех злокачественных заболеваний, суммарно они находятся на первом месте среди всех новообразований [3]. Смертность от этих заболеваний напрямую связана с ранним метастазированием и развитием рецидивов.

Развитие современных технологий сделало возможным определение единичных опухолевых клеток в биоптатах костного мозга и периферической крови [4]. Циркулирующие опухолевые клетки (CTCs) происходят из клонов первичной опухоли и представляют собой клетки эпителиального происхождения, которые определя-

ются в периферической крови больных с различными формами солидного рака [5]. В экспериментальных моделях было установлено, что ежедневно в кровотоке из 1 г опухолевой ткани поступает 1 млн клеток, при этом только 1 клетка из 40 может достигнуть преметастатической ниши и только 0,01% клеток реализуются в гематогенные метастазы [2]. Наиболее полно изучены количественные значения циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы, где их в крови у больных ранним (N0) раком молочной железы обнаруживаются в 30% случаев, у больных местнораспространенным (N+) раком – в 36%, у больных метастатическим раком – в 70% случаев [7].

До настоящего времени основными методами выявления CTCs были иммуноцитологические (иммуноцитохимический, проточная цитометрия и EPISPOT) и молекулярно-биологические (RT-PCR) методы [1]. Нами на практике апробирована система детекции циркулирующих опухолевых клеток CellSearch™ Veridex, Johnson & Johnson, США.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 15 больных раком молочной железы от 34 до 73 лет II стадии заболевания до и после хирургического лечения, 8 больных раком толстой кишки T3NxM0 в возрасте от 53 до 81 года до оперативного вмешательства и 7 больных раком предстательной железы в возрасте от 58 до 87 лет после проведения гормональной и лучевой терапии, у которых диагностированы дистантные метастазы в печень и кости.

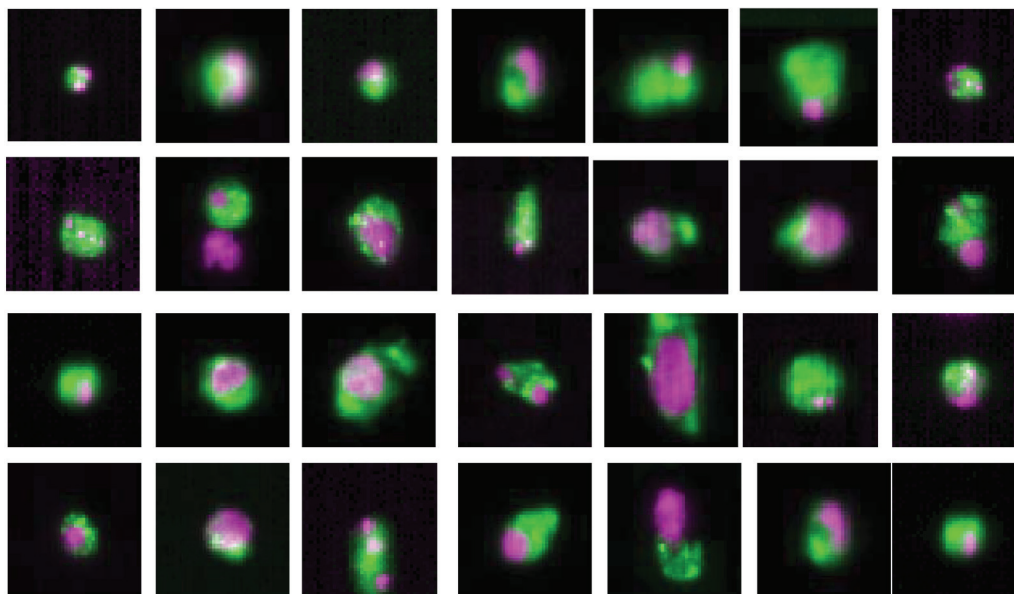
Кровь в объёме 8-10 мл забиралась в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт ЭДТА, а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Для отделения клеток крови и опухолевых от плазмы кровь смешивалась с рабочим буфером из набора реагентов CellSearch® CTC kit и центрифугировалась 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

У больных раком молочной железы II стадии единичные CTCs были обнаруже-

ны в 47% случаев (у 7 из 15 больных), при этом их количество ни в одном из случаев не достигло порога позитивности, составляющего для рака молочной железы 5 опухолевых клеток в исследуемом образце крови. Так, количество опухолевых клеток в исследуемой группе колебалось от 1 до 4 клеток в 7,5 мл исследуемого образца крови, максимальное количество опухолевых клеток (4 клетки) в нашем исследовании было зарегистрировано у 1 больной (в 6,7% случаев), в 13,3% (у 2 больных) случаев мы обнаружили единичную опухолевую клетку в образце, в 20% случаев всех исследованных образцов крови (у 3 больных) выявлялось по 2 клетки и в 6,7% (у 1 больной) определялось 3 CTCs в 7,5 мл периферической крови. Нами также отмечена тенденция к повышению количества опухолевых клеток после проведения радикального оперативного вмешательства с 1 до 4 клеток, вероятно связанная с травматичностью хирургического вмешательства и как следствие, выходу в кровяное русло единичных опухолевых клеток.

