

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2024-20-4-14-20>



Оценка прогностического значения циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы

А.В. Зюзюкина^{1,2}, В.И. Бородулина¹, О.С. Коловская^{1,3}, Г.С. Замай^{1,3}, Д.А. Кириченко¹, Т.Н. Замай^{1,3}, А.С. Кичкайло^{1,3}, Р.А. Зуков^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1;

²КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского»; Россия, 660133 Красноярск, ул. 1-я Смоленская, 16;

³Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 660036 Красноярск, ул. Академгородок, 50

Контакты: Алена Владимировна Зюзюкина alena-vz@mail.ru

Цель исследования – мониторинг противоопухолевой терапии с помощью уровня циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в периферической крови больных раком молочной железы (РМЖ) с помощью аптамеров.

Материалы и методы. В исследование включены 34 больных РМЖ. Первичное определение содержания ЦОК выполнено перед оперативным лечением в 2017 г. Спустя 32 и 48 мес после оперативного вмешательства проведено повторное определение количества ЦОК и их производных с оценкой динамики заболевания. Детекцию ЦОК проводили в 3,5 мл крови больных РМЖ с помощью аффинного клеткам РМЖ аптамера MDA231, меченного флуоресцентным красителем Cy5, подсчет ЦОК в мазках образцов крови – с помощью флуоресцентной и сканирующей лазерной микроскопии.

Результаты. Интервал времени наблюдения за пациентками составил от 1 до 143 мес. У 7 (20,6 %) из 34 пациенток наступило прогрессирование заболевания. Медиана времени до рецидива заболевания составила 69 мес. Выявлена статистически значимая корреляционная обратная умеренная связь ($p < 0,05$) между возрастом и количеством ЦОК ($-0,39$). Кроме того, обнаружена статистически значимая корреляционная прямая средняя связь ($p < 0,05$) между индексом пролиферативной активности Ki-67 и количеством ЦОК ($0,42$). Статистически значимые отличия обнаружены между пациентками, разделенными на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, по времени до наступления рецидива заболевания ($p = 0,015$). Медиана выживаемости и межквартильный размах у пациенток с ЦОК составили 68 (23–70) мес, а у пациенток без ЦОК – 76 (58–108) мес.

Выводы. Риск развития рецидива РМЖ при положительной детекции ЦОК составляет 28,6 %. Значение показателя абсолютного риска у больных РМЖ без ЦОК в периферической крови составило 5,9 %, значение показателя относительного риска – 4,857.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецидив, мониторинг противоопухолевой терапии, циркулирующие опухолевые клетки

Для цитирования: Зюзюкина А.В., Бородулина В.И., Коловская О.С. и др. Оценка прогностического значения циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2024;20(4): 14–20.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2024-20-4-14-20>

Assessing the influence of circulating tumor cells on the prognosis of breast cancer

A.V. Zyuzukina^{1,2}, V.I. Borodulina¹, O.S. Kolovskaya^{1,3}, G.S. Zamay^{1,3}, D.A. Kirichenko¹, T.N. Zamay^{1,3}, A.S. Kichkaylo^{1,3}, R.A. Zukov^{1,2}

¹Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Ministry of Health of Russia; 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

²Krasnoyarsk Regional Clinical Cancer Center named after A.I. Kryzhanovsky; 161-ya Smolenskaya St., Krasnoyarsk 660133, Russia;

³Federal Research Center Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 50 Akademgorodok St., Krasnoyarsk 660036, Russia

Contacts: Alena Vladimirovna Zyuzukina alena-vz@mail.ru

Aim. To monitor antitumor therapy using the level of circulating tumor cells (CTC) in the peripheral blood of breast cancer (BC) patients using aptamers.

Materials and methods. The study included 34 patients with BC. The primary determination of CTC content was performed before surgical treatment in 2017. 32 and 48 months after surgical treatment, the number of CTC and their derivatives was re-determined to assess the dynamics of the disease. Detection of CTC was carried out in 3.5 ml of blood from BC patients using the aptamer MDA231, which is affinity for BC cells and labeled with the fluorescent dye Cy5. Counting of CTC in smears of blood samples was performed using fluorescence and scanning laser microscopy.

