Вопросы онкологии, 2025. Том 71, № 3
УДК 618.19-006.6
DOI 10.37469/0507-3758-2025-71-3-OF-2290

© Е.А.А. Абдо[1], Н.А. Фалалеева[2,3], Л.Ю. Гривцова[2], А.Б. Галицына[2,3], А.С. Белохвостова[2,3], А.А. Софийчук[2], С.А. Иванов[2], А.Д. Каприн[1,2]

Влияние циркулирующих опухолевых клеток на прогноз у пациенток с ранним раком молочной железы

[1]Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Российская Федерация
[2]Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
[3]Обнинский институт атомной энергетики — филиал Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Обнинск, Российская Федерация

© Eman A.A. Abdo[1], Natalia A. Falaleeva[2,3], Luydmila Yu. Grivtsova[2], Anastasia B. Galitsyna[2,3], Anna S. Belokhvostova[2,3], Aleksander A. Sofiochuk[2], Sergey A. Ivanov[2], Andrey D. Kaprin[1,2]

The Impact of Circulating Tumor Cells on the Prognosis of Patients with Early Breast Cancer

[1]Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, the Russian Federation
[2]A.Tsyb Medical Radiological Research Center (MRRC) — the branch of the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Radiological Centre" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, the Russian Federation
[3]Obninsk Institute of Atomic Energy — the branch of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education National Research Nuclear University "MEPhI", Obninsk, the Russian Federation

Введение. Выявление циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) коррелирует с плохим прогнозом при метастатическом раке молочной железы (РМЖ), однако данных, доказывающих безусловную прогностическую ценность обнаружения ЦОК, их порогового уровня, фенотипических характеристик у пациенток с установленными ранними стадиями РМЖ недостаточно.

Цель. Изучение влияния ЦОК на течение раннего РМЖ с учетом их уровня и качественного состава с использованием метода проточной цитометрии в соответствии с оригинальной методикой МРНЦ им. А.Ф. Цыба.

Материалы и методы. В исследование включено 79 пациенток с ранним РМЖ. Средний возраст пациенток составил 50 лет. Медиана наблюдения — 43,3 мес. У половины пациенток было установлено вовлечение регионарных лимфатических узлов (53,2 %). Наиболее частым биологическим подтипом опухоли был тройной негативный (32,9 %). Всем пациенткам до начала терапии была проведена оценка ЦОК методом многопараметровой проточной цитометрии по оригинальной методике МРНЦ им. А.Ф. Цыба, оценивалось количество ЦОК, их иммунофенотипические особенности на основании анализа экспрессии антигенов CAM5.2, BerEP4, HLA-DR и CD95. Всем пациенткам было проведено лечение согласно стадии и биологическому подтипу опухоли в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения РФ.

Результаты. ЦОК в периферической крови выявлены у 43 пациенток (54,4 %), количество их варьировало в диапазоне от 2 до 98 клеток в 7,5 мл крови. Нами установлено, что пороговым значением, достоверно влияющим на прогноз при раннем РМЖ, является 5 ЦОК в 7,5 мл

Introduction. The detection of circulating tumor cells (CTCs) is associated with a poor prognosis in patients with metastatic breast cancer (BC). However, there is insufficient data to prove the prognostic value of CTC detection, their threshold level and phenotypic characteristics in patients with early-stage breast cancer (EBC).

Aim. To study the effect of CTC on the course of EBC, taking into account their level and qualitative composition using the flow cytometry method in accordance with the original methodology of the A. Tsyb MRRC.

Materials and Methods. The study involved 79 patients with EBC. The average age of the patients was 50 years. The median follow-up period was 43.3 months. Involvement of regional lymph nodes was found in half of the patients (53.2 %). The most common biological subtype of the tumor was triple negative (32.9 %). Before starting therapy, all patients underwent a CTC assessment using multiparameter flow cytometry according to the original methodology of the A. Tsyb MRRC. The number of CTCs and their immunophenotypic features were evaluated based on an analysis of the expression of CAM5.2, BerEP4, HLA-DR, and CD95 antigens. All patients were treated according to the stage and biological subtype of the tumor in accordance with the clinical recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Results. CTCs in peripheral blood were detected in 43 patients (54.4 %), their number ranged from 2 to 98 cells in 7.5ml of blood. We have established that the threshold value that significantly affects the prognosis for EBC is 5 CTC in 7.5 ml of blood. The 3-year overall survival (OS) rate was

крови. Так, трехлетняя общая выживаемость (ОВ) составила 63,2 % в группе с ≥ 5 ЦОК (n = 19), в группе с < 5 ЦОК — 95 % (n = 60), (p < 0,001); трехлетняя выживаемость без прогрессирования (ВБП) — 47,4 % и 90 % соответственно (p < 0,001). Установлены особенности качественного состава ЦОК, ассоциированные с прогнозом. Прогностически неблагоприятной оказалась группа с иммунофенотипом ЦОК CAM5.2^{+}BerEP4^{+}, по сравнению с группой CAM5.2+BEREP4- трехлетняя ОВ — 80 % против 100 % (p = 0,008); трехлетняя ВБП — 72,3 % против 100 % соответственно, (p = 0,012).

Выводы. ЦОК при раннем раке выявляются в 54,4 % случаев и представляют собой иммунофенотипически гетерогенную по экспрессии панэпителиальных маркеров субпопуляцию опухолевых клеток, достоверно связанных с прогнозом раннего РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; циркулирующие опухолевые клетки; ранний рак

Для цитирования: Абдо Е.А.А., Фалалеева Н.А., Гривцова Л.Ю., Галицына А.Б., Белохвостова А.С., Софийчук А.А., Иванов С.А., Каприн А.Д. Влияние циркулирующих опухолевых клеток на прогноз у пациенток с ранним раком молочной железы. *Вопросы онкологии*. 2025; 71(3): 00-00.-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-3-OF-2290

63.2% in the group with ≥5 CTC (n = 19), compared to 95% in the group with <5 CTC (n = 60), (p < 0.001). Similarly, the 3-year progression-free survival (PFS) rate was 47.4% and 90%, respectively (p < 0.001). Research has established the particular characteristics of the qualitative composition of CTC in relation to prognosis. The group with the CTC immunophenotype CAM5.2+BerEP4+ was prognostically unfavorable compared with the CAM5.2+BEREP4 group- 3-year OS, 80% vs. 100% (p = 0.008); 3-year FPS, 72.3% vs. 100%, respectively, (p = 0.012).

