

## **Раздел – обзоры, лекции**

### **Биомаркеры при метастазах в кости рака молочной железы: современные направления разработки и поиска с целью индивидуализации подходов в лечении**

Большакова С.А., Бычков Ю.М.

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, Москва 117997,  
Профсоюзная, 86

#### **Информация об авторах**

**Бычков Юрий Маркович** – к.м.н., заведующий дневным стационаром, e-mail:  
bychkovy@rambler.ru

**Большакова Светлана Алексеевна** – к.м.н., с.н.с. лаборатории лучевой терапии и комплексных методов лечения онкологических заболеваний

#### **Контактное лицо**

**Большакова Светлана Алексеевна**, e-mail: bolshakovasvetlana@rambler.ru

#### **Резюме**

Кости являются наиболее частым местом метастазирования большинства солидных опухолей (особенно рака молочной железы и рака предстательной железы). В результате развития костных метастазов могут появиться патологические переломы, компрессия спинного мозга, костные боли, гиперкальциемия. Существуют определенные рекомендации по лечению костных метастазов, например, применение бисфосфонатов и антиRANKL антител (деносумаб), что увеличивает выживаемость пациентов. Однако существует острая необходимость выявления биомаркеров, указывающих на риск костного метастазирования у пациентов. В последнее время интерес сосредоточен на роли генетических регуляторов взаимодействия опухоли и костной микросреды, в частности, микро-РНК в костных метастазах, и их потенциальной роли в качестве циркулирующих маркеров костного метастазирования.

**Ключевые слова:** костные метастазы, биомаркеры, персонализированная медицина, микро-РНК, костное микроокружение

## **Biomarkers in bone metastases of breast cancer: individualization of treatment approaches**

Bolshakova S.A., Bychkov Yu.M.

Federal State Budgetary Institution "Russian Scientific Center of Roentgenoradiology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (RSCRR), Moscow 117997, Profsoyuznaya, 86

### **Authors**

**Bychkov Yu.M.** – PhD, Head of the Day Hospital, e-mail: bychkovy@rambler.ru

**Bolshakova S.A.** – PhD, senior researcher of the Laboratory of Radiation Therapy and Complex Methods of Treatment of Oncological Diseases, e-mail: bolshakovasvetlana@rambler.ru

### **Address for correspondence**

**Bolshakova Svetlana Alekseevna**, e-mail: bolshakovasvetlana@rambler.ru

### **Summary**

Bones are the most frequent site of metastasis of most solid tumors (especially breast cancer and prostate cancer). Pathological fractures, spinal cord compression, bone pain, hypercalcemia may appear as a result of the development of bone metastases. There are certain recommendations for the treatment of bone metastases, such as the use of bisphosphonates and antiRANKL antibodies (denosumab), which increases patient survival. However, there is an urgent need to identify biomarkers indicating the risk of bone metastasis in patients. Recently, interest has focused on the role of epigenetic regulators of tumor-bone microenvironment interaction, in particular, micro-RNA in bone metastases, and their potential role as circulating markers of bone metastasis.

**Key words:** bone metastatic cancer, biomarkers, personalized medicine, micro-RNA, bone microenvironment

## **Введение**

Кости являются наиболее частым местом метастазирования большинства солидных опухолей (особенно рака молочной железы и рака предстательной железы) [14]. В результате развития костных метастазов могут появиться патологические переломы, компрессия спинного мозга, костные боли, гиперкальциемия [14, 60]. При РМЖ костные метастазы диагностируются приблизительно в 75% случаев у пациентов с распространенной формой заболевания [15]. Медиана выживаемости таких пациентов колеблется от 12 до 53 месяцев [15]. При РМЖ метастазы в кости могут быть смешанные: остеолитические и остеобластические. Существуют определенные рекомендации по лечению костных метастазов, как например, применение бисфосфонатов и антиRANKL антител (деносумаб), что увеличивает выживаемость пациентов. Однако существует острая необходимость выявления биомаркеров, указывающих на риск костного метастазирования у пациентов. Биомаркеры, потенциально влияющие на выбор лечения были установлены в геномных исследованиях (например, амплификация гена *MAF* [13,59]) и исследованиях белков (например, увеличение экспрессии белков *CAPG*, *GIPC1* и *DOCK4* [6, 75, 76] и циркулирующих продуктов ремоделирования внеклеточного матрикса, включающих С-терминальный пропептид коллагена I- типа [4]). В последнее время интерес сосредоточен на роли генетических регуляторов взаимодействия опухоли и костной микросреды, в частности, микро-РНК в костных метастазах, и их потенциальной роли в качестве циркулирующих маркеров костного метастазирования [20].

## **Изложение основного материала**

### **Костный гомеостаз и порочный круг**

Костный гомеостаз поддерживается работой нескольких клеточных подтипов, наиболее известными являются остеобласты (формирующие костную ткань) и остеокласты (участвующие в резорбции костной ткани) [3, 30, 65]. Большой спектр цитокинов и факторов роста регулируют этот процесс. В частности, активация пре-остеокластов приводит к их

преобразованию в остеокласты посредством воздействия макрофагального колониестимулирующего фактора (MCSF) и лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа- $\beta$  (RANKL) [69]. Существуют дополнительные факторы роста, которые являются медиаторами процессов активации остеокластов: интерлейкин-11 (IL-11), простагландины – E2 и паратиреоидный гормон – родственный белок (PTHrP) [66].

Метастатические раковые клетки изменяют баланс активации остеобластов и остеокластов, нарушая нормальный гомеостаз кости. При раке молочной железы в основном доминируют процессы разрушения костной ткани (остеолитические метастазы).

### **Остеолитические метастазы**

При появлении в костях метастазов рака молочной железы, опухолевые клетки начинают секретировать PTHrP, который действует на остеобласты, вызывая повышенное высвобождение RANKL и снижение экспрессии антагониста RANKL – остеопротегерина (OPG). PTHrP – не единственный фактор, выделяемый метастатическими клетками рака молочной железы, который вызывает эти изменения в экспрессии RANKL: OPG, члены семейства WNT, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ), эндотелин-1 (ET-1) и морфогенетические белки костей (BMPs) также играют важную роль. Увеличение уровня экспрессии RANKL и снижение уровня экспрессии OPG приводят к активации остеокластов и последующей деградации костного матрикса, что приводит к снижению плотности костной ткани. При разрушении костной ткани происходит высвобождение факторов роста, которые, воздействуя на опухолевые клетки, стимулируют их пролиферацию, в результате чего формируется «порочный круг» костной деструкции [30].

