

DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-2-23-31



Циркулирующие опухолевые клетки при раке молочной железы: клинико-молекулярные параллели

А.В. Зюзюкина^{1,2}, М.О. Ватрушкина¹, Т.Н. Замай¹, О.С. Коловская^{1,3}, Г.С. 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;

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

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

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее распространенный вид злокачественных новообразований среди женщин, имеющий высокий уровень метастазирования. Для увеличения эффективности противоопухолевой терапии необходима ранняя неинвазивная диагностика.

Цель исследования – определить содержание циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и их производных в периферической крови с помощью аптамера MDA-231, полученные результаты сравнить с клинико-молекулярными характеристиками РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 22 пациентки с РМЖ. Детекцию ЦОК и циркулирующих опухолевых микроэмболов проводили в 3,5 мл крови больных РМЖ с помощью аффинного клеткам РМЖ аптамера MDA-231, меченного флуоресцентным красителем Су3. Подсчет ЦОК в мазках образцов крови проводили с помощью флуоресцентной и сканирующей лазерной микроскопии.

Результаты и выводы. С помощью аптамера MDA-231 проанализировано содержание ЦОК и циркулирующих опухолевых микроэмболов в периферической крови больных РМЖ различных молекулярных подтипов. Выявлена зависимость между количеством ЦОК и молекулярно-биологическим подтипом РМЖ. Полученные результаты демонстрируют возможное прогностическое значение использования ЦОК для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии и контроля над рецидивами РМЖ.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие опухолевые микроэмболы, аптамер, рак молочной железы, молекулярно-биологический подтип рака молочной железы

Для цитирования: Зюзюкина А.В., Ватрушкина М.О., Замай Т.Н. и др. Циркулирующие опухолевые клетки при раке молочной железы: клинико-молекулярные параллели. Опухоли женской репродуктивной системы 2021;17(2):23–31. DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-2-23-31.

Circulating tumor cells in breast cancer: clinical and molecular parallels

A. V. Zyuzukina^{1,2}, M. O. Vatrushkina¹, T. N. Zamay¹, O. S. Kolovskaya^{1,3}, G. S. Zamay^{1,3}, A. S. Kichkailo^{1,3}, R. A. Zukov^{1,2}

¹V. F. Voyno-Yasenetskiy Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

²A. I. Kryzhanovskiy Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Dispensary; 16 1-ya Smolenskaya St., Krasnoyarsk 660133, Russia;

³Federal Research Center «Krasnoyarsk Research Center», Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 50 Akademgorodok, Krasnoyarsk 660036, Russia

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

Background. Breast cancer (BC) is the most common type of malignant neoplasm among women, with a high rate of metastasis. Early non-invasive diagnosis is required to increase the effectiveness of anticancer therapy.

Objective: to determine the content of circulating tumor cells (CTCs) and their derivatives in the peripheral blood using the MDA-231 aptamer, compare the results obtained with the clinical and molecular characteristics of BC.

Materials and methods. The study included 22 patients with BC. Detection of CTCs and circulating tumor microemboli was carried out in 3.5 ml of the blood of BC patients with the help of the MDA-231 aptamer which is affine for breast cancer cells, labeled with the fluorescent Cy3 dye. The count of CTCs in the blood samples was performed using fluorescent and laser scanning microscopy.

Results and conclusions. The content of CTCs and circulating tumor microemboli in the peripheral blood of patients with BC of various molecular subtypes was analyzed using the MDA-231 aptamer. The relationship between the number of CTCs and the molecular biological subtype was revealed. The obtained results show the possible prognostic value of CTCs use for monitoring effectiveness of anticancer therapy and control of recurrence of BC.

Key words: circulating tumor cells, circulating tumor microemboli, aptamer, breast cancer, molecular biological subtype of breast cancer

For citation: Zuzyukina A.V., Vatrushkina M.O., Zamay T.N. et al. Circulating tumor cells in breast cancer: clinical and molecular parallels. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system* 2021;17(2): 23–31. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-2-23-31.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее распространенный вид злокачественных новообразований среди женщин Европы, Америки и Азии. Согласно данным Международного агентства по исследованию рака, в 2020 г. РМЖ занял лидирующую позицию среди онкологических заболеваний, составляя 11,7 %, зарегистрировано более 2,2 млн новых случаев заболевания, при этом около 684 тыс. связаны со смертельным исходом [1]. В мире наблюдается постоянный рост числа онкологических больных, в частности, отмечается, что в период с 1975 по 2000 г. произошло его удвоение. Прогнозируется, что к 2030 г. число онкологических больных станет в 3 раза больше, а смертность возрастет до 17 млн случаев.

