

Материал поступил в редакцию: 25-12-2013

Принят к печати: 25-12-2013

УДК 616-006

Circulating tumour cells: molecular properties and anti-cancer treatment monitoring

Abay Baigenzhin¹, Galiya Shaimardanova², Nadezhda Popova³, Bakhit Zhussipova⁴, Gulziya Ismailova⁵.

¹ General Director of the «National Scientific Medical Research Center» JSC,

² Head of the path-morphological department the NSMRC

³ Head of the central research laboratory the NSMRC

⁴ Head of the Chemotherapy unit, the Oncology clinic Astana

⁵ Secretary of Academic Council the NSMRC

Existence of circulating tumor cells (CTCs) in blood of cancer patients, testifies about a dissemination of cancer cells to the peripheral blood stream, on the earliest stages of cancer development and very often testifies to an adverse clinical current, especially it is connected with formation of metastases. Besides, these cells can represent the minimum residual disease and quantitative monitoring of CTCs level in time of anti-cancer treatment provides researchers with valuable information. For today the role of epithelial-to-mesenchymal transit (EMT) and mesenchymal-to-epithelial transit (MET) in formation of various subpopulations CTCs, in expansion of cancer aggressive properties. In this article we want to prove the purpose and problems of our scientific research - the cytological molecular analysis of circulating tumour cells have isolated by the size dependent ISET technology (Isolation by size of epithelial tumor cells). To study the cyto-morphological and immunological characteristic, to identify targeted therapy markers and the metastatic response predictors to anti-cancer treatment on viable circulating cancer cells by the RT-PCR method (real-time polymerase chained action). To study of clinical profit from quantitative, immunological and molecular monitoring of CTCs, for elimination minimum residual disease, by application of individual targeted therapy, on the basis cytological molecular analysis of CTCs.

Key words: cell, cancer, cyto-immunology, targeted therapy, chemotherapy

J Clin Med Kaz 2013;4(30):9-13

Автор для корреспонденции: Исмаилова Гульзия Нуртазаевна. Ученый секретарь АО ННМЦ, 00001, Астана, пр. Абылай-хана, 42. к.м.н.. +7 701 822 81 88, dr.ismailova@mail.ru

ТАРАЛУШЫ ОБЫР ЖАСУШАЛАРЫ: ОБЫРДЫҢ МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ ЖӘНЕ ЕМДЕУ МОНИТОРИНГІ

Байгенжин А.К.¹, Шаймарданова Г.М.², Попова Н.В.³, Жүсіпова Б.Т.⁴, Исмаилова Г.Н.⁵

¹ «ҰҒМО» АҚ Бас директоры,

² «ҰҒМО» АҚ патоморфология бөлімінің жетекшісі,

³ «ҰҒМО» АҚ орталық ғылыми-зерттеу зертханасының жетекшісі,

⁴ Астана қаласы онкологиялық диспансерінің химиотерапия бөлімінің жетекшісі

⁵ «ҰҒМО» АҚ ғылыми хатшысы

Обыр ауруына шалдыққан науқастың қанында, обыр дамуының бастапқы ерте кезеңінде, circulating tumour cells (CTC) - таралушы обыр жасушаларының болуы ісік жасушаларының шеткері орналасқан қан жүретін арнасына таралғанының куәсі және бұл аурудың көбіне жағымсыз клиникалық ағымының белгісі, әсіресе бұл метастаздың пайда болуына байланысты. Сонымен қатар, жасалған ем барысында CTC аурудың ең төменгі деңгейін көрсетуі мүмкін және CTC деңгейінің сандық мониторингі зерттеушілерді маңызды ақпаратпен қамтамасыз етеді. Бүгінгі күні, обырдың агрессиялық қасиеттері мен өміршеңдігін арттырушы, CTC әртүрлі субпопуляциясы құрылуға эпителиалдың мезенхималды транзитке (ЭМТ) және мезенхималдың эпителиалды транзитке (МЭТ) деген ролі белсенді зерттелуде. Осы мақалада біз клиникалық зерттеуіміздің мақсатын – CTC цитологиялық молекулалық талдауын, бөлектенген, ISET (Isolation by size of epithelial tumor cells) тәуелді технологиясы мөлшеріне негіздегіміз келеді. Бөлектенген өміршең обыр жасушаларында олардың цитоморфологиялық және иммунологиялық