Ремоделирование костной ткани включает в себя взаимодействие остеокластов, абсорбирующих, поглощающих костную ткань и остеобластов, формирующих новую костную ткань. Взаимодействие этих двух типов клеток обеспечивает поддержание костного гомеостаза. Остеобласты происходят из мезенхимальных стволовых клеток, остеокласты – из моноцитов. Внедрившиеся в костную ткань опухолевые клетки нарушают сложившийся

гомеостаз и изменяют тканевой метаболизм. Опухоли, для которых характерно образование остеолитических метастазов, секретируют факторы роста, гормоны и цитокины (включая PTHrP), которые воздействуют на остеокласты, повышают в них экспрессию и секрецию RANKL, что индуцирует снижение уровня OPG, и в результате происходит активация процессов резорбции костной ткани. Эффектом этого является усиление связывания RANKL с RANK на предшественниках остеокластов и содействие их активации. Зрелые активные остеокласты разрушают костную ткань, высвобождая факторы роста, которые затем воздействуют на метастатические опухолевые клетки, активизируя их пролиферацию в патологическом цикле разрушения костной ткани. Остеобластические метастазы стимулируют процессы формирования костной ткани посредством активации дифференцировки остеобластов за счет высвобождения факторов роста и цитокинов, например, BMP и TGF $\beta$ . Эти процессы, в свою очередь, приводят к высвобождению маркеров костного обмена (Bone Turnover Markers, BTM), таких как TRACP-5b, CTN и NTX (из продуктов деградации костной ткани), и PINP, PICP и BALP (из костного депо). Эта система является основной мишенью для современной терапии бисфосфонатами (нацеливание на остеокласты) и деносумабом (связывание и блокада RANKL).

Метастатические клетки РМЖ достаточно сильно меняют внеклеточный матрикс с целью обеспечить дальнейшее проникновение опухолевых клеток, которые циркулируют в кровеносном русле, и периодически попадают в костную ткань. С этой целью метастатические клетки активно начинают секретировать матриксные металлопротеиназы (MMPs) и таким образом регулируют ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса.

Дополнительно, с целью модификации внеклеточного матрикса, метастатические опухолевые клетки также секретируют другие регуляторы. Остеопонтин (OPN) является одним из них, он играет важную роль в процессах костного метастазирования при РМЖ. Остеопонтин (или секретируемый фосфопротеин-1) действует чрез связывание с LV $\beta$ 3 интегрином и CD44 и играет ключевую роль как в процессах метастазирования, так и в

определении чувствительности РМЖ к лекарственному лечению. Остеопонтин является многообещающей мишенью для терапевтического воздействия [57].

### **Остеобластические метастазы**

В результате индуцированной опухолью передачи сигналов через костные морфогенетические белки (BMPs), факторы роста фибробластов и TGF $\beta$  происходит активация остеобластов и возникают остеобластические поражения [65]. Экспрессия BMP-2, -4, -6, -7 повышается в костных метастазах [67], внутри которых морфогенетические белки могут индуцировать остеогенетическую дифференцировку остеобластов [36].

Дополнительно к обширному взаимодействию метастатических опухолевых клеток с костным микроокружением посредством аутокринных или паракринных сигналов, несколько генетических альтераций, влияющих на метастатический фенотип были выявлены в самих опухолевых клетках.

### **Лечение костных метастазов**

Лечение метастазов рака молочной железы в кости включает использование антирезорбтивных препаратов, таких как бисфосфонаты (золендроновая кислота) [19, 79], деносумаб [31]. Эти препараты используются для снижения уровня побочных явлений при метастазах в кости [31, 43, 48, 78].

Бисфосфонаты – это группа препаратов, включающих в себя не содержащие азот (этидронат и клондронат) и азотсодержащие (резидронат, золедронат, аледронат и ибандронат) структурные аналоги пирофосфатов [64]. Бисфосфонаты индуцируют апоптоз остеокластов, таким образом, снижаются процессы костной деструкции. Хотя действие бисфосфонатов в основном связано с индукцией апоптоза остеокластов, все больше данных свидетельствует о том, что бисфосфонаты могут также предотвращать апоптоз остеобластов и остеоцитов, а также способствовать пролиферации остеобластов [53]. При мета-анализе данных большого международного исследования III фазы AZURE, в котором изучались вопросы адъювантного назначения бисфосфонатов при лечении пациентов с II/III стадией

рака молочной железы было показано, что при добавлении бисфосфонатов в схемы адъювантного лечения отмечено увеличение выживаемости без признаков заболевания (инвазивной опухоли) у женщин в постменопаузе [16].

Дополнительно, для лечения костных метастазов стали использовать препарат деносуаб (который относится к группе гуманизированных анти-RANKL моноклональных антител) [31]. При лечении метастазов в кости рака молочной железы была показана большая эффективность деносуаба при сравнении с золендроновой кислотой [68]. Деносуаб предотвращает созревание остеокластов (в отличие от бисфосфонатов, которые вызывают апоптоз остеокластов) и снижает резорбцию костной ткани. На сегодняшний день нет данных о влиянии деносуаба на остеобласты. Побочные эффекты деносуаба аналогичны таковым при введении бисфосфонатов: утомляемость, тошнота, диарея, остеонекроз нижней челюсти [28]. На сегодняшний день остро стоит вопрос о необходимости выявления биомаркеров, позволяющих определить группу пациентов, имеющих высокий риск появления костных метастазов, чтобы была возможность проводить таргетную терапию пациентам из группы высокого риска.

### **Биомаркеры при метастазах в кости**

В результате развития костных осложнений происходит высвобождение молекулярных фрагментов, являющихся производными продуктов распада проколлагена, в особенности N-терминального пропептида проколлагена I типа (P1NP) и C-терминального полипептида проколлагена I типа (P1CP), а также перидолина (PYD) и деоксипиридолина (DPD). Эти белковые фрагменты можно обнаружить в сыворотке крови, некоторые из них определяются в моче [4] (Таблица 1).