Results. The observation period for patients ranged from 1 to 143 months. 7 (20.6 %) of 34 patients experienced disease progression. The median time to disease relapse was 69 months. A statistically significant inverse moderate correlation ($p < 0.05$) was revealed between age and the number of CTC (-0.39). A statistically significant direct average correlation ($p < 0.05$) between proliferative activity index Ki-67 and the number of CTC (0.42) was also found. Statistically significant differences were found between patients divided into two groups depending on the presence or absence of CTC in the time until the onset of disease relapse ($p = 0.015$). The median survival and interquartile range in patients with CTC was 68 (23–70) months, and in patients without CTC 76 (58–108) months.

Conclusion. The risk of developing BC relapse with positive detection of CTC is 28.6 %. The value of the absolute risk indicator in BC patients without CTC in the peripheral blood is 5.9 %. The value of the relative risk indicator is 4.857.

Keywords: breast cancer, relapse, monitoring of antitumor therapy, circulating tumor cells

For citation: Zyuzukina A.V., Borodulina V.I., Kolovskaya O.S. et al. Assessing the influence of circulating tumor cells on the prognosis of breast cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of Female Reproductive System* 2024;20(4):14–20. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2024-20-4-14-20>

Введение

В 2022 г. рак молочной железы (РМЖ) занял 2-е место в структуре онкологической заболеваемости. Зарегистрировано 2 296 840 новых случаев заболевания, при этом около 666 тыс. случаев связаны со смертельным исходом [1]. Примерно у 20–30 % пациентов с ранней стадией РМЖ заболевание прогрессирует с развитием метастатических форм [2]. У большинства пациентов прогрессирование РМЖ происходит в течение 12–24 мес [3]. Для диагностики рецидива РМЖ используются инструментальные методы исследования или определение онкомаркеров: ракового антигена (CA-15-3) и ракового эмбрионального антигена [4, 5].

Одним из важных агентов метастазирования являются циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), представляющие собой гетерогенную группу, в которую входят попадающие в кровоток в ходе развития злокачественного новообразования эпителиальные опухолевые клетки, мезенхимальные опухолевые клетки, клетки с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, стволовые клетки и опухолевые микроэмболы [6]. ЦОК попадают в системный кровоток пассивным путем после разрушения базальной мембраны и активным путем с помощью эпителиально-мезенхимального перехода. Особенностью этих клеток является большой размер по сравнению с обычными клетками крови [7].

Несмотря на потенциальные преимущества использования ЦОК в качестве биомаркера злокачественного новообразования, их обнаружение в крови остается сложной задачей, поскольку их концентрация

в кровотоке чрезвычайно низка и у них отсутствуют уникальные для опухолевых клеток специфические маркеры, что ограничивает их использование в качестве диагностического инструмента. В настоящее время наиболее распространенным подходом к идентификации эпителиальных опухолевых клеток стало иммунофлуоресцентное окрашивание, при котором используются антитела против цитокератинов и ЕрСАМ, являющихся характерными белками эпителиальных клеток [8].

Альтернативой моноклональным антителам при идентификации ЦОК могут выступать аптамеры, представляющие собой фрагменты одноцепочечной РНК или ДНК, которые благодаря уникальной трехмерной конформации способны с высокой степенью аффинности и селективности связываться с функциональными группами своих биологических мишеней. По сравнению с естественными антителами аптамеры обладают рядом преимуществ, таких как стабильность, слабая иммуногенность. Их разрабатывают с помощью технологии, известной под названием SELEX (системная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением), представляющей собой процесс последовательного выбора наиболее специфичного к мишени пула олигонуклеотидов из ДНК-библиотеки со случайными последовательностями [9]. В результате происходит постепенное обогащение олигонуклеотидов последовательностями с повышенным сродством к молекуле-мишени. Использование аптамеров упрощает процесс идентификации ЦОК в периферической крови онкологических больных. Определение количества ЦОК

в крови больных РМЖ с помощью аптамеров может позволить оценить риск рецидива или прогрессирования заболевания.

Цель исследования — мониторинг противоопухолевой терапии с помощью уровня ЦОК в периферической крови больных РМЖ с помощью аптамеров.

