

УДК 616-006

*Д. А. Зубцов¹, Ж. И. Зубцова¹, А. В. Лавров², Е. В. Легченко¹,
В. А. Аладинский¹, А. В. Потеряхина¹, Д. В. Гольдштейн²*

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Медико-генетический научный центр РАМН

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) при раке молочной железы: прогностическая значимость и методы выделения

Существуют различные методы обнаружения циркулирующих опухолевых клеток в крови больных. Проведен анализ литературы, дана оценка преимуществ каждой из применяемых технологий. Основным показателем оценки являлись чувствительность и специфичность метода определения ЦОК. Для изучения оценки прогностической значимости определения опухолевых клеток в крови пациентов были изучены научные работы в базах Pubmed и eLibrary, а также работы из списков цитирования ключевых обзорных статей по данной теме.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, диссеминированные опухолевые клетки, рак молочной железы, прогноз заболевания, диагноз, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Введение

Стандартный запрос «breast cancer» в PubMed, сделанный в феврале 2012 года, выдает 239 908 работ, посвященных раку груди, при этом в 1717 из них авторы проводят изучение циркулирующих опухолевых клеток при онкологическом заболевании молочной железы. С начала 2003 года количество публикаций об исследовании опухолевых клеток при раке груди увеличилось с 5% до 20% от общего числа ежегодно публикуемых работ, посвященных онкологическим заболеваниям молочной железы. По статистике в США каждой восьмой случай онкологического заболевания является раком груди, в РФ — каждый пятый. У женщин рак молочной железы занимает 1 место среди других видов рака. Так, в 2011 году было отмечено 226 870 пациенток с данным диагнозом из 790 740 онкологических случаев у женщин (29%) в США. На втором месте — рак легких, 109 690 случаев. В Москве и Московской области встречаемость рака молочной железы крайне высока и достигает до 64 случаев на 100 000 населения. Несмотря на развитые программы скрининга и высокую информированность женщин о раке молочной железы, до сих пор распространён диагноз при первично выявленном раке «рак молочной железы III-IV стадии». К примеру, в США из 226 870 случаев рака молочной железы 39 510 (17,4%) закончились летальным исходом в 2011 [1]. Таким образом, сохраняет актуальность проблема ранней диагностики первичного рака и его рецидивов, а также подбора эффективной терапии рака молочной железы. При этом прогноз заболевания во многом определяется активностью метастатической болезни [2,3].

1. Материалы и методы

В марте 2012 года в базах данных PubMed и eLibrary был проведен систематический поиск публикаций на английском и русском языках без ограничения даты публикации. В качестве поискового запроса использовали такие ключевые слова, как «Circulating tumor cells», «CTCs», «breast cancer», «Циркулирующие опухолевые клетки», «ЦОК», «рак молочной железы». Для обнаружения потенциально значимых публикаций рассматривали все списки цитируемой литературы во всех найденных работах, включая обзорные статьи. Провели поиск исследований и в случае потенциально значимых работ изучили статьи целиком, после чего извлекли следующие данные из всех исследований: год публикации, фамилии авторов, количество случаев и контролей и методы оценки ЦОК.

2. Циркулирующие и диссеминированные опухолевые клетки (ЦОК и ДОК)