Таблица 1. Использование маркеров костного метаболизма при метастазах в кости

Маркеры костного метаболизма	Применение	Ссылка
<b>Маркеры резорбции костной ткани</b>		
N-терминальный телопептид коллагена I типа (NTX)	1. Диагностика костных метастазов при солидных опухолях 2. Фактор прогноза НПЯ* при костных метастазах при солидных опухолях 3. Прогноз эффективности лечения при РПЖ и РМЖ 4. Прогностическая роль при костно-таргетной терапии	[39, 77]  [4]  [17, 41]  [17, 18, 46]
C-терминальный телопептид коллагена I типа (CTX)	Диагностика костных метастазов при раке легкого и РПЖ	[39, 77]
Кислотная фосфатаза, устойчивая к тартрату (TRACP)	Диагностика костных метастазов при РМЖ	[51, 73]
Лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-β /Остеопротегерин (RANKL/OPG)	Диагностика костных метастазов при РМЖ	[26]
Сшитый карбоксиконцевой телопептид коллагена I типа (ICTP)	Диагностика костных метастазов при раке легкого	[12]
Пиридинолин (PYD)	Диагностика костных метастазов при РМЖ	[41]
<b>Маркеры костеобразования</b>		
Проколлаген I типа N-терминальный пропептид (PINP)	Диагностика костных метастазов при РПЖ и РМЖ	[26, 34, 51, 56, 73, 77]
Проколлаген I типа C-терминальный пропептид (PICP)	Диагностика костных метастазов при РМЖ. РПЖ – фактор прогноза ответа на лечение	[77]  [41]
Костная фракция щелочной фосфатазы	Диагностика костных метастазов при солидных опухолях Фактор прогноза развития НПЯ* у пациентов, получающих костно-таргетную терапию РПЖ – фактор прогноза ответа на лечение	[25, 51]  [5, 18, 47]  [41]

\*НПЯ – неблагоприятные побочные явления

Несмотря на целесообразность использования маркеров костного метаболизма, существуют и ограничения, связанные с изменением фоновых значений ВТМ у отдельных



пациентов: например, гормональная терапия у онкологических пациентов может влиять на уровень маркеров костного метаболизма. Маркеры костного метаболизма также зависят от пола, возраста, наличия заболеваний почек и/или печени [12].

Биомаркеры необходимы для оценки прогноза риска метастазирования первичной опухоли в кости, в частности, для назначения костно-таргетной терапии пациентам. Это могут быть генетические маркеры, белковые маркеры, или молекулярные маркеры – микро-РНК, и исследования выявили потенциальные биомаркеры во всех этих классах. Наибольшие перспективы для применения имеют молекулы, которые высвобождаются из опухоли в кровотоке, т.к. это позволяет осуществлять длительный мониторинг за пациентами с использованием неинвазивного метода забора образцов. Тканевые маркеры не могут быть взяты неинвазивным способом, однако их значение в достигнутом прогрессе в лечении пациентов с костными метастазами трудно переоценить.

Также существует необходимость в биомаркерах, предсказывающих эффективность лечения (маркеры прогноза). В следующих разделах описываются текущие исследования по обнаружению биомаркеров в различных видах молекулярных исследований. Целесообразность использования этих биомаркеров варьирует по данным разных исследований, некоторые из них являются маркерами прогноза риска появления костных метастазов, другие маркеры имеют дополнительную ценность при диагностике костных метастазов, а также помогают составить план лечения. Потенциальная полезность индивидуальных маркеров рассматривается в каждом случае отдельно.

### **Микро-РНК, как ключевой регулятор процессов метастазирования**

В большом количестве исследований была выявлена важная роль микро-РНК в регуляции разных клеточных процессов, таких как рост клетки, дифференцировка, запрограммированная гибель клеток, апоптоз и клеточный цикл [32]. Микро-РНК представляют собой РНК длиной 18-25 нуклеотидов, которые связываются с 3' или 5' нетранслируемой областью (UTR) мРНК, что приводит в основном к деградации мРНК или

регуляции трансляции белка [23]. Микро-РНК действует посредством комплементарного связывания с областями гомологии последовательностей, но может также связываться с последовательностями с частичной гомологией, при этом решающим фактором является термодинамическая стабильность комплекса микро-РНК-мРНК [2]. Благодаря такому механизму действия каждая отдельная микро-РНК может регулировать множественные мРНК, и каждая мРНК может быть мишенью для множества микро-РНК. Многими исследованиями была показана ключевая роль микро-РНК в регулировании процессов канцерогенеза и метастазирования [1, 10, 27, 33, 61, 80]. Микро-РНК можно выделить из разного биологического материала, например, из образцов ткани, крови, мочи, а также из циркулирующих и секретирующих экзосом [11, 74]. Благодаря их роли в регулировании процессов метастазирования и относительно простым способам их обнаружения и измерения в биоматериалах, существует большой интерес к микро-РНК в качестве циркулирующего биомаркера костных метастазов.

Исследования при раке молочной железы, проводимые, как *in vitro*, так и *in vivo*, позволили выявить 30 видов / семейств микро-РНК, которые идентифицируются в костных метастазах рака молочной железы. При метастатическом распространении клеток рака молочной железы в кости отмечено повышение экспрессии генов остеогенной дифференцировки в клетках рака молочной железы. Основную роль в процессах остеомимикрии играет фактор транскрипции *RUNX2* [40], вызывающий повышенную экспрессию коллагена- $\alpha 1$ , костного сиалопротеина, остеокальцина и остеопонтинина [8]. Экспрессия *RUNX2* регулируется группой микро-РНК, включая членов семейства *miR-30*, *miR-203* и *miR135a*. Низкий уровень экспрессии *miR-30* в первичной опухоли указывает на плохой прогноз по безрецидивной выживаемости [21]. Роль *miR-30* в процессах костного метастазирования была изучена в исследованиях, где оценивалась гиперэкспрессия *miR-30* для подавления роста метастазов в костях, уменьшения процессов костного разрушения и блокады процессов инвазии опухолевых клеток [21]. Уровень *miR-30* коррелирует со

статусом ЭР (эстрогеновый рецептор), ПР (прогестероновый рецептор) – так при отрицательном рецепторном статусе клетки экспрессируют более низкий уровень микро-РНК, чем при положительном рецепторном статусе клетки [21]. Мишени для *RUNX2* продолжают изучаться.