Conclusion. CTCs in EBC are detected in 54.4 % of cases and represent an immunophenotypically heterogeneous subpopulation of tumor cells with respect to the expression of pan-epithelial markers, which are significantly associated with the prognosis of EBC.

Keywords: breast cancer; circulating tumor cells; early cancer

For Citation: Eman A.A. Abdo, Natalia A. Falaleeva, Luydmila Yu. Grivtsova, Anastasia B. Galitsyna, Anna S. Belokhvostova, Aleksander A. Sofiochuk, Sergey A. Ivanov, Andrey D. Kaprin. The impact of circulating tumor cells on the prognosis of patients with early breast cancer. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2025; 71(3): 00-00.-DOI: 10.37469/0507-3758-2025-71-3-OF-2290

✉ Контакты: Галицына Анастасия Борисовна, galitsyna.anastaisha@gmail.com

Введение

В настоящее время считается, что циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) играют важную роль в метастазировании всех злокачественных новообразований эпителиальной природы. ЦОК представляют собой клетки опухоли, которые отделились от первичной опухоли и свободно циркулируют в кровеносной системе, как в виде единичных клеток, так и в виде скоплений (кластер клеток, микрометастаз), закономерно, микрометастазы лучше выживают в кровотоке и обладают более высоким метастатическим потенциалом [1].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) позволяет ЦОК адаптироваться к новым условиям в результате потери способности к межклеточной адгезии и приобретении свойств, позволяющих осуществить инвазию в органы и ткани [2]. Многочисленные исследования показывают, что присутствие ЦОК и/или их кластеров достоверно связано с худшими клиническими исходами [3].

Известно, что ЦОК характеризует значительная фенотипическая гетерогенность. Исследования показывают, что определенные иммунофенотипические свойства ЦОК, например, утрата экспрессии на мембране ЦОК антигенов CD95 и HLA-DR, могут являться независимым прогностическим фактором выживаемости без прогрессирования у больных различными ЗНО [3-4]. Обнаружение ЦОК в крови может служить предиктором общей выживаемости и прогноза, однако сложность их выявления и анализа функциональной характеристики до сих пор являются сдерживающим фактором широкого клинического применения оценки ЦОК [5].

Результаты недавно опубликованных научных работ подчеркивают важность ЦОК для прогноза и, в ряде случаев, для принятия решения о выборе тактики лечения при раке молочной железы (РМЖ) [6-7]. Авторы показывают, что по количеству ЦОК возможно стратифицировать пациентов на группы риска раннего прогрессирования, а более низкий их уровень коррелирует с лучшими показателями общей выживаемости [8-9].

Так, исследования STI-CTC и CirCe 01 демонстрируют, что выбор тактики лечения в зависимости от уровня ЦОК может улучшить показатели выживаемости без прогрессирования, по сравнению со стандартными клиническими оценками у больных РМЖ [9, 10]. Ряд исследований, в т. ч. исследования DETECT, проводят оценку влияния различных фенотипов ЦОК на прогноз и, в последующем, на выбор терапии [10].

Обнаружение и количественное определение ЦОК в периферической крови приобретает все большее значение, однако чрезвычайно низкая концентрация ЦОК в крови (приблизительно 100-1000 клеток на литр) создает значительные технические трудности для их обнаружения, точного подсчета и качественной характеристики [5]. В настоящее время наиболее распространенными подходами к обнаружению ЦОК являются визуальная проточная цитометрия (Imaging flow cytometry, IFC) или обогащение клеток с последующим количественным анализом ПЦР. IFC сочетает преимущества традиционной про-

точной цитометрии и цифровой микроскопии, позволяя одновременно анализировать как морфологические характеристики клеток, так и экспрессию поверхностных маркеров [11]. Это значительно повышает точность идентификации ЦОК, снижая риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Одним из наиболее известных вариаций IFC, получивших одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), является Cell Search System. Эта система опирается на комбинацию морфологических критериев (размер, форма клетки) и специфических маркеров, таких как эпителиальные клеточные адгезионные молекулы (EpCAM), позволяя идентифицировать клетки, потенциально происходящие из эпителиальных тканей. Однако Cell Search System не является единственной доступной технологией IFC [12]. Существуют и другие системы, такие как CellTracks, TDI и CellTracksAnalyzer II, которые также демонстрируют высокую эффективность в обнаружении ЦОК, хотя и могут отличаться по своим техническим характеристикам и алгоритмам анализа [13-14]. Выбор оптимальной системы зависит от конкретных задач исследования и доступных ресурсов. В дополнение к IFC, значительные успехи достигнуты в области высокочувствительной проточной цитометрии (FCM). Разработка микрофлюидных систем FCM, например, системы Fishman-R, позволила существенно повысить эффективность обнаружения редких клеток, таких как ЦОК, за счет минимизации фонового шума и оптимизации обработки образцов. Кроме того, непрерывное совершенствование методов обогащения клеток, включая использование магнитной сепарации и флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS), значительно увеличивает концентрацию ЦОК в анализируемом образце, что повышает чувствительность последующего анализа ПЦР [14]. Помимо совершенствования технологий, важный вклад в улучшение обнаружения ЦОК вносят исследования новых биомаркеров. К сожалению, специфических поверхностных маркеров, характерных только для ЦОК, не существует, поэтому используются, как правило, комбинации нескольких маркеров, потенциально положительных для ЦОК, и хотя бы одного отрицательного антигена (например, общелейкоцитарного антигена CD45), что позволяет повысить специфичность анализа и уменьшить количество ложноположительных результатов. Среди перспективных маркеров — рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его фосфорилированная форма (pEGFR). Изменения в экспрессии этих маркеров могут отражать состояние онкологического процесса и служить дополнительным критерием для идентификации ЦОК. Например, Ватанабе и соавт. в своих исследованиях использовали метод FCM Fishman-R в сочетании с анализом экспрессии EGFR для обнаружения ЦОК у пациентов с различными типами рака [15].

