

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616-006+116-006.04+577.29

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-370-384>

Поступила в редакцию 22.04.2021

Received 22.04.2021

Т. А. Позняк¹, А. Е. Гончаров¹, В. М. Абашкин¹, А. И. Становая¹,
А. В. Прохоров², Д. Г. Щербин¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ДЕТЕКЦИЯ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Аннотация. В обзоре приведено описание циркулирующих раковых стволовых клеток (цРСК) и циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в крови человека и методов их определения. цРСК являются одними из главных инициаторов рецидива онкологических заболеваний, что делает их основной мишенью для разработки новых методов лечения. ЦОК являются относительно новыми биомаркерами для ранней диагностики метастазирования, мониторинг содержания которых дает ценную информацию на всех этапах ведения онкопациентов, включая раннюю диагностику заболевания, оценку риска рецидива болезни, определение эффективности химиотерапии с возможностью последующей ее коррекции.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие раковые стволовые клетки, маркеры, клональная и иерархическая модели образования опухоли, многоцветная проточная цитофлуориметрия

Для цитирования: Циркулирующие опухолевые клетки и циркулирующие раковые стволовые клетки и их детекция методом проточной цитофлуориметрии / Т. А. Позняк [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 370–384. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-370-384>

Tatyana A. Pozniak¹, Andrei Y. Hancharou¹, Viktor M. Abashkin¹, Alesia I. Stanovaya¹,
Alexander V. Prokhorov², Dzmitry G. Shcharbin¹

¹Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

CIRCULATING TUMOR CELLS AND CIRCULATING CANCER STEM CELLS AND THEIR DETECTION BY THE METHOD OF FLOW CYTOMETRY

Abstract. This review describes the circulating cancer stem cells (CCSCs) and circulating tumor cells (CTCs). CCSCs are one of the main initiators of recurrent cancer and thus make them an important target for the development of new treatment methods. CTCs are relatively new biomarkers for the early diagnosis of metastasis. CTCs provide doctors with valuable information about each stages of cancer treatments: diagnostic of early-stage disease, early detection of recurrent cancer, the efficiency of chemotherapy, and makes it possible to select an individual sensitive drug.

The most informative and frequently used markers for the detection of CSCs and CCSCs were described. The mechanism of two models of tumor formation is considered: clonal and hierarchical. The known mechanisms of epithelial-mesenchymal transition of tumor cells are described. The most widely used specific cell surface markers for the detection and isolation of CTCs and CCSCs are described. The efficiency of a sensitive high-precision method of multicolor flow cytometry using specific fluorescent dye-labeled monoclonal antibodies for the detection of CCSCs and CTCs in the blood of cancer patients is analyzed. Detection of CTCs and CCSCs provides important information for the early diagnosis of metastasis and open a possibility to personalized treatment, and to monitoring of all stages cancers.

Keywords: circulating tumor cells, circulating cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, markers, clonal and hierarchical models of tumor formation, multicolor flow cytometry

For citation: Pozniak T. A., Hancharou A. Y., Abashkin V. M., Stanovaya A. I., Prokhorov A. V., Shcharbin D. G. Circulating tumor cells and circulating cancer stem cells and their detection by the method of flow cytometry. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 370–384 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-370-384>

Введение. Согласно статистике ВОЗ, злокачественные новообразования десятки лет занимают лидирующие позиции среди причин человеческой смертности. Так, в начале 2019 г. онкологические заболевания обогнали сердечно-сосудистые, став основной причиной смерти в развитых странах. По предварительным оценкам Международного агентства изучения рака (IARC), к 2030 г. число ежегодно регистрируемых

в мире случаев онкозаболеваний превысит 22,2 млн [1]. В то же время в лечении рака за последнее время достигнуты значительные успехи, доказательством чего служат статистические данные о существенном увеличении числа людей, проживших более 5 лет после постановки первичного диагноза. На сегодняшний день предотвратить возникновение около 30 % раковых заболеваний можно при условии исключения факторов риска (химического, физического, канцерогенного воздействия и др.) и осуществления стратегии их профилактики. А одним из главных факторов успешного лечения рака является ранняя диагностика и мониторинг всех этапов лечения, в том числе послеоперационного.

Основной причиной смерти пациентов с онкологическими заболеваниями является появление отдаленных метастазов, а также рецидивы в пораженных органах. Метастатические поражения трудно поддаются лечению, поскольку часто проявляют повышенную устойчивость к химиотерапии. Одним из главных условий эффективного выбора лечения является глубокое понимание механизмов процесса образования первичных и вторичных злокачественных опухолей, закономерностей метастазирования, возможных фенотипических изменений злокачественных раковых клеток.

Предполагается, что существует несколько моделей образования опухолей (рис. 1). Клональная (стохастическая) модель [2, 3] подразумевает, что любая опухолевая клетка способна инициировать образование опухоли, и это может происходить одновременно во многих клетках организма (рис. 1, *b*). При достижении мутациями определенного порогового значения в соматических клетках происходит злокачественное их перерождение. Каждая из клеток с мутациями при благоприятных условиях обладает потенциалом для восстановления до нормального состояния путем генетической репарации [4]. В этой модели гетерогенность опухоли объясняется геномной нестабильностью, различным уровнем и скоростью мутаций (рис. 1). Злокачественные клетки начинают различаться не только числом, но и качеством накопленных мутаций, а следовательно, и степенью их злокачественности. В результате образуются более злокачественные клоны, которые отвечают за рост опухоли. Согласно стохастической модели, излечение возможно лишь при условии гибели подавляющей части популяции опухолевых клеток, ответственных за ее прогрессирование.

Иерархическая модель (рис. 1, *a*) объясняет гетерогенность опухоли наличием пула раковых стволовых клеток (РСК), которые способны образовывать множество опухолевых клеток, ответственных за инициирование, рост и рецидив опухоли.

Первые доказательства существования РСК встречаются еще в работах Бонета [5], который обнаружил способность такой клетки инициировать острый миелоидный лейкоз человека у мышей, не страдающих такими заболеваниями, как диабет, ожирение и иммунодефицит.

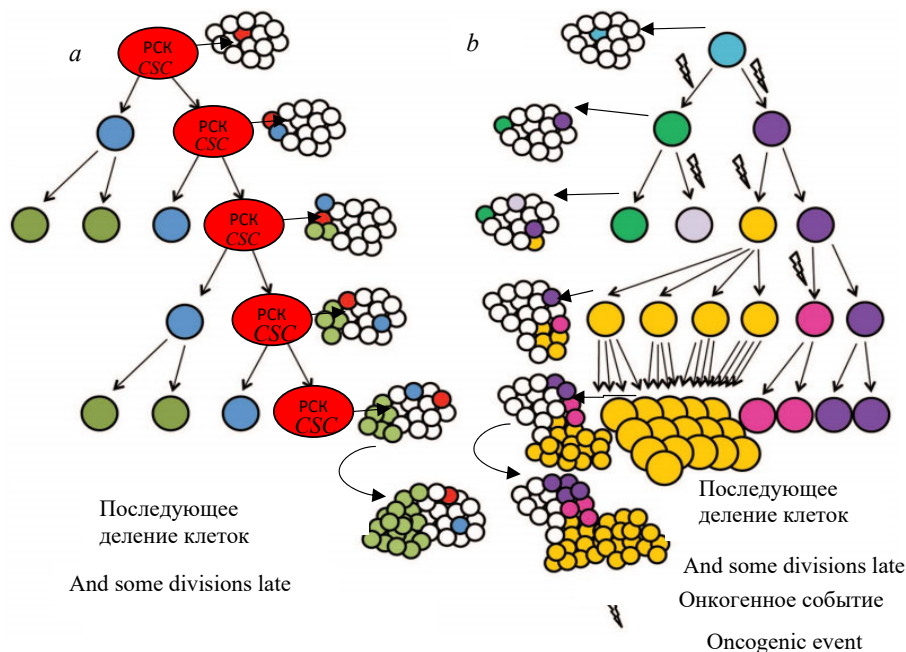


Рис. 1. Схемы возможных моделей образования опухоли: иерархическая (*a*), клональная (*b*). РСК – раковые стволовые клетки (рисунок модифицирован [3])

Fig. 1. Schemes of possible models of tumor formation: hierarchical (*a*), clonal (*b*). CSC – cancer stem cells (according to ref. [3])

Клетки, инициирующие лейкоз, обладают дифференцирующей, пролиферативной способностью и имеют потенциал для самообновления. Результаты все большего числа научных исследований подтверждают иерархическую модель большинства солидных опухолей, которая объясняет наличие пула РСК [6]. Гипотеза о наличии РСК и модель клональной эволюции не исключают друг друга. Напротив, многие авторы склоняются к версии одновременного задействования механизмов клональной и иерархической моделей [7]. Предположительно сами РСК могут подвергаться клональной эволюции с образованием более злокачественных субпопуляций, что способствует опухолевой прогрессии. Обе модели предполагают существование субпопуляции клеток с повышенной онкогенностью при образовании солидных опухолей.