Материалы и методы

Исследование проводили в несколько этапов в Красноярском краевом клиническом онкологическом диспансере им. А.И. Крыжановского. Первичное определение содержания ЦОК выполнено у 34 пациенток со злокачественными новообразованиями молочной железы до хирургического лечения при поступлении в отделение опухолей молочной железы в 2017 г. Возраст пациенток составил 35–79 лет, в среднем — 54 ± 12 лет. Неoadъювантную полихимиотерапию (антрациклины и таксаны) получили 4 (11,8 %) пациентки с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ и размером опухолевой ткани Т3–4. Адъювантную терапию получали большинство больных: 29 пациенткам проводили эндокринотерапию и в зависимости от менопаузального статуса назначали селективные модуляторы рецепторов эстрогенов или ингибиторы ароматазы III поколения, 6 пациенток получали анти-HER2-терапию, 2 больных — химиотерапию в монорежиме.

Для определения ЦОК использовали 3,5 мл крови. Выделение ЦОК проводили через 1,0–1,5 ч после сбора крови в вакутейнеры с гепарином. Для выделения и идентификации ЦОК использовали аптамер MDA231, конъюгированный с магнитными шариками, а затем окрашивали аптамером MDA231, меченным Cy5 [10]. Мазки с ЦОК фиксировали метанолом и окрашивали по методу Романовского–Гимзы. ЦОК подсчитывали на флуоресцентном микроскопе Axiostar PLUS (Carl Zeiss Group, Германия) и анализировали с помощью лазерной сканирующей микроскопии.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для оценки связи между признаками был выбран коэффициент корреляции Спирмена при $p < 0,05$. Определение различий между 2 группами пациенток по наличию или отсутствию ЦОК проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Для оценки влияния количества ЦОК на прогноз заболевания использовали двусторонний точный критерий Фишера. Анализ времени до прогрессирования заболевания проводили с помощью кривой Каплана–Мейера.

Абсолютный риск экспонированной группы вычисляли по формуле:

$$AP_{\Sigma} = \frac{a}{a + b},$$

где AP_{Σ} — абсолютный риск экспонированной группы, a — число лиц, находящихся под влиянием фактора и имеющих исход (заболевание), b — число лиц, находящихся под влиянием фактора и не имеющих исход (заболевание).

Абсолютный риск неэкспонированной группы вычисляли по формуле:

$$AP_n = \frac{c}{c + d},$$

где AP_n — абсолютный риск неэкспонированной группы, c — число лиц, не находящихся под влиянием фактора и имеющих исход (заболевание), d — число лиц, не находящихся под влиянием фактора и не имеющих исход (заболевание).

Относительный риск рецидивирования заболевания рассчитывали по формуле:

$$OP = \frac{AP_{\Sigma}}{AP_n}.$$

Результаты

Специфичность аптамера MDA231 к клиническим образцам РМЖ оценивали с помощью проточной цитометрии, лазерного сканирования и флуоресцентной микроскопии. Показано, что аптамер MDA231 дозозависимым образом связывается с клетками, выделенными из края опухоли отдаленных тканей и метастазов в лимфатические узлы, взятых после операций. Константа диссоциации ($K_d = 39$ нМ) для аптамера MDA231 была одинаковой для пациентов с трижды негативным и люминальным А РМЖ, что свидетельствовало о том, что аптамер MDA231 специфичен к этим молекулярно-клеточным типам РМЖ. Для дальнейших анализов использовали MDA231 в концентрации 70 нМ. Аптамер MDA231 не связывался со здоровой эпителиальной клеточной линией MCF10A, первичными культурами клеток, полученными из здорового эпителия легких, глиальной опухоли головного мозга, рака легких, но связывался с клеточными линиями РМЖ MCF7, MDA-MB-231, MDA453. Вторичная и третичная структуры аптамера MDA231 описаны в статье O.S. Kolovskaya и соавт. [10]. Циркулирующая опухолевая клетка, выделенная из периферической крови больной РМЖ, представлена на рис. 1.