Хотя исследования продемонстрировали важность микро-РНК при развитии костных метастазов, лишь немногие из них оценивали уровень циркулирующей микро-РНК в кровотоке в качестве фактора прогноза. В одном из этих исследований изучалась роль miR-218 при метастазировании рака молочной железы. Уровень miR-218 увеличивался в сыворотке крови у пациентов с метастазами в кости по сравнению с пациентами без метастазов [49]. MiR-218 секретируется клетками рака молочной железы в экстрацеллюлярных везикулах и блокирует экспрессию белков sFRP-2 и склеростина, которые являются ключевыми ингибиторами сигнального пути семейства Wnt. Активация белков семейства Wnt возникает при метастазировании рака молочной железы в кости, в этот процесс вовлечены ключевые мишени семейства Wnt, включая RHRP [38, 72]. Таким образом, секретируемая клетками рака молочной железы miR-218 может способствовать Wnt-опосредованной дифференцировке остеокластов и, как следствие, разрушению костной ткани. В исследованиях была продемонстрирована дополнительная роль miR-218, не связанная с активацией остеокластов, а именно – снижение экспрессии остеобластами коллагена I типа [49]. Для ряда микро-РНК также показана вовлеченность в процессы формирования и резорбции костной ткани, опосредованной метастатическим поражением при РМЖ. Ключевая роль принадлежит miR-34a-5p, которая блокирует метастазирование в кости путем ингибирования остеокластогенеза и Tgif2 (TGFβ-индуцированного фактора транскрипции 2) [40]. Анализ биопсийного материала, полученного у пациентов, указывает на увеличение экспрессии miR-34a-5p в образцах протоковой карциномы *in situ* по сравнению с образцами, полученными у женщин из здоровых молочных желез, а также значительно сниженную экспрессию в костных метастазах [40].

В нескольких исследованиях было отмечено, что молекулярный состав клеток рака молочной железы на белковом уровне влияет на риск появления костных метастазов. Не так давно были внедрены протеомные технологии для идентификации белковой сигнатуры, предсказывающей риск костного метастазирования при раке молочной железы. Протеомное сравнение клеточных линий, полученных на основе фибробластов костного мозга, с парентеральными MDA-MB-231 клетками позволили идентифицировать несколько белков, которые потенциально могут быть маркерами костного метастазирования, включая белок, блокирующий актин макрофагов (CAPG), белок, содержащий домен PDZ (GIPC1) [75], а также белок – дедикатор цитокина-4 (DOCK4) [6, 76]. Они активируют специфичные костно-хондральные клетки рака молочной железы. Определение этих маркеров в первичной биопсии опухоли, выполненное в большом рандомизированном исследовании III фазы AZURE, продемонстрировало высокий уровень экспрессии как CAPG, так и GIPC1, что коррелировало с появлением костных метастазов ( $P < 0,001$ ), а также с эффективностью профилактического назначения золендроновой кислоты ( $P < 0,008$ ) [75]. Также в исследовании AZURE выявлена корреляция высокой экспрессии DOCK4 и высокого риска костного метастазирования ( $P = 0,034$ ) [76]. Эти белки имеют значительный потенциал не только в прогнозе костного метастазирования при раке молочной железы, но также могут влиять на выбор терапевтического решения.

В 2019 г. группой ученых были обнаружены два белка, также ответственных за процессы костного метастазирования при РМЖ: ядерная p21-активирующая киназа-4 (пПАК4) и рецептор фактора, ингибирующего лейкемию LIFR [45]. Показано, что пПАК4 способствовал метастазированию ERА-позитивных клеток рака молочной железы, частично блокируя LIFR, супрессор метастазирования в кости. Проведенные исследования [58] показали, что высокий уровень экспрессии пПАК4 в клетках опухолей РМЖ коррелировал с повышенным уровнем RANK, что достоверно снижало показатели безрецидивной

выживаемости [58]. В этой же работе экспрессия RANKL была ассоциирована с достоверным увеличением выживаемости без костного метастазирования.

Также, в ряде работ были выявлены дополнительные факторы, влияющие на костное метастазирование рака молочной железы. Например, высокий уровень экспрессии пролактиновых рецепторов на поверхности клеток рака молочной железы ассоциируется с более коротким временем до проявления рецидива. Этот эффект, как было продемонстрировано, связан с улучшением дифференцировки остеокластов, что приводит к увеличению уровня процессов остеолитического и высвобождению факторов роста [71].

### **Дополнительные источники циркулирующих маркеров (экзосомы, циркулирующая опухолевая ДНК, циркулирующие опухолевые клетки)**

Основными и наиболее используемыми для анализа биологическими материалами являются ткани опухоли или метастазов (биопсийный или операционный материал), сыворотка и плазма крови. Однако, в настоящее время, все большее внимание уделяется поиску альтернативных материалов для анализа и выявления биомаркеров. Развитие молекулярно-генетических методов анализа и открытие новых методов детекции и анализа молекулярных маркеров позволяет проводить исследования микровезикул (экзосом), циркулирующих в кровотоке нуклеиновых кислот и опухолевых клеток.

#### ***Экзосомы***

Экзосомы – это маленькие липидные везикулы 30–100 нм в диаметре, которые синтезируются в эндосомальных каналах клеток и высвобождаются во внеклеточное пространство. Все больше данных указывает на тот факт, что высвобождаемые опухолью экзосомы и, в частности, экзосомальные интегрины могут перепрограммировать клетки, изменяя экспрессию генов [35, 55]. Экзосомы состоят из белков и микро-РНК, и, таким образом, они могут быть источниками обоих типов биомаркеров.

### ***Циркулирующая опухолевая ДНК***

Известно, что опухолевые клетки могут лизировать и высвобождать фрагменты ДНК в кровоток – циркулирующую опухолевую ДНК (ctDNA, цтДНК). Пациенты с метастатической формой заболевания имеют более высокий уровень цтДНК по сравнению с пациентами с локализованной формой заболевания [42]. На основе анализа опухолевой цтДНК возможно определение генетических маркеров опухоли, ответственных, в том числе, за процессы метастазирования [29].

