

В.К. Лядов, М.А. Скрыпникова, О.П. Попова

ВЫДЕЛЕНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ «ИЗОЛЯЦИИ ПО РАЗМЕРУ» (ISET)

ФГБУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России, Москва

Имеются сведения о важном значении циркулирующих в кровотоке клеток опухоли как фактора неблагоприятного прогноза онкологических заболеваний. Оптимальный метод выделения и изучения этих клеток не определен. Наиболее распространенные методики основаны либо на выделении опухолевого генетического материала из крови, либо на иммунно-опосредованной изоляции эпителиальных опухолевых клеток. Для первой группы методов характерна недостаточная специфичность, в то время как последние не позволяют выявить пул клеток, претерпевших в кровотоке эпителиально-мезенхимальную трансформацию. Представлен обзор результатов клинических исследований новой методики выделения опухолевых клеток из кровотока, основанной на фильтрации крови пациентов через мембрану с заданными размерами пор (ISET—Isolation by SizE of Tumor cells).

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, изоляция по размеру

Несомненные достижения онкологии за последние десятилетия, тем не менее, не привели к существенному снижению смертности от многих злокачественных новообразований как в мире, так и в нашей стране [1,22]. Одной из причин низкой эффективности современного противоопухолевого лечения является недостаток данных о процессе метастазирования, имеющем ключевое значение для выживаемости пациентов. Развитие клеточных технологий в последнее десятилетие позволило сформировать фундаментальное представление о циркулирующих в кровотоке опухолевых клетках (ЦОК) как о факторе, опосредующем распространение опухоли и, вследствие этого, определяющего выживаемость больных [10].

ЦОК представляют собой гетерогенную популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло. По последним данным, ЦОК могут включать фракцию стволовых опухолевых клеток, а также претерпевать фенотипические изменения, известные как эпителиально-мезенхимальная трансформация, которые позволяют им распространяться к месту формирования метастазов, будучи нечувствительными

к воздействию обычных цитостатических агентов [19].

В ряде работ показано, что ЦОК могут обнаруживаться при ранних стадиях болезни, в том числе до ее клинических и рентгенологических проявлений [9,21]. По мере развития опухоли число ЦОК возрастает и достигает пика в терминальной фазе заболевания. Показано, что динамика количества ЦОК в ходе лечения коррелирует с эффективностью терапии распространенного рака молочной железы, простаты, толстой кишки [3,4,5].

В то же время, изучение феномена ЦОК затруднено разнообразием и недостаточной эффективностью применяемых методик, поскольку речь идет о выявлении единичных клеток в среде, насчитывающей миллиарды обычных клеток крови. Наиболее распространенные на сегодняшний день иммунные и молекулярно-генетические методики выявления и анализа ЦОК высокочувствительны, однако, недостаточно специфичны и не позволяют изучать морфологические особенности ЦОК [2,8]. В связи с этим в последние годы в мире внедряется основанная на вакуумной фильтрации технология выделения ЦОК по размеру (ISET), которая характеризуется как исключительно высокой чувствительностью, так и достаточной для оценки морфологии клеток специфичностью [11]. В данном обзоре обобщены результаты исследований, посвященных экспериментальным и клиническим аспектам применения технологии ISET для выделения и характеристики ЦОК.

Технические аспекты и особенности методики ISET

Впервые методика выделения, а также дальнейшей иммуноморфологической и молекулярно-генетической характеристики циркулирующих опухолевых клеток ISET была описана коллективом авторов под руководством проф. P.Paterlini-Bréchet [23]. Ниже приводится описание данной методики с незначительными модификациями, внесенными позднее ее авторами [11].

Для анализа используется кровь пациентов либо лабораторных животных в количестве от 1 до 10 мл. Кровь транспортируется в лаборато-

рию в пробирках с ЭДТА, после чего разводится патентованным буферным раствором в пропорции 1:10. Раствор, содержащий сапонин, параформальдегид, ЭДТА и бычий сывороточный альбумин, необходим для лизиса эритроцитов. Разведенная буферным раствором кровь выдерживается при комнатной температуре в течение 10 мин., после чего фильтруется через одноразовый пластиковый фильтрационный модуль.

