

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАСТАЗ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ОСОБЕННОСТИ ПАРАМЕТРОВ БОКОВОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ

А. В. Бузенкова¹✉, Е. С. Григорьева¹, В. В. Алифанов¹, Л. А. Таширева¹, О. Е. Савельева³, Е. С. Пудова¹, М. В. Завьялова², Н. В. Чердынцева¹, В. М. Перельмутер¹

¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Детекция циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), находящихся в терминальной стадии эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), затруднена, поскольку они не экспрессируют или имеют слабую экспрессию эпителиальных маркеров. Это осложняет изучение их прогностического потенциала. Показано, что циркулирующие клетки (ЦК) с фенотипом CD45⁺EpCAM⁺CK7/8-CD24⁺N-cadherin⁻ ассоциированы с риском метастазирования при раке молочной железы (РМЖ). Целью исследования было изучить ЦК в зависимости от параметров бокового светорассеяния, с учетом экспрессии маркеров эпителиальности и CD11b. У 11 доноров и 20 пациенток с РМЖ методом проточной цитометрии проводили оценку фенотипов ЦК в областях с низким (SSC^{low}) и высоким (SSC^{high}) боковым светорассеянием. Все CD45⁺EpCAM⁺CK7/8-CD24⁺N-cadherin⁻ ЦК были представлены фенотипами CD11b⁻ и CD11b⁺, которые встречались как в SSC^{low}, так и в SSC^{high} областях. Из восьми обнаруженных у пациенток фенотипов CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8-CD24⁺N-cadherin⁻ ЦК с разными вариантами коэкспрессии эпителиальных маркеров (E-cadherin, panCK, и icEpCAM) и CD11b, шесть имели признаки эпителиальности по одному из маркеров, еще два не имели признаков эпителиальности и преобладали над прочими (у доноров встречались только такие два фенотипа). Различия параметров светорассеяния ЦК с одинаковыми фенотипами является дополнительной характеристикой, прогностическое значение которой предстоит выяснить. Экспрессия E-cadherin и panCK при отсутствии mEpCAM и наличие icEpCAM позволяют полагать, что часть ЦК являются опухолевыми в состоянии выраженного ЭМП. ЦК, коэкспрессирующие CD11b и эпителиальные маркеры, могут возникать вследствие гибридизации с миелоидными клетками.

Ключевые слова: рак молочной железы, циркулирующие клетки, проточная цитометрия, боковое светорассеяние

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-15-00135.

Вклад авторов: А. В. Бузенкова — анализ литературы, анализ данных, получение и статистическая обработка результатов, написание статьи; Е. С. Григорьева — проточная цитометрия, анализ данных, интерпретация результатов, написание статьи; В. В. Алифанов — проточная цитометрия, редактирование статьи; Л. А. Таширева, О. Е. Савельева — обсуждение результатов, редактирование статьи; Е. С. Пудова — проточная цитометрия; М. В. Завьялова — редактирование статьи; Н. В. Чердынцева — планирование, дизайн исследования, обсуждение результатов; В. М. Перельмутер — планирование и руководство исследованием, интерпретация результатов, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 8 от 17 июня 2016 г.), проведено в соответствии с федеральными законами Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларацией 1964 г. и всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериале, полученном у людей. Все участники подписали добровольное информированное согласие об участии в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ангелина Владиславовна Бузенкова
пер. Кооперативный, д. 5, г. Томск, 634009, Россия; buzenkova_av@mail.ru

Статья получена: 11.03.2025 **Статья принята к печати:** 26.03.2025 **Опубликована онлайн:** 18.04.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.019

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

CHARACTERISTICS OF THE METASTASIS-ASSOCIATED CIRCULATING CELLS: FEATURES OF SIDE SCATTER PARAMETERS

Buzenkova AV¹✉, Grigoryeva ES¹, Alifanov VV¹, Tashireva LA¹, Savelyeva OE³, Pudova ES¹, Zavyalova MV², Cherdyntseva NV¹, Perelmuter VM¹

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

It is difficult to detect the circulating tumor cells (CTCs) being through the epithelial-mesenchymal transition (EMT) terminal phase, since these do not express epithelial markers or show weak expression of those. This hampers assessment of the CTC prognostic potential. It has been shown that the circulating cells (CCs) with the CD45⁺EpCAM⁺CK7/8-CD24⁺N-cadherin⁻ phenotype are associated with the risk of metastasis in breast cancer (BC). The study aimed to test CCs based on the side scatter parameters considering the expression of epithelial cell markers and CD11b. CC phenotypes were assessed by flow cytometry within the regions with low (SSC^{low}) and high (SSC^{high}) side scatter in 11 donors and 20 female patients with BC. All the CD45⁺EpCAM⁺CK7/8-CD24⁺N-cadherin⁻ CCs were represented by the CD11b⁻ and CD11b⁺ phenotypes found in both SSC^{low} and SSC^{high} regions. Among eight CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8-CD24⁺N-cadherin⁻ CC phenotypes with different variants of co-expression of epithelial markers (E-cadherin, panCK, and icEpCAM) and CD11b found in patients, six showed signs of epithelial nature based on one of the markers, while another two showed no epithelial traits and predominated over other phenotypes (only these two phenotypes were found in donors). The differences in light scattering parameters of the CCs with the same phenotype is one more characteristic, the prognostic value of which remains to be uncovered. The E-cadherin and panCK expression in the absence of mEpCAM and presence of icEpCAM suggest that some CCs are tumor cells in the state of pronounced EMT. CCs showing co-expression of CD11b and epithelial markers can emerge due to hybridization with myeloid cells.

Keywords: breast cancer, circulating cells, flow cytometry, side scatter

Funding: the study was supported by the RSF grant No. № 23-15-00135.