сипаттамаларын зерттеу, сонымен қатар таргентті терапияның CTC маркерлерін және RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) тәсілімен емдеуге метастатикалық жауап предикторларымен сәйкестендіру. Жеке таргентті емді қолдану және CTC анализдері негізінде химиотерапияны уақытында түзету арқылы аурудың болмашы қалдықтарын жою үшін сандық, иммунологиялық және CTC молекулярлық мониторингінің клиникалық пайдасын зерттеу.

Маңызды сөздер: жасуша, обыр, молекулярлық сипаттама

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ КЛЕТКИ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МОНИТОРИНГ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Байгенжин А.К.¹, Шаймарданова Г.М.², Попова Н.В.³, Жүсіпова Б.Т.⁴, Исмаилова Г.Н.⁵

¹ Генеральный директор АО «ННМЦ»,

² Руководитель отдела патоморфологии АО «ННМЦ»,

³ Руководитель центральной научно-исследовательской лаборатории АО «ННМЦ»,

⁴ Заведующая отделением химиотерапии, Онкологического диспансера Астаны

⁵ Ученый секретарь АО «ННМЦ»

Наличие циркулирующих раковых клеток – circulating tumour cells (CTC) в крови больных раком, свидетельствует о диссеминации опухолевых клеток в периферическое кровеносное русло, уже на самых ранних стадиях развития рака. Очень часто уровень CTC свидетельствует о неблагоприятном клиническом течении, особенно это связано с формированием метастазов. Кроме того, CTC могут представлять собой минимальную остаточную болезнь, и количественный мониторинг за уровнем CTC в процессе проводимого лечения обеспечивает исследователей ценной информацией. На сегодня активно изучается роль эпителиального-к-мезенхимальному транзиту (ЭМТ) и мезенхимального-к-эпителиальному транзиту (МЭТ) в формировании различных субпопуляций CTC, в расширение агрессивных свойств и живучести рака. В этой статье мы обсудим значение циркулирующих раковых клеток и цитологического молекулярного анализа CTC, изолированных, размер-зависимой технологией ISET (Isolation by size of epithelial tumor cells). Изучение на изолированных жизнеспособных раковых клетках, их цито-морфологической и иммунологической характеристик, а также идентификация по CTC маркерам таргетной терапии и предикторов метастатического ответа на лечение, методами RT-PCR (real-time polymerase chain reaction), мониторинг CTC позволяют устранить минимальную остаточную болезнь, путем применения индивидуальной таргетной терапии и своевременной коррекции химиотерапии на основе CTC анализа.

Ключевые слова: клетка, рак, цито-иммунология, таргетная терапия, химиотерапия

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ КЛЕТКИ (СТС) И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ МИКРОЭМБОЛЫ (СТМ)

Впервые о существовании CTC в 1869 было опубликовано в отчете французского патологоанатома Ashworth. Большинство смертельных случаев от рака связаны с распространением клеток опухоли в отдаленные органы вследствие гематогенного метастатического распространения. Предполагают, что CTC в кровотоке представляют собой депозит опухолевых клеток сброшенных в кровеносное русло, из первичного ракового очага начиная на ранней стадии рака с размером ракового очага менее 1 мм или во время хирургического вмешательства [8].