Впервые ЦОК были обнаружены и задокументированы австрийским патологоанатомом Т.Р. Ашвортом (Ashworth) полтора века назад [4]. Однако циркулирующие опухолевые клетки до сих пор не имеют общепризнанного точного определения. В настоящее время принято считать, что ЦОК представляют собой популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло. Следует подчеркнуть, что ЦОК являются гетерогенной популяцией клеток. Поэтому в зависимости от применяемых для их поиска и анализа маркеров могут наблюдаться значительные колебания в их количестве при определении на одних и тех же стадиях развития опухоли. Особый интерес среди ЦОК вызывают так называемые стволовые опухолевые клетки и клетки, прошедшие эпителио-мезенхимную трансформацию (ЭМТ). Предполагается, что именно эти клетки являются основой для развития метастазов при переносе ЦОК с током крови в отдаленные органы, а обнаружение ЦОК и ДОК напрямую связано с прогнозированием протекания болезни [5–10]. Не исключено, что для развития метастазов важно сочетание маркеров стволовых опухолевых клеток и ЭМТ в одних и тех же клетках. Разница между циркулирующими и диссеминированными опухолевыми клетками лишь в том, что первые обнаруживаются в кровотоке, а вторые — в костном мозге, но и те, и другие не обнаруживаются традиционными методами. Время жизни ЦОК в кровотоке составляет 1–2 суток, поэтому они представляют собой динамично изменяющийся маркер активности диссеминации опухоли. Число выявляемых в крови ЦОК зависит от используемых для их определения маркеров (прежде всего, поверхностных антигенов) и может варьировать от 2 до нескольких тысяч на 7–10 мл крови [11, 12]. Отсутствие уникальных маркеров ЦОК и единой номенклатуры их определения приводит к разнообразию устанавливаемых норм, в том числе при некоторых методах выявления ЦОК возможно их обнаружение в образцах крови от здоровых людей.

3. Методы оценки количества ЦОК

Для начала нужно разобраться, каким образом выделяют ЦОК, что их отличает от обычных клеток крови. Во-первых, опухолевые клетки можно выделить по морфологическим признакам. Авторы статьи [13] показали, что ЦОК несколько больше, чем обычные клетки крови. Позже было обнаружено, что ЦОК экспрессируют эпителиальные молекулы клеточной адгезии на своей поверхности (ЕрСАМ) [14, 15]. ЕрСАМ является специфичным для опухолевых клеток, поэтому исследователи чаще всего используют именно его для выявления ЦОК. В других исследованиях было показано, что цитокератины (СК) являются специфическими маркерами эпителиальных раковых клеток в костном мозге. В одних работах [5, 16, 17] авторы предположили, а позже и показали, что в крови цитокератины могут быть специфическими маркерами ЦОК. В других исследованиях [6, 8] была проведена оценка влияния цитокин-положительных микрометастазов в костном мозге на прогноз протекания заболевания у женщин с раком молочной железы. При обследовании 552 женщин, больных раком молочной железы, у 36% из них в костном мозге были обнаружены цитокин-положительные опухолевые клетки. В контрольной группе больных доброкачественными опухолями лишь у 2 из 191 обследованных женщин были выявлены соответствующие клетки. Одна из пациенток наблюдалась с хроническим доброкачественным воспалением груди, а другая — с доброкачественной кистаденомой яичника [8]. И в этой работе, и в некоторых других [7, 16, 17] авторы установили, что наличие клеток, экспрессирующих цитокератин 19 (СК-19), является неблагоприятным фактором при прогнозировании исхода лечения рака.

Известно, что для диагностики онкологических заболеваний могут быть использованы менее специфичные маркеры, например, белки, такие как человеческий эпителиальный фактор роста 2 (Her2/neu), альфа-фетопротейн (α -Fetoprotein), карциноэмбриональный антиген (СЕА) и др. При раке молочной железы в качестве маркера ЦОК в крови может выступать эпителиальный муцин (MUC1 и MUC2) или маммоглобин [16, 18–26].

Для оценки количества ЦОК можно подобрать антитела, специфичные к маркерам

опухолевых клеток, и с их помощью создать систему для обнаружения ЦОК в крови. Некоторые разработанные технологии для количественного определения требуют выделения ЦОК из образцов. К невыделяющим методам относятся все иммунофлуоресцентные методы (оптические методы), в которых флуоресцентно-меченные антитела против одного из описанных выше маркеров взаимодействуют с ЦОК, которые теперь становятся определяемыми среди остальных клеток крови [24, 27–30].