Модуль состоит из 5 отсеков объемом 10 мл и одного отсека объемом 50 мл. В данные отсеки разливается по 10 мл (50 мл в большой отсек) разведенной крови, что соответствует 1 мл (5 мл в большом отсеке) неразведенной крови. Данная схема позволяет осуществлять фильтрацию любого количества крови в диапазоне от 1 до 10 мл.

Разведенная кровь с помощью вакуумного насоса фильтруется через поликарбонатную пористую мембрану с калиброванными цилиндрическими порами диаметром 8 мкм. Каждый отсек объемом 10 мл фильтруется через отдельный круглый участок мембраны диаметром 6 мм, отсек объемом 50 мл фильтруется через 5 аналогичных участков. Таким образом, кровь проходит не через всю поверхность мембраны, а через 10 отдельных участков («спотов»), что облегчает дальнейшую работу врача-цитолога. После фильтрации мембрана извлекается из фильтрационного модуля, высушивается, промывается фосфатно-буферным раствором и раствором Мэй-Грюнвальд и окрашивается по Гимзе, гематоксилином-эозином либо иным способом.

Окрашенные препараты анализируются врачом-цитологом с помощью светового микроскопа в следующей последовательности: просмотр стекол при увеличении $\times 20$ для выявления подозрительных клеток; детальный цитопатологический анализ подозрительных клеток/клеточных микроэмболов на увеличении $\times 63$ с масляной иммерсией. Для установления злокачественной природы клетки требуется наличие не менее 4 из следующих 5 критериев: анизонуклеоз (отношение $>0,5$), размер ядра >16 микрон, нерегулярность ядерного контура, наличие клеточных комплексов, высокое нуклеарно-цитоплазматическое отношение. При отсутствии одного либо нескольких критериев клетка признается атипичной [7].

Результаты применения технологии ISET в клинической практике

Ниже приводятся только результаты исследований, включавших более 20 пациентов. Крупнейшее на сегодняшний день исследование проведено группой французских ученых, оценивавших с помощью ISET число ЦОК, выявляемых

при различных злокачественных новообразованиях, а также воспроизводимость этих результатов путем оценки препаратов десятью независимыми экспертами-цитопатологами. При анализе периферической крови 808 пациентов, включая 569 больных различными злокачественными опухолями, ЦОК были выявлены в 49% случаев, преимущественно при раке легкого, меланоме и метастатическом раке различных локализаций. Анализ распространенности ЦОК по стадиям заболеваний не проводился. Коэффициент согласия между привлеченными цитопатологами в отношении диагностики ЦОК с определенно злокачественным фенотипом достиг 0,93, что свидетельствует об очень высокой воспроизводимости результатов [11].

Этой же группой авторов опубликован более подробный анализ 250 пациентов с резектабельным немелкоклеточным раком легкого. ЦОК при помощи метода ISET были выявлены у 123 (49%) пациентов перед операцией независимо от стадии либо гистологического вида опухоли. Прогностическое значение ЦОК не оценивалось [12].

В другом исследовании у 87 пациентов с ЦОК на фоне рака легкого с помощью иммуноцитохимии и флуоресцентной *in-situ* гибридизации (FISH) определяли наличие мутаций в гене ALK. Наличие мутантного гена было подтверждено у 5 больных [14].

F. Farace и соавт. [7] провели прямое сравнительное исследование эффективности технологии ISET и CellSearch (иммуномагнитное выделение ЦОК с эпителиальным фенотипом) у больных с метастатическим раком молочной железы, легкого, простаты. ISET и CellSearch позволили выявить ЦОК у 17/20 и 15/20 пациенток с раком молочной железы, 20/20 и 18/20 пациентов с раком простаты, 20/20 и 9/20 больных с раком легкого. В большинстве случаев ISET позволял выявлять больше клеток, чем CellSearch, хотя у нескольких пациентов было обратное соотношение. Корреляции между количеством выявленных обоими методами клеток и кликопатологическими характеристиками новообразований выявлено не было.