### ***Циркулирующие опухолевые клетки***

Опухоль также высвобождает опухолевые клетки в кровоток (они получили название циркулирующие клетки опухоли – ЦКО). Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) одобрен метод подсчета циркулирующих клеток опухоли – CellSearch [63]. Подсчет ЦКО имеет широкое применение. Перед началом химиотерапии доцетакселом 276 пациентов с метастатическим гормонорезистентным раком предстательной железы были разделены на подгруппы с «благоприятным» и «неблагоприятным» прогнозом на основании количества циркулирующих опухолевых клеток (<5 или  $\geq 5$  ЦКО на 7 мл крови, соответственно). Пациенты с «неблагоприятным» количеством ЦКО на исходном уровне имели худшую медиану общей выживаемости (11,5 месяцев) по сравнению с 21,7 месяцами у пациентов с «благоприятным» их количеством ( $P < 0,0001$ ) [22]. Важен также молекулярный фенотип ЦКО. Паттерны экспрессии генов могут быть информативны при мониторинге прогноза метастазирования рака. Была рассмотрена взаимосвязь между ER/PR и HER2 статусом ЦКО в прогнозировании исхода при раке молочной железы [1, 62]. В исследовании пациенты с метастатическим раком молочной железы и HER2-отрицательными первичными опухолями при HER2-положительных ЦКО получали лапатиниб в дозе 1500 мг/день во 2-ую линию терапии. Статус HER2 оценивался на ЦКО с помощью иммунофлуоресценции. Случай определялся как положительный по ЦКО, если было выделено  $\geq 2$  ЦКО / 7,5 мл крови, и как

HER2-положительный, если  $\geq 50\%$  ЦКО были HER2-позитивными. Было обследовано 139 HER2-отрицательных пациентов, 96 пациентов были положительными по ЦКО. Семь из 96 пациентов (7%) имели  $\geq 50\%$  HER2-положительных ЦКО и соответствовали критериям лечения лапатинибом. В этой популяции не было выявлено объективных ответов. У одного пациента наблюдалась стабилизация заболевания на 254 дня (8,5 месяцев). На основании результатов этого исследования исследователи пришли к выводу, что подгруппа пациентов с HER2-отрицательной первичной опухолью может иметь HER2-положительные ЦКО во время прогрессирования заболевания. Учитывая тот факт, что только 1 из 139 прошедших скрининг пациентов потенциально могли извлечь пользу из этого подхода, дальнейшие исследования, разработанные в соответствии с представленной стратегией, не могут быть рекомендованы [62].

Наряду с циркулирующими клетками опухоли, метастатический рак также характеризуется присутствием диссеминированных опухолевых клеток (ДКО), которые представляют собой раковые клетки, находящиеся в костном мозге в состоянии покоя [70]. Диссеминированные опухолевые клетки можно изучить при помощи РНК-секвенирования, геномного секвенирования для выявления ключевых генетических изменений, участвующих в метастазировании раковых клеток в костную ткань [8, 44, 52].

### **Маркеры костного метаболизма для клинического применения – биомаркерная панель и цифровое пространственное профилирование**

Как уже ранее было отмечено, в некоторых исследованиях были открыты потенциальные биомаркеры, используя информацию о которых появилась возможность принимать терапевтические решения. В большинстве этих исследований имелась преклиническая стадия (модели на животных и клеточных линиях), в некоторых исследованиях использовались образцы, полученные от пациентов. Тест на основе биомаркеров для использования в клинике должен учитывать гетерогенность опухоли и различные молекулярные подтипы в рамках любого конкретного рака, и, таким образом,

биомаркерные панели обладают большей потенциальной ценностью, чем отдельные маркеры [54].

Процесс метастазирования в кости имеет пространственное измерение, что не изучено в исследованиях по биомаркерам. Эксперименты, проведенные на животных, показали, что пролиферация и количество остеокластов и остобластов сильно зависят от того, находятся ли клетки в непосредственной близости и прямом контакте с метастатическими клетками рака молочной железы [7]. С учетом результатов этого исследования становится очевидным, что практическая ценность биомаркеров для оценки костных метастазов может зависеть как от их пространственного расположения в костном метастатическом процессе, так и от времени их перестройки, при более ранних изменениях имеет место больший потенциал для выполнения своевременных вмешательств. Значительный исследовательский интерес в настоящее время сосредоточен на дометастатической нише, пространственно обособленной области кости (которая перекрывается с нишей кроветворных стволовых клеток), где происходят ранние изменения хоминга костей [50].

Последние достижения в области визуализации и количественной оценки биомаркеров включают разработку таких методов, как цифровое пространственное профилирование (DSP) – мультиплексное цифровое пространственное профилирование белков и РНК в фиксированной ткани. Одновременное измерение экспрессии до 96 молекул микро-РНК/белка пространственно определенным образом с разрешением в одну клетку позволяет охарактеризовать ключевые молекулы, активные в местах образования предметастатической ниши, а также получить информацию о передаче сигналов в строму опухоли [24].

Цифровое пространственное профилирование – это недавно разработанная технология, которая начинает проливать свет на клеточные механизмы костных метастазов. В недавнем исследовании метастазов рака простаты в кости анализ DSP выявил уникальные иммунные популяции клеток и передачу сигналов в процессе литического и бластного типов



метастазирования. Иммунные клетки в бластных метастазах были обогащены pSTST3 (phospho-STAT3) и компонентами JAK-STAT пути патогенеза. В поражениях литического типа иммунные клетки были обогащены pАКТ (phospho-АКТ) и компонентами PI3K-АКТ пути патогенеза [37]. Белки иммунных контрольных точек, включая PD-L1, B7-H4, OX40L и IDO-1, были выявлены при бластном раке простаты. Из этих новаторских исследований ясно, что изучение образцов биопсии может помочь в выборе терапевтической тактики, основанной на уровне экспрессии таргетных белков и микро-РНК [37]. Подобно тому, как молекулярная патология дополняет диагностику и лечение первичных опухолей, возможно, она может быть успешно распространена на лечение пациентов с метастатическими поражениями. Накопление информации на клеточном и молекулярном уровнях, в комбинации с цифровым пространственным профилированием, может привести к качественному прорыву в идентификации потенциальных диагностических и терапевтических мишеней у пациентов с метастазами.

## **Заключение**

Костные метастазы являются серьезным осложнением, которое может значительно снизить качество жизни пациентов. Увеличение эффективности лечения рака молочной железы приводит к увеличению продолжительности жизни пациентов с метастатическим поражением костей. Это диктует необходимость появления новых подходов в диагностике и лечении метастазов в кости. Достижения в методах молекулярного профилирования позволили идентифицировать многочисленные биомаркеры, включая генетические мутации, регуляторные микро-РНК и белки, которые позволяют использовать персонализированный подход при лечении пациентов. Возможность выявить пациентов с наибольшим риском развития метастазов в кости позволит более оперативно и своевременно начать применять соответствующие терапевтические препараты.