Количество ЦОК в периферической крови больных РМЖ до операции значительно варьировало и в среднем составляло 40–50 клеток. Спустя 32 и 48 мес после первичного определения ЦОК у этих пациенток проводили повторные заборы крови с целью определения количества ЦОК и оценки динамики заболевания. Обнаружено, что в течение первых 32 мес наблюдения клинический рецидив заболевания был диагностирован у 7 пациенток, при этом были выявлены метастазы в легкие, головной мозг, печень, кости и послеоперационный рубец. Две пациентки умерли через

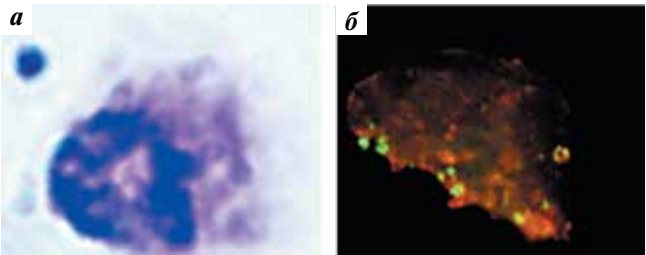


Рис. 1. Циркулирующая опухолевая клетка, выделенная из периферической крови больной раком молочной железы: а — окрашенная по Романовскому–Гимзе; б — окрашенная меченным Cy5 аптамером MDA231 (красный цвет) и меченным FITC антителом к цитокератину (зеленый цвет)

Fig. 1. Circulating tumor cell isolated from the peripheral blood of a breast cancer patient: a — stained with Romanowsky–Giemsa stain; б — stained with Cy5-labeled aptamer MDA231 (red color) and FITC-labeled antibody to cytokeratin (green color)

16 и 40 мес после оперативной терапии от основного заболевания.

Время наблюдения за пациентками составило 1–143 мес. У 7 (20,6 %) из 34 пациенток наступило прогрессирование заболевания. Медиана времени до прогрессирования заболевания составила 69 мес. Сводные данные исследуемой группы больных РМЖ представлены в табл. 1.

С целью определения прогностической значимости ЦОК была проведена оценка связи между количеством ЦОК и различными признаками. Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 1. Общая характеристика исследуемой группы
Table 1. General characteristics of the study group

Критерий Criterion	Число пациен- ток, n Number of patients, n	Доля па- циентов, % Proportion of patients, %
Возраст: Age:		
до 45 лет up to 45 years	8	23,5
после 45 лет after 45 years	26	76,5
Стадия: Stage:		
I	7	20,6
II	20	58,8
III	7	20,6
Размер опухолевого узла: Size of tumor node:		
T1	16	47,1
T2	9	26,5
T3	6	17,6
T4	3	8,8

Распространенность метастазов в регионарных лимфатических узлах: Prevalence of metastases in regional lymph nodes:		
N0	17	50,0
N1	14	41,2
N2	2	5,9
N3	1	2,9
Молекулярно-биологический подтип: Molecular biological subtype:		
HR+ HER2–	25	73,5
HR+ HER2+	4	11,8
HR– HER2–	3	8,8
HR– HER2+	2	5,9
Индекс пролиферативной активности Ki-67: Proliferative activity index Ki-67:		
низкий (<20 %) low (<20 %)	2	5,9
средний (20–30 %) average (20–30 %)	8	23,5
высокий (>30 %) high (>30 %)	24	70,6
Неоадьювантная терапия: Neoadjuvant therapy:		
проводилась no	4	71,4
не проводилась yes	30	28,6
Рецидив заболевания (июнь 2023): Relapse of the disease (July, 2023):		
да yes	7	20,6
нет no	27	79,4
Положительная детекция циркулирующих опухолевых клеток перед операцией: Positive detection of circulating tumor cells before surgery:		
да yes	31	91,2
нет no	3	8,8
Положительная детекция циркулирующих опухолевых клеток спустя 32 мес: Positive detection of circulating tumor cells after 32 months:		
да yes	5	14,7
нет no	29	85,3
Положительная детекция циркулирующих опухолевых клеток спустя 48 мес: Positive detection of circulating tumor cells after 48 months:		
да yes	3	8,8
нет no	31	91,2

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа

Table 2. Results of correlation analysis

Показатель Parameter	Возраст Age	Количество циркулирующих опухолевых клеток Number of circulating tumor cells	Ki-67
Возраст Age	1,00	−0,39	−0,09
Количество циркулирующих опухолевых клеток Number of circulating tumor cells	−0,39	1,00	0,42
Ki-67	−0,09	0,42	1,0

Выявлена статистически значимая корреляционная обратная умеренная связь ($p < 0,05$) между возрастом и количеством ЦОК (−0,39). Кроме того, обнаружена статистически значимая корреляционная прямая средняя связь ($p < 0,05$) между индексом пролиферативной активности Ki-67 и количеством ЦОК (0,42).