Раковые стволовые клетки (*англ.* cancer stem cells (CSCs)). РСК представляют собой небольшую популяцию неопластических клеток, способных в течение продолжительного времени размножаться для поддержания инвазивной солидной опухоли или лейкоза, а также обладают способностью к самообновлению и дают начало гетерогенным линиям раковых клеток опухоли [3, 8]. Эти свойства определяют РСК как одни из главных инициаторов рецидива, что делает их важной мишенью для разработки новых методов лечения. РСК названы по аналогии с нормальными стволовыми клетками, поскольку также обладают способностью к самообновлению и дифференцировке. Они могут давать начало фенотипически отличной популяции, состоящей из злокачественно трансформированных клеток с разным потенциалом пролиферации. РСК способны к асимметричному делению, в результате которого возникает одна клетка-реплика исходной клетки и одна клетка, утратившая способность делиться асимметрично, но обладающая неконтролируемым пролиферативным потенциалом (обычно с высокой инвазивностью) и часто проявляющая признаки дифференцировки. Считается, что РСК возникают не только в результате ряда мутаций стволовых клеток, но могут происходить и из дифференцированных эпителиальных клеток в процессе их эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), приобретая миграционные и опухолевые свойства [9, 10].

Важным фактом является то, что РСК, как и опухолевые клетки, характеризуются повышенной гетерогенностью и, следовательно, образуют внутри опухоли субклоны, отличающиеся по структуре генома клеток, характеру протеома и т. п. Субклоны имеют разную злокачественность, поскольку РСК внутри опухоли оказываются в разном микроокружении и по-разному с ним взаимодействуют [11]. Одним из фенотипических отличий РСК от основного пула опухолевых клеток является экспрессия на их поверхности специфических маркеров. Для выделения или идентификации РСК при разных видах опухоли уже наработана определенная линейка маркеров (см. таблицу), наиболее известными из которых являются CD133, CD44, ALDH, CD34, CD24, EpCAM [10]. Как показывает практика, для лучшего охвата всей популяции РСК необходимо использовать не меньше двух белковых маркеров.

Наиболее значимые маркеры РСК, экспрессируемые при различных онкозаболеваниях человека

The most important CSC markers expressed in various human cancers

Онкозаболевание	РСК маркеры
Рак шейки матки	CD133 ⁺ , CD49f ⁺ , CK-17 ⁺
Рак пищевода	CD44 ⁺ , ALDH1 ⁺ , Integrin α 7 ⁺
Рак почек	CD24 ⁻ , CD44 ⁺ , CD105 ⁺ , CD133 ⁺
Рак легких	CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD133 ⁺ , ABCG2 ⁺ , ALDH ⁺
Рак толстой кишки	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , EpCAM ⁺ , ALDH ⁺
Рак печени	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH ⁺ , ABCG2 ⁺
Рак поджелудочной железы	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ABCG2 ⁺ , ALDH ⁺ , EpCAM ⁺
Рак яичников	CD44 ⁺ , CD117 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH1 ⁺
Рак простаты	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , α 2 β 1 ⁺ , ALDH ⁺
Рак области головы и шеи	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH ⁺ , CD34 ⁺
Рак молочной железы	CD24 ⁻ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH-1 ⁺
Рак желудка	CD44 ⁺ , CD133 ⁺
Глиома	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , A2B5 ⁺ , BCRP1 ⁺ , SSEA-1 ⁺
Миелоидный лейкоз: острый хронический	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD123 ⁺ CD25 ⁺ , CD26 ⁺ , CD44 ⁺ , CD93 ⁺ , IL1RAP ⁺
Меланома	ABCB5 ⁺ , CD20 ⁺
Саркома	CD29 ⁺ , CD117 ⁺ , CD133 ⁺ , Nestin ⁺ , Stro-1 ⁺

Используя панель перевиваемых линий клеток рака молочной железы (РМЖ), Филмор и Купервассер показали, что клеточные линии РМЖ действительно содержат РСК. Они также обнаружили, что комбинация маркеров CD24–(low)/CD44+(high) идентифицирует клетки с фенотипом РСК только в подгруппе клеток РМЖ и не коррелирует с онкогенностью линий клеток РМЖ с базальноклеточным фенотипом [12].

Еще одним маркером РСК служит альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1). ALDH представляет собой семейство из 19 изоферментов человека. Гинестьер и его коллеги идентифицировали активность и экспрессию ALDH1 как маркера РСК при РМЖ и показали, что CD24–(low)/CD44+(high)/ALDH1+ раковые клетки могут образовывать опухоли всего из 20 клеток [13], а высокий уровень экспрессии ALDH1 коррелирует с плохим клиническим прогнозом. ALDH1 в качестве маркера РСК широко используется не только при РМЖ, но и при других солидных опухолях, включая плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легких и др.

Одной из главных проблем на сегодняшний день является резистентность раковых клеток к известным методам лечения и их способность вызывать рецидив. Устойчивость РСК к терапевтическим агентам может быть причиной активации сигнальных путей, которые приводят к самообновлению, повышенной экспрессии мембранных переносчиков АТФ-связывающих кластеров, уклонению от реакций иммунной системы, увеличению экспрессии ABC-транспортных белков, отвечающих за выведение лекарственных препаратов [14]. В частности, при анализе сверхэкспрессии апоптотических белков при лимфоидном онкозаболевании установлено, что к выживаемости раковых клеток и РСК причастны некоторые белки, участвующие в апоптозе [15]. Рецидив онкозаболеваний происходит либо в первичном очаге, либо во вторичных органах за счет миграции РСК. Это происходит вследствие ЭМП популяции раковых клеток с приобретением фенотипических признаков, которые позволяют им ослаблять контакт между клетками и открепляться от опухолевой ткани, разрушать базальную мембрану и диссоциировать из опухолевой массы в кровеносную или лимфатическую систему. Далее они могут попадать в отдаленные органы и инициировать появление вторичной опухоли и/или метастазов. В процессе ЭМП клетки частично теряют свои маркеры адгезии и, таким образом, становятся «неуловимыми» при применении ранее используемых методов. В работе [16] авторы рассматривают ЭМП в качестве отличительного признака метастазирования, связывающего образование как ЦОК, так и клеток с фенотипами РСК.

Эпителиально-мезенхимальный переход (*англ.* epithelial-mesenchymal transition (EMT)). ЭМП – это многоступенчатый процесс, включающий молекулярные и клеточные изменения в эпителиальных клетках. Неподвижные эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип, характеризующийся повышением клеточной подвижности и способностью разрушать внеклеточный матрикс [17, 18]. Во время этого перехода происходит полное или частичное подавление активности эпителиальных адгезивных белков, например Е-кадгерина, цитокератина (СК), клаудина, окклюдина. Одновременно отмечается экспрессия белков, характерных для мезенхимальных клеток: N-кадгерина, фибронектина, виментина, тенасцина С, коллагена VI и ламинина-1 [16]. ЭМП играет важную роль при ряде физиологических и патофизиологических состояний. В зависимости от механизма ЭМП различают три типа: I – эмбриональный, II – фиброзный (или ранозаживляющий), III – онкопрогрессирующий [17, 19].

Классический ЭМП (тип I) встречается в период эмбрионального развития и постнатального роста. Индукторы ЭМП подавляют экспрессию адгезивных и контактных белков, что приводит к разрушению базальной мембраны и дальнейшему приобретению клетками миграционных свойств. Первичные мезенхимальные клетки образованы таким образом, что они имеют потенциал для последующего прохождения мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), обратного ЭМП, генерируя таким образом вторичный эпителий [20]. Образование почти всех органов у взрослых – результат одного или нескольких ЭМП, за которыми следует МЭП. Такая способность клеток называется эпителиальной пластичностью, уникальным примером чего служит постнатальное развитие молочной железы. Во время цикла развития этого органа эпителиальные клетки проходят несколько этапов пролиферации, инвазии и гибели.

ЭМП типа II (фиброзный ЭМП) вызывается травмой, что провоцирует образование фибробластов, необходимых для реконструкции поврежденных тканей [19]. В физиологических условиях фибробласты и иммунные клетки выделяют факторы воспалительного процесса (например, разные цитокины) и внеклеточные матриксные белки, которые являются стимуляторами клеток к ЭМП. Когда воспаление стихает, процесс прекращается. Патологические состояния воспаления и непрерывные ЭМП нормальных эпителиальных клеток могут привести к фиброзу и поражению органов (легких, печени, почек) [7].