Author contribution: Buzenkova AV — literature review, data analysis, acquisition and statistical processing of the results, manuscript writing; Grigoryeva ES — flow cytometry, data analysis, interpretation of the results, manuscript writing; Alifanov VV — flow cytometry, manuscript editing; Tashireva LA, Savelyeva OE — discussion, manuscript editing; Pudova ES — flow cytometry; Zavyalova MV — manuscript editing; Cherdyntseva NV — study planning and design, discussion; Perelmuter VM — study planning and management, interpretation of the results, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 8 dated 17 June 2016) and conducted in accordance with Federal Laws of the Russian Federation (No. 152, 323, etc.), the Declaration of Helsinki (1964) and all later amendments and additions that regulate scientific research involving human biomaterial. All subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Angelina V. Buzenkova
Kooperativny per., 5, Tomsk, 634009, Russia; buzenkova_av@mail.ru

Received: 11.03.2025 **Accepted:** 26.03.2025 **Published online:** 18.04.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.019

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Гематогенное метастазирование — основная причина неблагоприятного исхода злокачественных новообразований. Источником гематогенных метастазов являются клетки первичной опухоли, обладающие способностью к интравазации и образованию циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК). Классический метод определения ЦОК CELLSEARCH основан на выделении CD45-отрицательных, EpCAM-положительных и цитокератин 8-, 18- и/или 19-положительных ЦОК в периферической крови [1]. К настоящему времени разработаны разные технологии обнаружения и выделения ЦОК: разделение центрифугированием в градиенте плотности; диэлектрофорез (метод выделения ЦОК на основе их диэлектрических свойств); метод разделения клеток на основе микрофлюидных чипов; обогащение ЦОК с использованием системы сортировки клеток с магнитной активацией (включает маркировку ЦОК суперпарамагнитными микросферами MACS, покрытыми антителами, специфичными для поверхностных антигенов ЦОК); использование магнитных бусин, покрытых тонким слоем гидрогеля, содержащего антитела против EpCAM; метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР); методы обнаружения, основанные на проточной цитометрии [2]. У пациентов на поздней стадии рака молочной железы ЦОК обнаруживают в 60% случаев, на ранних стадиях — в 20–30% случаев [3]. Использование метода проточной цитометрии позволяет выявить широкий спектр функциональных маркеров на каждой из ЦОК. Благодаря этой технологии при РМЖ продемонстрирована гетерогенность проявлений признаков стволовости и проявлений эпителиально-мезенхимального перехода [4, 5]. Выживаемость без прогрессирования связана при РМЖ с ЦОК. При количестве ЦОК ≥ 6 чаще возникают рецидивы и метастазы и уменьшается выживаемость [6]. Ранее нами были опубликованы данные о том, что наряду с классическими ЦОК, экспрессирующими мембранный EpCAM (mEpCAM) в крови, имеются клетки с фенотипом CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺N-cadherin⁺, которые ассоциированы с повышенным риском метастазирования [7]. Эти клетки, в отличие от ЦОК обозначены как циркулирующие клетки (ЦК). Их природа остается неясной.

Важными характеристиками любой клетки в кровотоке, в том числе и опухолевой, являются биофизические параметры, которое могут частично отражать ее морфофункциональное состояние. Измерение биофизических свойств клеток (таких как электрический импеданс, радиочастотная проводимость, рассеяние света клетками под различными углами) положено в основу методов автоматизированного гематологического анализа. Метод проточной цитометрии позволяет получить информацию относительно размера и структуры клеток посредством детекции параметров прямого и бокового светорассеяния. При прохождении клетки через испускаемый лазером световой поток регистрируется флуоресценция клеток и светорассеяние в различных направлениях. Прямое светорассеяние (FSC) учитывает интенсивность света, рассеянного под малым углом до 10° (детекторы расположены по ходу лазерного луча), и характеризует размер клетки. Боковое светорассеяние (SSC) учитывает интенсивность света, рассеянного до 90° (детекторы расположены перпендикулярно направлению лазерного луча), зависит от плотности клетки и характеризует сложность внутриклеточных структур [8] и выраженность цитоплазматической зернистости

[9]. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о более тонком влиянии различных структур клетки на параметры бокового светорассеяния. Так, рассеивание света под углом 5–30° обусловлено клеточным ядром, а под углом 50–130° — небольшими органеллами, такими как митохондрии, пероксисомы, лизосомы и гранулы [10].

В 2023 г. разработан метод и представлены результаты, демонстрирующие, что оцененная с помощью SSC гранулярность клеток может быть использована для разделения функциональных субпопуляций лимфоцитов. Так, наивные недифференцированные лимфоциты располагаются в области SSC^{low}, а цитотоксические лимфоциты с большим содержанием гранул — в SSC^{high} [9].

Цель данной работы заключалась в уточнении фенотипических характеристик CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺N-cadherin⁺ клеток в крови пациенток с раком молочной железы в зависимости от бокового светорассеяния SSC, с учетом экспрессии маркеров эпителиальности E-cadherin, цитокератинов AE1/AE3 (pan Cytokeratin), а также внутриклеточной экспрессии молекулы адгезии EpCAM (icEpCAM) у пациенток с инвазивной протоковой карциномой молочной железы неспецифического типа (ИПКНТ) и доноров.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование вошли 11 доноров и 20 пациенток с ИПКНТ, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Критерии включения пациенток в группу исследования: диагноз инвазивной протоковой карциномы молочной железы неспецифического типа, подтвержденный морфологически; распространенность первичной опухоли T₁-4N₀-3M₀; люминальный B Her2⁺ (9 пациенток), люминальный B Her2⁺ (4 пациентки), трижды негативный (5 пациенток) и HER2⁺ (2 пациентки) молекулярно-биологические подтипы. Критерии исключения пациенток из группы исследования: другие гистологические типы рака молочной железы; первично множественные злокачественные опухоли; хронические воспалительные заболевания в стадии обострения. Группа доноров была сопоставима с пациентками по возрасту, главным критерием включения являлось отсутствие хронических воспалительных заболеваний в стадии обострения. Образцы венозной крови забирали в вакуумные пробирки, обработанные ЭДТА, перед операцией и неoadъювантной химиотерапией (НАХТ). Дальнейшую пробоподготовку осуществляли согласно протоколу, описанному ранее [11]. Для окрашивания поверхностных маркеров использовали моноклональные антитела: BV570-анти-CD45 (клон HI30, мышиные IgG1; Sony Biotechnology, США), PE-Cy7-анти-N-кадгерин (клон 8C11, мышиные IgG1; Sony Biotechnology, США), BB700-анти-CD24 (клон ML5, мышиные IgG2a; BD Horizont, США), R718-анти-EpCAM (CD326) (клон EBA-1, мышиные IgG1; BD Biosciences, США), BV-421-анти-CD11b (клон ICRF44, мышиные IgG1; BioLegend, Великобритания), PE-Dazzle594-анти-E-кадгерин (CD324) (клон 67A4, крысиные IgG1; Sony Biotechnology, США). Для внутриклеточного окрашивания использовали: PE-анти-CK7/8 (клон CAM 5.2, мышиные IgG2a; BD Biosciences, США), eFlour660-анти-panCK (клон AE1/3, мышиные IgG1; Invitrogen, США), BV605-анти-EpCAM (CD326) (клон 9C4, IgG2b; Sony Biotechnology, США). Клетки линии рака молочной железы MCF-7 использовали в качестве положительного контроля при оценке уровня флуоресценции антител против