В последнее десятилетие в области диагностики РМЖ достигнуты значительные успехи, в частности, с помощью моноклональных антител. Тем не менее в использовании и производстве антител имеются недостатки, ограничивающие их применение в качестве диагностических препаратов, наиболее важными из которых являются следующие: 1) процедура получения антител, которую трудно масштабировать, не влияя на их характеристики; 2) возможность вирусного или бактериального загрязнения производственного процесса, которое способно изменять качество продукции; 3) ограниченный срок хранения вследствие возможной необратимой денатурации; 4) сложность химической модификации антител для придания им новых свойств и высокая стоимость разработки и производства моноклональных антител [2]. Именно поэтому актуален поиск новых инновационных препаратов, заменяющих моноклональные антитела.

В настоящее время вследствие достигнутых успехов в области молекулярной биологии стало понятно, что наиболее приемлемой заменой моноклональным антителам могут стать их синтетические функциональные аналоги — аптамеры. Аптамеры, состоящие из ко-

ротких ДНК- или РНК-олигонуклеотидов (15–100 нт.), образуют сложные третичные или квадрупольные структуры путем гибридизации комплементарных последовательностей [3]. Большие площади поверхности аптамеров, несмотря на их малую молекулярную массу (5–30 кДа), обеспечивают их высокое сродство с молекулярными мишенями [2]. Константы диссоциации (Kd) аптамеров, как правило, находятся в диапазоне от нескольких микро- до нескольких пикомолей [4], что сопоставимо с аффинностью антител. В настоящее время синтез аптамеров автоматизирован, что обеспечивает экономичное и быстрое объемное производство с минимальным изменением от партии к партии, в отличие от моноклональных антител. Кроме того, структурная стабильность аптамеров обеспечивает им длительный период хранения. Аптамеры способны выдерживать широкий диапазон температур, их функциональная третичная структура легко восстанавливается после тепловой денатурации. Другим значительным преимуществом аптамеров является их способность к химическим модификациям.

Рак молочной железы — онкологическое заболевание, характеризующееся очень ранним метастазированием в лимфатические узлы, костную ткань и висцеральные органы. Поэтому для увеличения эффективности противоопухолевой терапии и ее мониторинга необходимо раннее выявление РМЖ и его метастазов. Одним из важных агентов метастазирования являются циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), представляющие собой эпителиальные клетки карцином, попадающие в кровоток в ходе развития злокачественного новообразования. Три и более соединенные вместе ЦОК, имеющие пролиферативный потенциал, формируют циркулирующие опухолевые микроэмболы (ЦОМ), которые могут разрывать стенки капилляров и закупоривать сосуды, давая новые метастазы [5]. Определение количества ЦОК в крови больных РМЖ поможет оценить риск рецидива или прогрессирования

заболевания, провести количественный мониторинг в реальном времени, идентифицировать терапевтические цели и механизмы резистентности к терапии [6, 7].

Цель настоящего исследования – определить содержание ЦОК и ЦОМ в периферической крови с помощью аптамера MDA-231, полученные результаты сравнить с клинико-молекулярными характеристиками РМЖ.

Материалы и методы

В исследование включены 22 пациентки со злокачественными новообразованиями молочной железы, получавшие лечение в отделении онкомамологической хирургии КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» в 2017 г. Возраст пациенток составил 35–79 лет, в среднем – 54 ± 12 лет, из них 3 (13,6 %) пациентки проходили лечение по поводу злокачественного новообразования, в 2 случаях проводили комбинированное лечение по поводу рака контралатеральной молочной железы, у 1 женщины проведено радикальное хирургическое лечение по поводу базалиомы кожи. Неoadьювантную полихимиотерапию получили 4 (18,2 %) пациентки с размером опухолевой ткани T3–4 с различными молекулярно-биологическими подтипами.