Онкогенный процесс может нарушать гомеостаз в клетках и вызывать ЭМП III типа. ЭМП I и III типов очень схожи, однако последний менее упорядочен. Факт гистопатологического сходства вторичных опухолей с клетками первичной объясняется процессом МЭП, следующим после достижения клетками отдаленных органов. Имеется большое количество публикаций, описывающих переключения между ЭМП и МЭП при раке мочевого пузыря, раке яичников и колоректального рака [20], а также влияние микро-

окружения вторичного органа на способность индуцировать процесс МЭП путем возобновления экспрессии Е-кадгерина [21]. Такие ЭМП клеток, ведущие к изменению фенотипа, способствуют возникновению гибридных фенотипов, которые «накапливают» особенности обоих типов клеток [22]. Существует мнение, что для успешного метастазирования нет необходимости полного ЭМП всех клеток. Они могут морфологически оставаться дифференцированными и участвовать в метастазирующих процессах, что называется «коллективной» миграцией. Цуджи с соавт. [23] описали модель коллективной миграции при раковом заболевании, когда только «сотрудничество» между клетками ЭМП и раковыми клетками обеспечивает процесс метастазирования (рис. 2, модель В). Такая модель предполагает, что опухолевые клетки перемещаются не по отдельности, а как кластеры, в которых лишь некоторые клетки подверглись ЭМП. Эти клетки, имея инвазивный фенотип, способствуют деградации матрикса, помогая тем самым клеткам без ЭМП, с адгезивным фенотипом, проникать в локальные ткани и сосуды и прикрепляться к их стенке, создавая метастазы. Возможно, что в кластере мигрирующих клеток сосуществует много промежуточных типов клеток между эпителиальным и мезенхимальным фенотипами. Однако очевидным является наличие более чем одного клеточного механизма инвазии в ткани, что делает более трудоемким процесс исследования эпителиальных опухолей.

Циркулирующие опухолевые клетки (англ. circulating tumor cells (CTCs)). Процесс метастазирования является сложным многоступенчатым механизмом, в котором задействовано большое количество клеток и факторов, поэтому при его изучении появляются все новые и новые данные.

Известно, что метастатическое распространение опосредствуется в гетерогенной первичной опухоли редкими ЦОК, которые способны проникать в кровоток [24] и оттуда перемещаться во вторичные органы, инициируя там образование метастазов, либо снова поражать первичный орган, приводя к повышенной агрессивности опухоли. В первичной опухоли отмечается стремительный рост клеток, который вызывает нехватку кислорода, активируя ангиогенез. Кроме того, происходит подавление эпителиальных белков,

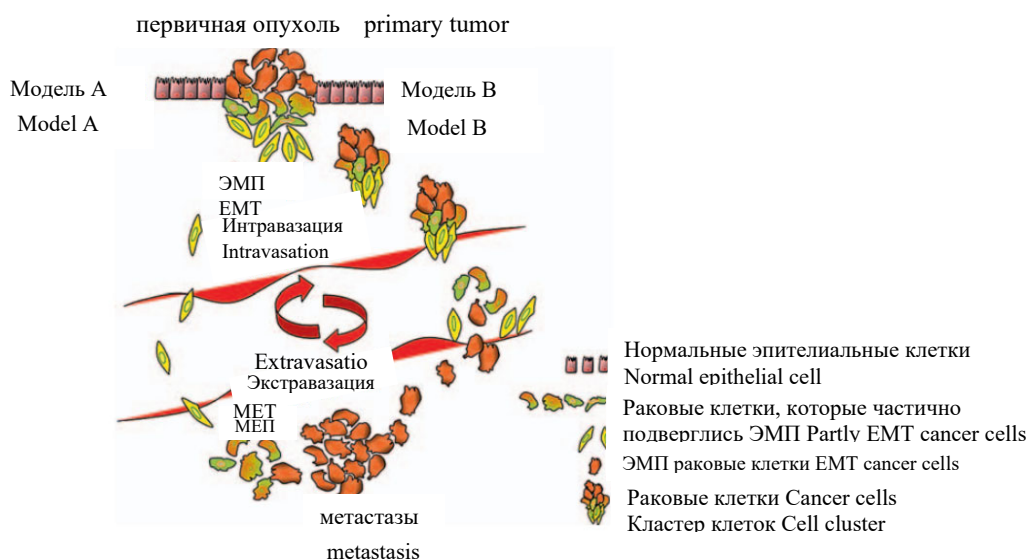


Рис. 2. Две возможные модели (А, В) метастазирования в процессе ЭМП раковых клеток. После стимуляции у опухолевых клеток происходит изменение фенотипа (либо на фенотип мезенхимальных клеток, либо на клетки с «гибридными» фенотипами) и они приобретают способность к ЭМП. Модель А: эпителиальные опухолевые клетки подвергаются процессу ЭМП, а далее уже мезенхимально-подобные раковые клетки мигрируют по кровеносной системе. Как только они достигают вторичного органа, они подвергаются МЭП и образуют метастазы [19]. Модель Б: раковые клетки мигрируют как кластеры клеток с разными фенотипами (раковые клетки, которые проходят полный и частичный ЭМП, и клетки, не относящиеся к ЭМП). Все типы клеток попадают в кровоток, но только раковые клетки, не относящиеся к EMT, способны экстравазировать и создавать метастазы [23]. (Рисунок модифицирован [16])

Fig. 2. Two possible models of cancer cell metastasis (A, B) during EMT. Two models have been proposed for EMT involvement in cancer metastasis. After stimulation, carcinoma cells activate a program of EMT and phenotypical changes occur, leading to the formation of either a pure population of highly invasive mesenchymal-like cells or sets of cell clusters with 'hybrid' phenotypes. Model A: after undergoing full EMT, mesenchymal-like cancer cells disseminate from the tumor mass and reach the circulatory system. Once they extravasate in a distant organ, they undergo MET and create metastases [19]. Model B: cancer cells disseminate and migrate as clusters of cells with different phenotypes; cancer cells that pass through full EMT lead the partial EMT and non-EMT cells. All cell types enter the circulation, but only non-EMT cancer cells are able to extravasate and create metastases [23] (according to ref. [16])

что приводит к снижению адгезии клеток и ранней инвазивности опухолевых клеток, устойчивых к апоптозу. В целом происходит смена эпителиального фенотипа клеток на мезенхимальный. После попадания в кровеносные сосуды (интравасация) ЦОК подвергаются апоптозу или циркулируют как изолированные клетки. В кровеносном русле ЦОК находятся в фазе покоя и не размножаются. Затем те ЦОК, которые не подверглись апоптозу, экстравазируются в отдаленные органы, после чего либо остаются в виде спящих одиночных клеток (диссеминированные опухолевые клетки), либо подвергаются ограниченной пролиферации с дальнейшим образованием очагов опухолевого роста (метастазов). Неконтролируемая пролиферация ЦОК приводит к формированию метастазов за счет реверсии фенотипа в процессе МЭП и ангиогенеза. Циркулирующие микроэмболы опухоли (ЦМО) представляют собой «коллективную миграцию» опухолевых клеток с высоким метастатическим потенциалом, поскольку они устойчивы к апоптозу и сохраняют способность к пролиферации. ЦМО не может экстравазировать, но способны задерживаться в капиллярах и разрастаться, разрывая стенки капилляров и инициируя образование метастазов.

Идентификация ЦОК позволяет определить один из первых этапов метастатического каскада, а также имеет большой потенциал для прогноза и мониторинга ответа на лечение онкозаболеваний. Прогностическое значение ЦОК было подтверждено у пациентов с неметастатическим РМЖ [24, 25], при метастатическом колоректальном раке, при злокачественных новообразованиях эпителия, в том числе при раке простаты [26], яичников, легких, толстого кишечника. Клетки с фенотипом ЦОК у здоровых людей либо у пациентов с незлокачественными заболеваниями встречаются крайне редко. Многочисленные исследования показали, что количественное определение ЦОК является надежным независимым прогностическим фактором общей выживаемости пациентов с ранним и метастатическим РМЖ [24, 27]. Таким образом, детекция и молекулярная характеристика ЦОК считаются ключом к ранней клинической оценке метастазирования, что дает важную информацию для своевременного выбора верного профиля терапии. Техническая задача в этой области состоит в обнаружении «редких» опухолевых клеток (всего несколько ЦОК среди примерно 10 млн лейкоцитов и 5 млрд эритроцитов в 1 мл крови) и в возможности отличить их от эпителиальных неопухолевых клеток и лейкоцитов.

По своей природе ЦОК гетерогенны и представляют собой популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло либо из первичных очагов, либо из метастазов. Часть популяции ЦОК представлена ЦРСК, часть – ЭМП клетками (находящиеся в состоянии ЭМП), а большая часть не имеют признаков ЭМП и РСК. Предполагается, что именно стволовые ЦОК и клетки, прошедшие эпителиально-мезенхимальную трансформацию, инициируют рост метастазов.