Метастатическое поражение костей – это пространственно детерминированный процесс, включающий заполнение опухолевыми клетками дometастатической ниши и

миграцию поступающих раковых клеток в поддерживающую их рост костную микросреду. Последние достижения в количественной оценке биомаркеров и пространственной визуализации открывают возможность исследовать молекулярные изменения, происходящие между метастатическими раковыми клетками и стромой костного микроокружения. Многофакторный количественный анализ биомаркеров в месте инициации активных метастазов в кости позволит идентифицировать основные молекулы, дифференциально экспрессируемые на стыке опухоль – строма, обеспечивая персонализированный подход к лечению. Кроме того, существует предположение, что молекулы, вовлеченные во взаимодействие опухоль – строма, будут полезны при разработке препаратов для лечения метастазов в кости.

Методы молекулярного анализа с целью индивидуализации подходов к лечению продолжают разрабатываться, однако перевод полученных результатов в клиническую практику потребует проведения клинических исследований на больших группах пациентов, чтобы гарантировать надежность разработанных биомаркерных тестов.

### **Список литературы**

1. *Agelaki S., Kalylaki A., Markomanolaki H., et al.* Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. PLoS ONE. 2015. V. 10. No. 6. Article ID e0123683. DOI: 1371/journal.pone.0123683.
2. *Bartel D.P.* MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004. V. 116. No. 2. P. 281-297. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
3. *Blonder J., Xiao Z., Veenstra T.D.* Proteomic profiling of differentiating osteoblasts. Expert Rev Proteom. 2006. V. 3. No. 5. 483-496. DOI: 10.1586/14789450.3.5.483.
4. *Brown J.E., Cook R.J., Major P., et al.* Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer and other solid tumors. J Natl Cancer Inst. 2005. V. 97. No. 1. P. 59-69. DOI: 10.1093/jnci/dji002.

5. *Brown J.E., Cook R.J., Lipton A., et al.* Prognostic factors for skeletal complications from metastatic bone disease in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010. V. 123. No. 3. P. 767-779. DOI: 10.1007/s10549-010-0981-1.
6. *Brown J.E., Westbrook J.A., Wood S.L.* Deducator of Cytokines 4: A Potential Prognostic and Predictive Biomarker Within the Metastatic Spread of Breast Cancer to Bone. *Cancer Inform.* 2019. V. 18. Article ID 1176935119866842. DOI: 10.1177/1176935119866842.
7. *Brown N.K., Ottewill P.D., Evans C.A., Holen I.* Osteoblast and osteoclast distribution is modified by the presence and proximity to breast cancer cells in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 2012. V. 29. No. 8. P. 927-938. DOI: 10.1007/s10585-012-9481-5.
8. *Bruderer M., Richards R.G., Alini M., Stoddart M.J.* Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 2014. V. 28. P.269-286. DOI: 10.22203/ecm.v028a19.
9. *Cackowski F.C., Wang Y., Decker J.T., et al.* Detection and isolation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Prostate* 2019. V. 79. No. 14. P.1715-1727. DOI: 10.1002/pros.23896.
10. *Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., et al.* Frequent deletions and down-regulations of micro-RNA genes miR15 and miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2002. V. 99. No. 24. P. 15524-15529. DOI: 10.1073/pnas.242606799.
11. *Christodoulatos G.S., Dalamaga M.* Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis? *World J Clin Oncol.* 2014. V. 5. No. 2. P. 71-81. DOI: 10.5306/wjco.v5.i2.71
12. *Coleman R., Costa L., Saad F., et al.* Consensus on the utility of bone markers in the malignant bone disease setting. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011,80,411-432.
13. *Coleman R., Hall A., Albanell J., et al.* Effect of MAF amplification on treatment outcomes with adjuvant zoledronic acid in early breast cancer: A secondary analysis of the international,

- open-label, randomized, controlled, phase 3 AZURE (BIG 01/04) trial. *Lancet Oncol.* 2017. V. 18. No. 3. P. 1543-1552. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.02.005.
14. *Coleman R.E.* Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res.* 2006. V. 12. No. 20. Pt. 2. P. 6243s-6249s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0931.
  15. *Coleman R.E.* Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat. Rev.* 2001. V. 27. No. 3. P. 165-176. DOI: 10.1053/ctrv.2000.0210.
  16. *Coleman R.E., Collinson M., Gregory W., et al.* Benefits and risks of adjuvant treatment with zoledronic acid in stage II/III breast cancer. 10 years follow-up of the AZURE randomized clinical trial (BIG 01|04). *J Bone Oncol.* 2018. V. 13. P. 123-135. DOI: 10.1016/j.jbo.2018.09.008
  17. *Coleman R.E., Lipton A., Costa L., et al.* Possible survival benefits from zoledronic acid treatment in patients with bone metastases from solid tumors and poor prognostic features – An exploratory analysis of placebo-controlled trials. *J Bone Oncol.* 2013. V. 2. No. 2. P. 70-76. DOI: 10.1016/j.jbo.2013.01.002.
  18. *Coleman R.E., Major P., Lipton A., et al.* Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *J Clin Oncol.* 2005. V. 23. No. 22. P. 4925-4935. DOI: 10.1200/JCO.2005.06.091.
  19. *Coleman R.E., McCloskey E.V.* Bisphosphonates in oncology. *Bone.* 2011. V. 49. No. 1. P. 71-76. DOI: 10.1016/j.bone.2011.02.003.
  20. *Croset M., Kan C., Clezardin P.* Tumor-derived miRNAs and bone metastasis. *Bonekey Rep.* 2015. V. 4. Article ID 688. DOI: 10.1038/bonekey.2015.56
  21. *Croset M., Pantano F., Kan C.W.S., et al.* miRNA-30 Family Members Inhibit Breast Cancer Invasion, Osteomimicry and Bone Destruction by Directly Targeting Multiple Bone Metastasis-Associated Genes. *Cancer Res.* 2018. V. 78. No. 18. P. 5259-5273. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3058.