эпителиальных маркеров, а клетки промоноцитарной клеточной линии U937 — в качестве отрицательного контроля. Позитивными по эпителиальным маркерам считали события, детектируемые в области высокого уровня интенсивности сигнала (седьмая декада и выше).

Иммунофлуоресценцию анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США) с помощью пакета программ NovoExpress 1.3.0 (ACEA Biosciences, США). Оценку гранулярности обнаруженных клеток проводили исходя из параметра бокового светорассеяния SSC, индивидуально для каждого случая. SSC^{low} -циркулирующие клетки локализовались на двумерном графике FSC/SSC в области, соответствующей популяциям агранулоцитов (лимфоциты и моноциты). SSC^{high} -клетки располагались на двумерном графике FSC/SSC в области, соответствующей популяции гранулоцитов. Медианное значение границы между SSC^{low} и SSC^{high} областями для данного цитометра составило 0,40 (0,36–0,45) (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ GraphPadPrism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Для сравнения частот встречаемости различных фенотипов клеток использовали точный критерий Фишера. Для сравнения количеств клеточных фенотипов между собой использовали непараметрический критерий Уилкоксона, для сравнения количеств клеточных фенотипов у доноров и пациентов — непараметрический критерий Манна–Уитни; данные представлены как Me (Q_1 ; Q_3). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частота встречаемости и количество ЦК в областях SSC^{low} и SSC^{high} у доноров и пациенток с ИПКНТ

Для уточнения природы ЦК оценивали экспрессию маркера миелоидного происхождения CD11b, а также маркеров эпителиальности: E-cadherin, pan-Cytokeratin и внутриклеточного EpCAM (icEpCAM). Из 16 возможных фенотипов ЦК в цельной крови пациенток с ИПКНТ

обнаруживались восемь. Причем каждая клетка экспрессировала только один из перечисленных эпителиальных маркеров. Было проведено сравнение частоты встречаемости (табл. 1) и количества (табл. 2) этих клеточных популяций в зависимости от степени бокового светорассеяния: SSC^{low} или SSC^{high} .

В табл. 1 и представлены только те фенотипы клеток, которые были обнаружены в крови пациенток с ИПКНТ. Частота встречаемости клеток с изучаемыми фенотипами ЦК не различалась в областях SSC^{low} и SSC^{high} . Независимо от параметра SSC и экспрессии CD11b в большинстве случаев (от 85 до 100%) обнаруживали ЦК с фенотипами № 1 и № 5 без экспрессии эпителиальных маркеров. В 20–35% процентах случаев среди ЦК присутствовали E-cadherin⁺-клетки. В шести фенотипах ЦК наблюдали экспрессию одного из исследованных эпителиальных маркеров.

Суммарное количество клеток, экспрессирующих эпителиальные маркеры (независимо от экспрессии CD11b и параметра SSC), составляет 1,9 клеток в 1 мл цельной крови. ЦК с фенотипами № 1 и № 5 не только чаще обнаруживались в крови, но и были самыми многочисленными. Медиана остальных шести фенотипов была близкой к нулю.

Количество ЦК с фенотипом № 5 в области SSC^{high} было в 24 раза больше, чем в области SSC^{low} ($p < 0,0001$) (табл. 2). В отличие от пациенток с ПМЖ у доноров обнаружено только два фенотипа исследуемых клеток. Стоит отметить, что это те же самые часто встречающиеся и многочисленные фенотипы № 1 и № 5. Частоты встречаемости указанных фенотипов клеток не различались в зависимости от их расположения в областях SSC^{low} и SSC^{high} , а количество было не одинаковым. Количество клеток с фенотипом № 5 CD11b⁺E-cadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺ было в 12,5 раз больше в области SSC^{high} по сравнению с SSC^{low} ($p = 0,0020$), а клеток с фенотипом № 1 CD11b⁺E-cadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺, напротив, было в 7,5 раз больше в SSC^{low} , чем в SSC^{high} ($p = 0,0156$). Также области в SSC^{high} количество клеток с фенотипом № 5 CD11b⁺E-cadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺ в 25 раз преобладало над клетками с фенотипом № 1 CD11b⁺E-cadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺ ($p = 0,0020$) (табл. 3).