Позднее схожее сравнительное исследование было проведено группой из Манчестера под руководством проф. Caroline Dive в группе пациентов с немелкоклеточным раком легкого стадии IIIA-IV [17]. Метод ISET позволил выявить ЦОК у 32 из 40 обследованных больных, CellSearch — у 9 из 40. Циркулирующие опухолевые микроэмболы были обнаружены при помощи ISET у 17 пациентов, при этом пролиферативной активностью по результатам окраски Ki-67 обладали лишь изолированные клетки опухоли, но не микроэмболы.

Этой же группой исследователей проведен сравнительный анализ возможностей ISET и CellSearch у больных с метастатическим раком поджелудочной железы. ЦОК были выявлены у 24 из 27 больных с помощью ISET (93%) и 21 из 53 пациентов при помощи CellSearch (40%). Влияния ЦОК на выживаемость отмечено не было, что объясняется авторами недостаточным размером выборки и низкой продолжительностью жизни больных. При иммуноцитохимическом исследовании выделенных ЦОК была выявлена выраженная гетерогенность экспрессии цитокератинов, эпителиальной молекулы адгезии EpCAM и виментина [15].

G. Vona и соавт. [24] изучали прогностическое значение ЦОК при гепатоцеллюлярной карциноме без внепеченочных метастазов. Методика ISET позволила выявить ЦОК и опухолевые микроэмболы у 23 и 2 из 44 обследованных пациентов, соответственно. Среди обследованных здоровых добровольцев, пациентов с вирусным гепатитом и циррозом печени (n=107) ни ЦОК, ни клеток с признаками атипии выявлено не было. ЦОК достоверно чаще встречались у больных с диффузным характером опухолевого процесса и тромбозом ветвей воротной вены. В то же время, снижение выживаемости в группе пациентов с выявленными ЦОК было статистически значимым лишь при однофакторном анализе. Многофакторный анализ не показал влияния ЦОК на прогноз, что, по мнению авторов, связано с малым размером выборки.

При резектабельном раке молочной железы ЦОК при помощи метода ISET были выявля-

ны до операции у 12 из 44 (27%) пациенток. Немаловажно, что в этой работе была показана возможность лазерной микродиссекции выделенных ЦОК с последующим молекулярно-генетическим анализом их ДНК [20].

При изучении группы из 90 пациентов с метастатической меланомой кожи L. Khoja и соавт. обнаружили ЦОК у 46 больных [16]. Подсчет числа ЦОК проводился после двойного иммуногистохимического окрашивания: наличие экспрессии маркера S100 говорило о наличии опухолевой клетки при отсутствии экспрессии CD45 (лейкоциты) или CD144 (эндотелий). При иммуноцитохимической окраске панелью из 6 характерных для меланомы антител обращала на себя внимание выраженная гетерогенность клеток, что, по мнению авторов, требует отказа от маркер-зависимых систем детекции ЦОК.

Крупное исследование проведено итальянскими исследователями из Флоренции. V. de Giorgi и соавт. [6] изучали распространенность ЦОК в крови пациентов, оперированных по поводу меланомы кожи (n=87) либо меланоцитарных невусов (n=10). При инвазивной форме меланомы ЦОК отмечены в 23% случаев, при метастатических опухолях — в 63%.

Помимо этого, ЦОК были выявлены у 17 из 31 пациента с меланомой глаза, в том числе у 8 пациентов обнаружили опухолевые микроэмболы. Корреляции между исходными характеристиками опухоли отмечено не было, однако, у пациентов без ЦОК либо с количеством ЦОК менее 1 на 1 мл крови общая и безрецидивная выживаемость были выше [18].

Табл. 1. Результаты основных (более 20 наблюдений) клинических исследований, посвященных анализу ЦОК методом ISET

Автор, год	Локализация рака (стадия)	Число больных	ЦОК	Примечание
Hofman, 2011 [11]	НМКРЛ Меланома Прочие	394 30 145	123 (31%) 26 (87%) 94 (65%)	Цитология
Hofman, 2012 [12]	НМКРЛ	250	123 (49%)	Цитология
Farace, 2011 [7]	РМЖ НМКРЛ Простата	20 20 20	17 20 20	ИЦХ
Krebs, 2012 [17]	НМКРЛ (нерезект.)	40	32 (80%)	ИЦХ
Khoja, 2012 [15]	Рак подж. железы (метаст.)	27	24 (93%)	ИЦХ
Vona, 2004 [24]	ГЦР	44	23 (52%)	Мутация гена -катенина в ЦОК
Pinzani, 2006 [20]	РМЖ (лок.)	44	12 (27%)	Анализ ДНК ЦОК
Khoja, 2014 [16]	Меланома (метаст.)	90	46 (51%)	ИЦХ
Mazzini, 2014 [18]	Меланома глаза	31	17 (55%)	ЦОК и выживаемость
De Giorgi, 2010 [6]	Меланома (инвазивн.)	70	23 (33%)	ИЦХ, ПЦР
Hofman, 2013 [13]	Меланома (метаст.)	97	87 (89%)	Мутация BRAF в ЦОК (ИЦХ)