22. *De Bono J.S., Scher H.I., Montgomery R.B., et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008. V. 14. No. 19. P. 6302-6309. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0872.
23. *Deng X., Liu Y., Luo M., et al.* Circulating miRNA-24 and its target YKL-40 as potential biomarkers in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget.* 2017. V. 21. No. 38. P. 63038-63046. DOI: 10.18632/oncotarget.18593.
24. DSP (digital spatial profiling). Адрес доступа <https://www.nanostring.com/?s=DSP> (дата доступа 15.10.2021).
25. *Du W.X., Duan S.F., Chen J.J., et al.* Serum bone-specific alkaline phosphatase as a biomarker for osseous metastases in patients with malignant carcinomas: A systemic review and meta – analysis. *J Cancer Res Ther.* 2014. No. 10 (Suppl.). P. C140-C143. DOI: 10.4103/0973-1482.145842.
26. *Elfar G.A., Ebrahim M.A., Elsherbiny N.M., Eissa L.A.* Validity of Osteoprotegerin and Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand for the Detection of Bone Metastasis in Breast Cancer. *Oncol Res.* 2017. V. 25. No. 4. P. 641-650. DOI: 10.3727/096504016X14768398678750.
27. *Esquela-Kerscher A., Slack F.J.* Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006. V. 6. No. 4. P. 259-269. DOI: 10.1038/nrc1840.
28. *Ford J.A., Jones R., Elders A., et al.* Denosumab for the treatment of bone metastases secondary to solid tumors: Systematic review and network meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013. V. 49. No. 2. P. 416-430. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.07.016.
29. *Gourdin T., Sonpavde G.* Utility of cell-free nucleic acid and circulating tumor cell analysis in prostate cancer. *Asian Androl.* 2018. V. 20. No. 3. P. 230-237. DOI: 10.4103/aja.aja\_1\_18.
30. *Guise T.A.* Breaking down bone: New insight into site-specific mechanisms of breast cancer osteolysis mediated by metalloproteinases. *Genes Dev.* 2009. V. 23. No. 18. P. 2117-2123. DOI: 10.1101/gad.1854909.

31. *Gul G., Sendur M.A., Aksoy S., et al.* A comprehensive review of denosumab for bone metastasis in patients with solid tumors. *Curr Med Res Opin.* 2016. V. 32. No. 1. P. 133-145. DOI: 10.1185/03007995.2015.1105795.
32. *Gulyaeva L.F., Kushlinskiy N.E.* Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med.* 2016. V. 14. No. 1. Article ID 143. DOI: 10.1186/s12967-016-0893-x.
33. *Hayashita Y., Osada H., Tatematsu Y., et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005. V. 65. No. 21. P. 9628-9632. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2352.
34. *Koopmans N., de Jong I.J., Breeuwsma A.J., van der Veer E.* Serum bone turnover markers (PINP and ICTP) for the early detection of bone metastases in patients with prostate cancer: a longitudinal approach. *J Urol.* 2007. V. 178. No. 3. Pt. 1. P. 849-853. DOI: 10.1016/j.juro.2007.05.029.
35. *Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015. V. 527. P. 329–335. DOI: 10.1038/nature15756.
36. *Huntley R., Jensen E., Gopalakrishnan R., Mansky K.C.* Bone morphogenetic proteins: Their role in regulating osteoclast differentiation. *Bone Rep.* 2019. V.10. Article ID 100207. DOI: 10.1016/j.bonr.2019.100207.
37. *Ihle C.L., Provers M.D., Straign D.M., et al.* Distinct tumor microenvironments of lytic and blastic bone metastases in prostate cancer patients. *J Immunother Cancer.* 2019. V. 7. No. 1. Article ID 293. DOI: 10.1186/s40425-019-0753-3.
38. *Johnson R.W., Merkel A.R., Page J.M., et al.* Wnt signaling induces gene expression of factors associated with bone destruction in lung and breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2014. V. 31. No. 8. P. 945-959. DOI: 10.1007/s10585-014-9682-1.
39. *Kong Q.Q., Sun T.W., Dou Q.Y., et al.* Beta-CTX and ICTP act as indicators of skeletal metastasis status in male patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers.* 2007. V. 22. No. 3. P. 214-220. DOI: 10.5301/jbm.2008.3777.

40. *Krzeszinski J.Y., Wei W., Huynh H., et al.* miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature*. 2014. V. 512. No. 7515. P. 431-435. DOI: 10.1038/nature13375.
41. *Lara P.N. Jr., Ely B., Quinn D.J., et al.* Serum biomarkers of bone metabolism in castration-resistant prostate cancer patients with skeletal metastases. Results from SWOG 0421. *J Natl Cancer Inst*. 2014. V. 106. No. 4. Article ID dju013. DOI: 10.1093/jnci/dju013.
42. *Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J.* Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 V. 37. No. 3. P. 646-650.
43. *LeVasseur N., Clemons M., Hutton B., et al.* Bone-targeted therapy use in patients with bone metastases from lung cancer. A systemic review of randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev*. 2016. V. 50. P. 183-193. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.09.013.
44. *Li Y., Dong M., Zang X.Y., et al.* The emerging role of circulating tumor cells in cancer management. *Am J Transl Res*. 2020. V. 12. No. 2. P. 332-342.
45. *Li Y., Zhang H., Zhao Y., et al.* A mandatory role of nuclear PAK4-LIFR axis in breast-to-bone metastasis of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. *Oncogene*. 2019. V. 38. No. 6. P. 808-821. DOI: 10.1038/s41388-018-0456-0.
46. *Lipton A., Cook R., Saad F., et al.* Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. *Cancer*. 2008. V. 113. No. 1. P. 193-201. DOI: 10.1002/cncr.23529.
47. *Lipton A., Smith M.R., Fizazi H., et al.* Changes in Bone Turnover Marker Level and Clinical Outcomes in Patients with Advanced Cancer and Bone Metastases Treated with Bone Antiresorptive Agents. *Clin Cancer Res*. 2016. V. 22. No. 23. P. 5713-5721. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3086.
48. *Litwin M.S., Tan H.J.* The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017. V. 317. No. 24. P. 2532-2542. DOI: 10.1001/jama.2017.7248.

49. *Liu X., Cao M., Palomares M., et al.* Metastatic breast cancer cells overexpress and secrete miR-218 to regulate type I collagen deposition by osteoblasts. *Breast Cancer Res.* 2018. V. 20. No. 1. P. 1-12. DOI: 10.1186/s13058-018-1059-y.
50. *Liu Y., Cao X.* Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell.* 2016. V. 30. No. 5. P. 668-681. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.09.011.
51. *Lumachi F., Basso S.M., Camozzi V., et al.* Bone turnover markers in women with early stage breast cancer who developed bone metastases. A prospective study with multivariate logistic regression analysis of accuracy. *Clin Chim Acta.* 2016. V. 460. P. 227-230. DOI: 10.1016/j.cca.2016.07.005.
52. *Maheswaran S., Haber D.A.* Circulating tumor cells: A window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev.* 2010. V. 20. No. 1. P. 96-99. DOI: 10.1016/j.gde.2009.12.002.
53. *Maruotti N., Corrado A., Neve A., Cantatore F.P.* Bisphosphonates: Effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012. V. 68. No. 7. P. 1013-1018. DOI: 10.1007/s00228-012-1216-7.
54. *Muinao T., Deka Boruah H.P., Pal M.* Multi-biomarker panel signature as the key to diagnosis of ovarian cancer. *Heliyon.* 2019. V. 5. No. 12. Article ID e02826. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02826.
55. *Myint P.K., Park E.J., Gaowa A., et al.* Targeted remodeling of breast cancer and immune cell homing niches by exosomal integrins. *Diagn Pathol.* 2020. V. 15. No. 1. P. 1-4. DOI: 10.1186/s13000-020-00959-3.
56. *Oremek G., Sauer-Eppel H., Klepzig M.* Total procollagen type 1 amino-terminal propeptide (total PINP) as a bone metastasis marker in gynecological carcinomas. *Anticancer Res.* 2007. V. 27. No. 4A. P. 1961-1962.
57. *Pang X., Gong K., Zhang X., et al.* Osteopontin as multifaceted driver of bone metastasis and drug resistance. *Pharmacol Res.* 2019. V. 144. P. 235-244. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.04.030.