Перечисленные выше системы достаточно трудоемки, поэтому постоянно идет поиск оптимальных, менее дорогостоящих и не столь трудоемких методов оценки ЦОК. Одним из возможных решений может быть использование метода проточной цитометрии, как это продемонстрировано в работах зарубежных исследователей [16-17].

В данной работе проведено исследование прогностической значимости ЦОК, выявленных и охарактеризованных иммунофенотипически методом многопараметровой проточной цитометрии, по оригинальной методике, предложенной в МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Методикой предусмотрено выявление ЦОК среди лейкоцитов, выделенных из 7,5 мл крови. ЦОК выявляются по оценке экспрессии пан-цитокератинов (CAM5.2), панэпителиального антигена BEREP4 (CD326) и отсутствию экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45 среди всех ядросодержащих, жизнеспособных клеток (syto 16+) образца [18].

Материалы и методы

В исследование включено 79 пациенток с морфологически/иммуногистохимически верифицированным диагнозом РМЖ. У всех пациенток была установлена ранняя форма заболевания (I-III стадии). Средний возраст составил 50 лет. Медиана наблюдения — 43,3 мес. У половины пациенток было установлено вовлечение в опухолевый процесс регионарных лимфатических узлов (53,2 %). Самым распространенным биологическим подтипом опухоли был тройной негативный подтип (32,9 %) (табл. 1).

Всем пациентам перед началом лечения проводилось определение циркулирующих опухолевых клеток методом многопараметровой проточной цитометрии с последующей оценкой их иммунологического фенотипа. Затем пациентки проходили лечение в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения РФ в зависимости от распространенности процесса и биологического типа опухоли.

Оценка количества и характеристик циркулирующих опухолевых клеток проводилась методом проточной цитометрии с применением оригинальной методики Центра [18].

Таблица 1. Характеристика пациенток

Критерий	n пациенток	%
Возраст, лет Среднее, лет	33-77 50	
Медиана наблюдения, мес. Медиана	8,8-1454,5 43	
Стадия 1A 1B 2A 2B 3A 3B 3C	 17 5 27 11 9 4 6	 21,5 6,3 34,2 13,9 11,4 5,1 7,6
Стадия первичной опухоли (по TNM) T1 T2 T3 T4	 29 39 6 5	 36,7 49,3 7,6 6,4
Поражение лимфатических узлов N0 N1 N2 N3	 42 22 9 6	 53,2 27,8 11,4 7,6
Биологический тип Люминальный А Люминальный В HER2-отрицательный Люминальный В HER2-положительный HER2-сверхэкспрессирующий тип Трижды негативный	 19 14 13 7 26	 24,1 17,7 16,5 8,8 32,9

Table 1. Characteristics of the patients

Criteria	n of patients	%
Age. years Average. years	33-77 50	
Median follow-up, months Median follow-up	8.8-1454.5 43	
Stage 1A 1B 2A 2B 3A 3B 3C	 17 5 27 11 9 4 6	 21.5 6.3 34.2 13.9 11.4 5.1 7.6
Tumor stage (TNM) T1 T2 T3 T4	 29 39 6 5	 36.7 49.3 7.6 6.4
Lymph nodules involvement N0 N1 N2 N3	 42 22 9 6	 53.2 27.8 11.4 7.6
Biological type Luminal A Luminal B HER2-negative Luminal B HER2-positive Her2-Enriched Triple negative	 19 14 13 7 26	 24.1 17.7 16.5 8.8 32.9

Для проведения исследования у пациентки из периферической вены забиралось 8 мл крови, из этой пробирки отбиралась аликвота 0,5 мл для подсчета лейкоцитарной формулы. 7,5 мл периферической крови брали для иммунологического исследования. На первом этапе проводили выделение лейкоцитов из всего объема путем осаждения клеточного осадка центрифугированием при 300 g и дальнейшим лизированием эритроцитов (стандартная манипуляция лизиса эритроцитов с применением готового лизирующего раствора,

BDFACSLysingSolution.). Весь полученный клеточный объем делили на 2 пробы. Первая проба — опытный образец, который инкубировали с моноклональными антителами к исследуемым антигенам, панэпителиальным маркерам (CAM5.2 — цитокератины CD326 (EPCAM или BerEP4) — мембранный эпителиальный антиген) и общелейкоцитарному антигену CD45 и нуклеотропному красителю — syto16, а также антитела для выявления экспрессии на клетках антигена CD133 (маркер, ассоциированный с фенотипом стволовых опухолевых клеток), молекулы HLA-DR (молекула главного комплекса гистосовместимости II класса) и антигена CD95 — Fas-рецептор (англ. — *Fasreceptor*, сокр. — FasR), также известный как апоптозный антиген 1 (APO-1 или APT) [19]. В исследовании использовалась комбинация антител к панцитокератинам с CD326 или BerEP4 в зависимости от наличия антител в лаборатории. Вторая проба — контрольный образец, который инкубировался с изотипическими контролями, для оценки неспецифического связывания. Панель антител представлена в табл. 2.

Далее проводилась стандартная реакция иммунофлуоресцентной (РИФ) окраски. Клетки инкубировалась с антителами в течение 20 мин. в темноте и далее отмывались от не связавшихся антител центрифугированием в течение 5 мин. при 300 g дважды (стандартная реакция иммунофлуореценции). После этого осуществлялся счет клеток на проточном цитометре. Анализу подвергалось 10 000 000-25 000 000 клеток образца в зависимости от уровня лейкоцитов крови у пациентки. По завершении счета на проточном цитометре данные обрабатывались с применением программного обеспечения Kaluza 2.0, позволяющего анализировать нативные файлы проточной цитометрии на обычном персональном компьютере. Преимуществом программного обеспечения Kaluza является возможность анализа большого количества клеток.