Примечание: РМЖ — рак молочной железы, ГЦР — гепатоцеллюлярный рак, НМКРЛ — немелкоклеточный рак легкого, ИЦХ — иммуноцитохимия

Заслуживающие внимания данные получены V. Hofman и соавт. [13] при исследовании мутации в гене BRAF у 97 пациентов с метастатической меланомой кожи. ЦОК были выявлены у 87 больных (89%). У всех больных проводили оценку BRAF-статуса первичной опухоли методами пиросеквенирования ДНК и иммуногистохимии с помощью антитела VE1, а также иммуноцитохимическое исследование ЦОК с помощью тех же антител. Мутации гена BRAF были выявлены в 53 первичных опухолях, а также в 54 случаях при анализе ЦОК. Чувствительность и специфичность иммуноцитохимического анализа ЦОК на мутации в гене BRAF с помощью VE1 антитела составила 100 и 81%, соответственно.

Результаты проведенных выше исследований обобщены в табл. 1.

Заключение

Анализ литературы показывает, что наибольший опыт выделения ЦОК с помощью методики ISET накоплен в отношении немелкоклеточного рака легкого и меланомы кожи. Имеются данные о применении данной методики у больных раком молочной железы, печени, поджелудочной железы, меланомы сосудистой оболочки глаза, простаты. Показано, что методика имеет высокую воспроизводимость и позволяет с помощью стандартных цитопатологических критериев выявлять эпителиальные и мезенхимальные ЦОК, а также циркулирующие комплексы опухолевых клеток (опухолевые кластеры, или микроэмболы) в периферической крови больных.

Изучены технические аспекты проведения иммуноцитохимического окрашивания и молекулярно-генетического исследования выделенных клеток и микроэмболов. В то же время, связь выделенных с помощью ISET опухолевых клеток и микроэмболов с выживаемостью и другими важными клиническими показателями, в том числе, в зависимости от стадии и локализации опухоли, практически не изучена.

С фундаментальной точки зрения, уникальным достоинством вышеописанной методики является возможность параллельного изучения морфологических и генетических особенностей ЦОК как с эпителиальным, так и с мезенхимальным фенотипом. Кроме того, применение цитологических критериев злокачественности для оценки полученных препаратов без необходимости проведения сложных и дорогостоящих иммунных и молекулярных тестов позволяет надеяться на широкое распространение метода в клинической практике. Необходимым условием для этого являются, разумеется, проспективные когортные исследования, посвящен-