В экспериментальных моделях на мышах было показано, что всего 1 из 40 ЦОК может создать очаги метастазирования и лишь 1 из 100 таких очагов может образовать опухоль [28]. Такая «неэффективность» метастазирования является результатом апоптоза (формы программируемой клеточной смерти путем апоптоза) и объясняет низкую выживаемость ЦОК после выхода из опухолевой массы [29], а также неспособностью ранних микрометастазов в отдаленных органах стимулировать ангиогенез и продолжить рост. И одиночные клетки, и микрометастазы могут оставаться в состоянии покоя в течение многих лет и не подвергаться апоптозу.

Неоваскуляризация, индуцированная опухолью, происходит параллельно с инвазией опухолевых клеток, что обеспечивает их распространение по сосудам и может предшествовать явному разрастанию первичной опухоли в течение многих лет. Таким образом, распространение опухолевых клеток может начаться на ранних этапах онкогенеза, т. е. задолго до постановки диагноза [30]. Подтверждением этого служат результаты клинических исследований пациентов с РМЖ, раком толстой кишки и др., среди которых значительная часть (20–30 %) имели макрометастазы на момент постановки диагноза [31].

На сегодняшний день для выделения и определения ЦОК используют следующие параметры, которые отличают ЦОК от других популяций клеток: наличие специфических белков-маркеров и транскриптов генов, несколько больший размер, плотность, электрический заряд, инвазивные свойства. Наиболее эффективный и часто используемый подход для детекции и выделения ЦОК основан на применении антител против эпителиально-специфических или опухолеспецифических маркеров, присутствующих на поверхности клеток, таких как ЕpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), СК 8, 18, 19, ЕpHB4 (рецептор эфрина), EGFR (эпидермальный фактор роста), СЕА (карциноэмбриональный антиген), FGFR (рецептор фактора роста фибробластов), HER2, эпителиальный муцин (MUC1 и MUC2), эпителиальный фактор роста 2 (Her2/neu), маммоглобин и др. [32]. Каждый из них имеет как преимущества, так и недостатки.

Наиболее часто применяемым маркером для обнаружения и выделения ЦОК является ЕpCAM [33]. Впервые ЕpCAM был обнаружен на эпителиальных клетках карциномы. Установлено также, что он экспрессируется на большинстве первичных и метастатических опухолей. При использовании этого маркера ЦОК в количестве больше 2 клеток на 7,5 мл крови были обнаружены у пациентов с метастатическим

РМЖ [34], метастатическим раком толстой кишки и раком простаты в 70, 60 и 70,8 % случаев соответственно [35]. Во многих работах по изучению различных видов солидных опухолей была подтверждена информативность ЕрСАМ и доказано, что он является исключительным маркером отбора для выделения ЦОК. Однако следует учитывать, что при ЭМП экспрессия ЕрСАМ может подавляться, а наиболее инвазивные опухолевые клетки при этом не детектируются. Более того, экспрессия данного маркера варьируется в зависимости от типа опухоли. Наблюдается сильная экспрессия ЕрСАМ при РМЖ, раке легких, толстой кишки, предстательной железы, тогда как он не обнаруживается при мезенхимальных раковых образованиях (саркоме, лимфоме и нейрогенных опухолях).

Среди разработанных многочисленных методов выделения ЦОК система CellSearch® (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, США) на сегодняшний день является единственной платформой, которая одобрена FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) для клинического использования при раке груди, толстой кишки и простаты [36]. Первый этап данного метода – иммуномагнитное обогащение с использованием антител против молекулы ЕрСАМ, второй – окрашивание выделенных клеток специфическими флуоресцентными конъюгатами антител против CD45 и СК 8, 18, 19. На следующем этапе образец сканируется на анализаторе. В этой системе ЦОК определяются как ядродержащие клетки, лишенные лейкоцитарного маркера CD45, так и экспрессирующие СК.

Однако платформа CellSearch® имеет некоторые недостатки, что связано с использованием маркера эпителиальности клеток ЕрСАМ. Есть вероятность ложноположительных результатов, поскольку эпителиальные неопухолевые клетки могут циркулировать в крови также во время воспаления, регенерации органов, при повреждении ткани (например, после хирургических вмешательств, биопсии). Данная система может давать и ложноотрицательные результаты в случае ЭМП, что ведет к потере эпителиальных и СК-маркеров и экспрессии новых мезенхимальных маркеров, в частности виментина, N-кадгерина [16]. После установления факта изменения эпителиальных маркеров на мезенхимальные после химиотерапии группой ученых сделано предположение, что причиной химиорезистентности является ЭМП [37]. Также известно, что более агрессивные СК-отрицательные ЦОК появляются после ЭМП или нейроэндокринной дифференциации [38]. Однако эти клетки не выделяются системой CellSearch®. Кроме того, наиболее злокачественные циркулирующие мезенхимальные и стволовые опухолевые клетки не обнаруживаются этой системой.

Анализ полученных результатов методом CellSearch® показывает, что ЦОК обнаруживается лишь у 40–50 % пациентов с диссеминированными карциномами и не детектируется при других видах опухолей [39]. Например, большое количество ЦОК (ЕрСАМ+) часто обнаруживается в образцах крови пациентов с РМЖ, раком простаты и мелкоклеточным раком легкого. И наоборот, низкое количество ЦОК у пациентов с панкреатическим, колоректальным и немелкоклеточным раком легкого [40]. Это объясняется тем, что во время диссеминации для преодоления интравазации и образования вторичных опухолей в эпителиальных опухолевых клетках изменяется паттерн экспрессии ЕрСАМ. Обнаружено, что наиболее злокачественные ЦОК теряют эпителиальные маркеры, что показано в работе Sieuwerts, где широко используемый маркер ЕрСАМ, экспрессия которого наблюдается в 60–100 % случаев РМЖ, не распознается на клетках РМЖ, характеризующегося агрессивным поведением [41]. Runnouse в своих исследованиях показал, что клеточные линии с низким уровнем экспрессии ЕрСАМ проявляют и низкую экспрессию других эпителиальных маркеров – СК 8, 18 и 19 или Е-кадгерина и высокую экспрессию виментина [42]. Кроме того, иногда наблюдаются снижение межклеточной адгезии и потеря апикально-базолатеральной полярности. В связи с этим при использовании только маркеров ЕрСАМ и СК иногда невозможно обнаружить ЦОК [43]. С учетом перечисленных проблем, которые встречаются на сегодняшний день при детекции ЦОК системой CellSearch, очевидно, что этот вопрос требует дальнейшего исследования и расширения линейки специфических маркеров.

Кроме системы CellSearch® существуют и другие методы количественного определения и выделения ЦОК, основанные на применении ЕрСАМ как маркера: MagSweeper (иммуномагнитный метод), GILPUI CellCollector® (выделение ЦОК *in vivo* из вены руки с помощью нанопроволоки), IsoFlux® (использование покрытых антителами к ЕрСАМ магнитных микрофлюидных шариков) и др. Однако все эти методы по-прежнему требуют аналитической и клинической проверки, поскольку на сегодняшний день ни один из них не получил одобрения FDA.

Существует также независимый от ЕрСАМ метод выделения ЦОК, основанный на физических характеристиках клеток – ISET® (изоляция эпителиальных опухолевых клеток по размеру). Принцип действия этого метода заключается в фильтрации крови через специальный фильтр ISET® с порами размером 8 мкм, задерживающий опухолевые клетки, которые намного крупнее лейкоцитов (24 мкм и более).

Одним из подходов, устраняющим недостатки системы CellSearch®, является использование дополнительных к ЕрСАМ маркеров ЦОК. Так, например, разработана методика выделения ЦОК из образцов

крови онкопациентов с использованием индивидуальных магнитных микрочастиц, конъюгированных с антителами к EpCAM и EGFR [44]. Комбинация этих двух маркеров показала оптимальную комплементарность для эффективного охвата различных фенотипов опухолевых клеток. Авторами установлено, что общее количество ЦОК в 68,18 % исследованных образцов было выше по сравнению с числом клеток, обнаруженных с помощью метода CellSearch®. Этот новый подход устраняет недостаток использования только маркера EpCAM и охватывает широкий спектр фенотипов, включая мезенхимальные клетки.

EGFR принадлежит к семейству рецепторов тирозинкиназ HER/ErbB, отвечающих за регулирование сигнальных путей во время роста, выживания и подвижности клеток. Активация EGFR нарушает межклеточную адгезию вследствие дестабилизации комплекса E-кадгерин/ β -катенин, способствует ЭМП и приобретению подвижного фенотипа. Функция EGFR часто нарушается при эпителиальных опухолях, а передача сигналов через EGFR играет важную роль как при прогрессировании рака, так и при ЭМП. Однако чувствительность данного маркера невысока.