Статистическая обработка данных проведена с применением программного пакета SPSS версии 27.0. Для оценки отдаленных результатов лечения расчет производился путем построения кривых по методике Kaplan – Meier (1958), отражающих показатели кумулятивной выживаемости к началу определенного временного интервала [20]. Для построения кривой выживаемости без прогрессирования (ВБП) сроки жизни больных рассчитывались от даты начала терапии до прогрессирования, развития рецидива или последней явки больного. Для построения кривой, отражающей общую выживаемость (ОВ), сроки жизни рассчитывались от даты начала лечения до смерти или до даты последней явки больного. Для определения информативности ЦОК использовались следующие операционные характеристики: чувствительность, специфичность, точность. Для вычисления этих показателей применялся ROC-анализ (Receiver Operating

Таблица 2. Иммунологическая панель для выявления циркулирующих опухолевых клеток крови

Параметр vs Антиген	Флуорохром	Производитель	Каталожный номер
Syto 16	FL-1 канал детектора (FITC)	Thermo Fisher Scientific/Invitrogen	S7578
CAM5.2	PE	BD Biosciences	347204
CD326/ berEP4	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	347199
CD95	PE-Cy7	BD Biosciences	561636
HLA-DR	APC	BD Biosciences	347403
CD45	APC-H7	BD Biosciences	641417

Table 2. Immunological panel for detection of circulating blood tumor cells

Parameter vs Antigen	Fluorochrome	Manufacturer	Catalog number
Syto 16	FL-1 detector channel (FITC)	Thermo Fisher Scientific/Invitrogen	S7578
CAM5.2	PE	BD Biosciences	347204
CD326/ berEP4	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	347199
CD95	PE-Cy7	BD Biosciences	561636
HLA-DR	APC	BD Biosciences	347403
CD45	APC-H7	BD Biosciences	641417

Characteristic Analysis). С целью сравнения кривых выживаемости между исследуемыми группами, применялся ТЕСТ логарифмического рангового критерия (log-ranktest). Для оценки статистической достоверности рассчитанных критериев применялись показатели и таблицы критических значений для приемлемых уровней значимости (p). Для статистики различия были приняты два основных уровня достоверности: достоверный — $p < 0,050$, недостоверный — $p > 0,050$.

Результаты

При проведении проточной цитометрии у 43 пациенток (54,4 %) было установлено наличие ЦОК, количество их варьировало от 2 до 98 клеток. На основании оценки панэпителиальных маркеров выявлено присутствие различных субпопуляций ЦОК, отличных по экспрессии антигенов BEREP4 и CAM5.2 (табл. 3).

У подавляющего большинства пациентов наблюдалась экспрессия моноклонального антитела к цитокератину (Cam5.2) — 39 пациентов (49,3 %). У 36 пациенток (45,6 %) был обнаружен панэпителиальный фенотип CAM5.2+ BEREP4+, у 6 пациенток — CAM5.2+ BEREP4- (7,6 %), и в 1 случае CAM5/2- BEREP4+ (1,3 %) (табл. 3).

Для оценки дискриминационной способности количества ЦОК при прогнозировании выживаемости пациентов нами был применен метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного признака в точке *cut-off* определялось по наивысшему значению индекса Юдена.

Так, нами было установлено, что ЦОК являются статистически значимым предиктором общей выживаемости (AUC = 0,785; 95 % ДИ: 0,618–0,952, p = 0,001). Пороговое значение ЦОК в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 5 клеток. Смерть прогнозировалась при значении ЦОК выше данной величины или равном ей. Чувствительность и специфичность полученной прогностической модели составили 72,7 % и 83,8 % соответственно (рис. 1а).

Гипотеза была проверена с помощью методики Каплана – Майера, с помощью которой нами подтверждена ее достоверность: так, трехлетняя ОВ в группе пациентов с 5 (n = 19) и более ЦОК составила 63,2 %, в группе с менее, чем 5 ЦОК (n = 60) — 95 % ($p < 0,001$) (рис. 1б).

Идентичным образом был проведен анализ влияния ЦОК на риск прогрессирования РМЖ. Так, мы установили, что ЦОК являются статистически значимым предиктором прогрессирования опухоли (AUC = 0,758; 95 % ДИ: 0,622–0,894, $p < 0,001$). Пороговое значение ЦОК в точке *cut-off*, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 5 клеток. Прогрессирование РМЖ прогнозировалось при значении ЦОК выше данной величины или равном ей. Чувствительность и специфичность

Таблица 3. Характеристика циркулирующих опухолевых клеток

Критерий	n пациентов	%
Обнаружение ЦОК		
Да	43	54,4
Нет	36	45,6
Фенотип		
Cam5.2+	39	49,3
EpCAM (CD326)+	23	29,1
BerEP4+	20	25,3
Панэпителиальный фенотип		
CAM5.2+ BEREP4+	36	45,6
CAM5.2+BEREP4-	6	7,6
CAM5/2- BEREP4+	1	1,3

Table 3. Characteristics of circulating tumor cells.

Criteria	n of patients	%
Detecting CTC		
Yeas	43	54.4
No	36	45.6
Phenotype		
Cam5.2+	39	49.3
EpCAM (CD326)+	23	29.1
BerEP4+	20	25.3
Pan-epithelial phenotype		
CAM5.2+ BEREP4+	36	45.6
CAM5.2+BEREP4-	6	7.6
CAM5/2- BEREP4+	1	1.3

