

Современное состояние проблемы лечения пациенток с микрометастазами в костном мозге

С.П. Козловская, Н.Н. Антоненкова, Э.А. Жаврид

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»;

Республика Беларусь, 223040, Минский р-н, агрогородок Лесной

Контакты: Светлана Петровна Козловская sve3110@rambler.ru

Представлен обзор данных литературы, посвященный определению опухолевых клеток в костном мозге и периферической крови при различных опухолевых заболеваниях, а также при раке молочной железы. Анализ большинства исследований свидетельствует о том, что наличие опухолевых клеток в костном мозге коррелирует с ранними рецидивами заболевания и меньшей продолжительностью жизни; определение опухолевых клеток в костном мозге является одним из важнейших подходов для раннего выявления метастазов и улучшения результатов лечения рака молочной железы. Представлены результаты исследования, проведенного в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова с 2008 по 2014 г., в ходе которого установлено, что наличие раковых клеток в костном мозге является неблагоприятным прогностическим признаком: 3-летняя безрецидивная выживаемость пациенток с непораженным костным мозгом составляет 88,7 %, с пораженным костным мозгом — 69,3 % ($p < 0,01$).

Ключевые слова: рак молочной железы, микрометастазы, опухолевые клетки в костном мозге, полимеразная цепная реакция

DOI: 10.17650/1994-4098-2016-12-1-12-18

Treatment of patients with bone marrow metastases: the present state of the problem

S.P. Kozlovskaya, N.N. Antonenkova, E.A. Zhavrid

N.N. Aleksandrov Republican Research and Practical Center for Oncology and Medical Radiology;

Lesnoy Agrotown, Minsk Region, 223040, Republic of Belarus

The paper reviews the data available in the literature on the identification of tumor cells in bone marrow and peripheral blood in different tumors and breast cancer. Analysis of the majority of investigations suggest that the presence of tumor cells in the bone marrow correlates with early disease recurrences and lower survival; to detect bone marrow tumor cells is one of the most important approaches to early identifying metastases and improving the results of treatment for breast cancer. The paper gives the results of an investigation conducted at the N.N. Aleksandrov Republican Research and Practical Center for Oncology and Medical Radiology in 2008 to 2014, which established that the presence of cancer cells in the bone marrow is a poor prognostic sign: the 3-year relapse-free survival of patients with the unaffected and affected bone marrow was 88.7 and 69.3 %, respectively ($p < 0.01$).

Key words: breast cancer, micrometastases, tumor cells in bone marrow, polymerase chain reaction

Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой патогенетически полиморфное заболевание, поэтому все пациентки не могут получать одинаковое лечение с одинаковым эффектом. Несмотря на достигнутые результаты в ранней диагностике и успехи в комплексной терапии (хирургическое лечение, послеоперационная лучевая и химиотерапия (ХТ)), безрецидивная выживаемость ограничена из-за возникновения отдаленных метастазов, которые являются основной причиной смерти этой категории пациенток.

По данным канцер-регистра Республики Беларусь, за 2014 г. зарегистрировано 3835 новых случаев РМЖ. Из этого числа 82,2 % заболеваний было выявлено на ранних стадиях опухолевого процесса. Лечение по радикальной программе получили 75,2 % женщин. Пятилетняя выживаемость пациенток с впервые уста-

новленным диагнозом РМЖ в 2009 г. составила 76 %, среди женщин с I и II стадиями заболевания — 85,6 %, с III стадией — 58,6 %, с IV стадией — 14,1 %. Смертность от злокачественных новообразований молочной железы составила в 2014 г. 21 на 100 тыс. женщин [1].

Таким образом, лечение первичного РМЖ является сложной и не окончательно решенной на сегодняшний день проблемой. На современном этапе план лечебных мероприятий включает, как правило, несколько компонентов: хирургическое лечение, лучевое лечение, ХТ, гормонотерапию в случае положительных гормональных рецепторов в опухоли и таргетную терапию при экспрессии опухолью эпидермального фактора роста 2-го типа (HER-2/neu).

Однако факторы, приводящие к развитию отдаленных метастазов, до сих пор недостаточно изучены.