Детекцию ЦОК и ЦОМ проводили из 3,5 мл крови пациенток через 1,0–1,5 ч после сбора в вакутейнеры с гепарином. ЦОК выделяли из крови с помощью аптамера MDA-231, конъюгированного с магнитными шариками, а затем окрашивали аптамером MDA-231, меченным Cy5. Из полученной суспензии делали мазки, которые фиксировали в метаноле и окрашивали красителем Романовского–Гимзе. ЦОК подсчитывали с использованием флуоресцентного микроскопа AxioStar Plus (Carl Zeiss Group, Германия) и анализировали с помощью лазерной сканирующей микроскопии.

Классификацию РМЖ проводили согласно системе TNM (7-е издание, 2010 г.) [8]. Патоморфологическую стадию заболевания определяли на основании заключения морфолога после изучения тканей, удаленных во время операции. Распределение пациенток по стадиям заболевания было следующим: I стадия – 5 (22,7 %), II стадия – 12 (54,6 %), III стадия – 5 (22,7 %) пациенток. Положительный статус регионарных лимфатических узлов выявлен у 45,5 % пациенток, из них у 30 % на основании патологоанатомического заключения было установлено поражение N2 и N3.

Гистологическую степень злокачественности (G) определяли по Ноттингемской системе. Согласно данной классификации оценивали 3 признака: формирование трубочек, ядерный полиморфизм, число митозов. I степень (низкая злокачественность) – 3–5 баллов, II степень (умеренная злокачественность) – 6–7 баллов, III степень (высокая злокачественность) – 8–9 баллов

[9, 10]. Распределение больных по степени злокачественности: I степень – 18,2 %, II степень – 72,7 %, III степень – 9,1 % пациенток.

Экспрессию рецепторов эстрогенов (ЭР) и прогестерона (ПР) оценивали полуколичественным методом при помощи Allred Scoring System [11]. Определение экспрессии HER2/neu проводили с помощью иммуногистохимии. Результат 0–1+ – отрицательная экспрессия, 2+ – сомнительная, 3+ – положительная [12]. Всем больным с сомнительной экспрессией выполнялась флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH).

Распределение больных по биологическим подтипам РМЖ осуществляли на основании следующих критериев [13]:

- 1) люминальный А: положительный статус ЭР (по Allred) и ПР (≥ 6), экспрессия HER2/neu (0–1+), уровень Ki-67 < 20 %;
- 2) люминальный В HER2-отрицательный: положительный статус ЭР и/или ПР (≤ 5 по Allred), уровень Ki-67 ≥ 20 %. Люминальный В HER2-положительный: положительный статус ЭР и/или ПР, гиперэкспрессия HER2/neu (3+), уровень Ki-67 любой;
- 3) HER2-сверхэкспрессирующий РМЖ: гиперэкспрессия HER2/neu (3+), отсутствие экспрессии ЭР и ПР, уровень Ki-67 любой;
- 4) трижды негативный РМЖ: отсутствие экспрессии ЭР и ПР, отсутствие экспрессии HER2/neu ($< 2+$), уровень Ki-67 любой.

Распределение пациенток по биологическим подтипам РМЖ представлено в табл. 1.

Таблица 1. Распределение пациенток по биологическим подтипам рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients by biological subtypes of breast cancer

Биологический подтип рака молочной железы Biological subtype of breast cancer	Число пациенток, n (%) Number of patients, n (%)
Люминальный А Luminal A	2 (9,1)
Люминальный В: Luminal B: HER2-отрицательный HER2-negative HER2-положительный HER2-positive	13 (59,1) 4 (18,2)
HER2-сверхэкспрессирующий HER2-overexpressing	1 (4,5)
Трижды негативный Triple negative	2 (9,1)
<i>Всего</i> <i>Total</i>	22 (100)

Результаты

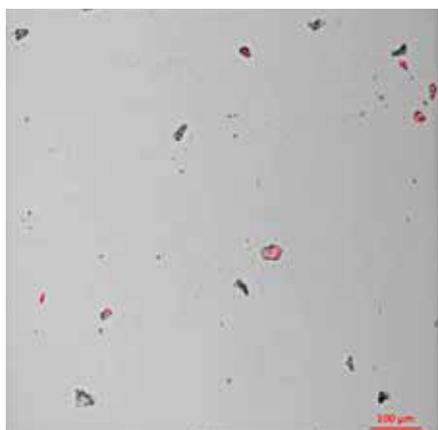
Примеры ЦОК из крови больных РМЖ, выделенных и окрашенных с помощью аптамера MDA-231, меченного Cy3, представлены на рисунке.