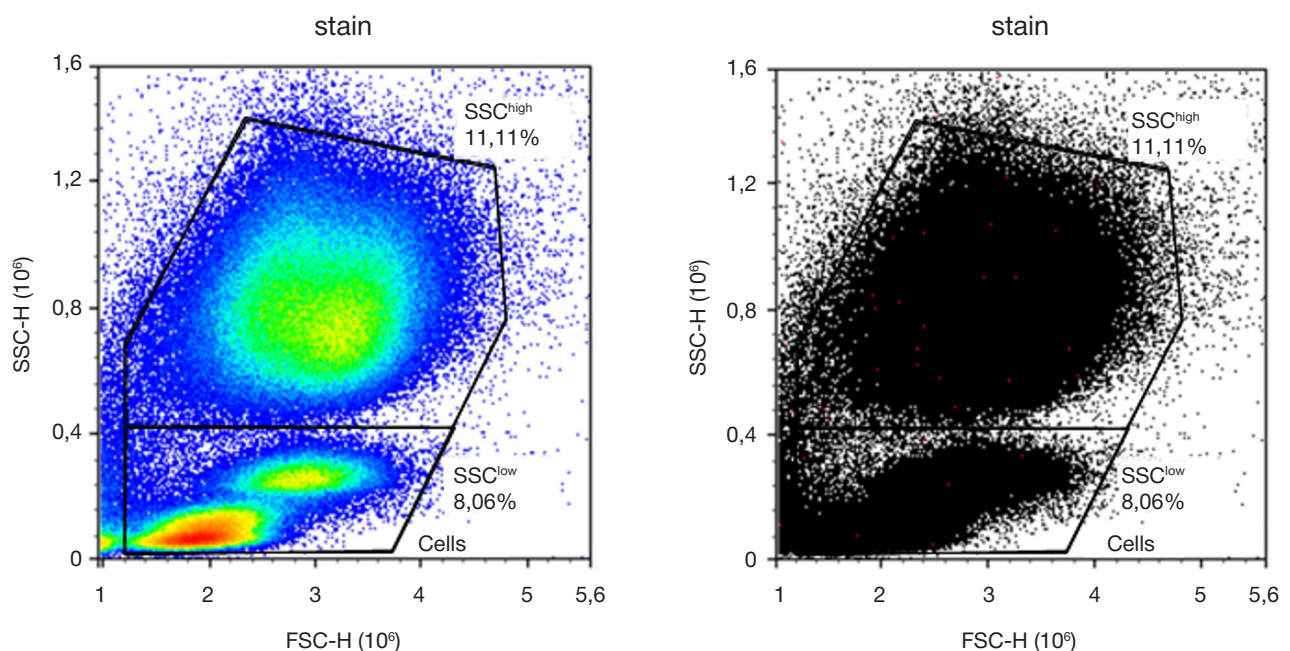


Рис. 1. Распределение ЦК (CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺Ncadh⁺) в областях SSC^{low} и SSC^{high} (изучаемые клетки обозначены красным цветом)

Таблица 1. Сравнение частоты встречаемости ЦК в областях SSC^{low} и SSC^{high} у пациенток с ИПКНТ

Фенотип ЦК (CD45 ⁺ mEpCAM ⁺ CK7/8 ⁺ CD24 ⁺ Ncadh ⁺)	Частота встречаемости, % (абс. знач.)	
	n = 20	
	SSC ^{low}	SSC ^{high}
(№1) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	85 (17/20)	100 (20/20)
(№2) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	0 (0/20)	10 (2/20)
(№3) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	5 (1/20)	10 (2/20)
(№4) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	35 (7/20)	20 (4/20)
(№5) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	95 (19/20)	100 (20/20)
(№6) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	10 (2/20)	10 (2/20)
(№7) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	10 (2/20)	25 (5/20)
(№8) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	15 (3/20)	25 (5/20)

Примечательно, что у доноров не было ЦК, в которых бы экспрессировались какие-либо из использованных нами маркеров эпителиальных клеток.

Сравнение частоты встречаемости и количества различных фенотипов ЦК у доноров и пациенток с ИПКНТ

Сравнение частоты встречаемости и количества различных фенотипов ЦК в крови доноров и пациенток с ИПКНТ представляет отдельный интерес в связи с возможностью существования ассоциативной связи между идентификацией в крови ЦК и наличием онкологического заболевания. Было проведено сравнение частоты встречаемости ЦК с фенотипом CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺Ncadherin⁺ с разными вариантами коэкспрессии CD11b, E-cadherin, pan-Cytokeratin и icEpCAM в областях SSC^{low} и SSC^{high} (рис. 2). С наибольшей частотой и у доноров, и у пациенток с ИПКНТ в SSC^{low} и SSC^{high} областях встречались два фенотипа ЦК: № 1 CD11b⁺Ecadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺ и № 5 CD11b⁺Ecadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺, т. е. клетки, не экспрессирующие маркеры эпителиальности E-cadherin, pan-Cytokeratin и icEpCAM (рис. 2А, Б). Эти же фенотипы ЦК (№ 1 и 5) оказались не только самыми частыми, но и самыми многочисленными в обеих областях (рис. 2С, Г). Клетки с фенотипом

№ 4 CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺Ncadherin⁺CD11b⁺Ecadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺ в области SSC^{low} встречались достоверно чаще ($p = 0,0331$) (рис. 2А) и в большем количестве на уровне тенденции ($p = 0,0522$) (рис. 2В) у пациенток с ИПКНТ по сравнению с донорами. Стоит еще раз подчеркнуть, что у доноров клеток, экспрессирующих маркеры эпителиальности, не было обнаружено вовсе. У пациенток с ИПКНТ ЦК, экспрессирующие маркеры эпителиальности, обнаруживались, однако частота их встречаемости была низкой.

Частота встречаемости клеток, экспрессирующих любые эпителиальные маркеры, в области SSC^{low} была выше у пациенток с ИПКНТ, чем у доноров (у доноров таких клеток обнаружено не было) независимо от экспрессии CD11b (соответственно $p = 0,0331$ и $p = 0,0331$), в SSC^{high} — только для CD11b⁺-клеток ($p = 0,0116$) (рис. 3А). Количество таких клеток было больше у пациенток с ИПКНТ по сравнению с донорами только для CD11b⁺-клеток в области SSC^{high} ($p = 0,0129$) (рис. 3Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка параметра бокового светорассеяния позволила разделить исследуемые клетки на две популяции, располагающиеся в областях SSC^{low} и SSC^{high}, различающихся (как следует из физической природы

Таблица 2. Сравнение количеств ЦК в областях SSC^{low} и SSC^{high} у пациенток с ИПКНТ

Фенотип ЦК (CD45 ⁺ mEpCAM ⁺ CK7/8 ⁺ CD24 ⁺ Ncadh ⁺)	Количество клеток Me (Q ₁ –Q ₃) / мл		<i>p</i>
	<i>n</i> = 20		
	SSC ^{low}	SSC ^{high}	
	<i>a</i>	<i>b</i>	
(№1) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	47,25 (10,38–97,25)	19,50 (3,13–48,50)	
(№5) CD11b ⁺ E ⁺ cadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	11,75 (5,00–36,50)	287,00 (73,00–1132,00)	<i>p</i> _{a-b} < 0,0001