Согласно теории Фишера РМЖ является заболеванием, при котором на ранних стадиях (T1–2N0M0) высока вероятность скрытой системной диссеминации опухолевого процесса. Адьювантная ХТ направлена на уничтожение клинически неопределяемых микрометастазов, рассеянных по всему организму уже в момент хирургического лечения, которые могут превращаться в клинически значимые метастазы и приводить к гибели пациентки. Предполагается, что микрометастатические опухолевые клетки имеют те же биологические характеристики, что и первичная опухоль, и проведение профилактической ХТ способствует торможению роста микрометастазов и их гибели.

Согласно современным данным выбор режима адьювантной полихимиотерапии (ПХТ) базируется на разделении пациенток на категории риска возврата болезни: низкий, промежуточный и высокий. При этом учитываются следующие параметры: возраст, менструальная функция, размер первичной опухоли, наличие или отсутствие поражения регионарных лимфатических узлов, степень дифференцировки опухоли, наличие или отсутствие перитуморальной инвазии сосудов, рецепторный статус опухоли. Для определения категорий риска используются рекомендации Международного консенсуса по лечению первичного РМЖ (St. Gallen, 2009).

С помощью мультигенного анализа была создана молекулярно-биологическая классификация РМЖ. В повседневной практике деление на молекулярно-биологические подтипы (люминальный А, люминальный В HER-2-негативный и люминальный В HER-2-позитивный, HER-2-позитивный (нелюминальный), базальноподобный (трижды негативный)) осуществляется на основании определения иммуногистохимических характеристик опухоли: рецепторов к эстрогенам и прогестерону, экспрессии HER-2/neu, маркера пролиферации Ki-67. По современным представлениям молекулярно-биологическая характеристика опухоли должна иметь решающее значение при выборе терапии РМЖ наряду с морфологическими особенностями опухоли и распространенностью опухолевого процесса. Доказано, что разные молекулярно-биологические подтипы характеризуются различными показателями общей и безрецидивной выживаемости. Принадлежность опухоли к определенному биологическому подтипу не влияет на выбор режима ХТ. В целом адьювантная ХТ назначается при наличии факторов неблагоприятного прогноза, проводится с использованием стандартных схем, как правило, применяются антрациклин- и таксансодержащие режимы. В зависимости от конкретной клинической ситуации проводят 4–8 курсов. Согласно рекомендации Международного консенсуса по лечению первичного РМЖ (St. Gallen, 2013) адьювантная ХТ показана в большинстве случаев люминального В подтипа, при HER-2-положительном

(нелюминальном) и трижды негативном вариантах РМЖ. Исключение может быть сделано для пациенток с гормонозависимыми медленно растущими образованиями (люминальный А РМЖ) при небольшой степени распространенности опухолевого процесса [2].

Постоянно происходит развитие методов адьювантной ПХТ, в клиническую практику вводятся новые лекарственные препараты, совершенствуются режимы ХТ, но, несмотря на это, значительное количество случаев возникновения отдаленных метастазов в различные сроки после проведенной адьювантной терапии свидетельствует о недостаточной ее эффективности. Метастазы РМЖ могут развиваться при очень малых размерах первичной опухоли (менее 0,125 см³). Точность определения исходной стадии заболевания зависит от разрешающей способности методов обследования: ультразвукового и рентгенологического исследований, магнитно-резонансной томографии, радиоизотопной сцинтиграфии. Современное диагностическое оборудование позволяет установить наличие опухолевого узла только в тех случаях, когда его диаметр превышает 3–5 мм. Поэтому поиск дополнительных методов обнаружения ранней диссеминации опухолевого процесса является перспективным направлением научных исследований. Это даст возможность применять индивидуализированный подход к лечению больных РМЖ. Одним из таких подходов может быть определение диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге (КМ). Эти клетки, вероятно, находятся в латентном состоянии и не уничтожаются иммунной системой. Какие-то внутренние и/или внешние факторы активизируют эти клетки и дают толчок к их делению и росту метастазов в различных органах. На сегодняшний день факторы, определяющие длительность скрытого периода и развитие отдаленных метастазов, до конца не ясны [3].