Сводные данные по содержанию ЦОК в крови больных РМЖ представлены в табл. 2. Из таблицы видно, что в крови 90,9 % пациенток были выявлены ЦОК, в периферической крови остальных больных ЦОК не обнаружены. Количественный диапазон ЦОК, выявленных в крови больных РМЖ, варьировал от 0 до 20 клеток в 3,5 мл крови. У 50 % пациенток количество ЦОК соответствовало высокому значению (≥ 5), во всех остальных случаях содержание ЦОК находилось в интервале от 1 до 4 клеток. ЦОМ выявлены в 31,8 % случаев и в большинстве случаев ассоциированы с высоким числом ЦОК.

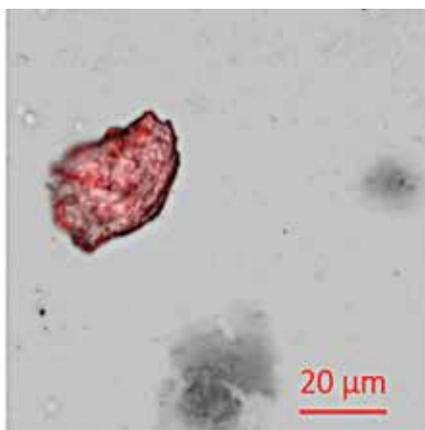
С целью оценки прогностических возможностей использования аптамера MDA-231 для выявления ЦОК была проведена оценка зависимости количества ЦОК и ЦОМ от показателей экспрессии ЭР и ПР,

рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2-го типа; пролиферативной активности; степени дифференцировки опухоли; гистологической структуры опухолевого процесса.

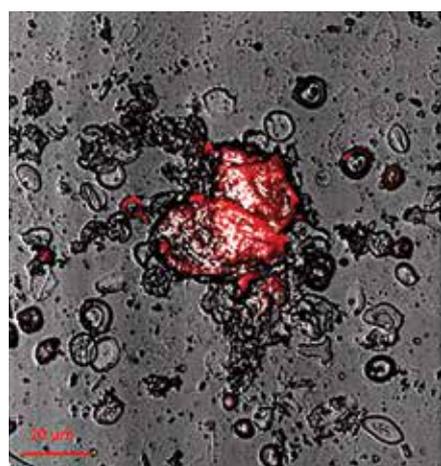
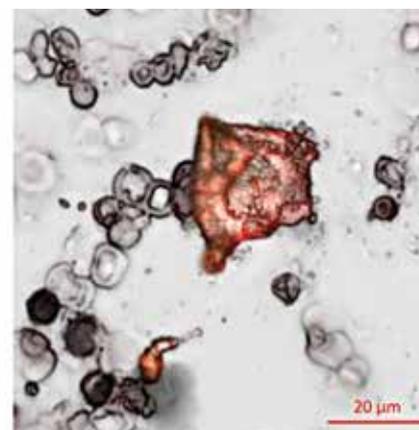
Анализ связи между количеством ЦОК и молекулярным подтипом РМЖ показал, что у больных с люминальным А подтипом РМЖ отсутствовали ЦОК. У пациентки с HER2-сверхэкспрессирующим подтипом выявлено 20 ЦОК. При люминальном В (HER2-отрицательном) подтипе, представленном наибольшим числом клинических случаев, содержание ЦОК в периферической крови находилось в интервале от 2 до 10 клеток. При люминальном В (HER2-положительном) подтипе количество ЦОК варьировало от 3 до 6 клеток. У больных с трижды негативным подтипом РМЖ количество ЦОК было практически одинаковым и составляло 6–8 клеток. Таким образом, в целом прослеживается определенная взаимосвязь между содержанием ЦОК и молекулярно-биологическим подтипом РМЖ.