Таблица 3. Сравнение частоты встречаемости и количества ЦК в областях SSC^{low} и SSC^{high} у доноров

Фенотип ЦК (CD45 ⁺ mEpCAM ⁺ CK7/8 ⁺ CD24 ⁺ Ncadh ⁺)			SSC ^{low}	SSC ^{high}	p
			a	b	
(№1) CD11b ⁺ Ecadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	Частота встречаемости, % (абс. знач.)	1	91 (10/11)	82 (9/11)	
	Количество клеток Me (Q ₁ –Q ₃)	2	7,50 (1,50–12,50)	1,00 (0,50–7,50)	$p_{a-b} = 0,0156$
(№5) CD11b ⁺ Ecadh ⁺ panCK ⁺ icEpCAM ⁺	Частота встречаемости, % (абс. знач.)	3	100 (11/11)	100 (11/11)	
	Количество клеток Me (Q ₁ –Q ₃)	4	2,00 (1,00–7,50)	25,00 (3,50–61,00)	$p_{a-b} = 0,0020$; $p_{2-4} = 0,0020$

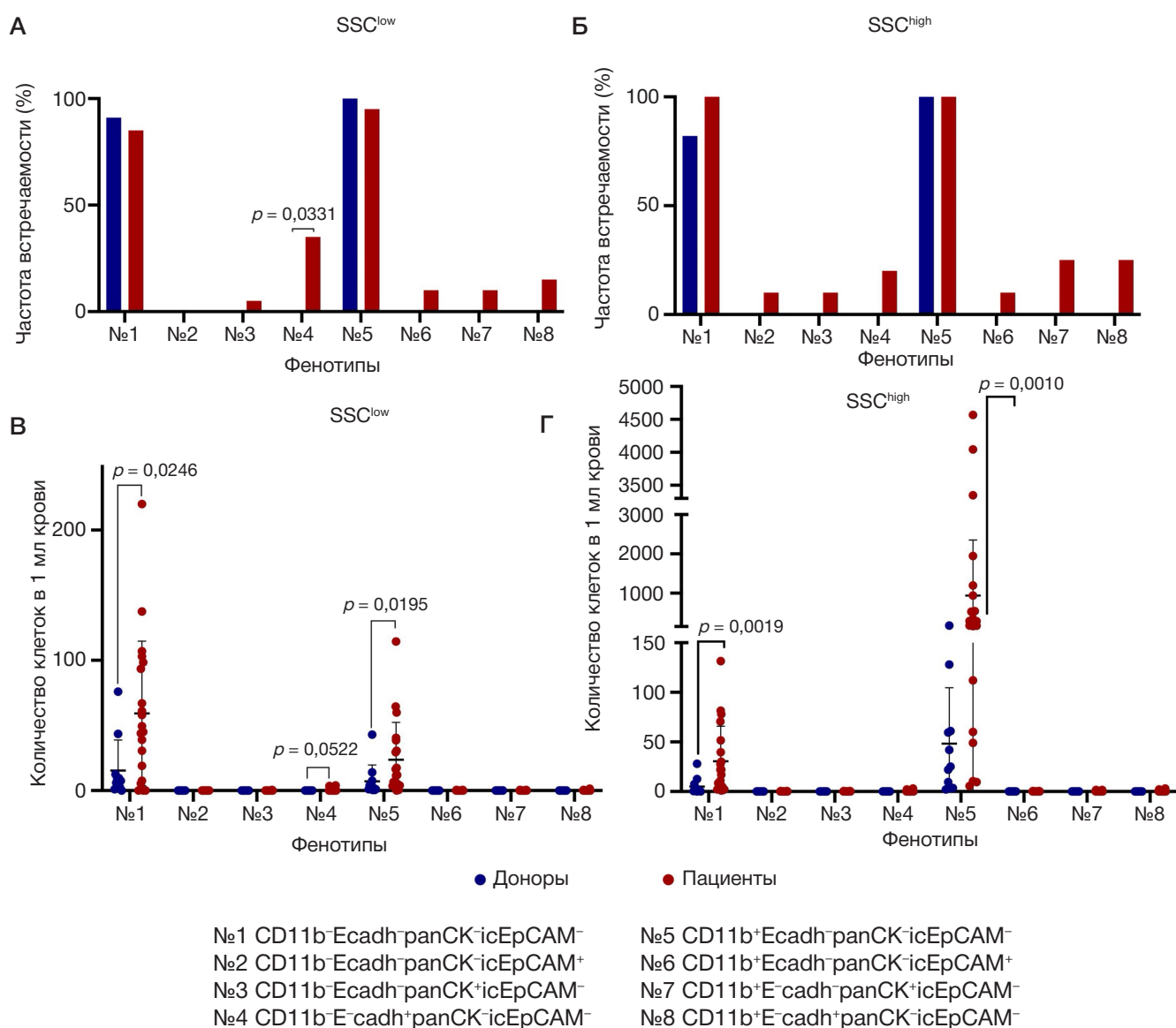


Рис. 2. Сравнение частоты встречаемости и количества в крови доноров и пациенток с ИПКНТ ЦК (основной фенотип: CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺Ncadh⁻ — с коэкспрессией CD11b, E-cadherin, pan-Cytokeratin и icEpCAM) в областях SSC^{low} и SSC^{high} . **А.** Сравнение частоты встречаемости ЦК у доноров и пациенток в области SSC^{low} . **Б.** Сравнение частоты встречаемости ЦК у доноров и пациенток в области SSC^{high} . **В.** Сравнение количества ЦК у доноров и пациенток в области SSC^{low} . **Г.** Сравнение количества ЦК у доноров и пациенток в области SSC^{high} .

показателя) сложностью внутриклеточной организации клетки, включая количество органоидов и выраженность цитоплазматической зернистости [8].