Считается, что источником возобновления опухолевого процесса являются злокачественные клетки, мигрировавшие до или во время операции из первичной опухоли с током крови. Процесс развития отдаленных метастазов, согласно современным представлениям, состоит из ряда последовательных этапов: ангиогенеза в опухолевом узле, инвазии, интравазации, экстравазации и диссеминации опухолевых клеток. Гематогенная диссеминация злокачественных клеток происходит вскоре после васкуляризации первичной опухоли. Для развития метастазов необходим заключительный этап — выход опухолевых клеток из сосудистого русла в периваскулярную ткань и вновь прохождение стадий превращения из микрометастазов в клинически определяемые. Механизмы, обуславливающие развитие метастазов в различных органах, активно изучаются исследователями во всем мире [4–6].

Исследовательская группа М.У. Kim из США открыла феномен «опухолевого самообсеменения» — повторного заселения первичной опухоли циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК) и ДОК. Авторы изучали это явление на мышах, несущих человеческие опухоли — рак толстой кишки, РМЖ и меланому. Введенные в молочную железу мышей ДОК колонизировали первичную опухоль в другой молочной железе, а затем приобретали новые свойства и большой метастатический потенциал: отличались агрессивностью с тропизмом к костям, легким и головному мозгу, что доказано на основании профилей генной экспрессии, характерных для широкого спектра метастазов. Исследователями описано выраженное ускорение роста первичной опухоли, в котором важную роль играют стимуляция ангиогенеза и привлечение стромы в опухоль [7].

В настоящее время изучается прогностическая значимость определения опухолевых клеток в КМ и крови при различных степенях распространенности опухолевого процесса и локализациях первичного очага. При РМЖ она наиболее изучена у пациенток с IV стадией заболевания, а также при наличии местных рецидивов и отдаленных метастазов. Вместе с тем проводятся многочисленные исследования, направленные на изучение эффективности различных режимов цитостатической терапии, используемых как в неоадьювантных, так и в адьювантных режимах в целях уничтожения опухолевых клеток в крови и КМ.

Наиболее часто для определения опухолевых клеток в КМ используется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР — осуществляемая *in vitro* специфическая амплификация нуклеиновых кислот, иницируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами. Чувствительность ПЦР при выявлении опухолевых клеток составляет 1 на 100 000–1 000 000 нормальных клеток КМ. Уникальность этого метода заключается в универсальности применения для исследования различного биологического материала. Метод ПЦР сразу был внедрен в практическую медицину, что позволило поднять диагностику на качественно новый уровень. В настоящее время разработаны различные модификации этого метода, для идентификации РНК применяется модифицированный метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Он основан на обратном транскрибировании и используется для обнаружения в образцах тканей заданной матричной РНК (мРНК). О наличии опухолевых клеток в крови и КМ с помощью ПЦР судят по обнаружению мРНК опухолевых антигенов (цитокератина, маммоглобина, ракового эмбрионального антигена), экспрессируемых опухолевыми клетками. ПЦР позволяет определить гены, мутации которых специфичны для опухолевых клеток, например гены *ERB2*, *p53* и *K-RAS* [8, 9].

При выявлении микрометастазов РМЖ для достижения высокой чувствительности изучена эффективность использования различных маркеров. В ходе исследований были объединены неспецифические эпителиальные маркеры и специфические маркеры РМЖ. Установлено, что мультимаркерный подход при ПЦР-диагностике является наиболее эффективным для выявления микрометастазов РМЖ в КМ [10–16].

В многочисленных работах различных авторов в течение последних 10 лет ген (и его продукты) маммоглобин А (*SCGB2A1*) благодаря своей тканевой специфичности рассматривается в качестве перспективного диагностического маркера РМЖ. Он локализован на длинном плече 11-й хромосомы (11q12.3–13.1). Экспрессия маммоглобина была обнаружена в эпителиальных клетках молочной железы, в клетках стромы экспрессии гена не наблюдалось. Наиболее перспективным методом исследования экспрессии маммоглобина является молекулярно-генетический метод исследования, основанный на ПЦР. Отмечено, что оценка уровня маммоглобина может применяться для скрининга и выявления первичного или метастатического РМЖ, прогнозирования заболеваемости и излеченности пациенток. Исследования продолжаются [17–31].