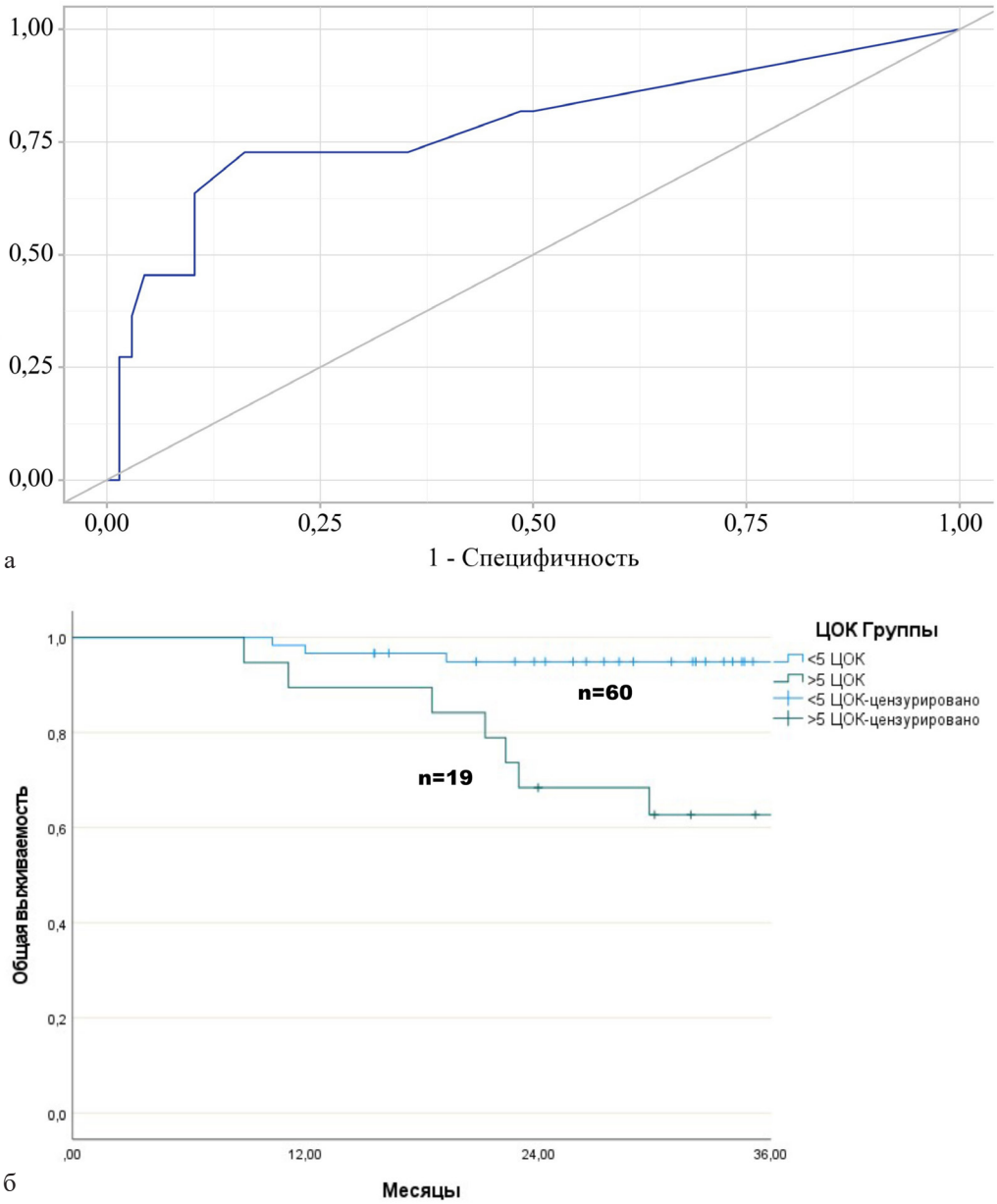


Рис. 1. а — ROC-кривая, характеризующая дискриминационную способность ЦОК при прогнозировании общей выживаемости; б — общая выживаемость в зависимости от порогового значения ЦОК, $p < 0,001$

Fig. 1. а — ROC curve characterizing the discriminative ability of CTC in predicting overall survival; б — overall survival depending on the CTC threshold, $p < 0.001$

полученной прогностической модели составили 68,4 % и 90,0 % соответственно (рис. 2а).

При анализе выживаемости без прогрессирования в соответствии с выдвинутой гипотезой нами было установлено, что в группе пациентов с 5 и более ЦОК трехлетняя ВБП составила 47,4 %, в группе с менее, чем 5 ЦОК — 90 % ($p < 0,001$) (рис. 2б).

Мы оценили влияние качественного состава ЦОК (субпопуляций ЦОК, отличных по экспрессии панэпителиальных маркеров, см. табл. 3) на прогноз заболевания. Поскольку пациентка, иммунофенотип ЦОК у которой характеризовался как CAM5/2- BEREP4+, в нашей группе была единственной, данное наблюдение из анализа мы исключили.

Нами установлено, что ЦОК с фенотипом $CAM5.2^{+}BEREP4^{+}$ связан с худшим прогнозом как в отношении ОВ, так и в отношении ВБП. Так, трехлетняя ОВ при фенотипе $CAM5.2^{+}BEREP4^{+}$ составила 80 %, при фенотипе $CAM5.2^{+}BEREP4^{-}$ — 100 %, ($p = 0,008$) (рис. 3а).

При анализе кривых, отражающих ВБП, также были получены достоверные различия: 72,3 % — при фенотипе $CAM5.2^{+}BEREP4^{+}$, 100 % — при фенотипе $CAM5.2^{+}BEREP4^{-}$, ($p = 0,012$) (рис. 3б).