Данный критерий, по-видимому, действительно отражает гранулярность цитоплазмы, так как количество клеток в областях SSC^{low} и SSC^{high} зависело от экспрессии в клетках миелоидного маркера CD11b. Количество ЦК с фенотипом № 5, которые экспрессировали CD11b, как у доноров, так и у пациенток с ПМЖ в области SSC^{high} было больше, чем в SSC^{low} . В то же время количество ЦК с таким же фенотипом, но без экспрессии CD11b (№ 1) не различалось в областях SSC^{low} и SSC^{high} . При оценке частоты встречаемости оказалось, что каждый из восьми фенотипов ЦК с равной вероятностью находился в областях SSC^{low} и SSC^{high} . Это свидетельствует о том, что клетки с экспрессией одинаковых цитокератинов и/или CD11b имеют разную степень сложности внутриклеточной организации. Судя по результатам исследования разных по функциональной активности лимфоцитов [9], можно отметить, что клетки с высокой активностью располагаются в области SSC^{high} . По-видимому, такой вывод уместен

и относительно изучаемых ЦК. ЦК с одинаковыми фенотипами, но с разными биофизическими свойствами, а значит и функциональными характеристиками, могут в разной степени быть ассоциированными с механизмами метастазирования.

При обсуждении эпителиальных признаков ЦК следует уточнить некоторые методические особенности исследования. В работе использовали анти-EpCAM моноклональные антитела с двумя разными флуоресцентными метками, что позволило выявить отдельно мембранную и внутриклеточную экспрессию EpCAM. Для этого антитела с первой меткой добавляли на этапе поверхностного окрашивания, а со второй — после проведения пермеабилзации. Оба используемых коммерческих антитела против EpCAM продуцируются клонами клеток EBA-1 и 9C4 и обладают специфичностью, позволяющей выявлять наличие маркера как на мембране, так и внутриклеточно, в зависимости от наличия этапа пермеабилзации [12]. Казалось бы, невозможно утверждать, что окрашивание после пермеабилзации выявляет только внутриклеточную экспрессию EpCAM,

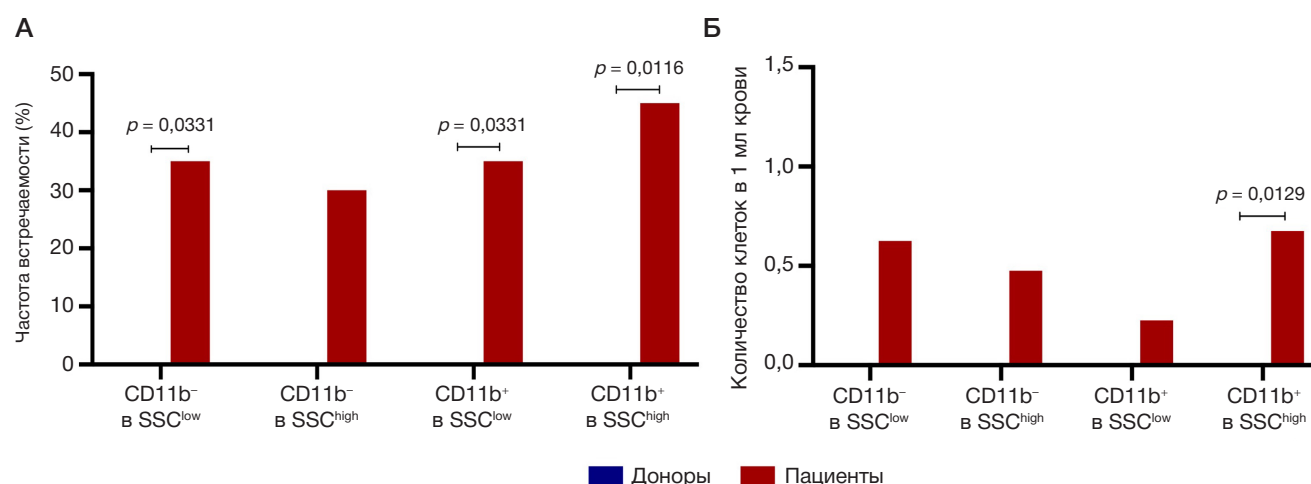


Рис. 3. Общая частота встречаемости и количество клеток CD11b⁻ и CD11b⁺, экспрессирующих любой из маркеров эпителиальности (основной фенотип: CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺Ncadh⁻, маркеры эпителиальности: Ecadh, panCK, icEpCAM) в областях SSC^{low} и SSC^{high}. **А.** Сравнение общей частоты встречаемости эпителиальных маркеров ЦК у доноров и пациенток с ИПКНТ в областях SSC^{low} и SSC^{high}. **Б.** Сравнение общего количества эпителиальных маркеров ЦК у доноров и пациенток с ИПКНТ в областях SSC^{low} и SSC^{high}.

так как существует вероятность наличия свободных антигенных эпитопов на поверхности, несмотря на избыточное добавление антител на этапе поверхностного окрашивания. Однако в нашем наблюдении ни в одном из случаев не было выявлено ни одной клетки с одновременной экспрессией EpCAM на мембране и внутри клеток (в цитоплазме или в ядре), что позволяет говорить о наличии истинной «внутриклеточной» экспрессии EpCAM.

Потеря мембранной экспрессии EpCAM может происходить в процессе ЭМП вследствие транслокации молекулы [13, 14] или обусловлена RIP (regulated intramembrane proteolysis) и эндоцитозом мембранного EpCAM с конечной деградацией в протеосомах [15, 16]. Экспрессия использованных эпителиальных маркеров (E-cadherin и pan-Cytokeratin) при отсутствии mEpCAM и наличии icEpCAM позволяет предположить, что по крайней мере часть рассматриваемых ЦК является опухолевыми клетками в состоянии выраженного ЭМП. Эти клетки можно считать ЦОК. Однако, согласно современным данным, имеется и неопухолевое происхождение обсуждаемых ЦК. Описаны эпителиальные клетки-предшественники костномозгового происхождения [17, 18]. Имеются данные о том, что клетки из костного мозга могут экспрессировать белки эпителиальных клеток и становиться эпителиальными клетками многих органов. Такие клетки негативны по лейкоцитарному маркеру CD45, но обладают экспрессией цитокератинов и выявляются только после предварительного повреждения эпителия. Это рассматривают как аргумент в пользу того, что костномозговые клетки — предшественники эпителия предназначены для регенерации [19–21]. Приведенные результаты позволяют предположить, что исследуемые ЦК, экспрессирующие эпителиальные маркеры, но без экспрессии CD45, могут быть нормальными клетками, источником которых является костный мозг. Отсутствие этих клеток у доноров не препятствует такому предположению, поскольку их количество, вероятно, может достигать цифр, достаточных для обнаружения только в условиях рекрутирования в участки регенерации или микроокружение карцином, которые, как известно, рассматривают как «незаживающую рану» [22, 23].