Рассмотрим технологии, которые наиболее популярны в настоящее время. Технология автоматической цифровой микроскопии (ADM) позволяет оптическим методом оценивать количество ЦОК в образце. Процесс занимает достаточно много времени при сканировании больших по площади цитологических препаратов, поэтому технологию усовершенствовали и разработали массивное оптоволоконное сканирование (FAST). Новый подход позволяет просканировать за то же время в 500 раз большую площадь по сравнению с технологией ADM без потери чувствительности. Использование FAST и ADM совместно помогает выявить очень редкие эпителиальные клетки из всего образца крови после предварительной обработки флуоресцентно-мечеными антителами к цитокератинам [23, 27]. Другой метод обнаружения циркулирующих эпителиальных раковых клеток из необработанной крови под названием MAINTRAC заключается в использовании сканирующей лазерной цитометрии образцов крови, прошедших процедуру окрашивания антителами против клеток, экспрессирующих эпителиальные молекулы клеточной адгезии (ЕpСAM), и против лейкоцитов (CD45-аллофикиоциан) [31].

Многие исследователи при определении ЦОК в крови пациентов с раком молочной железы использовали систему CellSearch компании Veridex [32]. Данная технология прошла одобрение Управления по контролю за продуктами питания и медицинскими изделиями США (Food and Drug Administration, FDA, USA) для выявления уровней ЦОК у пациентов с метастазами. Система является полуавтоматической и в ее основе лежат методы иммунофлуоресценции, иммуномагнитного разделения и проточной цитометрии [33]. Однако для клинического использования система до сих пор не получила одобрения. При использовании данной технологии образец крови помещается в системный комплекс, где обогащается магнитными частицами, покрытыми антителами против эпителиальных молекул клеточной адгезии (ЕpСAM), и флуоресцентной меткой, например зеленого цвета. Затем происходит обработка флуоресцентно-мечеными антителами против лейкоцитов (CD45-аллофикиоциан), например, красного цвета. В результате реакции опухолевые клетки взаимодействуют с антителами с магнитными частицами и зеленой меткой, а лейкоциты взаимодействуют с антителами против них и красной меткой. Далее, под воздействием магнитного поля, опухолевые клетки прижимаются к поверхности, и автоматический сканер (на двух длинах волн) считывает количество клеток, автоматически проверяя, не является ли данная клетка лейкоцитом. Таким образом, система позволяет не только отделить лейкоциты от раковых эпителиальных клеток, но и подсчитать последние. Предел чувствительности данного прибора составил 5 и более ЦОК на 7,5 мл крови [32, 34–37]. Подобный CellSearch принцип работы реализован в еще одной системе под названием Ariol [38].

Достаточно новая и перспективная технология STC-chip, основанная на микропроточной системе, позволяет специфично количественно определить наличие ЦОК в образце крови при помощи связывания клеток с антителами против ЕpСAM, которыми покрыты ячейки чипа. Через чип прокачивается поток крови в строго определенных условиях ламинарного течения. Чувствительность метода высокая (99%), и технология позволяет проводить анализ достаточно малых объемов крови (2–3 мл) [14].

Методы выделения ЦОК можно разделить на две категории. В первую категорию входят технологии разделения по морфологическим признакам, например по размеру при помощи микрофильтров [13, 39, 40, 42]. Чувствительность данного метода позволяет выделить более 1 эпителиальной клетки на один миллилитр крови. В настоящее время технология совершенствуется в сторону получения недеформированных клеток, поскольку часто при выделении клетки деформируются и разрушаются [13, 39]. Метод разделения по градиенту

плотности при помощи центрифугирования (Ficoll-Нураque GE Healthcare) и последующего выделения технологией OncoQuick также позволяет получить ЦОК, но образующиеся клеточные фракции не обладают достаточной степенью чистоты, поэтому разработка данного метода продолжается [40–42].

В другую категорию выделения ЦОК входят иммуномагнитные методы, в которых опухолевые клетки взаимодействуют с антителами против маркеров ЦОК с конъюгированными магнитными частицами, после чего раковые клетки можно извлечь при помощи магнитного поля. На одном из таких методов основана работа систем MACS, RosseteSep, OncoQuick+ [36, 43–45]. Однако следует отметить, что фирма AdnaGen разработала более совершенную систему, в которой ЦОК подвергают воздействию антител с магнитными метками против и эпителиальных, и опухолево-специфических маркеров [46]. AdnaGen производит наборы для диагностики рака молочной железы, простаты, кишечника. Совершенство выделения оценивалось в дополнительных исследованиях.