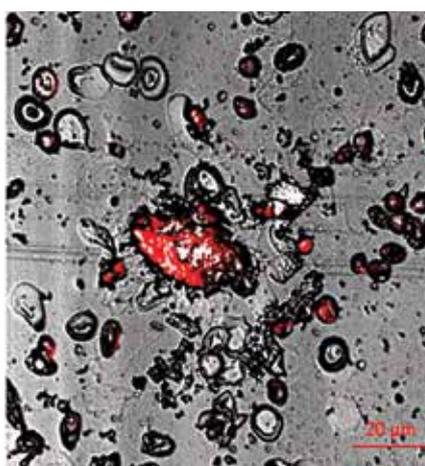
Cy3 MDA-231 аптамер ЦОК / Cy3 MDA-231 aptamer CTC



Cy3 MDA-231 аптамер ЦОК от разных пациенток / Cy3 MDA-231 aptamer CTC from different patients



Cy3 MDA-231 аптамер микроэмбола из 2 клеток / Cy3 MDA-231 aptamer of a microembolus consisting of 2 cells



Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), выделенные из крови больных раком молочной железы и окрашенные с помощью аптамера MDA-231, меченного Cy3

Circulating tumor cells (CTC) isolated from blood of breast cancer patients and stained with Cy3-labeled MDA-231 aptamer

Таблица 2. Сводная таблица количества циркулирующих опухолевых клеток и циркулирующих опухолевых микроэмболов, выделенных из 3,5 мл периферической крови больных раком молочной железы различных молекулярных подтипов

Table 2. Summary table showing the number of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli isolated from 3.5 mL of peripheral blood of patients with different molecular subtypes of breast cancer

Пациентка Patient	Возраст, лет Age, years	TNM	G	ЭР, ПР, Ki-67, HER2 ER, PR, Ki-67, HER2	Количество циркулирующих опухолевых клеток Number of circulating tumor cells	Количество циркулирующих опухолевых микроэмболов Number of circulating tumor microemboli
1	50	T3N0M0	2	ЭР – 0, ПР – 0, Ki-67 – 70 %, HER2 – 3 ER – 0, PR – 0, Ki-67 – 70 %, HER2 – 3	20	1
2	54	T3N1M0	3	ЭР – 0, ПР – 0, Ki-67 – 90 %, HER2 – 1 ER – 0, PR – 0, Ki-67 – 90 %, HER2 – 1	6	0
3	43	T1cN1M0	1	ЭР – 7, ПР – 6, Ki-67 – 40 %, HER2 – 1 ER – 7, PR – 6, Ki-67 – 40 %, HER2 – 1	5	0
4	44	T2N1M0	2	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0	10	3
5	38	T1cN0M0	2	ЭР – 8, ПР – 4, Ki-67 – 20 %, HER2 – 2, FISH – отрицательный ER – 8, PR – 4, Ki-67 – 20 %, HER2 – 2, FISH – negative	9	0
6	35	T1N1M0	2	ЭР – 8, ПР – 3, Ki-67 – 70 %, HER2 – 2, FISH – отрицательный ER – 8, PR – 3, Ki-67 – 70 %, HER2 – 2, FISH – negative	10	3
7	60	T1cN3M0	2	ЭР – 6, ПР – 5, Ki-67 – 70 %, HER2 – 1 ER – 6, PR – 5, Ki-67 – 70 %, HER2 – 1	9	0
8	63	T2N0M0	2	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 50 %, HER2 – 3 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 50 %, HER2 – 3	2	0
9	51	T1cN0M0	2	ЭР – 8, ПР – 4, Ki-67 – 40 %, HER2 – 1 ER – 8, PR – 4, Ki-67 – 40 %, HER2 – 1	2	0
10	64	T4N2M0	3	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 60 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 60 %, HER2 – 0	4	0
11	66	T1cN1M0	2	ЭР – 7, ПР – 5, Ki-67 – 40 %, HER2 – 3 ER – 7, PR – 5, Ki-67 – 40 %, HER2 – 3	4	0
12	68	T2N1M0	2	ЭР – 8, ПР – 7, Ki-67 – 20 %, HER2 – 1 ER – 8, PR – 7, Ki-67 – 20 %, HER2 – 1	3	0
13	67	T1cN0M0	2	ЭР – 8, ПР – 5, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 5, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0	7	0
14	60	T2N0M0	2	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0	2	0
15	44	T3N1M0	2	ЭР – 8, ПР – 5, Ki-67 – 20 %, HER2 – 1 ER – 8, PR – 5, Ki-67 – 20 %, HER2 – 1	4	2
16	47	T4N0M0	2	ЭР – 8, ПР – 7, Ki-67 – 50 %, HER2 – 3 ER – 8, PR – 7, Ki-67 – 50 %, HER2 – 3	3	0
17	68	T2N0M0	1	ЭР – 8, ПР – 7, Ki-67 – 10 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 7, Ki-67 – 10 %, HER2 – 0	0	0
18	45	T1cN0M0	1	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 40 %, HER2 – 1 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 40 %, HER2 – 1	2	0
19	45	T1cN0M0	2	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0	5	1