В среднем в 1 мл крови присутствует 10 миллионов лейкоцитов и 5 миллиардов эритроцитов. Обнаружение 1 единственной CTC в 1 мл крови, является клинически важным и означает, что 5000 CTC присутствуют в циркуляции. Уровень 50 и более CTC в 10 мл крови идентифицированных технологией ISET у значительной части больных раком легкого показало, значительно более короткую общую выживаемость и выживаемостью без болезни [10].

Что происходит с раковыми клетками после того как они попадают в кровоток? На этот вопрос пытались ответить многие ученые в пре-клинических испытаниях с разными животными, с разными раковыми клетками и радиоизотопами. Результаты приблизительно одинаковые. В случае, когда использовали смесь разных раковых клеток с относительно невысоким метастатическим потенциалом 85% радиоактивно меченных CTC сразу после введения подвергались апоптозу, всего 15% CTC с высоким метастатическим потенциалом сформировали колонии во вторичных органах. В случае, когда использовали смесь раковых клеток с относительно высоким метастатическим потенциалом, 85% CTC выжили в течение первых 24 часов и формировали колонии

в легких. В эксперименте выявили значение супрессии апоптоза в выживании раковых клеток, а также метастатического потенциала раковых клеток и первых 24-48 часов и формировании ими колоний. Раковые клетки без высокого метастатического потенциала, выжившие в кровотоке в течение первых 24 часов, в результате супрессии апоптоза в дальнейшем обретают высокий метастатический потенциал и формируют колонии во вторичных местах [13].

Пациенты с метастатическим повреждением имеют большую вероятность, обнаружить CTC в цельной крови. Изучение кластеров CTC или циркулирующих раковых микроэмболов (СТМ) в крови больных раком может обеспечить большим пониманием процесса метастазирования рака. Кластеры CTC в крови у пациентов с метастатическим раком, имеют большие размеры и состоят максимум из 14 CTC в пределах одного кластера, и имеют изменчивую цито-морфологическую характеристику. Имеется предположения, что кластеры CTC, отрываются от опухолевой массы, а также они могут быть результатом внутрисосудистой пролиферации опухолевых клеток. Несмотря на все последние исследования в этой области, механизм формирования кластеров CTC или СТМ и их вклад в формирование метастазов еще до конца не ясен. Это углубленное понимание метастатического процесса крайне важно, поскольку 90% больных раком умирают от метастатической болезни [3,10,11,12].

Современный принцип стадирования рака главным образом основаны на диссеминации опухоли, вовлеченности метастатических узлов и отдаленных метастазов, подтвержденных технологиями визуализации. Однако, устоявшиеся методы стадирования не достаточно чувствительны для отражения самого процесса диссемина-

ции опухолевых клеток, основного механизма прогрессирования рака [1].

Технологии обнаружения циркулирующих раковых клеток.

На сегодня известно около пятидесяти технологий, для захвата CTC из периферической крови. Большинство из них, являются молекула-зависимыми технологиями, которые позволяют выполнить *in vitro* захват CTC, на основе специфичной молекулярной особенности, на поверхности раковой клетки или секреции скрытых или активных специфичных белковых маркеров и др.

Одна из наиболее распространенных технологий захвата CTC на основе EpCAM молекулы (молекулы адгезии эпителиальной клетки) - система CellSearch (Veridex). Система CellSearch единственная технология, одобрена Американским Управлением по контролю, за продуктами и лекарствами (FDA) для *in vitro* диагностики и последующего контроля метастатической болезни в цельной крови. Для контроля метастатического рака молочной железы (2004), метастатического рака ободочной и прямой кишки (2007) и метастатического рака простаты (2008).