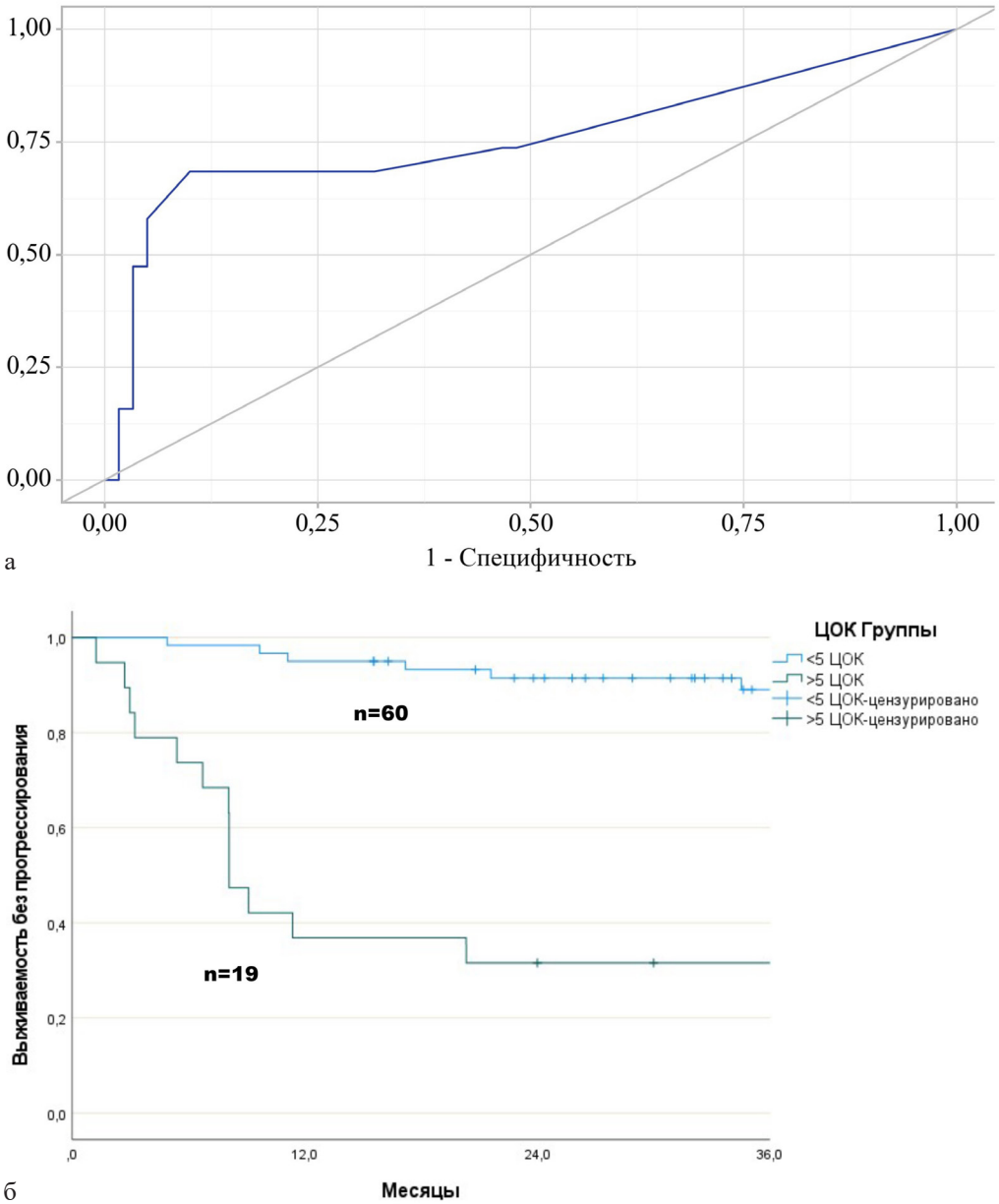
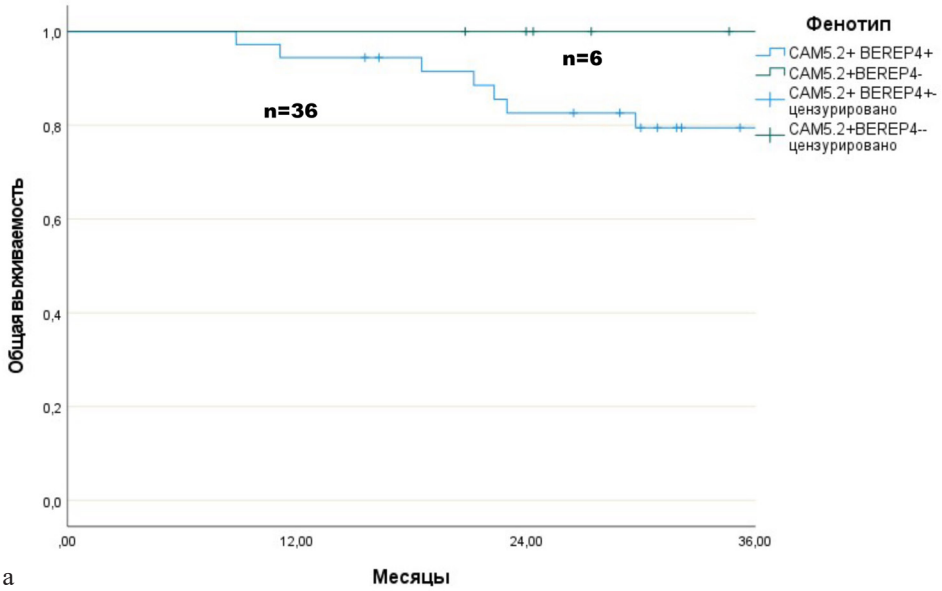


Рис. 2. а — ROC-кривая, характеризующая дискриминационную способность ЦОК при прогнозировании выживаемости без прогрессирования; б — выживаемость без прогрессирования в зависимости от порогового значения ЦОК, $p < 0{,}001$
Fig. 2. а — ROC curve characterizing the discriminative ability of CTCs in predicting progression-free survival; б — progression-free survival depending on the CTC threshold, $p < 0.001$

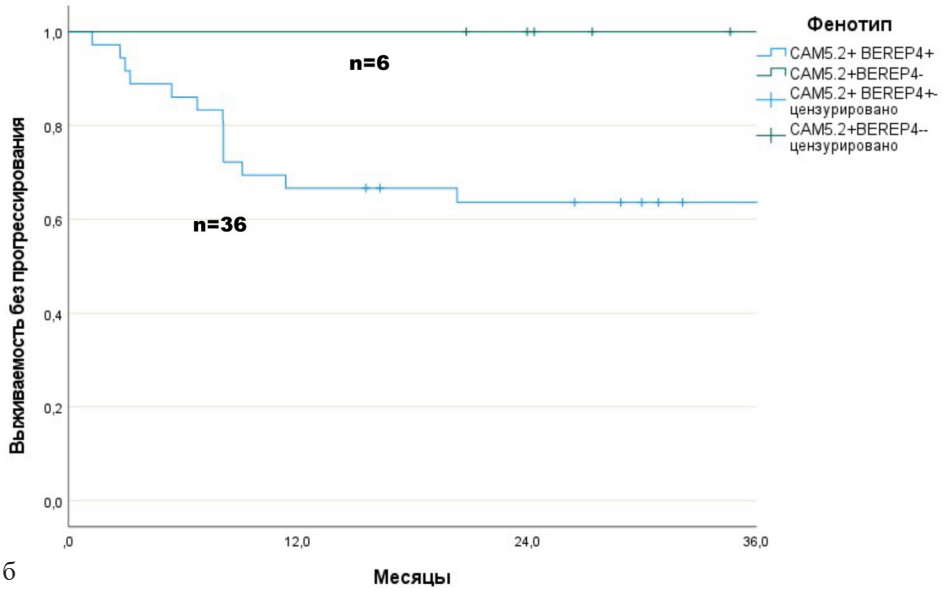
Обсуждение

Несмотря на современные программы лечения больных ранним РМЖ, у части пациентов заболевание прогрессирует с развитием метастатической болезни, что неизбежно влияет на сроки жизни пациентов. Поскольку существующие прогностические модели все же далеки от совершенства, изучение иных параметров, позволяющих более точно обозначать группу неблагоприятного прогноза, остается актуальным вопросом современной онкологии.