Окончание таблицы 2
End of the table 2

Пациентка Patient	Возраст, лет Age, years	TNM	G	ЭР, ПР, Ki-67, HER2 ER, PR, Ki-67, HER2	Количество циркулирующих опухолевых клеток Number of circulating tumor cells	Количество циркулирующих опухолевых микроэмболов Number of circulating tumor microemboli
20	46	T3N0M0	1	ЭР – 8, ПР – 6, Ki-67 – 10 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 6, Ki-67 – 10 %, HER2 – 0	0	0
21	45	T3N0M0	2	ЭР – 0, ПР – 0, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0 ER – 0, PR – 0, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0	8	1
22	79	T1cN1M0	2	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 80 %, HER2 – 2, FISH – положительный ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 80 %, HER2 – 2, FISH – positive	6	2

Примечание. ЭР – рецепторы эстрогенов; ПР – рецепторы прогестерона.
Note. ER – estrogen receptors; PR – progesterone receptors.

Проведенная оценка зависимости количества ЦОК от степени дифференцировки опухоли показала у пациенток с высокодифференцированной опухолевой тканью как отсутствие ЦОК и ЦОМ в крови, так и их наличие. У всех больных с умеренно- и низкодифференцированной опухолью обнаружены ЦОК и представлены в широком диапазоне – от минимального до максимального количества.

У пациенток с метастазами в регионарных лимфатических узлах (N1–3) выявлены ЦОК в периферической крови, у больных со статусом N0 количество ЦОК составляло от 0 до 20.

Все пациентки с неблагоприятными прогностическими факторами (размер опухоли, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, гистологическая степень злокачественности, биологический подтип) получали лечение в неoadьювантном режиме (табл. 3). У пациенток с трижды негативным и HER2-сверхэкспрессирующим подтипами РМЖ отмечен выраженный и полный лечебный патоморфоз, сопровождающийся высокими показателями количества ЦОК (6–20 клеток). Люминальные подтипы РМЖ продемонстрировали умеренную степень патоморфоза и низкие значения ЦОК (3–4 клетки).

Пациентки с наличием злокачественного новообразования в анамнезе представлены в табл. 4. Данные таблицы свидетельствуют о высоком риске рецидива или прогрессирования заболевания у 2 больных РМЖ. Вывод сделан на основании высокого содержания ЦОК, выделенных из периферической крови этих больных.

Обсуждение

Диссеминация опухолевых клеток из первичной опухоли в кровотоки является критическим этапом

в опухолевом процессе РМЖ и считается предшественником отдаленных метастазов [14]. По данным литературы, наиболее широко используемое предельное значение количества ЦОК при метастатическом РМЖ составляет 5 ЦОК на 7,5 мл периферической крови [15].

Выполненное исследование выявило взаимосвязь между количеством ЦОК и молекулярно-биологическим подтипом опухоли. Проводимые клинические наблюдения показывают наиболее неблагоприятный результат по показателю общей и безрецидивной выживаемости при HER2-сверхэкспрессирующем и трижды негативном подтипах РМЖ [16]. В нашем исследовании все пациентки с такими подтипами имели высокое содержание ЦОК. При этом люминальный А РМЖ с благоприятным прогнозом продемонстрировал отсутствие опухолевых клеток в периферической крови.

Проведенная оценка зависимости количества ЦОК и ЦОМ от клинико-молекулярных показателей продемонстрировала отсутствие ЦОК у больных с люминальным А молекулярно-биологическим подтипом и высокой степенью дифференцировки опухолевой ткани. Минимальное число ЦОК, в нашем исследовании равно 2, отмечается у пациенток со степенью дифференцировки опухоли G₂ и отсутствием метастазирования в регионарные лимфатические узлы. Для средних и максимальных значений количества ЦОК в крови больных характерно неблагоприятное гистологическое строение опухоли, высокая степень пролиферативной активности.