Количество CTC больше чем > 5 клеток в 7.5 мл цельной крови до базовой терапии или после первого курса продолжающегося лечения являются прогностическим маркером, который прогнозируют более короткую выживаемость без прогрессирования болезни и более короткую общую выживаемость. Снижение числа CTC меньше чем < 5 клеток в 7.5 мл цельной крови после базовой терапии и до первого курса продолжающегося лечения связано с более длительной выживаемостью без прогрессирования болезни и более длительной общей выживаемостью. Кроме того, было отмечено, что количество CTC больше чем > 5 клеток в 7.5 мл цельной крови предсказывают неблагоприятный прогноз у пациентов с раком груди и раком простаты, и больше чем > 3 клеток прогнозируют более короткую выживаемость без прогрессирования болезни и общую выживаемость при метастатическом раке ободочной и прямой кишки [15].

В нашем проекте мы используем не автоматизированную технологию ISET, которая позволяет изолировать CTC по размеру через вакуумную фильтрацию. Технология мягко отделяет жизнеспособные CTC, пригодные для дальнейшего молекулярного исследования [10,13].

Для выполнения анализа необходимо собрать 10 мл периферической крови в буферную среду, при температуре 4°C, исследование необходимо выполнить в течение 1.5 часов. Фильтрационное устройство состоит из 10 ячеек для фильтрации и позволяет загрузить и отфильтровать 10 мл крови по 1 миллилитру крови на 1 ячейку параллельно. Фильтрация крови проводится через поликарбонатный фильтр с откалиброванным размером пор $8 \mu\text{m}$. Мембрана промывается фосфатно-основным буфером, отделяется от фильтрационного устройства и высушивается на воздухе. На спотах мембраны выполняют цито-морфологический, цитоиммунологический, а также молекулярный анализы. Споты окрашиваются модифицированным методом May-Grünwald-Giemsa [10,13].

Не-гематологические эпителиальные опухолевые

клетки или CTC, с характерными малигнизированными особенностями должны иметь, четыре положительных критерия из следующих: анизонуклеоз (отношение > 0.5), ядро больше, чем трижды калиброванный размер пор ($8 \mu\text{m}$) (то есть $> 24 \mu\text{m}$), ненормальность ядра, присутствие tridimensional sheets клеток, и высокое ядерно/цитоплазматическое соотношение. По данным *V.J.Hofmanu др.*, большинство больных раком имеют количество опухолевых клеток с признаками малигнизации более чем 100 клеток в 10 мл крови, или от 10 до 100 клеток, и только у единичных больных количество этих клеток было меньше 10 в 10 мл крови [13].

В целом, технологии захвата CTC по их молекулярной принадлежности нуждаются в тщательном клиническом тестировании, для стандартного применения в клинической практике. Система CellSearch не учитывает способность CTC на фоне проводимой химиотерапии проходить ЭМТ/МЭТ и избавляться от EpCAM молекулы и тем самым становится не доступной для захвата молекула зависимой технологией CellSearch.

Использование технологии ISET является актуальной на сегодняшний день, так как все молекула зависимые технологии, захватывают только отдельную субпопуляцию CTC, с учетом их молекулярной характеристики. Кроме того, молекула-зависимые технологии, не позволяют идентифицировать CTC и маркеры таргетной терапии, которые очень важны для подбора лечения.

Идентификация молекулярной характеристики циркулирующих раковых клеток

Спектр молекулярной характеристики рака очень обширный, количество молекулярных маркеров давно перевалил за сотню. Ориентировочно, все молекулярные маркеры ученые США предлагают разделять на три основные группы: таргетные маркеры устойчивых молекулярных изменений рака, на которые разработаны таргетные препараты, прогностические маркеры – это маркеры, по которым можно делать прогноз исхода заболевания и выживания, а также предикторные маркера – это маркеры, по которым можно предсказать ответ на то или иное лечение рака [17]. Такое распределение необходимо, как считают ученые, так как очень часто в литературе сами ученые путают прогностические и предикторные значения маркеров.