ные оценке прогностической значимости ЦОК, полученных с помощью технологии ISET.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России. — 2012. — 260 с.
2. Патютко Ю.И., Сагайдак И.В., Тупицын Н.Н. и др. Влияние циркуляции опухолевых клеток в крови на прогноз при операциях на печени по поводу злокачественных опухолей // Хирургия. — 2011. — № 4. — С. 22-26.
3. Cohen S. J., Punt C. J., Iannotti N. и др. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer // J Clin Oncol. — 2008. — Vol. 26. — № 19. — P. 3213-3221.
4. Cristofanilli M., Budd G. T., Ellis M. J. и др. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer // N Engl J Med. — 2004. — Vol. 351. — № 8. — P. 781-791.
5. De Bono J. S., Scher H. I., Montgomery R. B. и др. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer // Clin Cancer Res. — 2008. — Vol. 14. — P. 6302-6309.
6. De Giorgi V., Pinzani P., Salvianti F. и др. Application of a filtration- and isolation-by-size technique for the detection of circulating tumor cells in cutaneous melanoma // J Invest Dermatol. — 2010. — Vol. 130. — № 10. — P. 2440-2447.
7. Farace F., Massard C., Vimond N. и др. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas // Br J Cancer. — 2011. — Vol. 105. — № 6. — P. 847-53.
8. Fehm T., Solomayer E.F., Meng S. и др. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells // Cytotherapy. — 2005. — Vol. 7. — № 2. — P. 171-185.
9. Franken B., de Groot M.R., Mastboom W.J. и др. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer // Breast Cancer Res. — 2012. — Vol. 14. — № 5. — P. R133.
10. Friedlander T.W., Premasekharan G., Paris P.L. Looking back, to the future of circulating tumor cells // Pharmacol Ther. — 2014. — Vol. 142. — № 3. — P. 271-280.
11. Hofman V.J., Ilie M.I., Bonnetaud C. и др. Cytopathologic detection of circulating tumor cells using the isolation by size of epithelial tumor cell method // Am J Clin Pathol. — 2011. — Vol. 135. — P. 146-156.
12. Hofman V., Long E., Ilie M. и др. Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method // Cytopathology. — 2012. — Vol. 23. — № 1. — P. 30-38.
13. Hofman V., Ilie M., Long-Mira E. и др. Usefulness of immunocytochemistry for the detection of the

- BRAFV600E mutation in circulating tumor cells from metastatic melanoma patients // *J Invest Dermatol.* — 2013. — Vol. 133. — N10. — P.1378-1381.
14. Ilie M., Long E., Butori C. и др. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma // *Ann Oncol.* — 2012. — Vol. 23. — № 11. — P. 2907-2913.
 15. Khoja L., Backen A., Sloane R. и др. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker // *Br J Cancer.* — 2012. — Vol. 106. — № 3. — P. 508-516.
 16. Khoja L., Shenjere P., Hodgson C. и др. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma // *Melanoma Res.* — 2014. — Vol. 24. — № 1. — P. 40-46.
 17. Krebs M.G., Hou J.M., Sloane R. и др. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches // *J Thorac Oncol.* — 2012. — Vol. 7. — № 2. — P. 306-315.
 18. Mazzini C., Pinzani P., Salvianti F. и др. Circulating tumor cells detection and counting in uveal melanomas by a filtration-based method // *Cancers (Basel).* — 2014. — Vol. 6. — № 1. — P. 323-332.
 19. Paterlini-Brechot P., Benali N.L. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions // *Cancer Letters.* — 2007. — Vol.253. — P. 180-204.
 20. Pinzani P., Salvadori B., Simi L. и др. Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection // *Hum Pathol.* — 2006. — Vol. 37. — № 6. — P.711-718.
 21. Riethdorf S., Muller V., Zhang L. и др. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial // *Clin Cancer Res.* — 2010. — Vol. 16. — № 9. — P. 2634-2645.
 22. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer Statistics, 2013 // *CA Cancer J Clin.* — 2013. — Vol. 63. — P.11-30.
 23. Vona G., Sabile A., Louha M. и др. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells // *Am J Pathol.* — 2000. — Vol. 156. — P. 57-63.
 24. Vona G., Estepa L., Bèoud C. и др. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer // *Hepatology.* — 2004. — Vol. 39. — № 3. — P. 792-797.

Поступила в редакцию 23.05.2014 г.

V.K. Lyadov, M.A. Skrypnikova, O.P. Popova

Isolation of circulating tumor cells in blood by means of “Isolation by SizE of Tumor cells (ISET)”

„Treatment and Rehabilitation Center”
Moscow

There is evidence of the importance of circulating tumor cells in bloodstream as a factor of poor prognosis of cancer. The optimum method for isolating and studying of these cells is not defined. The most common methods are either based on the isolation of tumor genetic material from blood or on immune-mediated isolation of epithelial tumor cells. The first group of methods is characterized by a lack of specificity, while the latter do not allow identifying a pool of cells undergone in bloodstream epithelial-mesenchymal transformation. There is presented an overview of results of clinical trials of a new technique of isolation of tumor cells from bloodstream based on the patients' blood filtration through a membrane with defined pore sizes (ISET—Isolation by SizE of Tumor cells).

Key words: circulating tumor cells, isolation by size