Еще одним маркером, используемым для детекции ЦОК, является EphB4 (рецептор эфрина) – представитель рецепторных протеинкиназ, активность которого повышается при некоторых видах рака. Этот комплекс лиганд с рецептором опосредствует передачу сигнала межклеточного контакта и является регулятором миграции клеток и формирования тканевого паттерна, которые часто используются раковыми клетками при прогрессировании опухоли. Сверхэкспрессия EphB4 наблюдается при раке головы и шеи [45], раке желудка, РМЖ и др. При этом у здоровых доноров не обнаружена экспрессия данного маркера. Однако поскольку этот маркер присутствует и на неопухолевых эпителиальных клетках, он может давать ложноположительные результаты.

Недавно был разработан метод детекции ЦОК у пациентов с немелкоклеточной карциномой легких с применением технологий ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени [46]. Была изучена вероятность содержания внеклеточной РНК в периферической крови как потенциального биомаркера для обнаружения ЦОК у онкологических больных путем определения уровня экспрессии мРНК генов *CK7*, *EphB4*, *EGFR*, *ELF3*. Авторы показали, что экспрессия *CK7* и *EphB4* в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) коррелирует с возрастом и гистопатологическим типом соответственно. Экспрессия *CK7* и *ELF3* в опухолевых тканях и *EGFR* в МКПК была связана с метастазами в лимфатических узлах. Экспрессия всех четырех генов в опухолевых тканях и МКПК достоверно коррелировала с клинической стадией. Анализ выживаемости показал, что пациенты с повышенной экспрессией мРНК генов *CK7*, *ELF3*, *EGFR* и *EphB4* в МКПК имели более низкую безрецидивную и общую выживаемость. Таким образом, исследование показало, что изменение содержания внеклеточной РНК в периферической крови может иметь важное клиническое значение для диагностики и лечения пациентов с немелкоклеточной карциномой легких.

Маркер HER2 – мембранный белок, тирозиновая протеинкиназа семейства рецепторов эпидермального фактора роста EGFR/ErbB. Амплификация или повышенная экспрессия гена этого белка играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов РМЖ, а также является важным биомаркером и терапевтической мишенью этого вида рака. В настоящее время определение данной молекулы широко используется для иммунохимической диагностики и таргетной терапии РМЖ. Однако при использовании его для детекции ЦОК HER2 зарекомендовал себя хуже, чем EpCAM. Из 66 пациентов с прогрессирующим РМЖ у 40 были EpCAM-положительные ЦОК, из которых лишь 15 имели HER2+ статус [47]. Чен с соавт. [48] для детекции HER2-позитивных клеток ЦОК в цельной крови использовали систему LiquidBiopsy. HER2 были обнаружены на всех стадиях РМЖ, включая раннюю, но уровень обнаружения был выше при метастатическом процессе. Анализ экспрессии HER2 используется при РМЖ и является эффективной терапевтической мишенью для лечения РМЖ, а также может быть применен в комплексе с другими маркерами для подсчета ЦОК.

MUC-1 – мембранный белок, протеогликан из группы муцинов. Синтезируется апикальной поверхностью эпителиальных клеток и обеспечивает их защиту от бактерий и ферментов. Экспрессия данного белка значительно повышена в большинстве карцином, что способствует снижению адгезивных свойств клетки и, следовательно, их миграции. Результаты исследования показали, что пациенты с MUC-1+ метастатической аденокарциномой поджелудочной железы ЦОК имели более короткую медианную общую выживаемость по сравнению с пациентами с MUC-1-отрицательными ЦОК [49]. Высокая экспрессия MUC-1 наблюдалась также при эпителиальных опухолях яичников и метастатическом РМЖ, аденокарциноме поджелудочной железы, колоректальном раковом образовании, раке простаты [50]. Однако MUC-1 не является специфическим маркером опухолевых клеток, он экспрессируется также на нормальных и доброкачественных клетках РМЖ, что приводит к ложноположительным результатам.

Исследования показали, что хирургические вмешательства инициируют массовый выброс опухолевых клеток в кровотоки [51], а дальнейшее снижение ЦОК до исходного уровня после операции происходит

за счет процессов апоптоза и повторного метастазирования во вторичные органы [52]. Обнаружение одной клетки ЦОК в 1 мл крови является клинически важным и означает, что в организме присутствуют 5000 ЦОК. Количественные определения ЦОК в цельной крови больных раком легких до базовой терапии и после первого курса (при использовании технологии ISET) показали отрицательную корреляцию количества этих клеток с продолжительностью жизни без прогрессирования болезни и общей выживаемостью [53]. Кроме того, по результатам многих клинических исследований, при РМЖ отмечается положительная корреляция между количеством ЦОК и снижением свободной прогрессии и общей выживаемостью при операбельной болезни до и после химиотерапии [53].

Поскольку ЦОК можно получать повторно неинвазивным способом, их можно использовать для исследования и подбора оптимальной терапии, наблюдая за их количественным изменением. Результаты исследований показали снижение количества ЦОК у онкопациентов после начала эффективной терапии рака груди, простаты, колоректального и других видов рака [36, 54, 55], что свидетельствует о применимости этого маркера при изучении ответа на лечение. Кроме того, исследование молекулярных характеристик ЦОК является перспективным, поскольку может стать инструментом для изучения молекулярной эволюции опухолевых клеток в процессе курса лечения, что особенно важно для мониторинга развития лекарственной устойчивости.

Определение ЦОК, как и других циркулирующих опухолевых маркеров, обладает явными преимуществами перед биопсией ткани за счет простоты сбора материала и возможности серийной оценки. Кроме того, наблюдение за изменением молекулярного профиля ЦОК в процессе лечения может служить инструментом фармакодинамического мониторинга, способствующим лучшему пониманию причин резистентности применяемой терапии [36]. Обнаружено, что ЦОК могут генетически отличаться от первичной опухоли, от которой они происходят, и эти различия могут влиять на реакцию организма пациента на терапию, которую назначают, основываясь лишь на первичной характеристике опухоли. Следовательно, ЦОК можно рассматривать как «жидкую биопсию», предоставляющую прогностическую и прогностически-клиническую информацию [24].

На сегодняшний день неизвестны поверхностные или внутриклеточные маркеры для 100 %-ной детекции ЦОК у онкобольных. Это связано с геномной нестабильностью злокачественных клеток, которая приводит к гетерогенности популяции ЦОК. Линейка ЦОК-специфических маркеров в будущем может быть дополнена мезенхимальными маркерами и маркерами стволовости, однако для эффективного подбора подобных антигенов необходимо проведение дополнительных исследований. Таким образом, одним из способов преодоления трудностей количественного определения ЦОК является одновременное использование нескольких маркеров, что дает возможность наибольшего охвата популяции ЦОК.

Многоцветная проточная цитофлуориметрия (*англ.* multicolor flow cytometry). Многоцветная проточная цитометрия (МПЦ) – чувствительный высокоточный мультиинформативный метод, позволяющий идентифицировать и охарактеризовать любую клеточную субпопуляцию среди десятков тысяч клеток не только благодаря ее морфологическим особенностям, но и за счет отслеживания уровня экспрессии белков, что дает возможность диагностики множества заболеваний и мониторинга их лечения [56].

Метод МПЦ основан на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции отдельных клеток. В проточной камере прибора суспензия анализируемых клеток попадает в поток обжимающей жидкости так, что клетки выстраиваются в очередь и проходят через лазерный луч. Рассеивание света и флуоресценция от каждого события регистрируются при помощи разных детекторов. Информация от детекторов представляется в наглядной форме, что дает возможность разделить клетки на отдельные популяции, отличающиеся друг от друга по заданным параметрам.

Для многопараметрового исследования клеток образца используют одновременно несколько флуорохромов с разными длинами волн испускания и эмиссии. Современные цитофлуориметры содержат минимум 3 лазера и не менее 10 каналов детекции (фильтров) для анализа испускаемого свечения. Такой подход существенно экономит время, расход образца и при этом дает широкую линейку результатов. Использование в современной практике специфических моноклональных антител (монАТ), меченных флуорохромами, позволяет проводить как качественный, так и количественный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов. Флуоресцентный сигнал появляется в случае связывания монАТ, меченного флуорохромным красителем, со специфической белковой структурой клетки. В настоящее время в клинической практике можно использовать одновременно до 12 меченых антител в одной пробирке [57], что дает возможность контролировать функциональное состояние многих клеточных популяций.

Преимущество метода состоит также в высокой производительности, возможности анализа большого массива клеток, высокой точности и чувствительности при одновременном анализе порядка 30 параметров флуоресценции.