После выделения из образца ЦОК проводят дополнительные исследования для подтверждения злокачественной природы и типа выделенных клеток [47, 48]. Дело в том, что несмотря на высокую специфичность антител, в кровотоке в норме могут быть обнаружены неопухолевые клетки, экспрессирующие анализируемые опухолевые антигены, что может привести к ложноположительному результату. Таким образом, мы можем только с некоторой вероятностью, которая зависит от конкретных антител, говорить о том, что выделенные клетки — ЦОК.

4. Анализ уровня экспрессии генов в ЦОК

Наиболее распространённым методом исследований ЦОК является анализ экспрессии генов [47, 49–51]. После выделения ЦОК разрушают, извлекают мРНК, после обратной транскрипции получают кДНК. Далее, подобрав праймеры для исследуемых генов, амплифицируют нужные кодирующие участки при помощи полимеразной цепной реакции. Таким образом, можно определить, экспрессируются ли выбранные гены в ЦОК или нет.

Выбор анализируемых генов крайне важен, так как наличие экспрессии тех или иных генов может также показать принадлежность полученной кДНК ЦОКам, то есть позволяет добавить дополнительную проверку правильности выделения опухолевых клеток. Чаще всего эти гены подбираются на основе таких предположений, как, если есть экспрессия данного гена в опухоли, то он также экспрессируется в ЦОК. Многие опухоль-специфические гены хорошо изучены и могут быть маркерами ЦОК, определение же уровня экспрессии других генов, характер экспрессии которых ещё недостаточно изучен в ткани опухоли, может привести к ошибочным результатам [52–57]. Тем не менее анализ экспрессии генов в ЦОК важен, и в некоторых случаях даже позволяет не только устанавливать наличие раковых клеток в крови, но и определять локализацию опухоли — источника ЦОК.

Рассмотрим гены-кандидаты, которые чаще всего используют при анализе экспрессии генов, характерных для ЦОК при раке молочной железы. В первую очередь среди анализируемых генов должны быть гены, связанные с поверхностными маркерами, по которым выделяют ЦОК. Ген *GA733-2* экспрессирует EpCAM, таким образом, определение экспрессии данного гена обосновано при определении ЦОК [15, 58]. Было показано, что среди цитокератиновых рецепторов наиболее часто встречается СК-19, который экспрессируется соответствующим геном *СК-19*. Другие цитокератиновые гены *СК-7*, *СК-20* и т.д. реже экспрессируют, и поэтому их не используют для анализа ЦОК [15, 17, 59].

Также используют анализ экспрессии менее специфичных для ЦОК генов. Среди них ген человеческого эпителиального фактора роста 2 (*Her2/neu*), ген альфа-фетопротейна (α -*Fetoprotein*), ген карциноэмбрионального антигена (*CEA*), ген эпителиального муцина (*MUC1* и *MUC2*), ген маммоглобина (*hMAM*) и другие. При раке молочной железы выбирают более специфичные маркеры именно для этой локализации. Среди них ген эпидермального фактора роста (*EGFR*), совместно с геном *Her2/neu*, ген альдегид дегидрогеназы (*ALDH1*), ген-супрессор, ответственный за развитие рака молочной железы *BRCA1*, и

ген маммоглобина [15, 16, 22, 32, 60–62]. Кроме того, для определения клеток с признаками эпителиально-мезенхимной трансформации, характерной для многих опухолевых клеток, мигрировавших из опухоли в кровотоки, список дополняют генами регуляции транскрипции *TWIST1* и *PI3Ka*. В качестве контрольного гена используют гены «домашнего хозяйства», например, гены актина (*Actin1*), гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы *HPRT*, глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа *GAPDH*.