В основном все технологии обнаружения CTC ориентированы на EpCAM молекулу раковых клеток, есть также технологии обнаружения раковых клеток со стволовыми свойствами. Исследования показали, что технология CTC-чипа на микро-постах, покрытых антителами против EpCAM, не обеспечивает достаточным количеством CTC и чистоту исследования [6]. Хотя, устройства NB-Chip второго поколения позволяет обнаружить CTC у 93% пациентов с метастатическим раком предстательной железы в среднем 63 CTC/мл, [11] у которых, имеют место мезенхимальный или гибридный фенотипы раковых клеток без EpCAM молекулы.

Испытание на CTC-чипе, посредством SARMS позволило идентифицировать EGFR мутацию на CTC-чипах у 94% пациентов и у 39% в образцах плазмы. *Maheswaran, S. и др.* в предварительном исследовании показали, что молекулярный анализ CTC, более чувствительный - 92%, чем анализ по свободной плазмен-

ной ДНК с 33% чувствительностью ($P=0.009$) [6].

На сегодня очевидно, что цитологический молекулярный подбор таргетных препаратов по молекулярной характеристике СТС самый чувствительный, специфичный и точный метод, но отсутствие недорогой, простой и быстрой технологий затрудняет применение этого подхода в широкой клинической практике. Прямой способ определения молекулярной характеристики СТС по клеточным останкам – по сводной ДНК и РНК обладают низкой чувствительностью, так в сводной циркуляции матричные ДНК и РНК являются не стабильными в процессе апоптоза или *in vivo* распада, кроме того время необходимое на *in vitro* обработку материала приводит к дальнейшему распаду матричного ДНК и РНК. Известно, что резистентность к апоптозу в зависимости от степени агрессивности рака, метастатический потенциал раковых клеток определяют уровень свободной ДНК и РНК.

Maheswaran S. и др. подтверждают очевидную необходимость подбора таргетной терапии по молекулярной характеристике СТС в реальном времени, но на сегодня с высокой точностью можно выполнить по этапным способом: выделив живую раковую клетку, извлечь из нее ДНК или РНК, в последующем подвергнув их различным молекулярным исследованиям. Отсутствие технологий обладающих высокой специфичностью и чувствительностью делают необходимый молекуляр-

ный подбор таргетных препаратов в реальном времени затратным и сложным [6].

В клинических рекомендациях ESMO основную причину рецидива рака видят в оставшихся живых раковых клетках. Эксперты ESMO оправдывают применение новых методов лечения рака в клинической практике, если они позволяют к увеличению любого из показателей выживаемости больных раком [18,19,20].

Songdong Meng и др., предполагают, что СТМ в виде стабильного уровня единичных СТС, наблюдается при дорментном раке, спустя несколько десятилетий после мастэктомии, при отсутствии метастазов и клинических проявлений рецидива рака. Баланс СТС остается стабильным, не смотря на активный апоптоз и короткий период полу-жизни раковых клеток в 1,5-2,4 часа. Предполагают, что существует некий механизм репликации СТС в пред-метастатических нишах и циркулирующие раковые клетки в кровотоке являются копиями раковых клеток пред-метастатических ниш [16].

P. Paterlini-Bréchetand, P. Hofman и др. продемонстрировали, что ALK статус можно определить по СТС, изолированных от пациентов с раком легкого иммуно-цитохимическим методом, FISH исследованием не-инвазивно без вреда для пациента, предварительно проверив статуса гена обычным методом. Новый путь необходим для мониторинга в реальном времени для подбора таргетной терапии [14].

МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Способность СТС благодаря ЭМТ оставаться в живых в ходе проводимой химиотерапии может обеспечить информацией о неадекватности проводимой терапии, позволяя модифицировать лечебную стратегию и указать, когда и какую альтернативную терапию следует применить [10].

Ранее выполненные прогностические исследования были сфокусированы на клиническом результате и первоначального уровня СТС, их корреляция с ответом на лечение. Захват СТС микро-флюидным устройством показал, что число СТС у пациентов с раком легкого и простаты быстро снижается после эффективной химиотерапии, гормональной терапии и таргетного ингибирования тирозин киназой. Выявлено что, дополнительные мутации могут появиться во время прогрессирования опухоли после химиотерапии, такие мутации могут быть связаны с лекарством-индуцированными изменениями в популяции опухолевых клеток, подтверждая гипотезу клонового отбора во время лечения [6,7].