Необходимо учитывать, что исследуемая группа не была равномерно распределена по анализируемым клиническим признакам. У ряда пациенток, включенных в исследование, имелись факторы, которые могут

Таблица 3. Некоторые диагностические показатели больных раком молочной железы, получавших неoadъювантную терапию
Table 3. Some diagnostic parameters of breast cancer patients receiving neoadjuvant therapy

Пациентка Patient	Возраст, лет Age, years	TNM	G	ЭР, ПР, Ki-67, HER2 ER, PR, Ki-67, HER2	Количество циркулирующих опухолевых клеток Number of circulating tumor cells	Количество циркулирующих опухолевых микроэмболов Number of circulating tumor microemboli	Неoadъювантное лечение Neoadjuvant treatment	Степень патоморфоза Grade of pathomorphosis
1	50	T2N3M0	2	ЭР – 0, ПР – 0, Ki-67 – 70 %, HER2 – 3 ER – 0, PR – 0, Ki-67 – 70 %, HER2 – 3	20	1	Трастузумаб + цисплатин Trastuzumab + cisplatin	III
15	44	T3N1M0	2	ЭР – 8, ПР – 5, Ki-67 – 20 %, HER2 – 1 ER – 8, PR – 5, Ki-67 – 20 %, HER2 – 1	4	2	Доксорубин + циклофосфамид Doxorubicin + cyclophosphamide	II. Метастаз в 1 лимфатическом узле подмышечной области II. Metastasis in 1 an axillary lymph node
16	47	T4N0M0	2	ЭР – 8, ПР – 7, Ki-67 – 50 %, HER2 – 3 ER – 8, PR – 7, Ki-67 – 50 %, HER2 – 3	3	0	Трастузумаб Trastuzumab	II
21	45	T3N0M0	2	ЭР – 0, ПР – 0, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0 ER – 0, PR – 0, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0	8	1	Доксорубин + циклофосфамид Doxorubicin + cyclophosphamide	IV

Примечание. ЭР – рецепторы эстрогенов; ПР – рецепторы прогестерона.
Note. ER – estrogen receptors; PR – progesterone receptors.

Таблица 4. Клинико-лабораторные данные пациенток со злокачественными новообразованиями в анамнезе
Table 4. Clinical and laboratory parameters of patients with a history of malignant tumors

Пациентка Patient	Возраст, лет Age, years	TNM	G	ЭР, ПР, Ki-67, HER2 ER, PR, Ki-67, HER2	Количество циркулирующих опухолевых клеток Number of circulating tumor cells	Количество циркулирующих опухолевых микроэмболов Number of circulating tumor microemboli	Злокачественные новообразования в анамнезе History of malignant tumors
5	38	T1cN0M0	2	ЭР – 8, ПР – 4, Ki-67 – 20 %, HER2 – 2, FISH – отрицательный ER – 8, PR – 4, Ki-67 – 20 %, HER2 – 2, FISH – negative	9	0	2011 г: злокачественное новообразование молочной железы IIa (T2N0M0) 2011: stage IIa breast cancer (T2N0M0)
13	67	T1cN0M0	2	ЭР – 8, ПР – 5, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 5, Ki-67 – 40 %, HER2 – 0	7	0	2015 г: злокачественное новообразование кожи лица T1N0M0 2011: skin cancer of the face (T1N0M0)
14	60	T2N0M0	2	ЭР – 8, ПР – 8, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0 ER – 8, PR – 8, Ki-67 – 90 %, HER2 – 0	2	0	2011 г: злокачественное новообразование молочной железы IIIa (T3N0M0) 2011: stage IIIa breast cancer (T3N0M0)

Примечание. ЭР – рецепторы эстрогенов; ПР – рецепторы прогестерона.
Note. ER – estrogen receptors; PR – progesterone receptors.

дополнительно влиять на количество ЦОК и их производных, такие как злокачественное новообразование в анамнезе ($n = 4$) или неoadъювантный режим лечения заболевания ($n = 4$).

В результате проведенного анализа невозможно выделить единый клинический критерий, который был бы полностью ассоциирован с содержанием ЦОК. Поэтому при оценке количества ЦОК в периферической крови необходимо учитывать основные клинические и молекулярные характеристики опухолевого процесса.