Такое большое разнообразие генов необходимо для того, чтобы увеличить вероятность обнаружения ЦОК, увеличить чувствительность и специфичность анализа в целом. Учитывая гетерогенность фракции ЦОК, выделяемых с помощью иммунно-опосредованной сортировки, анализируемые гены могут быть экспрессированы в них в различных комбинациях. Обычно панель генов подбирается таким образом, что даже экспрессия одного из анализируемых генов признается положительным маркером правильно выделенных ЦОК. Например, при выделении ЦОК с помощью магнитных частиц и дальнейшем анализе экспрессии, показали что *hMAM* экспрессируется только в 9,5% случаев, [19], *CK-19* — 40,8%, а *Her2/neu* — 39,8% [5] и т.д.

5. Заключение

Большое разнообразие методов выявления и выделения циркулирующих опухолевых клеток явно указывает на интерес, который проявляют исследователи к ЦОК, и это не случайно. Дело в том, что, несмотря на всё разнообразие методов, результаты, получаемые при обследовании пациентов и прогнозировании клинической картины, всегда остаются теми же самыми: наличие ЦОК или ДОК всегда связано с негативным прогнозом по выживаемости. Наиболее перспективными технологиями выделения ЦОК являются иммуномагнитные методы, т.к. они позволяют проводить дальнейшие исследования клеток. Оценка уровня экспрессии нескольких генов увеличивает специфичность и чувствительность методов анализа.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», ГК № 16.512.11.2041.

Литература

1. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer Statistics // Cancer J. — 2012. — P. 10–29.
2. Осинский С. П., Глузман Д. Ф. Диссеминированные опухолевые клетки в крови и костном мозге (Молекулярный прогноз в клинической онкологии) // Онкология. — 2006. — Т. 8 — С. 102–108.
3. Красильников С. Э., Сидоров С. В., Гуляева Л. Ф. Сравнительный анализ экспрессии генов ER α и ароматазы в опухолевых тканях молочной железы и эндометрия // Сибирский онкологический журнал. — 2007. — Т. 4 — С. 89–95.
4. Ashworth T. R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death // Aust. Med. J. — 1869. — V. 14. — P. 146–149.
5. Ignatiadis M., Xenidis N., Perraki M., Apostolaki S., Politaki E., Kafousi M., Stathopoulos E. Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. — 2007. — V. 25, N 16. — P. 5194–5202.
6. Stathopoulou A., Vlachonikolis I., Mavroudis D., Perraki M., Kouroussis C., Apostolaki S., Malamos N. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. — 2002. — V. 20, N 16. — P. 3404–3412.
7. Xenidis N., Perraki M., Kafousi M., Apostolaki S., Bolonaki I., Stathopoulou A., Kalbakis K. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients // Journal of clinical

- oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. — 2006. — V. 24, N 23. — P. 3756–3762.
8. *Braun S., Pantel K., Muller P., Janni W., Hepp F., Kantenich C.* Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer // *New England journal of medicine.* — 2000. — V. 343, N 4. — P. 525–533.
 9. *Braun S., Vogl F., Naume B., Janni W., Osborne M., Coombes R., Schlimok G.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer // *New England journal of medicine.* — 2005. — V. 353, N 8. — P. 793–802.
 10. *Diel I., Kaufmann M., Costa S., Minckwitz G., Solomayer E., Kaul S., Bastert G.* Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Comparison With Nodal Status // *Journal of the National Cancer Institute.* — 1996. — V. 88, N 22. — P. 1652–1658.
 11. *Pierga J., Bonneton C., Vincent-Salomon A., de Cremoux P., Nos C., Blin N., Pouillart P.* Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* — 2004. — V. 10, N 4. — P. 1392–1400.
 12. *Pantel K., Muller V., Auer M., Nusser N., Harbeck N., Braun S.* Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer // *Clinical cancer research.* — 2003. — V. 9, N 17. — P. 6326–6334.
 13. *Vona G., Sabile A., Louha M., Sitruk V., Romana S., Schutze K., Capron F.* Isolation by size of epithelial tumor cells?: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells // *The American journal of pathology.* — 2000. — V. 156, N 1. — P. 57–63.
 14. *Nagrath S., Sequist L., Maheswaran S., Bell D., Irimia D., Utkus L., Smith M.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology // *Nature.* — 2007. — V. 450, N 7173. — P. 1235–1239.
 15. *Tveito S., Andersen K., Karesen R., Fodstad O.* Analysis of EpCAM positive cells isolated from sentinel lymph nodes of breast cancer patients identifies subpopulations of cells with distinct transcription profiles // *Breast cancer research.* — 2008. — V. 13, N 4. — P. 75.
 16. *Ignatiadis M., Kallergi G., Ntoulia M., Perraki M., Apostolaki S., Kafousi M., Chlouverakis G.* Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* — 2008. — V. 14, N 9. — P. 2593–2600.
 17. *Xenidis N., Ignatiadis M., Apostolaki S., Perraki M., Kalbakis K., Agelaki S., Stathopoulos E.* Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* — 2009. — V. 27, N 13. — P. 2177–2184.
 18. *Mikhitarian K., Martin R., Ruppel M., Gillanders W., Hoda R., Schutte D., Callahan K.* Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study // *BMC cancer.* — 2008. — V. 8. — P. 55.
 19. *Ferro P., Franceschini M., Bacigalupo B., Dessanti P., Falco E., Fontana V., Gianquinto D.* Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors // *Anticancer research.* — 2010. — V. 30, N 6. — P. 2377–2382.
 20. *Suchy B., Austrup F., Driesel G., Eder C., Kusiak I., Uciechowski P., Grill H.* Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients // *Cancer letters.* — 2000. — V. 158, N 2. — P. 171–178.
 21. *Watson M. A., Fleming T. P., Flemine T. P.* Mammaglobin, a Mammary-specific Member of the Uteroglobulin Gene Family, Is Overexpressed in Human Breast Cancer Mammaglobin, a Mammary-specific Member of the Uteroglobulin Gene Family «Is Overexpressed in Human Breast Cancer» // *Cancer Research.* — 1996. — P. 860–865.
 22. *Ge Y., Domschke C., Stoiber N., Schott S., Heil J., Rom J., Blumenstein M.* Detronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome // *Cancer immunology, immunotherapy.* — 2011.
 23. *Krivacic R., Ladanyi A., Curry D., Hsieh H., Kuhn P., Bergsrud D., Kepros J.* A rare-cell detector for cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 2004. — V. 101, N 29. — P. 10501–10504.