У 7 из 8 исследованных больных раком толстой кишки III стадии мы не обнаружили циркулирующие опухолевые клетки в периферической крови, и только у одной больной была выявлена единичная опухолевая клетка, но и этот образец мы расценили как отрицательный, т.к. не был превышен порог рефересных значений в 3 клетки для рака толстой кишки.



Больной С., 1955 г.р. Диагноз: рак предстательной железы, st III, состояние после гормональной и лучевой терапии, метастазы в печень. В 2009 г. диагностирован рак предстательной железы, g/a G2 светлоклеточная аденокарцинома. В 2013 г. была биопсия образования печени, g/a ИГХ – mts солидного рака предстательной железы. Исследование периферической крови выявило 190 CTCs. Опухолевые клетки гетерогенны по морфологическим характеристикам, имеют иммунофенотип CD45-CD8+CD18/19+

Из 7 больных раком предстательной железы с диагностированными метастазами в кости и печень в 57% случаев были выявлены CTCs в периферической крови (у 4 из 7 больных). При этом у 2-х больных мы наблюдали не больше 3-х опухолевых клеток, что не превысило порога позитивности для рака предстательной железы в 5 CTCs в 7,5 мл периферической крови. У одного больного с диагностированными метастазами в кости мы обнаружили 37 опухолевых клеток, и у больного с метастазами в печень их количество в исследованном образце крови составило 190 CTCs (рис.1). Отсутствие CTCs в периферической крови у исследованных больных, а также значения их ниже референсных, вероятно, связаны с эффективностью проводимого гормонального и лучевого лечения.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование показало, что при II стадии рака молочной железы ни в одном случае количество циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови не достигло порога позитивности, однако после хирургического лечения у 13% больных отмечена тенденция к повышению количества циркулирующих опухолевых клеток, что вероятно связано либо с травматичностью хирургического вмешательства, либо со стрессовой реакцией организма на лечение и выбросом в кровяное русло опухолевых клеток, которые, возможно, до этого были в состоянии покоя. Мы предполагаем, что 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.

Что касается исследования больных первичным раком толстой кишки III стадии, у 88% пациентов мы не обнаружили в крови CTCs, что не противоречит данным зарубежной литературы [6], свидетельствующей о наличии этих клеток только при

дистантных метастазах. При раке предстательной железы с диагностированными метастазами в кости и печень после лечения в 57% случаев были выявлены CTCs в периферической крови, что, возможно, связано с не эффективностью проводимого лечения и требует изменения тактики лечения и более тщательно наблюдения больных.

Таким образом, проведенное исследование, направленное на обнаружение CTCs в крови больных раком молочной железы, предстательной железы и толстой кишки может служить маркером распространенности опухолевого процесса и оценки эффективности проводимого лечения, а также индикатором активности опухолевого процесса и его стабилизации, даже при наличии дистантных метастазов. Исследования, направленные на количественную оценку CTCs как фактора прогноза течения заболевания и его связи с морфологическими, клиническими и прогностическими характеристиками, а также оценку эффективности проводимого противоопухолевого лечения на разных этапах будут продолжены.

Список литературы

1. Аликс-Панабиер К., Пантел К. Выявление и характеристика диссемилирующих раковых клеток при солидных эпителиальных опухолях. – Иммунология гемопоэза. – 1/2012. Т. 10. С.78-93
2. Ковалев А.А., Грудинская Т.В., Кузнецова Т.П., Ковалев К.А. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток. – Онкология. – Т.14. – № 2. – 2012. – С. 126-129.
3. Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2011 году. – М., 2013. – С. 11-12.
4. Gafforio J.J., Serrano M.J., Sanches-Rovira P. et al. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int J Cancer* 2003 Dec 20; 107 (6): 984-90.
5. Fehm et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin. Cancer Res.* 8: 2002, 2073-84.
6. Hiroya Takeuchi, Yuko Kitagawa Detection of circulating tumor cells in gastrointestinal cancer: Has its time come? // *Gastrointest Oncol.* 2012. June; 3(2): 84–85.
7. Riethdorf S., Fritsche H., Muller V., et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007;13: 920-8.