Тестирование химиотерапии-индуцированных изменений количества СТС может обеспечить понимание эффективности лечения прогрессирующих раковых образований. Однако, известно, что экспрессия эпителиальных маркеров: ЕрСАМ или цитокератинов СК 19 иСК 20, необходимых для захвата СТС, могут быть утеряны раковыми клетками в ЭМТ во время неадекватной химиотерапии, как один из механизмов выживания раковых клеток. Поэтому, видимое снижение уровня раковых клеток после проведенной химиотерапии, может быть ложно-отрицательным, в результате ошибочной интерпретации сниженного захвата СТС, как элиминация СТС/ДТС [2,10].

Мониторинг химиотерапии-индуцированных изменений количества СТС могут обеспечить пониманием эффективности лечения прогрессирующих раковых образований контроль числа СТС после хирургической резекции первичного рака позволяет идентифицировать случаи, возможного риска развития рецидива рака. Молекулярный анализ раково-эмбрионального антигена (СЕА) и СК 20 в брыжеечной венозной крови у пациентов с колоректальным раком имеет прогностическое значение. Молекулярный анализ периферической крови, во время хирургии предполагает гематогенную диссеминацию опухолевых клеток связанную с увеличенным выбросом СТС в циркуляцию во время хирургии. Выявлено, что эпителиальные клетки с СК 19-экспрессией, выбрасываются в циркуляцию из первичного очага во время операции по резекции немелкоклеточного рака легкого [4,5]. Выявлено влияние хирургических манипуляций на уровень СТС и на их диссеминацию во время хирургической резекции первичного очага колоректального рака. Предполагают, что хирургическая манипуляция играет важную роль в процессах, вовлеченных в отделение первичных раковых клеток и их выброс в систему циркуляции. Хотя *Soo Yeun Park и др.* не нашли значимой разницы во влияние хирургических тактик: резекции с открытым доступом и классической эндохирургической иммобилизацией рака на уровень СТС [9]. Имело место одинаковое повышение уровня раковых клеток сразу после резекции и иммобилизации и снижение до исходного уровня после завершения операции. Эти данные свидетельствуют, что хирургические манипуляции способствуют массивному выбросу раковых клеток в кровоток. Снижение СТС до исходно-

го уровня после операции, с учетом знаний результатов пре-клинических испытаний, это можно объяснить с активным апоптозом в течение первых 24 часов и формированием пред-метастатических ниш во вторичных местах в зависимости от иммунологической и молекулярной характеристик CTC.

Таким образом, современное лечение рака требует развития новых лечебных и диагностических тактик, нацеленных на раннюю диагностику, применения робота-хирургии и альтернативных подходов удаления опухоли: HIFU, стереотоксическая радиохирurgia и