24. *Thurm H., Ebel S., Kentenich C., Hemsen A., Riethdorf S., Coith C., Wallwiener D.* Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* — 2003. — V. 9, N 7. — P. 2598–2604.
25. *Braun S., Hepp F., Sommer H., Pantel K.* Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease // *Int. journal of cancer.* — 1999. — V. 84, N 1. — P. 1–5.
26. *Sleijfer S., Gratama J., Siewerts A., Kraan J., Martens J., Foekens J.* Circulating tumour cell detection on its way to routine diagnostic implementation? // *European journal of cancer (Oxford, England: 1990).* — 2007. — V. 43, N 18. — P. 2645–2650.
27. *Ntourophi T., Ashraf S., McGregor S., Turney B., Seppo A., Kim Y., Wang X.* Detection of circulating tumour cells in peripheral blood with an automated scanning fluorescence microscope // *British journal of cancer.* — 2008. — V. 99, N 5. — P. 789–795.
28. *Fehm T., Krawczyk N., Solomayer E., Becker-Pergola G., Durr-Storzer S., Neubauer H., Seeger H.* ER α -status of disseminated tumour cells in bone marrow of primary breast cancer patients // *Breast cancer research.* — 2008. — V. 10, N 5. — P. 76.
29. *Theodoropoulos P., Polioudaki H., Agelaki S., Kallergi G., Saridaki Z., Mavroudis D., Georgoulas V.* Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer // *Cancer letters.* — 2010. — V. 288, N 1. — P. 99–106.
30. *Patel A., Allen J., Dicker D., Peters K., Jonas M., Glantz M., El-deiry W.* Identification and enumeration of circulating tumor cells in the cerebrospinal fluid of breast cancer patients with central nervous system metastases // *Current.* — 2011. — P. 1–9.
31. *Camara O., Jorke C., Hammer U., Egbe A., Rabenstein C., Runnebaum I., Hoeffken K.* Monitoring circulating epithelial tumour cells (CETC) to gauge therapy: in patients with disease progression after trastuzumab persisting CETC can be eliminated by combined lapatinib treatment // *Journal of cancer research and clinical oncology.* — 2009. — V. 135, N 4. — P. 643–647.
32. *Andreopoulou E., Yang L.-Y., Rangel K., Reuben J., Hsu L., Krishnamurthy S., Valero V.* Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/DetectTM versus Veridex CellSearchTM system // *Int. journal of cancer.* — 2012. — V. 130, N 7. — P. 1590–1597.
33. *Kagan M., Howard D., Bendele T., Mayes J., Silvia J., Repollet M., Doyle J.* A Sample Preparation and Analysis System for Identification of Circulating Tumor Cells // *Journal of Clinical Ligand Assay.* — 2002. — V. 25, N 1. — P. 104–110.
34. *Bauer K., de la Torre-Bueno J., Diel I., Hawes D., Decker W., Priddy C., Bossy B.* Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* — 2000. — V. 6, N 9. — P. 3552–3559.
35. *Kraeft S., Sutherland R., Gravelin L., Hu G., Ferland L., Richardson P., Elias A.* Detection and analysis of cancer cells in blood and bone marrow using a rare event imaging system // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* — 2000. — V. 6, N 2. — P. 434–442.
36. *Negin B., Cohen S.* Circulating tumor cells in colorectal cancer: past, present, and future challenges // *Current treatment options in oncology.* — 2010. — V. 11, N 1–2. — P. 1–13.
37. *Van der Auwera I., Peeters D., Benoy I., Elst H., Van Laere S., Prove A., Maes H.* Circulating tumour cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer // *British journal of cancer.* — 2010. — V. 102, N 2. — P. 276–284.
38. *Deng G., Herrler M., Burgess D., Manna E., Krag D., Burke J.* Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients // *Breast cancer res.* — 2008. — V. 10, N 4. — P. 69.
39. *Tan S., Yobas L., Lee G., Ong C., Lim C.* Microdevice for the isolation and enumeration of cancer cells from blood // *Biomedical microdevices.* — 2009. — V. 11, N 4. — P. 883–892.
40. *Gertler R., Rosenberg R., Fuehrer K., Dahm M., Nekarda H., Siewert J.* Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation // *Recent results in cancer*