Два фенотипа ЦК № 1 и № 5 лишены маркеров эпителиальности. ЦК № 1 экспрессировали только CD24, а № 5 — CD24 и CD11b⁺. ЦК с фенотипами № 1

и № 5 не только встречались чаще в сравнении с другими обнаруженными в крови фенотипами, но и были самыми многочисленными. Касаясь происхождения этих клеток можно предположить, что это эпителиальные клетки, но с утраченными, при достижении терминальной стадии ЭМП, эпителиальными признаками, либо эти ЦК имеют неэпителиальное происхождение и принадлежат к иной неизвестной популяции.

Фенотипы ЦК № 1–4 были тождественны фенотипам № 5–8 по восьми из девяти исследуемым маркерам. Отличались эти группы фенотипов только экспрессией CD11b⁺ в ЦК № 5–8. Как известно, интегрин CD11b экспрессируется преимущественно на моноцитах/макрофагах и нейтрофилах и некоторых субпопуляций дендритных клеток. CD11b представляет собой субъединицу интегрин альфа-M (α М CD11bCD18), которая входит в состав гетеродимера α М β 2. Данный интегрин служит рецептором для фибриногена и для молекулы адгезии эндотелия ICAM-1 [24]. CD11b опосредует клеточную адгезию, хемотаксис, миграцию, фагоцитарную активность, а также ингибирует воспалительные реакции, которые инициированы через Toll-подобные рецепторы [25]. Одной из важнейших функций миелоидных клеток, экспрессирующих CD11b, является иммуносупрессия [26]. Каким может быть происхождение обнаруженных CD11b⁺-ЦК? Экспрессия CD11b наблюдается на достаточно поздней промоноцитарной стадии дифференцировки, в то время как CD45 должен экспрессироваться намного раньше: на стадии монобласта [27]. В связи с этим сомнительно, что рассматриваемые CD45⁺CD11b⁺-ЦК могут относиться к миелоидным элементам (тем более клетки, экспрессирующие эпителиальные маркеры). Уместно рассматривать ЦК, коэкспрессирующие CD11b⁺ и эпителиальные маркеры, как гибридные, возникающие вследствие гибридизации с миелоидными клетками. В таком случае ожидаема экспрессия лейкоцитарных маркеров. Не исключен и редко изучаемый, и обсуждаемый механизм ЭМП, при котором появляются не фибробластические, а лейкоцитарные признаки. Такой вариант ЭМП обоснован в одной из работ [28]. Наконец, если принять гипотезу костномозгового происхождения ЦК с эпителиальными признаками, то наличие миелоидного маркера могло быть результатом нелинейного процесса дифференцировки стволовых костномозговых клеток с

наличием в дифференцировочном континууме клеток с нетипичными фенотипами.

Необходимо уточнить, что проведенное исследование имеет ряд ограничений.

Перспективный характер исследования не позволил выяснить, действительно ли фенотипические особенности сочетания характера бокового светорассеяния с экспрессией CD11b⁺ и наличием признаков эпителиальности сопряжены с развитием гематогенных метастазов и безметастатической выживаемостью. Более длительное наблюдение позволит ответить на эти вопросы.

Малая выборка доноров ($n = 11$) могла ограничить выявление редких фенотипов ЦК в контрольной группе. Увеличение контрольной группы позволит уточнить наличие ЦК с экспрессией эпителиальных маркеров у доноров.

Неоднородность исследуемой группы пациенток с ИПКНТ также является ограничением исследования. Возможно, анализ изучаемых параметров в более однородных по молекулярно-биологическому подтипу группах пациентов позволит выявить ассоциации ЦК с эпителиальными признаками с более неблагоприятными подтипами РМЖ.

ВЫВОДЫ

Исследуемые ЦК являются гетерогенной популяцией. Все фенотипы клеток встречались в области как SSC^{low}, так и SSC^{high}. ЦК с экспрессией CD11b в большем количестве встречались в области SSC^{high} ($p = 0,0020$ — для доноров; $p < 0,0001$ — для пациенток с ИПКНТ). У пациенток с РМЖ из восьми обнаруженных фенотипов CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺N-cadherin⁺ ЦК с разными вариантами коэкспрессии эпителиальных маркеров (E-cadherin, pan-Cytokeratin, и icEpCAM) и CD11b, шесть фенотипов имели признаки эпителиальности только по одному из маркеров. Все фенотипы ЦК были представлены двумя вариантами в зависимости от экспрессии CD11b. Самыми часто встречающимися и многочисленными были клетки с двумя фенотипами: CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺N-cadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺CD11b⁺ и CD45⁺mEpCAM⁺CK7/8⁺CD24⁺N-cadherin⁺panCK⁺icEpCAM⁺CD11b⁺. У доноров выявлялись только эти два фенотипа ЦК без эпителиальных признаков. Значение бокового светорассеяния ЦК с одинаковыми фенотипами является дополнительной характеристикой. В будущих исследованиях предстоит выяснить роль этого признака в ассоциации изучаемых ЦК с развитием отдаленных метастазов.