Не обнаружено различий между пациентками в зависимости от статуса эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2) ($p = 0,61$), параметров опухолевого узла (T) ($p = 0,77$) и числового значения показателя N ($p = 0,84$).

Статистически значимые различия обнаружены между пациентками, разделенными на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия ЦОК, по показателю «число месяцев до наступления рецидива заболевания» ($p = 0,015$). Оценка результатов сравнения проведена по значению 3 критериев: Гехана–Вилкоксона (0,06154), Кокса–Мантела (0,02092) и лог-рангового (0,02904).

Для визуальной оценки различий в выживаемости без рецидива построен график кривых Каплана–Мейера для пациенток с наличием ЦОК и без ЦОК. Результаты сравнения в подгруппах представлены на рис. 2. Медиана выживаемости и межквартильный размах у пациенток с ЦОК составили 68 (23–70) мес, а у пациенток без ЦОК – 76 (58–108) мес.

Выявлены статистически значимые различия во времени наступления рецидива заболевания у пациенток с наличием ЦОК и без ЦОК по прошествии 32 мес после хирургического лечения ($p = 0,02414$) и отсутствие различий спустя 48 мес после операции ($p = 0,07607$).

В результате проведенного статистического анализа определено прогностическое значение ЦОК в периферической крови больных РМЖ. Абсолютный риск

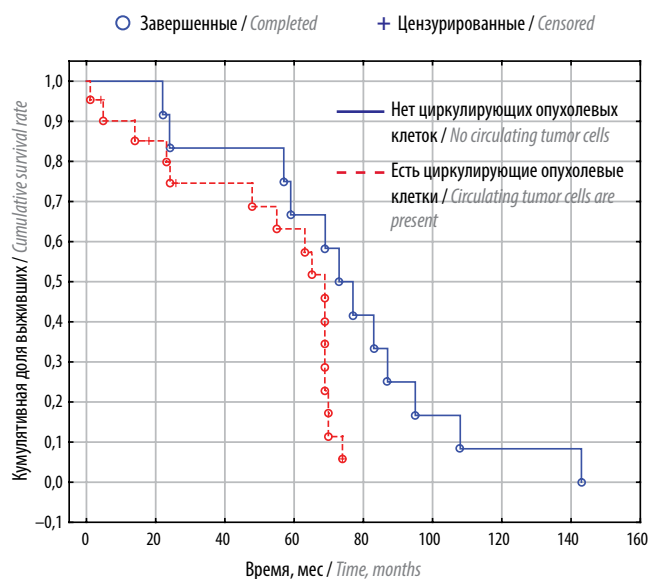


Рис. 2. Кривые безрецидивной выживаемости Каплана–Мейера

Fig. 2. Kaplan–Meier relapse-free survival curves

развития рецидива заболевания у ЦОК-положительных пациенток составляет 28,6 %, а у больных без ЦОК – 5,9 %. Значение показателя относительно риска – 4,857.

Обсуждение

Стандартная диагностика и мониторинг динамики заболевания РМЖ используют биопсию тканей. Выявление биомаркеров в плазме крови – один из предпочтительных подходов к диагностике РМЖ. В настоящее время CellSearch® является единственным одобренным методом, который можно использовать для мониторинга пациентов с РМЖ, раком предстательной железы и колоректальным раком. Его выделение основано на антителах к молекулам адгезии эпителиальных клеток (EpCAM) для положительного захвата опухолевых клеток эпителиального происхождения. Однако данный метод не позволяет обнаружить мезенхимальный фенотип клеток [8].