В настоящее время широко используется термин «минимальный остаточный (резидуальный) рак». Он означает наличие у радикально пролеченных пациентов ЦОК или ДОК. Спустя годы и даже десятилетия они могут активизироваться и вызвать метастазирование в различных органах. Уже проведен ряд исследований, предполагающих изучение наличия опухолевых клеток в КМ при различных солидных опухолях. Микрометастазы в КМ наиболее характерны для рака предстательной железы, молочной железы, легкого, поджелудочной железы, колоректального рака, нейробластомы. Так, при РМЖ они выявляются практически в 30–35 % случаев, при нейробластоме у детей — в 50–67 %, при мелкоклеточном раке легкого — в 17–45 %, при немелкоклеточном раке легкого — у 21 % пациентов, при раке толстой кишки — в 12–17 % случаев [32–35].

U. Bork и соавт. показали, что наличие минимальной остаточной болезни играет важную роль в рецидивировании заболевания и формировании метастазов при колоректальном раке. Авторами продемонстрировано, что наличие ЦОК в крови, ДОК в КМ является прогностическим маркером общей выживаемости пациента. Определение ЦОК в крови исследователи использовали в клинической практике для мониторинга заболевания у пациентов с колоректальным раком. Сделан вывод, что определение минимальной остаточной болезни может применяться в будущем для выявления групп риска

пациентов, которым необходимо подбирать индивидуальные варианты лечения [36].

Китайские ученые исследовали клиническое значение определения ДОК в КМ при раке желудка. Их количество значимо коррелировало со стадией TNM ($p = 0,038$); связи с полом, возрастом, гистологической дифференцировкой и наличием метастазов в лимфатических узлах выявлено не было. Сделан вывод о том, что наличие ДОК в КМ при раке желудка свидетельствует о плохом прогнозе [37].

Иранские исследователи изучили клиническую значимость определения микрометастазов в КМ при немелкоклеточном раке легкого. Это исследование было проведено в целях оценки точности ПЦР и иммуногистохимии в выявлении микрометастазов и определения лучшего метода биопсии КМ для их обнаружения. Из 41 пациента у 14 (34 %) обнаружены ДОК в КМ с помощью ПЦР, при использовании иммуногистохимии ДОК зарегистрированы в тех же пробах КМ только у 2 (4,8 %) пациентов. Все ДОК были диагностированы в сегментах ребер, тогда как в материале из подвздошных костей их не найдено. Полученные в ходе исследования данные не показали существенной связи между наличием ДОК в КМ и возрастом, полом пациентов, гистологическим типом, локализацией опухоли (сторона поражения, количество пораженных долей), курением [38]. Значение выявления ДОК при раке легкого изучается и другими авторами [39, 40].

Болгарские ученые в своем исследовании оценили значение обнаружения эпителиальных клеток в КМ 79 пациенток с РМЖ в качестве индикатора метастазов. Цитокератин-положительные клетки выявлены у 51 (64 %) из них. Частота рецидивов опухоли или смерти от рака у них была значительно выше. Многофакторный анализ с использованием регрессионной модели Кокса показал, что поражение КМ является прогностическим параметром независимо от статуса подмышечных лимфатических узлов. Выявление диссеминированных эпителиальных клеток в КМ связано с плохим клиническим прогнозом при РМЖ. Тем не менее авторы сделали вывод, что присутствие этих клеток не является достаточным критерием распространенности процесса, предполагая, что эпителиальные клетки в КМ пациенток с РМЖ на момент операции имеют ограниченный метастатический потенциал и их роль должна быть дополнительно оценена [41].