Выводы

Использование аптамера MDA-231 позволяет выявить ЦОК и их производные у больных РМЖ. Полученные результаты указывают на взаимосвязь между количеством ЦОК и молекулярно-биологическим подтипом, а также степенью дифференцировки опухолевой ткани. Проведенное исследование демонстрирует прогностическое значение содержания ЦОК для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии и развития рецидивов заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Breast. Source: Globocan 2020. World Health Organization. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>.
- Brody E.N., Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J Biotechnol* 2000;4(1):5–13. DOI: 10.1016/s1389-0352(99)00004-5.
- 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.
- Seo H.B., Gu M.B. Aptamer-based sandwich-type biosensors. *J Biol Eng* 2017;11:11. DOI: 10.1186/s13036-017-0054-7.
- Yang J., Mani S.A., Weinberg R.A. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 2006;66(9):4549–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3850.
- Russano M., Napolitano A., Ribelli G. et al. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *J Exp Clin Cancer Res* 020;39(1):95. DOI: 10.1186/s13046-020-01601-2.
- Banys-Paluchowski M., Reinhardt F., Fehm T. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: Clinical applications and future possibilities. *Appl Sci* 2020;10(9):3311. DOI: 10.3390/app10093311.
- Edge S.B., Byrd D.R., Compton C.C. et al. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
- Bloom H.J., Richardson W.W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957;11(3):359–77. DOI: 10.1038/bjc.1957.43.
- Elston C.W., Ellis I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5):403–10. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
- Hammond M.E., Hayes D.F., Dowsett M. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(16):2784–95. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6529. Erratum in: *J Clin Oncol* 2010;28(21):3543.
- Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N. et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(1):118–45. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.2775.
- Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S. et al. Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24(9):2206–23. DOI: 10.1093/annonc/mdt303.
- Janni W.J., Rack B., Terstappen L.W. et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22(10):2583–93. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1603.
- Cristofanilli M., Budd G.T., Ellis M.J. et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(8):781–91. DOI: 10.1056/NEJMoa040766.
- Parker J.S., Mullins M., Cheang M.C. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1160–7. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1370.

Вклад авторов

А.В. Зюзюкина: набор материала, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

М.О. Ватрушкина: обзор литературы;

Т.Н. Замай: написание текста рукописи, анализ полученных данных;

О.С. Коловская: определение количества циркулирующих опухолевых клеток методами флуоресцентной и сканирующей лазерной микроскопии;

Г.С. Замай: разработка метода выделения циркулирующих опухолевых клеток, выделение циркулирующих опухолевых клеток из периферической крови больных и их окрашивание аптамерами;

А.С. Кичкайло: микроскопия циркулирующих опухолевых клеток с использованием лазерной сканирующей микроскопии, написание текста рукописи, анализ полученных данных;

Р.А. Зуков: разработка дизайна исследования, коррекция/написание текста рукописи.

Authors' contributions

A.V. Zyuzukina: performing data collection and analysis, writing the article;
M.O. Vatrushkina: reviewing the literature;
T.N. Zamay: writing the article, performing data analysis;
O.S. Kolovskaya: measuring the number of circulating tumor cells using fluorescence microscopy and scanning laser microscopy;
G.S. Zamay: developing the method of circulating tumor cell isolation, isolated circulating tumor cells from peripheral blood of patients and performing their staining with aptamers;
A.S. Kichkaylo: performing scanning laser microscopy of circulating tumor cells, writing the article, performing data analysis;
R.A. Zukov: developing the study design, writing and editing the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.B. Зюзюкина / A.V. Zyuzukina: <https://orcid.org/0000-0002-6758-4800>
M.O. Ватрушкина / M.O. Vatrushkina: <https://orcid.org/0000-0002-2318-6296>
Т.Н. Замай / T.N. Zamay: <https://orcid.org/0000-0002-7493-8742>
O.C. Коловская / O.S. Kolovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-2494-2313>
A.C. Кичкайло / A.S. Kichkaylo: <https://orcid.org/0000-0003-0690-7837>
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 выполнено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского» № 6 от 22 марта 2016 г. Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
The study protocol was approved by the local Ethics Committee of A.I. Kryzhanovskiy Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Dispensary (protocol No. 6 dated 22.03.2016). All patients gave written informed consent to participate in the study.