Учитывая широкие возможности метода проточной цитофлуориметрии, ученые уже десятки лет успешно применяют его для иммунофенотипирования лейкоцитов и диагностики лимфопролиферативных заболеваний [58, 59]. Использование данного метода позволяет наиболее точно детектировать гетерогенные клеточные популяции и редкие события (одиночные клетки), т. е. встречающиеся с частотой 10^{-5} – 10^{-7} , и охарактеризовать их одновременно по нескольким фенотипическим признакам, подобрав нужную линейку специфических флуорохром-меченых моноклональных антител. Так, применение МПЦ позволяет обнаруживать минимальную остаточную болезнь с чувствительностью от 10^{-5} до 10^{-6} [60]. Метод проточной цитофлуориметрии является наиболее точным, быстрым и удобным для количественного определения минимальной остаточной болезни и выявления ЦОК в крови пациентов с онкозаболеваниями и часто используется в медицинской практике [58, 59]. Lianyuan Tao с соавт. [58] применяли этот метод для обнаружения ЦОК в крови с целью прогнозирования послеоперационных метастазов у пациентов с новообразованиями поджелудочной железы, проведя анализ 39 образцов крови. Также Юшэн Лу с соавт. [59] с помощью данного метода в комплексе с отрицательной иммуномагнитной сепарацией по CD45 детектировали ЦОК в крови пациентов с колоректальной карциномой. Авторами установлено, что количество ЦОК положительно коррелирует со стадией онкозаболевания пациента, является надежным предиктором общей выживаемости и имеет решающее значение для принятия клинических решений.

На основе метода проточной цитофлуориметрии в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси разработан метод определения содержания циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови у пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями эпителиальной природы. Для детекции ЦОК в качестве основного маркера использовали ЕрСАМ (CD326). Лейкоциты и другие клетки гемопоэтического происхождения идентифицировали при помощи панлейкоцитарного маркера CD45. В качестве интеркалирующего красителя для исключения мертвых клеток применяли To-Pro3. Конгломераты клеток выявляли путем гейтирования событий на цитограмме SSC-H против SSC-A.

Данный метод успешно используется в комплексе медицинских услуг для ранней диагностики процессов метастазирования и контроля лечения пациентов, страдающими онкозаболеваниями [61].

Заключение. В настоящее время применение современных подходов и методов лечения онкопациентов часто приводит к полной ремиссии. Однако у части таких пациентов в конечном итоге случаются рецидивы, что объясняется тем, что при использовании методов диагностики, основанных лишь на морфологической оценке клеточной популяции, не удается обнаружить остаточное количество опухолевых клеток после терапии [60]. МПЦ в сочетании с молекулярными и цитогенетическими исследованиями является наиболее часто используемым методом диагностики минимальной остаточной болезни.

Что касается злокачественных новообразований эпителиальной природы, то определение циркулирующих опухолевых и раковых стволовых клеток методом многоцветной проточной цитофлуориметрии позволяет провести раннюю диагностику процессов метастазирования, а также мониторинг и коррекцию всех этапов этого процесса.

Список использованных источников

1. Рак (онкологические заболевания) [Electronic resource] // Zdrav. Expert. – Mode of access: [http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_\(онкологические_заболевания\)](http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_(онкологические_заболевания)). – Date of access: 14.03.2021.
2. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in *BRAF*-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406) / S. Kopetz [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 35, N 4. – P. 285–294. <https://doi.org/10.1200/jco.20.01994>
3. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? / A. Antoniou [et al.] // Cell Cycle. – 2013. – Vol. 12, N 24. – P. 3743–3748. <https://doi.org/10.4161/cc.27305>
4. Understanding the cancer stem cell / S. Bomken [et al.] // Br. J. Cancer. – 2010. – Vol. 103, N 4. – P. 439–445. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605821>
5. Bonnet, D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell / D. Bonnet, J. E. Dick // Nat. Med. – 1997. – Vol. 3, N 7. – P. 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
6. Eun, K. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting / K. Eun, S. W. Ham, H. Kim // BMB Rep. – 2017. – Vol. 50, N 3. – P. 117–125. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.222>
7. Lang, F. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia / F. Lang, B. Wojcik, M. A. Rieger // Stem Cells Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/137164>
8. Visvader, J. E. Cancer stem cells: current status and evolving complexities / J. E. Visvader, G. J. Lindeman // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 10, N 6. – P. 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
9. Hollier, B. G. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies / B. G. Hollier, K. Evans, S. A. Mani // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. – 2009. – Vol. 14, N 1. – P. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9110-3>
10. Молекулярные маркеры раковых стволовых клеток, верифицированные *in vivo* / Я. С. Ким [и др.] // Биомед. химия. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 228–238.

11. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells and their microenvironment / H. R. Sun [et al.] // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9, N 9. – P. 1104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01104>
12. Fillmore, C. M. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that selfrenew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy / C. M. Fillmore, C. Kuperwasser // *Breast Cancer Res.* – 2008. – Vol. 10, N 2. – Art. R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
13. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome / C. Ginestier [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2007. – Vol. 1, N 5. – P. 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
14. Begicevic, R. R. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance / R. R. Begicevic, M. Falasca // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
15. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
16. Książkiewicz, M. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells / M. Książkiewicz, A. Markiewicz, A. J. Zaczek // *Pathobiology.* – 2012. – Vol. 79, N 4. – P. 195–208. <https://doi.org/10.1159/000337106>
17. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells / A. Bonnomet [et al.] // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* – 2010. – Vol. 15, N 2. – P. 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9174-0>
18. Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells / R. Kalluri // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 6. – P. 1417–1419. <https://doi.org/10.1172/jci39675>
19. Kalluri, R. The basics of epithelial-mesenchymal transition / R. Kalluri, R. A. Weinberg // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 6. – P. 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/jci39104>
20. Chaffer, C. L. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease / C. L. Chaffer, E. W. Thompson, E. D. Williams // *Cells Tissues Organs.* – 2007. – Vol. 185, N 1–3. – P. 7–19. <https://doi.org/10.1159/000101298>
21. Chao, Y. L. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition / Y. L. Chao, C. R. Shepard, A. Wells // *Mol. Cancer.* – 2010. – Vol. 9, N 1. – Art. 179. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
22. Klymkowsky, M. W. Epithelialmesenchymal transition: a cancer researcher’s conceptual friend and foe / M. W. Klymkowsky, P. Savagner // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 174, N 5. – P. 1588–1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
23. Tsuji, T. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis / T. Tsuji, S. Ibaragi, G. F. Hu // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 18. – P. 7135–7139. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1618>
24. Hall, C. Circulating tumor cells in breast cancer patients / C. Hall, L. Valad, A. Lucci // *Crit. Rev. Oncog.* – 2016. – Vol. 21, N 1–2. – P. 125–139. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2016016120>
25. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) при раке молочной железы: прогностическая значимость и методы выделения / Д. А. Зубцов [и др.] // *Тр. МФТИ.* – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 18–26.
26. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data / H. I. Scher // *Lancet Oncol.* – 2009. – Vol. 10, N 3. – P. 233–239. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70340-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70340-1)
27. Bidard, F. C. Circulating tumor cells in breast cancer / F. C. Bidard, C. Proudhon, J. Y. Pierga // *Mol. Oncol.* – 2016. – Vol. 10, N 3. – P. 418–430. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.001>
28. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases / K. J. Luzzi [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 153, N 3. – P. 865–873. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65628-3)
29. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells / O. Berezovskaya [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 6. – P. 2378–2386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2649>
30. Gray, J. W. / Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors / J. W. Gray // *Cancer Cell.* – 2003. – Vol. 4, N 1. – P. 4–6. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00167-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00167-3)
31. Spread of human cancer cells occurs with probabilities indicative of a nongenetic mechanism / J. S. Michaelson [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 93, N 11. – P. 1244–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602848>
32. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells / T. Fehm [et al.] // *Cytotherapy.* – 2005. – Vol. 7, N 2. – P. 171–185. <https://doi.org/10.1080/14653240510027082>
33. Man, Y. Currently Used markers for CTC isolation – advantages, limitations and impact on cancer prognosis / Y. Man, Q. Wang, W. Kemmner // *J. Clin. Exp. Pathol.* – 2011. – Vol. 1, N 1. – Art. 102. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000102>
34. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system / S. Riethdorf [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 3. – P. 920–928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1695>
35. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages / L. M. Maestro [et al.] // *Anticancer Res.* – 2009. – Vol. 29, N 11. – P. 4839–4843.
36. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents / J. Tol [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2010. – Vol. 21, N 5. – P. 1006–1012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp463>
37. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance / K. R. Fischer [et al.] // *Nature.* – 2015. – Vol. 527, N 7579. – P. 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>
38. The initial detection and partial characterization of circulating tumor cells in neuroendocrine prostate cancer / H. Beltran [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, N 6. – P. 1510–1519. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0137>