В контексте сказанного исследование прогностической значимости ЦОК, равно как и их характеристик, представляется интригующе важным. Кроме того, предполагается, что часть ЦОК обладают особым фенотипом раковых стволовых клеток, который связан с усилением регуляции белков множественной лекарственной устойчивости, что может объяснить устойчивость циркулирующих опухолевых клеток к химиотерапии [21]. Кроме того, ЦОК-клетки, часто находящиеся в состоянии покоя, константные клетки, часто выявляются у пациентов после противоопухолевой лекарственной терапии, направленной на пролиферирующие клетки. Помимо этого, предыдущие исследования выявили различия



а



б

Рис. 3. а — общая выживаемость в зависимости от фенотипа ЦОК, p = 0,008; б — выживаемость без прогрессирования в зависимости от ЦОК, p = 0,012

Fig. 3. a — overall survival depending on the CTC phenotype, p = 0.008; б — progression-free survival depending on CTC, p = 0.012

в иммунофенотипических характеристиках ЦОК и первичной опухоли, которые выражались в том, что ЦОК в отличие от первичной опухоли демонстрировали позитивность по рецепторам гормонов и эпидермального фактора роста HER2 [21, 22].

Несмотря на то, что обнаружение ЦОК в крови уже имеет доказанную прогностическую ценность при целом ряде злокачественных новообразований, сложность интерпретации полученных данных при применении зарегистрированных методик, а также их высокая стоимость не позволяют в настоящее время использовать этот параметр в рутинной клинической практике. В связи с этим использование проточной цитометрии представляется вполне оправданным шагом, однако требующим дополнительного изучения в контексте установления как уровня ЦОК, так и конкретных их иммунофенотипических характеристик, обладающих доказанным влиянием на прогноз.

В настоящей работе нами установлена достоверная прогностическая значимость детекции ЦОК, равной 5 и более клеток в 7,5 мл крови больных РМЖ с установленными ранними стадиями, определенными до этапа лечения методом проточной цитометрии. Установлено достоверное прогностическое влияние этого параметра на показатели общей выживаемости (трехлетняя ОВ — 63,2 % против 95 %, p < 0,001), и на выживаемость без прогрессирования (трехлетняя ВБП — 47,4 % против 90 %, p < 0,001).

Кроме того, нами проанализированы уникальные иммунофенотипические характеристики ЦОК: различия в экспрессии цитокератинов 7 и 8, выявляемых антителом CAM 5.2 в цитоплазме клетки, и молекулы клеточной адгезии эпителиальных клеток (EpCam, панэпителиальный антиген), выявляемой на мембране клеток посредством антител BerEP4, стандартно применяемых в иммуногистохимической практике при характеристике эпителиальных опухолей [23, 24].

В результате было установлено присутствие в кровотоке гетерогенных субпопуляций ЦОК, отличных по экспрессии цитокератинов и панэпителиальных антигенов. Данные указывают на то, что ЦОК могут быть гетерогенны не только в отношении экспрессии, например, рецепторов эпидермального фактора роста и рецепторов программируемой клеточной гибели, но и в отношении маркеров, достаточно типичных для эпителиальных опухолей [24-25]. Кроме того, обнаруженные субпопуляции ЦОК оказались ассоциированы с различным прогнозом.

Так, на основании проведенного анализа, для субпопуляции $CAM5.2^{+}BEREP4^{+}$ были установлены достоверные взаимосвязи между количеством ЦОК и показателями как общей, так и безрецидивной выживаемости (трехлетняя ОВ — 80 % против 100 %, p = 0,008; трехлетняя ВБП — 72,3 % против 100 %, p = 0,012).

Заключение

Таким образом, дальнейшее изучение ЦОК при раннем РМЖ актуально и может иметь важное прикладное значение. Перспективным представляется валидация метода проточной цитометрии как доступного и относительно недорогостоящего аналога существующим зарубежным методикам.

ЦОК могут детектироваться и по завершении всей программы лечения больных РМЖ, оценить значимость и влияние на течение заболевания динамики уровня ЦОК, а также их уникальных характеристик еще предстоит.

Возможно, в будущем накопленные знания приведут к изменению всей парадигмы прежде всего адьювантного лечения больных РМЖ с обязательным учетом при ее назначении характеристик ЦОК.

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

Финансирование
Исследование не имело спонсорской поддержки.
Funding
The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики
Все пациенты, включенные в исследование, получали лечение в рамках рутинной практики после подписания информированного согласия на лечение. Персональные данные пациентов не использовались при проведении исследования.
Compliance with patient rights and principles of bioethics
All included patients received therapy in routine clinical practice after obtaining of inform consent for the therapy. Personal patient's data were not used in the study.