58. *Park H.S., Lee A., Chae B.J., et al.* Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B as poor prognostic marker in breast cancer. *J Surg Oncol.* 2014. V. 110. No. 7. P. 807-812. DOI: 10.1002/jso.23737.
59. *Pavlovic M., Arnal-Estape A., Rojo F., et al.* Enhanced MAF Oncogene Expression and Breast Cancer Bone Metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2015. V. 107. No. 12. Article ID djv256. DOI: 10.1093/jnci/djv256.
60. *Pelger R.C., Soerdjbalie-Maikoe V., Hamdy N.A.* Strategies for management of prostate cancer-related bone pain. *Drugs Aging.* 2001. V. 18. No. 12. P. 899-911. DOI: 10.2165/00002512-200118120-00002.
61. *Peng Y., Croce C.M.* The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016. V. 1. Article ID 15004. DOI: 10.1038/sigtrans.2015.4.
62. *Pestrin M., Bessi S., Puglisi F., et al.* Final results of a multicenter phase II clinical trial evaluating the activity of single-agent lapatinib in patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. A proof-of-concept study. *Breast Cancer Res Treat.* 2012. V. 134. No. 1. P. 283-289. DOI: 10.1007/s10549-012-2045-1.
63. *Reithdorf S., Fritsche H., Muller V., et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007. V. 13. No. 3. P. 920-928. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1695.
64. *Roelofs A.J., Thompson K., Ebetino F.H., et al.* Bisphosphonates: molecular mechanisms of action and effects on bone cells, monocytes and macrophages. *Curr Pharm Des.* 2010. V. 16. No. 27. P. 2950-2960. DOI: 10.2174/138161210793563635.
65. *Roodman G.D.* Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 2004. V. 350. No. 8 (Suppl.). P. 1655-1664. DOI: 10.1002/(sici)1097-0142(19971015)80:8+<1546::aid-cnrc4>3.3.co;2-r.
66. *Sims N.A., Gooi J.H.* Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008. V. 19. No. 5. P. 444-451. DOI: 10.1016/j.semcd.2008.07.016.

67. *Spanjol J., Djordjevic G., Markic D., et al.* Role of bone morphogenetic proteins in human prostate cancer pathogenesis and development of bone metastasis: immunohistochemical study. *Coll Antropol.* 2010. V. 34. Suppl. 2. 119-125.
68. *Stopeck A.T., Lipton A., Body J.J., et al.* Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol.* 2010. V. 28. No. 35. P. 5132-5139. DOI: 10.1200/JCO.2010.29.7101.
69. *Suda T., Takahashi N., Udagawa N., et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999. V. 20. No. 3. P. 345-357. DOI: 10.1210/edrv.20.3.0367.
70. *Summers M.A., McDonald M.M., Croucher P.I.* Cancer Cell Dormancy in Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020. V. 10. No. 4. Article ID a037556. DOI: 10.1101/cshperspect.a037556.
71. *Sutherland A., Forsyth A., Cong Y., et al.* The Role of Prolactin in Bone Metastasis and Breast Cancer Cell-Mediated Osteoclast Differentiation. *J Natl Cancer Inst.* 2016. V. 108. No. 3. Article ID djv338. DOI: 10.1093/jnci/djv338.
72. *Taipaleenmaki H., Farina N.H., Van Wijnen A.J., et al.* Antagonizing miR-218-5p attenuates Wnt signaling and reduces metastatic bone disease of triple negative breast cancer cells. *Oncotarget.* 2016. V. 7. No. 48. P. 79032-79046. DOI; 10.18632/oncotarget.12593.
73. *Wada N., Fujisaki M., Ishii S., et al.* Evaluation of bone metabolic markers in breast cancer with bone metastases. *Breast Cancer.* 2001. V. 8. No. 2. P. 131-137. DOI: 10.1007/BF02967492.
74. *Weidle U.H., Epp A., Birzele F., Brinkmann U.* The Functional Role of Prostate Cancer Metastasis-related Micro-RNAs. *Cancer Genom Proteom.* 2019. V. 5. No. 1. P. 71-81. DOI: 10.21873/cgp.20108.

75. Westbrook J.A., Cairns D.A., Peng J., et al. CAPG and GIPC1: Breast Cancer Biomarkers for Bone Metastasis Development and Treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2016. V. 108. No. 4. Article ID djv360. DOI: 10.1093/jnci/djv360.
76. Westbrook J.A., Wood S.L., Cairns D.A., et al. Identification and validation of DOCK4 as potential biomarkers for the risk of bone metastasis development in patients with early breast cancer. *J Pathol.* 2019. V. 247. No. 3. P. 381-391. DOI: 10.1002/path.5197.
77. Westerhuis L.W., Delaere K.P. Diagnostic value of some biochemical bone markers for the detection of bone metastases in prostate cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997. V. 35. No. 2. P. 89-94. DOI: 10.1515/cclm.1997.35.2.89.
78. Wiu Z., Lu J. Advanced in treatment of metastatic breast cancer with boe metastasis. *Chin Clin Oncol.* 2018. V. 7. No. 3. Article ID 31. DOI: 10.21037/cco.2018.06.05.
79. O'Carrigan B., Wong M.H., Willson M.L., et al. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017. V. 10. No. 10. Article ID CD003474. DOI: 10.1002/14651858.CD003474.pub4.
80. Zhang L., Huang J., Yang N., et al. micro-RNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. V. 103. No. 24. P. 9136-9141. DOI: 10.1073/pnas.0508889103.