39. Lianidou, E. S. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer / E. S. Lianidou, A. Markou // Clin. Chem. Lab. Med. – 2011. – Vol. 49, N 10. – P. 1579–1590. <https://doi.org/10.1515/ccm.2011.628>
40. Eslami, S. Z. Circulating tumor cells: moving forward into clinical applications / S. Z. Eslami, L. E. Cortés-Hernández, C. Alix-Panabières // Precis Cancer Med. March. – 2020. – Vol. 3, N 4. – P. 781–791. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31377345/>
41. Antiepitheial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normallike breast tumor cells / A. M. Sieuwerts [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2009. – Vol. 101, N 1. – P. 61–66. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn419>
42. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells / E. A. Punnoose [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, N 9. – P. e12517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012517>
43. Detection of EpCAM negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood / S. D. Mikolajczyk [et al.] // J. Oncol. – 2011. – Vol. 2011. – P. 252361. <https://doi.org/10.1155/2011/252361>
44. EGFR-based immunoisolation as a recovery target for low-EpCAM CTC subpopulation / A. Vila [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 10. – P. e0163705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163705>
45. Long term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma / S. C. Winter [et al.] // BMC Cancer. – 2009. – Vol. 9, N 1. – Art. 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-424>
46. Cell-free RNA content in peripheral blood as potential biomarkers for detecting circulating tumor cells in non-small cell lung carcinoma / X. M. Yu [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17, N 11. – P. 1845. <https://doi.org/10.3390/ijms17111845>
47. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients / M. Pestrin [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. – 2009. – Vol. 118, N 3. – P. 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0461-7>
48. Detection of HER2-positive circulating tumor cells using the LiquidBiopsy System in breast cancer / W. Chen [et al.] // Clin. Breast Cancer. – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.10.009>
49. Prognostic significance of MUC-1 in circulating tumor cells in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma / E. Dotan [et al.] // Pancreas. – 2016. – Vol. 45, N 8. – P. 1131–1135. <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000000619>
50. MUC1-positive circulating tumor cells and MUC1 protein predict chemotherapeutic efficacy in the treatment of metastatic breast cancer / J.-P. Cheng [et al.] // J. Cancer. – 2011. – Vol. 30, N 1. – P. 54–61. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10239>
51. Influence of surgical manipulation and surgical modality on the molecular detection of circulating tumor cells from colorectal cancer / Soo Yeun Park [et al.] // J. Korean Surg. Soc. – 2012. – Vol. 82, N 6. – P. 356–364. <https://doi.org/10.4174/jkss.2012.82.6.356>
52. Circulating tumour cells: molecular properties and anti-cancer treatment monitoring / A. Baigenzhin [et al.] // J. Clin. Med. Kazakhstan. – 2013. – Vol. 4, N 30. – P. 9–13.
53. Paterlini-Brechot, P. // Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions / P. Paterlini-Brechot, N. L. Benali // Cancer Lett. – 2007. – Vol. 253, N 2. – P. 180–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.014>
54. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study / J. Sastre [et al.] // Oncologist. – 2012. – Vol. 17, N 7. – P. 947–955. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0048>
55. Paoletti, C. Circulating tumor cells / C. Paoletti, D. F. Hayes // Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer / ed. V. Stearns. – Cham, 2016. – Vol. 882. – P. 235–258. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22909-6_10
56. Gwatkin, R. B. L. Practical flow cytometry, by H. M. Shapiro, Wiley-Liss, New York, 3rd ed., 1994, 542 p. / R. B. L. Gwatkin // Mol. Rep. Dev. – 1995. – Vol. 41, N 4. – P. 540. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410419>
57. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population / A. Rajab [et al.] // Int. J. Lab. Hematol. – 2017. – Vol. 39, suppl. 1. – P. 76–85. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12678>
58. Postoperative metastasis prediction based on portal vein circulating tumor cells detected by flow cytometry in periampullary or pancreatic cancer / L. Tao [et al.] // Cancer Manag. Res. – 2019. – Vol. 11. – P. 7405–7425. <https://doi.org/10.2147/cmar.s210332>
59. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry / Y. Lu [et al.] // Cancer. – 2015. – Vol. 121, N 17. – P. 3036–3045 <https://doi.org/10.1002/cncr.29444>
60. Xu, J. How do we use multicolor flow cytometry to detect minimal residual disease in acute myeloid leukemia? / J. Xu, J. L. Jorgensen, S. A. Wang // Clin. Lab. Med. – 2017. – Vol. 37, N 4. – P. 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2017.07.004>
61. Способ определения циркулирующих опухолевых клеток : пат. BY 23371 / А. Е. Гончаров, О. В. Тимохина. – Опубл. 30.04.2021.

References

1. Cancer (oncological diseases). *Zdrav. Expert*. Available at: [http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_\(онкологические_заболевания\)](http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_(онкологические_заболевания)) (accessed 14.03.2021).
2. Kopetz S., Guthrie K. A., Morris V. K., Lenz H.-J., Magliocco A. M., Maru D. [et al.]. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in *BRAF*-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *Journal of Clinical Oncology*, 2017, vol. 35, no. 4, pp. 285–294. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01994>
3. Antoniou A., Hebrant A., Dom G., Dumont J., Maenhaut C. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 24, pp. 3743–3748. <https://doi.org/10.4161/cc.27305>
4. Bomken S., Fišer K., Heidenreich O., Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. *British Journal of Cancer*, 2010, vol. 103, no. 4, pp. 439–445. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605821>

5. Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 1997, vol. 3, no. 7, pp. 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm.0797-730>
6. Eun K., Ham S. W., Kim H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Reports*, 2017, vol. 50, no. 3, pp. 117–125. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.222>
7. Lang F., Wojcik B., Rieger M. A. Stem cell hierarchy and clonal evolution in acute lymphoblastic leukemia. *Stem Cells International*, 2015, vol. 2015, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/137164>
8. Visvader J. E., Lindeman G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 10, no. 6, pp. 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
17. Mani S. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, vol. 133, pp. 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
9. Hollier B. G., Evans K., Mani S. A. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9110-3>
10. Kim Ya. S., Kaidina A. M., Chang Yu. Kh., Yarygin K. N., Lupatov A. Yu. Molecular markers of cancer stem cells verified *in vivo*. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical chemistry], 2016, vol. 62, no. 3, pp. 228–238 (in Russian).
11. Sun H., Wang S., Yan S., Zhang Yu., Nelson P., Jia H., Qin L., Dong Q. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells and their microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 2019, vol. 9, no. 9, p. 1104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01104>
12. Fillmore C. M., Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that selfrenew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research*, 2008, vol. 10, no. 2, art. R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
13. Ginestier C., Hur M., Charafe-Jauffret E., Birnbaum D., Wicha M., Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007, vol. 1, no. 5, pp. 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
14. Begicevic R. R., Falasca M. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, p. 2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
15. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, no. 5, pp. 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
16. Książkiewicz M., Markiewicz A., Zaczek A. J. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology*, 2012, vol. 79, no. 4, pp. 195–208. <https://doi.org/10.1159/000337106>
17. Bonnomet A., Brysse A., Tachsidis A., Waltham M., Thompson E., Polette M., Gilles C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2010, vol. 15, no. 2, pp. 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9174-0>
18. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, vol. 119, no. 6, pp. 1417–1419. <https://doi.org/10.1172/jci39675>
19. Kalluri R., Weinberg R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/jci39104>
20. Chaffer C. L., Thompson E. W., Williams E. D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*, 2007, vol. 185, no. 1–3, pp. 7–19. <https://doi.org/10.1159/000101298>
21. Chao Y. L., Shepard C. R., Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer*, 2010, vol. 9, art. 179. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
22. Klymkowsky M. W., Savagner P. Epithelialmesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *American Journal of Pathology*, 2009, vol. 174, no. 5, pp. 1588–1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
23. Tsuji T., Ibaragi S., Hu G. F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Research*, 2009, vol. 69, no. 18, pp. 7135–7139. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1618>
24. Hall C., Valad L., Lucci A. Circulating tumor cells in breast cancer patients. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 2016, vol. 21, no. 1–2, pp. 125–139. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2016016120>
25. Zubtsov D. A., Zubtsova Zh. I., Lavrov A. V., Legchenko E. V., Aladinskii V. A., Poteryakhina A. V., Gol'dshtein D. V. Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: prognostic significance and methods for isolation. *Trudy MFTI. Trudy Moskovskogo fiziko-tekhnicheskogo instituta (natsional'nogo issledovatel'skogo universiteta)* [Proceedings of MIPT. Proceedings of the Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)], 2012, vol. 4, no. 3, pp. 18–26 (in Russian).
26. Scher H. I. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncology*, 2009, vol. 10, no. 3, pp. 233–239. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70340-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70340-1)
27. Bidard F. C., Proudhon C., Pierga J. Y. Circulating tumor cells in breast cancer. *Molecular Oncology*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 418–430. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.001>
28. Luzzi K., MacDonald I., Schmidt E., Morris V., Chambers A. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*, 1998, vol. 153, no. 3, pp. 865–873. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65628-3)
29. Berezovskaya O., Schimmer A. D., Glinskii A. B., Pinilla C., Hoffman R. M., Reed J. C., Glinsky G. V. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Research*, 2005, vol. 65, no. 6, pp. 2378–2386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2649>