Одним из наиболее важных прогностических и предиктивных факторов у пациенток с РМЖ является метастатическое поражение регионарного лимфатического аппарата. В настоящее время стандартными методами выявления метастатического поражения лимфатических узлов являются цитологические и гистологические исследования. Однако использование в клинической практике данных мето-

дов детекции позволяет выявлять злокачественные клетки при их достаточно большом количестве, вследствие чего обнаружение метастазов становится возможным лишь на поздних стадиях опухолевого процесса. A.D. Hartkopf и соавт. рассматривали метастазы рака как прогрессирующий процесс с момента образования микроокружения в первичной опухоли и вплоть до распространения по лимфоваскулярной системе в отдаленные органы. Этот тип распространения опухоли часто происходит упорядоченно, через сторожевой лимфатический узел, который является воротами для распространения в регионарные лимфатические узлы, КМ и периферическую кровь и в конечном итоге — в отдаленные органы. Но это не общее правило, опухолевые клетки могут попадать в кровь и распространяться на отдаленные участки, минуя сторожевые лимфатические узлы. Исследователи выявили более низкую выживаемость пациенток с микрометастазами в сторожевых лимфатических узлах, КМ и периферической крови, отметили, что наличие микрометастазов также имеет важные биологические последствия для прогрессирования заболевания; дальнейшая характеристика этих клеток на каждой стадии и при различной локализации метастазов необходима для выработки новых селективных методов лечения для более персонализированной терапии [42].

Единичные эпителиальные клетки в КМ при РМЖ изучаются по нескольким основным направлениям — как фактор прогноза рецидива и продолжительности жизни, а также как потенциальный маркер, позволяющий оценить эффективность системного лечения.

В исследовании G. Gebauer и соавт. после проведения многофакторного анализа подтверждена гипотеза о том, что обнаружение единичных опухолевых клеток в КМ коррелирует с неблагоприятным прогнозом; особенно это касается пациенток с метастазами РМЖ в регионарных лимфатических узлах. При среднем периоде наблюдения 75 мес отдаленные метастазы развились у 27 % (105 из 393) пациенток, в том числе у 35 % (59 из 166) с микрометастазами в КМ и у 20 % (46 из 227) без поражения КМ на момент первичного хирургического лечения ($p < 0,0001$). В подгруппе пациенток без метастазов в регионарном лимфатическом аппарате отдаленные метастазы появились у 16 %. В этой подгруппе не отмечено разницы в общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от наличия опухолевых клеток в КМ на момент установления диагноза. Важно отметить, что после 5-летнего наблюдения 65 % пациенток с микрометастазами в КМ на момент постановки диагноза живы без признаков прогрессирования заболевания, т.е. диссеминация процесса в КМ в период первичного оперативного лечения не обязательно приводит к развитию отдаленных метастазов [43].

В проспективном исследовании швейцарские ученые проанализировали результаты 5-летней безрецидивной и общей выживаемости 410 пациенток с ранним РМЖ (T1 и T2 ≤ 3 см, cN0). Всем больным было проведено исследование КМ с последующей биопсией сторожевого лимфатического узла. Непораженные сторожевые лимфатические узлы были найдены в 67,6 % случаев (277 из 410 больных), из них статус КМ был отрицательным в 75,8 % (210 из 277) и положительным — в 24,2 % (67 из 277). Медиана наблюдения составила 61 (11–96) мес. Пятилетняя выживаемость без признаков заболевания достигла 93,6 % (95 % доверительный интервал (ДИ) 89,1–96,0) у КМ-отрицательных и 92,2 % (95 % ДИ 82,5–96,2) у КМ-положительных пациенток ($p = 0,50$); 5-летняя общая выживаемость — 92,7 % (95 % ДИ 87,9–95,8) и 92,5 % (95 % ДИ 83,4–96,2) соответственно ($p = 0,85$). Авторы сделали вывод, что наличие микрометастазов в КМ не влияет на течение заболевания и общую выживаемость [44].