- research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer. — 2003. — V. 162. — P. 149–155.
41. *Busch R., Cesar D., Higuera-Alhino D., Gee T., Hellerstein M., McCune J.* Isolation of peripheral blood CD4(+) T cells using RosetteSep and MACS for studies of DNA turnover by deuterium labeling // *J. of immunological methods.* — 2004. — V. 286, N 1–2. — P. 97–109.
 42. *Hayes G., Busch R., Voogt J., Siah I., Gee T., Hellerstein M., Chiorazzi N.* Isolation of malignant B cells from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) for analysis of cell proliferation: validation of a simplified method suitable for multi-center clinical studies // *Leukemia research.* — 2010. — V. 34, N 6. — P. 809–815.
 43. *Cohen S., Punt C., Iannotti N., Saidman B., Sabbath K., Gabrail N., Picus J.* Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* — 2008. — V. 26, N 19. — P. 3213–3221.
 44. *Nezos A., Pissimisis N., Lembessis P., Sourla A., Dimopoulos P., Dimopoulos T., Tzelepis K.* Detection of circulating tumor cells in bladder cancer patients // *Cancer treatment reviews.* — 2009. — V. 35, N 3. — P. 272–279.
 45. *Tewes M., Aktas B., Welt A., Mueller S., Hauch S., Kimmig R., Kasimir-Bauer S.* Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. // *Breast cancer research and treatment.* — 2009. — V. 115, N 3. — P. 581–590.
 46. *Cristofanilli M.* The biological information obtainable from circulating tumor cells // *Breast (Edinburgh, Scotland).* — 2009. — V. 18, N 3. — P. 38–40.
 47. *Sun Y.-F., Yang X.-R., Zhou J., Qiu S.-J., Fan J., Xu Y.* Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance // *Journal of cancer research and clinical oncology.* — 2011. — P. 1151–1173.
 48. *Hayashi N., Yamauchi H.* Role of circulating tumor cells and disseminated tumor cells in primary breast cancer // *Breast cancer (Tokyo, Japan).* — 2011. — P. 1–5.
 49. *Aktas B., Tewes M., Fehm T., Hauch S., Kimmig R., Kasimir-Bauer S.* Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients // *Breast cancer res.* — 2009. — V. 11, N 4. — P. 46.
 50. *Schmitt M., Foekens J.* Circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients assessed by a novel RT-PCR test kit and comparison with status of bone marrow-disseminated tumor cells // *Breast cancer research.* — 2009.— V. 11, N 5. —P. 109.
 51. *Fehm T., Hoffmann O., Aktas B., Becker S., Solomayer E., Wallwiener D., Kimmig R.* Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells // *Breast cancer res.* — 2009. — V. 11, N 4. — P. 59.
 52. *Lacroix M.* Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells // *Endocrine-related cancer.* — 2006. — V. 13, N 4. — P. 1033–1067.
 53. *Pantel K., Cote R., Fodstad O.* Detection and clinical importance of micrometastatic disease // *Journal of the National Cancer Institute.* — 1999. — V. 91, N 13. — P. 1113–1124.
 54. *Ring A., Smith I., Dowsett M.* Reviews Circulating tumour cells in breast cancer // *Lancet Oncology.* — 2004.— V. 5, N 2. — P. 79–88.
 55. *Jung R., Kruger W., Hosch S., Holweg M., Kroger N., Gutensohn K., Wagener C.* Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro // *British journal of cancer.* — 1998. — V. 78, N 9. — P. 1194–1198.
 56. *Zippelius A., Kufer P., Honold G., Kollermann M. W., Oberneder R., Schlimok G., Riethmuller G.* Limitations of reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses for detection of micrometastatic epithelial cancer cells in bone marrow // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* — 1997. — V. 15, N 7. — P. 2701–2708.
 57. *Kowalewska M., Chechlinska M., Markowicz S., Kober P., Nowak R.* The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes // *European journal of cancer (Oxford, England).* — 2006. — V. 42, N 16. — P. 2671–2674.

58. *Fehm T., Muller V., Alix-Panabieres C., Pantel K.* Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance // *Breast cancer res.* — 2008. — V. 10, N 1. — P. 1.
59. *Daskalaki A., Agelaki S., Perraki M., Apostolaki S., Xenidis N., Stathopoulos E., Kontopodis E.* Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer // *British journal of cancer.* — 2009. — V. 101, N 4. — P. 589–597.
60. *Fehm T., Muller V., Aktas B., Janni W., Schneeweiss A., Stickeler E., Lattrich C.* HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial // *Breast cancer res. and treatment.* — 2010. — V. 124, N 2. — P. 403–412.
61. *Hayashi N., Nakamura S., Tokuda Y., Shimoda Y., Yagata H., Yoshida A., Ota H.* Prognostic value of HER2-positive circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer // *Int. journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology.* — 2011.
62. *Marques A., Teixeira E., Diamond J., Correia H., Santos S., Neto L., Ribeiro M.* Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence // *Breast cancer res. and treatment.* — 2009. — V. 114, N 2. — P. 223–232.

Поступила в редакцию 10.05.2012.