30. Gray J. W. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*, 2003, vol. 4, no. 6, pp. 4–6. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00167-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00167-3)
31. Michaelson J. S., Cheongsatmoy J. A., Dewey F., Silverstein M. J., Sgroi D., Smith B., Tanabe K. K. Spread of human cancer cells occurs with probabilities indicative of a nongenetic mechanism. *British Journal of Cancer*, 2005, vol. 93, no. 11, pp. 1244–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602848>
32. Fehm T., Solomayer E. F., Meng S., Tucker T., Lane N., Wang J., Gebauer G. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*, 2005, vol. 7, no. 2, pp. 171–185. <https://doi.org/10.1080/14653240510027082>
33. Man Y., Wang Q., Kemmner W. Currently Used Markers for CTC Isolation – Advantages, Limitations and Impact on Cancer Prognosis. *Journal of Clinic and Experimental Pathology*, 2011, vol. 1, no. 1, art. 102. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000102>
34. Riethdorf S., Fritsche H., Müller V., Rau T., Schindlbeck C., Rack B. [et al.]. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical Cancer Research*, 2007, vol. 13, no. 3, pp. 920–928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1695>
35. Maestro L., Sastre J., Rafael S., Vezanones S., Vidaurreta M., Martín M. [et al.]. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Research*, 2009, vol. 29, no. 11, pp. 4839–4843. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20032444/>
36. Tol J., Koopman M. C., Miller M. C., Tibbe A., Cats A., Creemers G. J. M., Vos A. H., Nagtegaal I. D., Terstappen L. W. M. M., Punt C. J. A. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Annals of Oncology*, 2010, vol. 21, no. 5, pp. 1006–1012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp463>
37. Fischer K., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S. [et al.]. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 2015, vol. 527, no. 7579, pp. 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>
38. Beltran H., Jendrisak A., Landers M., Mosquera J., Kossa M., Louw J. [et al.]. The initial detection and partial characterization of circulating tumor cells in neuroendocrine prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 2016, vol. 22, no. 6, pp. 1510–1519. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0137>
39. Lianidou E. S., Markou A. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, vol. 49, no. 10, pp. 1579–1590. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.628>
40. Eslami S. Z., Cortés-Hernández L. E., Alix-Panabières C. Circulating tumor cells: moving forward into clinical applications. *Precision Cancer Medicine*, 2020, vol. 3, no. 4, pp. 781–791. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.07.008>
41. Sieuwerts A. M., Kraan J., Bolt J., van der Spoel P., Elstrodt F., Schutte M., Martens J. W. M., Gratama J. W., Sleijfer S., Foekens J. A. Antiepitheial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normallike breast tumor cells. *Journal of the Nature Cancer Institute*, 2009, vol. 101, no. 1, pp. 61–66. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn419>
42. Punnoose E. A., Atwal S. K., Spoerke J. M., Savage H., Pandita A., Yeh R. [et al.]. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5, no. 9, p. e12517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012517>
43. Mikolajczyk S. D., Millar L. S., Tsinberg P., Coutts S. M., Zomorodi M., Pham T., Bischoff F. Z., Pircher T. J. Detection of EpCAM negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood. *Journal of Oncology*, 2011, vol. 2011, pp. 252–361. <https://doi.org/10.1155/2011/252361>
44. Vila A., Abal M., Muinelo-Romay L., Rodriguez-Abreu C., Rivas J., López-López R., Costa C. EGFR-based immunoisolation as a recovery target for Low-EpCAM CTC subpopulation. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 10, p. e0163705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163705>
45. Winter S. A., Stephenson S. A., Subramaniam S. K., Paleri V., Ha K., Marnane C., Krishnan S., Rees G. Long-term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2009, vol. 9, no. 1, art. 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-424>
46. Yu X. M., Yi-Chen Wu, Xiang Liu, Xian-Cong Huang, Xiu-Xiu Hou, Jiu-Li Wang, Xiang-Liu Cheng, Wei-Min Mao, Zhi-Qiang Ling. Cell-free RNA content in peripheral blood as potential biomarkers for detecting circulating tumor cells in non-small cell lung carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 11, p. 1845. <https://doi.org/10.3390/ijms17111845>
47. Pestrin M., Bessi S., Galardi F., Truglia M., Biggeri A., Biagioni C., Cappadona S., Biganzoli L., Giannini A., Di Leo A. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009, vol. 118, no. 3, pp. 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0461-7>
48. Chen W., Zhang J., Huang L., Chen L., Zhou Y., Tang D., Xie Y., Wang H., Huang C. Detection of HER2-positive circulating tumor cells using the LiquidBiopsy System in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.10.009>
49. Dotan E., Alpaugh K., Ruth K., Negin B. P., Denlinger C. S., Hall M. J., Astsaturov I., McAleer, C., Fittipaldi P., Thrash-Bingham C., Meropol N., Cohen S. J. *Pancreas*, 2016, vol. 45, no. 8, pp. 1131–1135. <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000000619>
50. Cheng J.-P., Yan Y., Wang X.-Y., Lu Y.-L., Lu Y.-L., Jia J., Ren J. MUC1-positive circulating tumor cells and MUC1 protein predict chemotherapeutic efficacy in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Communications*, 2011, vol. 30, no. 1, pp. 54–61. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10239>
51. Park S. Y., Choi G. S., Park J. S., Kim H. J., Ryuk J. P., Choi W. H. Influence of surgical manipulation and surgical modality on the molecular detection of circulating tumor cells from colorectal cancer. *Journal of Korean Surgical Society*, 2012, vol. 82, no. 6, pp. 356–364. <https://doi.org/10.4174/jkss.2012.82.6.356>

52. Baigenzhin A., Shaimardanova G., Popova N., Zhussipova B., Ismailova G. Circulating tumour cells: molecular properties and anti-cancer treatment monitoring. *Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan*, 2013, vol. 4, no. 30, pp. 9–13.
53. Paterlini-Brechot P., Benali N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Letters*, 2007, vol. 253, no. 2, pp. 180–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.014>
54. Sastre J., Maestro M. L., Gómez-España A., Rivera F., Valladares M., Massuti B. [et al.]. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist*, 2012, vol. 17, no. 7, pp. 947–955. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0048>
55. Paoletti C., Hayes D. F. Circulating tumor cells. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer. Vol. 882*. Cham, 2016, pp. 235–258.
56. Gwatkin R. B. L. Practical flow cytometry, by H. M. Shapiro, Wiley-Liss, New York, 3rd ed., 1994, 542 p. *Molecular Reproduction and Development*, 1995, vol. 41, no. 4, p. 530. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410419>
57. Rajab A., Axler O., Leung J., Wozniak M., Porwit A. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2017, vol. 39, suppl. 1, pp. 76–85. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12678>
58. Tao L., Su L., Yuan C., Ma Z., Zhang L., Bo S., Niu Y., Lu S., Xiu D. Postoperative metastasis prediction based on portal vein circulating tumor cells detected by flow cytometry in periampullary or pancreatic cancer. *Cancer Management and Research*, 2019, vol. 11, pp. 7405–7425. <https://doi.org/10.2147/cmar.s210332>
59. Lu Y., Liang H., Yu T., Xie J., Chen S., Dong H. [et al.]. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry. *Cancer*, 2015, vol. 121, no. 17, pp. 3036–3045. <https://doi.org/10.1002/cncr.29444>
60. Xu J., Jorgensen J. L., Wang S. A. How do we use multicolor flow cytometry to detect minimal residual disease in acute myeloid leukemia? *Clinics in Laboratory Medicine*, 2017, vol. 37, no. 4, pp. 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.07.004>
61. Goncharov A. E., Timokhina O. B. *Method for determining circulating tumor cells. Patent BY 23371, 2021* (in Russian).

Информация об авторах

Позняк Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatyana.pozniak@gmail.com

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Абашкин Виктор Михайлович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: viktar.abashkin@gmail.com

Становая Аlesia Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alesiastanovaya@gmail.com

Прохоров Александр Викторович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aprokharau@gmail.com

Шербин Дмитрий Григорьевич – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shcharbin@gmail.com

Information about the authors

Tatyana A. Pozniak – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatyana.pozniak@gmail.com

Andrei E. Hancharou – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Viktar M. Abashkin – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: viktar.abashkin@gmail.com

Alesia I. Stanovaya – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alesiastanovaya@gmail.com

Alexander V. Prokhorov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aprokharau@gmail.com

Dmitry G. Shcharbin – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shcharbin@gmail.com