Изучены результаты анализа КМ 726 пациенток с РМЖ из университетских клиник в Осло ($n = 356$), Мюнхене ($n = 228$) и Тюбингене ($n = 142$). Интервал наблюдения составил 31,7 мес после первичной диагностики РМЖ pT1–4N0–3M0. Микрометастазы в КМ были обнаружены в 15,4 % случаев ($n = 112$). Безрецидивная выживаемость составила 163,6 мес у пациенток с отрицательным и 105,2 мес — с положительным статусом КМ. Общая выживаемость больных без микрометастазов в КМ составила 165,6 мес, что было значительно выше, чем при положительном статусе КМ (103,3 мес; $p < 0,0001$). Сохранение ДОК после первичного лечения может быть показанием для длительной адъювантной терапии. Тем не менее до сих пор клиническое значение обнаружения ДОК при солидных опухолях, в частности при РМЖ, не было подтверждено. Авторы делают вывод, что поиск изолированных опухолевых клеток в КМ должен выполняться главным образом в клинических испытаниях [45].

Выявление диссеминированных одиночных или малых кластеров опухолевых клеток в КМ является

одним из важнейших подходов для раннего обнаружения метастазов и улучшения результатов лечения РМЖ.

В Республиканском научно-практическом центре онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова с 2008 по 2014 г. проведено проспективное рандомизированное исследование по разработке метода адъювантной ХТ больных операбельным РМЖ промежуточной и высокой групп риска с микрометастазами в КМ. Материалом для исследования послужили данные о 290 пациентках с I–III стадиями РМЖ, а также биологический материал — КМ.

В ходе исследования установлено следующее. Среди пациенток с операбельным РМЖ, относящихся к промежуточной и высокой группам риска, опухолевые клетки в КМ определяются в 31,4 % случаев. Из числа больных с пораженным КМ люминальный А молекулярно-генетический подтип опухоли выявили в 35 % случаев (у 32 из 91), люминальный В HER-2-негативный — в 13 % (у 12 из 91), люминальный В HER-2-позитивный — в 16,5 % (у 15 из 91), HER-2-положительный (нелюминальный) — в 16,5 % (15 из 91) и базальноподобный (трижды негативный) — у 19 % (17 из 91) пациенток.

Наличие раковых клеток в КМ является неблагоприятным прогностическим признаком: 3-летняя безрецидивная выживаемость пациенток с непораженным КМ составляет 88,7 %, с пораженным — 69,3 % ($p < 0,01$). Общая выживаемость всех 290 пациенток составила 90,9 % (95 % ДИ 87,1–94,1); больных с непораженным КМ — 96,4 % (95 % ДИ 92,9–98,6), с пораженным КМ — 79,7 % (95 % ДИ 70,6–87,8) ($p = 0,006$).

Разработан метод адъювантной ХТ, предполагающий использование паклитаксела отечественного производства. Он позволяет нивелировать этот неблагоприятный прогностический индекс. Трехлетняя безрецидивная выживаемость пациенток с исходно пораженным КМ, у которых в результате адъювантной ХТ достигнута его санация, практически такая же, как и у больных с исходно непораженным КМ: 88,7 и 81,6 % соответственно ($p = 0,29$).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Океанов А.Е., Моисеев П.И., Левин Л.Ф. Статистика онкологических заболеваний. Под ред. О.Г. Суконко. Минск: РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, 2014. С. 136–41. [Okeanov A.E., Moiseev P.I., Levin L.F. Statistics of oncologic diseases. Ed. by O.G. Sukonko. Minsk: N.N. Aleksandrov RSPC OMR, 2014. Pp. 136–41. (In Russ.)].
2. Стенина М.Б. Опухоли женской репродуктивной сферы. Рак молочной железы. В кн.: Руководство по химиотерапии опу-

- холевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой, В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015. С. 241–57. [Stenina M.B. Tumors of the female reproductive system. Mammary gland cancer. In: Manual for the chemotherapy of tumor diseases. Ed. by N.I. Perevodchikova, V.A. Gorbunova. Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2015. Pp. 241–57. (In Russ.)].
3. Riethdorf S., Pantel K. Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor

- cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. Pathobiology 2008;75(2):140–8.
4. Braun S., Vögl F.D., Naume B. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. N Engl J Med 2005;353(8):793–802.
5. Janni W., Rack B., Schindlbeck C. et al. The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk

- for recurrence. *Cancer* 2005;103(5): 884–91.
6. Schoenfeld A., Kruger K.H., Gomm J. et al. The detection of micrometastases in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer using immunohistochemistry and reverse transcriptase polymerase chain reaction for keratin 19. *Eur J Cancer* 1997;33(6):854–61.
7. Kim M.Y., Oskarsson T., Acharyya S. et al. Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 2009;139(7):1315–26.
8. Стариков В.И., Ходак А.С. Детекция диссеминированных опухолевых клеток в крови, костном мозге и лимфатических узлах с помощью молекулярно-биологических методов. *Международный медицинский журнал* 2007;(2):96–100. [Starikov V.I., Khodak A.S. Detection of disseminated tumor cells in blood, bone marrow and lymphatic nodules by means of molecular and biologic methods. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal = International Medical Journal* 2007;(2):96–100. (In Russ.)].
9. Смолякова Р.М. и др. Молекулярно-генетические исследования в клинической онкологии. В кн.: *Руководство по онкологии*. В 2 т. Под общ. ред. О.Г. Суконко. Минск: Беларус. энцикл. им. П. Бровки, 2015. Т. 1. С. 356–60. [Smolyakova R.M. et al. Molecular and genetic studies in clinical oncology. In: *Oncology manual*. In 2 vol. General ed. by O.G. Sukonko. Minsk: Belarus. encycl. im. P. Brovki, 2015. Vol. 1. Pp. 356–60. (In Russ.)].
10. Braun S., Pantel K., Müller P. et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000;342(8): 525–33.
11. Nissan A., Jager D., Roystacher M. et al. Multimarker RT-PCR assay for the detection of minimal residual disease in sentinel lymph nodes of breast cancer patients. *Br J Cancer* 2006;94(5):681–5.
12. Chen Y., Zou T.N., Wu Z.P. et al. Detection of cytokeratin 19, human mammaglobin, and carcinoembryonic antigen-positive circulating tumor cells by three-marker reverse transcription-PCR assay and its relation to clinical outcome in early breast cancer. *Int J Biol Markers* 2010;25(2):59–68.
13. Szoke J., Udvarhelyi N. Modern pathologic diagnostics in breast cancer. *Orv Hetil* 2012;153(1):22–30.
14. Mari P., Ozreti P., Levanat S. et al. Tumor markers in breast cancer – evaluation of their clinical usefulness. *Coll Antropol* 2011;35(1):241–7.
15. Weinschenker P., Soares H.P., Clark O., Del Giglio A. Immunocytochemical detection of epithelial cells in the bone marrow of primary breast cancer patients: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2004;87(3):215–24.
16. Al-Joudi F.S., Kaid F.A., Ishak I. et al. Expression of human mammaglobin and clinicopathologic correlations in breast cancer: findings in Malaysia. *Indian J Pathol Microbiol* 2011;54(2):284–9.
17. Al-Joudi F.S. Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *Indian J Med Res* 2014;139(5):675–85.
18. Koh E.H., Cho Y.W., Mun Y.J. et al. Upregulation of human mammaglobin reduces migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Invest* 2014;32(1):22–9.
19. Lewis G.H., Subhawong A.P., Nassar H. et al. Relationship between molecular subtype of invasive breast carcinoma and expression of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin. *Am J Clin Pathol* 2011;135(4):587–91.
20. Li G., Zhang J., Jin K. et al. Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomark Med* 2011;5(2):249–60.
21. Ferro P., Franceschini M.C., Bacigalupo B. et al. Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors. *Anticancer Res* 2010;30(6):2377–82.
22. Dono M., Ferro P., Franceschini M.C. et al. Human mammaglobin transcript amplification for differential diagnosis in a breast cancer metastatic to dura mater. *Anticancer Res* 2011;31(3):1061–4.
23. Wang Z., Spaulding B., Sienko A. et al. Mammaglobin, a valuable diagnostic marker for metastatic breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2(4):384–9.
24. Markou A., Strati A., Malamos N. et al. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem* 2011;57(3):421–30.