F. Li и соавт. в своем исследовании выявили статистически значимую разницу в общей выживаемости ЦОК-отрицательных и ЦОК-положительных пациентов (медиана общей выживаемости 49,8 мес против 26,9 мес). После 4 нед лечения, когда уровень ЦОК снизился более чем на 50 %, отмечалась значимая разница в выживаемости между 2 группами (40,1 мес против 25,8 мес; отношение рисков 0,588; 95 % доверительный интервал 0,350–0,933) [11].

J. Sparano и соавт. провели определение ЦОК примерно через 5 лет после установления диагноза у 547 пациенток и обнаружили ЦОК у 8 (4,1 %) из 193 пациенток с гормоннезависимым РМЖ, поздний рецидив был зарегистрирован у 1 пациентки. Еще 1 пациентка с рецидивом была ЦОК-отрицательной. Среди пациенток

с гормонозависимым РМЖ (всего 353) ЦОК обнаружены у 18 (5,1 %), у 23 (6,5 %) из них был клинический рецидив. У 7 (30,4 %) из 23 пациенток ЦОК были обнаружены в среднем за 2,8 года до клинического рецидива. Частота рецидивов составила 21,4 % (7 рецидивов на 32,7 человеко-года) в ЦОК-положительной группе против 2,0 % (16 рецидивов на 796,3 человеко-года) в ЦОК-отрицательной группе [12].

В зарубежной литературе описаны результаты исследований с ДНК- или РНК-аптамерами, выбранными для целых клеток или тканей без предварительного знания цели, которые могут быть использованы для открытия новых биомаркеров [13]. Представлены аптамеры к таким белковым биомаркерам РМЖ, как HER2 [14], CA-15-3 [15].

В нашем исследовании мы использовали РНК-аптамер MDA231, отобранный против клеточной линии MDA-MB-231, происходящей из злокачественного трижды негативного РМЖ. Этот аптамер демонстрирует чувствительность к онкогенным белкам на опухолевых клетках [10].

В ходе проведенного исследования выявлены корреляционные связи между количеством ЦОК и возрастом, а также показателем Ki-67. Дополнительно проведена оценка влияния ЦОК на характер течения РМЖ. В результате корреляционного анализа установлено уменьшение количества ЦОК с увеличением возраста больных ($p < 0,05$), а также увеличение количества ЦОК у пациенток с высокими показателями Ki-67 ($p < 0,05$). Обнаруженные связи могут быть обусловлены молекулярно-биологическими особенностями опухолевой ткани. С увеличением возраста больных РМЖ растет количество гормон-положительных опухолей с низкими показателями Ki-67, которые менее агрес-

сивны по сравнению с другими суррогатными подтипами. Выявлены статистически значимые различия в выживаемости без рецидива у больных РМЖ с ЦОК и без ЦОК в периферической крови. Медиана выживаемости без рецидива у пациенток с ЦОК составила 68 мес, а у пациентов без ЦОК — 76 мес. В результате определен абсолютный риск рецидива заболевания у больных с положительной детекцией ЦОК, который равен 28,6 %. Следовательно, не у всех пациентов с ЦОК в периферической крови развивается рецидив заболевания, и наоборот (при отсутствии ЦОК абсолютный риск рецидива заболевания составил 5,9 %). Полученные результаты требуют дальнейшего наблюдения за пациентами и продолжения исследования.

Проведенное исследование показывает возможность использования жидкостной биопсии, а именно определения ЦОК в периферической крови, которая является одним из малоинвазивных методов диагностики. Количественное определение ЦОК в периферической крови может быть использовано для прогнозирования риска развития рецидива заболевания.