Участие авторов
Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработке концепции статьи, получении и анализе фактических данных, написании и редактировании текста статьи, проверке и утверждении текста статьи.
Authors' contributions
All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Australas Med J.* 1869; 14: 146-149.
2. Yu M., et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science.* 2013; 339: 580-584.
3. Hong Y., Fang F., Zhang Q. Circulating tumor cell clusters: what we know and what we expect (Review). *Int J Oncol.* 2016; 49(6): 2206-2216.-DOI: 10.3892/ijo.2016.3747.
4. Dunne M.R., Phelan J.J., Michielsen A.J., et al. Characterising the prognostic potential of HLA-DR during colorectal cancer development. *Cancer ImmunolImmunother*. 2020; 69(8): 1577-1588.-DOI: 10.1007/s00262-020-02571-2.
5. Alix-Panabières C., Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(9): 623-31.-DOI: 10.1038/nrc3820.
6. Bidard F.C., Michiels S., Riethdorf S., et al. Circulating tumor cells in breast cancer patients treated by neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018; 110(6): 560-567.-DOI: 10.1093/jnci/djy018.
7. Wang X.Q., Liu B., Li B.Y., et al. Effect of CTCs and INHBA level on the effect and prognosis ofdifferent treatment methods for patients with early breast cancer. *Eur Rev Med Pharm Sci.* 2020; 24: 12735-12740.
8. Schochter F., Friedl T.W.P., deGregorio A., et al. Are circulating tumor cells (CTCs) Ready for clinical use in breast cancer? an overview of completed and ongoing trials using CTCs for clinical treatment decisions. *Cells.* 2019; 8: 1412.-DOI: 10.3390/cells8111412.
9. Schramm A., Friedl T.W., Schochter F., et al. Therapeutic intervention based on circulating tumor cell phenotype in metastatic breast cancer: concept of the DETECT study program. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 293(2): 271-81.-DOI: 10.1007/s00404-015-3879-7.
10. Bidard F.C., Fehm T., Ignatiadis M., et al. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. *Cancer Metastasis Rev*. 2013 ;32(1-2): 179-88.-DOI: 10.1007/s10555-012-9398-0.
11. Lowes L.E., Hedley B.D., Keeney M., Allan A.L. User-defined protein marker assay development for characterization of circulating tumor cells using the CellSearch®

system. *Cytometry A*. 2012; 81(11): 983-95.-DOI: 10.1002/cyto.a.22158.

12. Scholtens T.M., Schreuder F., Ligthart S.T., et al. Automated identification of circulating tumor cells by image cytometry. *Cytometry A*. 2012; 81(2): 138-48.-DOI: 10.1002/cyto.a.22002.
13. Takao M., Takeda K. Enumeration, characterization, and collection of intact circulating tumor cells by cross contamination-free flow cytometry. *Cytometry A*. 2011; 79(2): 107-17.-DOI: 10.1002/cyto.a.21014.
14. Hristozova T., Konschak R., Budach V., Tinhofer I. A simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers. *Cytometry A*. 2012; 81(6): 489-95.-DOI: 10.1002/cyto.a.22041.
15. Watanabe M., Serizawa M., Sawada T., et al. A novel flow cytometry-based cell capture platform for the detection, capture and molecular characterization of rare tumor cells in blood. *J Transl Med*. 2014; 12: 143.-DOI: 10.1186/1479-5876-12-143.
16. Almufti R., Wilbaux M., Oza A., et al. A critical review of the analytical approaches for circulating tumor biomarker kinetics during treatment. *Ann Oncol*. 2014; 25(1): 41-56.-DOI: 10.1093/annonc/mdt382.
17. Mușină A.M., Zlei M., Mentel M., et al. Evaluation of circulating tumor cells in colorectal cancer using flow cytometry. *J Int Med Res*. 2021; 49(9): 300060520980215.-DOI: 10.1177/0300060520980215.
18. Зацаренко С.В, Гривцова Л.Ю., Мушкарина Т.Ю. Способ выявления циркулирующих в крови опухолевых клеток методом многопараметровой проточной цитометрии. Патент на изобретение RU 2825188, 21.08.2024, заявка № 2024103239 от 09.02.2024. [Zatsarenko S.V., Grivtsova L.Yu., Mushkarina T.Yu. A method for detecting tumor cells circulating in the blood by multiparameter flow cytometry. Patent for invention RU 2825188, 08/21/2024, application No. 2024103239 dated 02/09/2024 (In Rus)].
19. Nagata S. Early work on the function of CD95, an interview with Shige Nagata (англ.). *Cell Death & Differentiation journal*. 2004; 11(Suppl 1): S23-7.-DOI: 10.1038/sj.cdd.4401453.
20. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. Journal of the American Statistical Association. 1958; 53: 457-481.-DOI: 10.1080/01621459.1958.10501452.
21. Theodoropoulos P.A., Polioudaki H., Agelaki S., et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett*. 2010; 288(1): 99-106.-DOI: 10.1016/j.canlet.2009.06.027.
22. Müller V., Stahmann N., Riethdorf S., et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(10): 3678-85.-DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2469.
23. Chang K.L., Chao W.R., Han C.P. Anticytokeratin (CAM5.2) reagent identifies cytokeratins 7 and 8, not cytokeratin 18. Chest. 2014; 145(6): 1441-2.-DOI: 10.1378/chest.14-0168.
24. Sunjaya A.P., Sunjaya A.F., Tan S.T. The use of BEREP4 immunohistochemistry staining for detection of basal cell carcinoma. *J Skin Cancer*. 2017; 2017: 2692604.-DOI: 10.1155/2017/2692604.
25. Bergmann S., Coym A., Ott L., Soave A., et al. Evaluation of PD-L1 expression on circulating tumor cells (CTCs) in patients with advanced urothelial carcinoma (UC). *Oncoimmunology*. 2020; 9(1): 1738798.-DOI: 10.1080/2162402X.2020.1738798.

Поступила в редакцию / Received / 26.02.2025
Прошла рецензирование / Reviewed / 12.03.2025
Принята к печати / Accepted for publication / 20.03.2025

Сведения об авторах / Authors' Information / ORCID

Еман Абдулкадер Абдулхалим Абдо / Eman A.A. Abdo / ORCID ID: https://orcid.org/0009-0002-6631-3862.
Наталья Александровна Фалалеева / Natalia A. Falaleeva / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-0023-4216.
Людмила Юрьевна Гривцова / Luydmila Yu. Grivtsova / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-9103-9688.
Анастасия Борисовна Галицына / Anastasia B. Galitsyna / ORCID ID: https://orcid.org/0009-0009-0188-8420.
Анна Сергеевна Белохвостова / Anna S. Belokhvostova / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-4709-1726.
Александр Александрович Софийчук / Aleksandr A. Sofiochuk / ORCID ID: https://orcid.org/0009-0008-0769-1736.
Сергей Анатольевич Иванов / Sergey A. Ivanov / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-7689-6032.
Андрей Дмитриевич Каприн / Andrey D. Kaprin / ORCID ID: https://orcid.org/0000-0001-8784-8415.