25. Ceballos M.P., Zumoffen C., Massa E. et al. Detection of mammaglobin A in blood from breast cancer patients, before and after treatment, using a one-tube nested PCR protocol. Association with the absence of tumor estrogen receptors. *Clin Biochem* 2011;44(17–18):1429–33.
26. Lopez-Bonet E., Pérez-Martínez M.C., Martín-Castillo B. et al. Diagnostic utility of mammaglobin and GCDFP-15 in the identification of primary neuroendocrine carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126(1):241–5.
27. Tjensvoll K., Gilje B., Olteidal S. et al. A small subgroup of operable breast cancer patients with poor prognosis identified by quantitative real-time RT-PCR detection of mammaglobin A and trefoil factor 1 mRNA expression in bone marrow. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116(2):329–38.
28. Bitisik O., Saip P., Saglam S. et al. Mammaglobin and maspin transcripts in blood may reflect disease progression and the effect of therapy in breast cancer. *Genet Mol Res* 2010;9(1):97–106.
29. Zuo L., Li L., Wang Q. et al. Mammaglobin as a potential molecular target for breast cancer drug delivery. *Cancer Cell Int* 2009;9:8.
30. Tiriveedhi V., Sarma N.J., Subramanian V. et al. Identification of HLA-A24-restricted CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes derived from mammaglobin-A, a human breast cancer-associated antigen. *Hum Immunol* 2012;73(1):11–6.
31. Flatmark K., Borgen E., Nesland J.M. et al. Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011;104(9):1434–9.
32. Carpenter E.L., Rader J., Ruden J. et al. Dielectrophoretic capture and genetic analysis of single neuroblastoma tumor cells. *Front Oncol* 2014;4:201.
33. Banys M., Solomayer E.F., Gebauer G. et al. Influence of zoledronic acid on disseminated tumor cells in bone marrow and survival: results of a prospective clinical trial. *BMC Cancer* 2013;13:480–6.
34. Murray N.P., Reyes E., Tapia P. et al. Redefining micrometastasis in prostate cancer – a comparison of circulating prostate cells, bone marrow disseminated tumor cells and micrometastasis: Implications in determining local or systemic treatment for biochemical failure after radical prostatectomy. *Int J Mol Med* 2012;30(4): 896–904.
35. Balic M., Williams A., Dandachi N., Cote R.J. Micrometastasis: detection methods and clinical importance. *Cancer Biomark* 2010;9(1–6):397–419.
36. Bork U., Grützmann R., Rahbari N.N. et al. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(30):10296–304.
37. Wang G., Wang S., Li Y. et al. Clinical study of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2013;60(122):273–6.
38. Mohajeri G., Sanei M.H., Tabatabaee S.A. et al. Micrometastasis in non-small-cell lung cancer: Detection and staging. *Ann Thorac Med* 2012;7(3):149–52.
39. Li X., Asmitananda T., Gao L. et al. Biomarkers in the lung cancer diagnosis: a clinical perspective. *Neoplasma* 2012;59(5):500–7.
40. Dragomir A., Moldoveanu E., Mihăilă F. Update regarding the role of biomarkers in early diagnosis of non-small cell bronchopulmonary cancer. *Pneumologia* 2011;60(1):9–13.
41. Yovtchev Y.P., Minkov G.A., Petrov A.T. et al. Epithelial cells expressing cytokeratins-19 and bone marrow micrometastases in patients with breast cancer at the time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *Breast Cancer* 2014;21(5): 590–7.
42. Hartkopf A.D., Taran F.A., Wallwiener M. et al. Prognostic relevance of disseminated tumour cells from the bone marrow of early stage breast cancer patients – results from

a large single-centre analysis. Eur J Cancer 2014;50(15):2550–9.

43. Gebauer G., Fehm T., Merkle E. et al. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery. Clinical

outcome during long-term follow-up. J Clin Oncol 2001;19(16):3669–74.

44. Langer I., Guller U., Worni M. et al. Bone marrow micrometastases do not impact disease-free and overall survival in early stage sentinel

lymph node-negative breast cancer patients. Ann Surg Oncol 2014;21(2):401–7.

45. Janni W., Rack B., Kasprowicz N. et al. DTCs in breast cancer: clinical research and practice. Recent Results Cancer Res 2012;195:173–8.