Выводы

В нашем исследовании установлены корреляционные связи между количеством ЦОК и возрастом, а также показателем Ki-67. Определен абсолютный риск развития рецидива заболевания при положительной детекции ЦОК, который составляет 28,6 %, а у больных без ЦОК в периферической крови — 5,9 %. Значение показателя относительного риска — 4,857. Необходимо продолжить исследование с целью разработки метода прогнозирования течения заболевания у больных РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Breast. Globocan 2022. World Health Organization. Available at: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf>.
2. Cardoso F., Kataja V., Tjan-Heijnen V. Breast Cancer. Essentials for Clinicians. ESMO Press, 2019.
3. Pagani O., Senkus E., Wood W. et al. International guidelines for management of metastatic breast cancer: Can metastatic breast cancer be cured? J Natl Cancer Inst 2010;102(7):456–63. DOI: 10.1093/jnci/djq029
4. Molina R., Barak V., van Dalen A. et al. Tumor markers in breast cancer — European Group on Tumor Markers recommendations. Tumour Biol 2005;26(6):281–93. DOI: 10.1159/000089260
5. Wang W., Xu X., Tian B. et al. The diagnostic value of serum tumor markers CEA, CA19-9, CA125, CA15-3, and TPS in metastatic breast cancer. Clin Chim Acta 2017;470:51–5. DOI: 10.1016/j.cca.2017.04.023
6. Ковалев А.А., Грудинская Т.А., Кузнецова Т.П. и др. Гетерогенность циркулирующих опухолевых клеток. Онкология 2012;14(2):126–9. Kovalev A.A., Grudinskaya T.A., Kuznetsova T.P. et al. Heterogeneity of circulating tumor cells. Onkologiya = Oncology 2012;14(2):126–9. (In Russ.).
7. Vona G., Sabile A., Louha M. et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: A new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. Am J Pathol 2000;156(1):57–63.
8. Lozar T., Jesenko T., Kloboves Prevodnik V. et al. Preclinical and clinical evaluation of magnetic-activated cell separation technology for CTC isolation in breast cancer. Front Oncol 2020;10:554554. DOI: 10.3389/fonc.2020.554554
9. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature 1990;346(6287):818–22. DOI: 10.1038/346818a0

10. Kolovskaya O.S., Zyuzukina A.V., Dassie J.P. et al. Monitoring of breast cancer progression via aptamer-based detection of circulating tumor cells in clinical blood samples. *Front Mol Biosci* 2023;10:1184285. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1184285
11. Li F., Li J., Yuan Y. et al. A real-world comparison of circulating tumor cells in breast cancer from China: Novel device, CTC counts and its overall survival. *Heliyon* 2024;10(7):e29217. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e29217
12. Sparano J., O'Neill A., Alpaugh K. et al. Association of circulating tumor cells with late recurrence of estrogen receptor-positive breast cancer. *JAMA Oncol* 2018;4(12):1700–6. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.2574
13. Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N. et al. Aptamers selected to postoperative lung adenocarcinoma detect circulating tumor cells in human blood. *Mol Ther* 2015;23:1486–96. DOI: 10.1038/mt.2015.108
14. Liu Z., Duan J.-H., Song Y.-M. et al. Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells *in vitro*. *J Transl Med* 2012;10:148. DOI: 10.1186/1479-5876-10-148
15. Agnihotri N.P., Dubey S., Bhide M. Design and characterization of DNA aptamer for breast tumor marker by an advantageous method. *IJIRSET* 2014;3:16642–8. DOI: 10.15680/IJIRSET.2014.0310030

Вклад авторов

A.B. Зюзюкина: набор материала, написание статьи;
B.A. Бородулина, D.A. Кириченко, G.S. Замай: набор материала;
O.S. Коловская: анализ полученных данных;
T.N. Замай: написание статьи;
A.S. Кичкайло: разработка дизайна исследования;
P.A. Зуков: разработка дизайна исследования, коррекция текста статьи.

Authors' contributions

A.V. Zyuzukina: data collection, article writing;
V.A. Borodulina, D.A. Kirichenko, G.S. Zamay: data collection;
O.S. Kolovskaya: data analysis;
T.N. Zamay: article writing;
A.S. Kichkaylo: study design development;
R.A. Zukov: study design development, article text correction.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.B. Зюзюкина / A.V. Zyuzukina: <https://orcid.org/0000-0002-6758-4800>
T.N. Замай / T.N. Zamay: <https://orcid.org/0000-0002-7493-8742>
A.S. Кичкайло / A.S. Kichkaylo: <https://orcid.org/0000-0003-1054-4629>
P.A. Зуков / R.A. Zukov: <https://orcid.org/0000-0002-7210-3020>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (государственное задание REYC-2023-0012).

Funding. The study was conducted with the support of the Ministry of Health of Russia (state assignment REYC-2023-0012).