др., различных лечебно-диагностических модификаций таргетной радионуклеидной терапии, своевременного применения анти-метастатического лечения на основе полимодальной терапии рака, а также нового молекулярного подбора таргетных препаратов для снижения уровня оставшихся живых раковых клеток в организме больного. Успешное применение новых подходов лечения рака нуждается в адекватном и эффективном мониторинге методами идентификации и характеристики CTC/CTM.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alix-Panabieres C, Muller V, Pantel K. // Current status in human breast cancer micrometastasis. // *Curr. Opin. Oncol.* 2007;19, 558–563.
2. Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K. // Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. // *Clin. Cancer Res.* 2008;14, 5013–5021.
3. Eccles SA, Welch DR. // Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. // *Lancet* 2007;369, 1742–1757.
4. Ge MJ, Shi D, Wu QC, Wang M, Li LB. // Observation of circulating tumour cells in patients with non-small cell lung cancer by real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction in peroperative period. // *J. Cancer Res Clin Oncol.* 2006; Apr; 132(4):248-56.
5. Kazuya Yamaguchi, Yukihiro Takagi, Shinichiro Aoki, Manabu Futamura, and Shigetoyo Saji // Significant Detection of Circulating Cancer Cells in the Blood by Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction During Colorectal Cancer Resection // *Ann Surg.* 2000; July; 232(1): 58–65.
6. Maheswaran, S., L.V. Sequist, S. Nagrath, L. Ulkus, B. Brannigan, C.V. Collura, E. Inerra, S. Diederichs, A.J. Iafrate, D.W. Bell, et al. // Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. // *N. Engl. J. Med.* 2008. 359:366–377.
7. Nagrath, S., L.V. Sequist, S. Maheswaran, D.W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M.R. Smith, E.L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, et al. // Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. // *Nature.* 2007.450:1235–1239.
8. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. // Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. // *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8, 329–340.
9. SooYeun Park, Gyu-Seog Choi, Jun Seok Park, Hye Jin Kim, Jong-PilRyuk, and Whon-Ho Choi // Influence of surgical manipulation and surgical modality on the molecular detection of circulating tumor cells from colorectal cancer // *J Korean Surg Soc.* 2012 June; 82(6): 356–364.
10. Paterlini-Brechot P, Benali NL. // Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. // *Cancer Lett.* 2007; 253, 180–204.
11. Stott, S.L., C.H. Hsu, D.I. Tsukrov, M. Yu, D.T. Miyamoto, B.A. Waltman, S.M. Rothenberg, A.M. Shah, M.E. Smas, G.K. Korir, et al. // Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010b. 107:18392–18397.
12. Vogel I, Kalthoff H. // Disseminated tumour cells. Their detection and significance for prognosis of gastrointestinal and pancreatic carcinomas. // *Virchows Arch.* 2001; 439, 109–117.
13. V.J.Hofman, M.I.Ilie, Ch.Bonnetaud, E.Selva, E.Long, Th.Molina, J.M.Vignaud, J.F.Flejou, S.Lantuejoul, E.Piaton, C.Butori, N.Mourad, M.Poudenx, Ph.Bahadoran, S.Sibon, N.Guevara, J.Santini, N.Venissac, J.Mouroux, Ph.Vielh, and P.M.Hofman // Cytopathologic Detection of Circulating Tumor Cells Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method // *Am J Clin Pathol* 2011; 135:146-156
14. M. Ilie, E. Long, C. Butori, V. Hofman, C. Coelle, V. Mauro, K. Zahaf, C.H. Marquette, J. Mouroux, P. Paterlini-Brechot & P. Hofman. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma *Annals of Oncology* 0: 1–7, 2012.
15. *National Medical Policy* // Circulating Tumor Cells // Policy Number: NMP 513 // Effective Date: June 2012.
16. Songdong Meng, Debasish Tripathy, Eugene P. Frenkel, et al. Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. American Association for Cancer Research, Vol. 10, 8152–8162, December 15, 2004.
17. *National Medical Policy* // Molecular Tumor Markers for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) // Policy Number: NMP206 // Effective Date: November 2010 // Update: September 2011.
18. S. Aebi, T. Davidson, G. Gruber & F. Cardoso On behalf of the ESMO Guidelines Working Group clinical practice uidelines // Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Annals of Oncology* 22 (Supplement 6): vi12–vi24, 2011.
19. E. Van Cutsem, B. Nordlinger & A. Cervantes On behalf of the ESMO Guidelines Working Group clinical practice guidelines // Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment// *Annals of Oncology* 21 (Supplement 5): v93–v97, 2010.
20. A. Horwich, C. Parker, C. Bangma & V. Kataja On behalf of the ESMO Guidelines Working Group // Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Annals of Oncology* 21 (Supplement 5): v129–v133, 2010.