Литература

- 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 BC: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (3): 920–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1695. PMID: 17289886.
- Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajdich M, et al. Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (4): 3902. DOI: 10.3390/ijms24043902. PMID: 36835311.
- Fabisiewicz A, Szostakowska-Rodzos M, Zaczek AJ, Grzybowska EA. Circulating Tumor Cells in Early and Advanced Breast Cancer; Biology and Prognostic Value. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (5): 1671. DOI: 10.3390/ijms21051671. PMID: 32121386.
- Tashireva LA, Savelieva OE, Grigoryeva ES, Nikitin YV, Denisov EV, et al. Heterogeneous Manifestations of Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (5): 2504. DOI: 10.3390/ijms22052504. PMID: 33801519.
- Savelieva OE, Tashireva LA, Kaigorodova EV, Buzenkova AV, Mukhamedzhanov RKH, Grigoryeva ES, et al. Heterogeneity of Stemlike Circulating Tumor Cells in Invasive Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (8): 2780. DOI: 10.3390/ijms21082780. PMID: 32316333.
- Xu W, Yuan F. Detection of Circulating Tumor Cells in the Prognostic Significance of Patients with Breast Cancer: A Retrospective Study. *J Clin Lab Anal.* 2025; 39 (1): e25126. DOI: 10.1002/jcla.25126. PMID: 39692703.
- Perelmutter VM, Grigoryeva ES, Savelieva OE, Alifanov VV, Andrukhova ES, Zavyalova MV, et al. EpCAM-CD24⁺ circulating cells associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 12245. DOI: 10.1038/s41598-024-61516-2. EDN: XZHVTO.
- Chabot-Richards DS, George TI. White blood cell counts. *Clin Lab Med.* 2015; 35 (1): 11–24. DOI: 10.1016/j.cll.2014.10.007. PMID: 25676369.
- Wu T, Tan JHL, Sin WX, Luah YH, Tan SY, Goh M, et al. Cell granularity reflects immune cell function and enables selection of lymphocytes with superior attributes for immunotherapy. *Adv Sci.* 2023; 10 (28): e2302175. DOI: 10.1002/adv.202302175. PMID: 37544893.
- Watson D, Hagen N, Diver J, Marchand P, Chachisvilis M. Elastic light scattering from single cells: orientational dynamics in optical trap. *Biophys J.* 2004; 87 (2): 1298–306. DOI: 10.1529/biophysj.104.042135. PMID: 15298932.
- Grigoryeva ES, Tashireva LA, Alifanov VV, Savelieva OE, Vtorushin SV, Zavyalova MV, et al. Molecular subtype conversion in CTCs as indicator of treatment adequacy associated with metastasis-free survival in breast cancer. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 20949. DOI: 10.1038/s41598-022-25609-0. PMID: 36470982.
- Sterzynska K, Kempisty B, Zawierucha P, Zabel M. Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.5603/17845. PMID: 23264216.
- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumor cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC cancer.* 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.1186/1471-2407-12-178. PMID: 22591372.
- Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011; 50 (5): 700–10. DOI: 10.3109/0284186X.2010.549151. PMID: 21261508.
- Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, et al. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene.* 2014; 33 (41): 4904–15. DOI: 10.1038/ncr.2013.441. PMID: 24141784.
- Перельмутер В. М., Манских В. Н. Прениша как отсутствующее звено концепции метастатических ниш, объясняющее избирательное метастазирование злокачественных опухолей и форму метастатической болезни. *Биохимия.* 2012; 77 (1): 130–9.
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol.* 2007; 137 (6): 491–502. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06610.x. PMID: 17539772.
- Huang Y, Chanou A, Kranz G, Pan M, Kohlbauer V, Ettinger A, et al. Membrane-associated epithelial cell adhesion molecule is slowly cleaved by γ -secretase prior to efficient proteasomal degradation of its intracellular domain. *JBC.* 2019; 294 (9): 3051–64. DOI: 10.1074/jbc.RA118.005874. PMID: 30598504.
- Schreier S & Triampo W. The blood circulating rare cell population. What is it and what is it good for? *Cells.* 2020; 9 (4): 790. DOI: 10.3390/cells9040790. PMID: 32218149.
- Holtorf S, Boyle J, Morris R. Evidence for EpCAM and cytokeratin expressing epithelial cells in normal human and murine blood and bone marrow. *JoVE.* 2023; (194): 10.3791/65118. DOI:

- 10.3791/65118. PMID: PMC10653199.
21. Kassmer SH & Krause DS. Detection of bone marrow-derived lung epithelial cells. *Exp Hematol*. 2010; 38 (7): 564–73. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.04.011. PMID: 20447442.
 22. Van Amam JS, Herzog E, Grove J, Bruscia E, Ziegler E, Swenson S. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Stem Cell Rev*. 2005; 1 (1): 21–7. DOI: 10.1385/SCR:1:1:021. PMID: 17132871.
 23. Borue X, Lee S, Grove J, Herzog EL, Harris R, Diflo T, et al. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol*. 2004; 165 (5): 1767–72. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63431-1. PMID: 15509544.
 24. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *JBC*. 2005; 280 (2): 1336–45. DOI: 10.1074/jbc.M406968200. PMID: 15485828.
 25. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol*. 2010; 11 (8): 734–42. DOI: 10.1038/ni.1908. PMID: 20639876.
 26. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 5379. DOI: 10.1038/s41467-018-07387-4. PMID: 30568188.
 27. Lambert C, Preijers FW, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017; 92 (3): 180–8. DOI: 10.1002/cyto.b.21280. PMID: 26332381.
 28. Johansson J, Tabor V, Wikell A, Jalkanen S, Fuxe J. TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. *Front Oncol*. 2015; 5: 3. DOI: 10.3389/fonc.2015.00003. PMID: 25674539.
- ## References
1. 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 BC: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (3): 920–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1695. PMID: 17289886.
 2. Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajdich M, et al. Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (4): 3902. DOI: 10.3390/ijms24043902. PMID: 36835311.
 3. Fabisiowicz A, Szostakowska-Rodnos M, Zaczek AJ, Grzybowska EA. Circulating Tumor Cells in Early and Advanced Breast Cancer; Biology and Prognostic Value. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (5): 1671. DOI: 10.3390/ijms21051671. PMID: 32121386.
 4. Tashireva LA, Savelieva OE, Grigoryeva ES, Nikitin YV, Denisov EV, et al. Heterogeneous Manifestations of Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (5): 2504. DOI: 10.3390/ijms22052504. PMID: 33801519.
 5. Savelieva OE, Tashireva LA, Kaigorodova EV, Buzenkova AV, Mukhamedzhanov RK, Grigoryeva ES, et al. Heterogeneity of Stemlike Circulating Tumor Cells in Invasive Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (8): 2780. DOI: 10.3390/ijms21082780. PMID: 32316333.
 6. Xu W, Yuan F. Detection of Circulating Tumor Cells in the Prognostic Significance of Patients with Breast Cancer: A Retrospective Study. *J Clin Lab Anal*. 2025; 39 (1): e25126. DOI: 10.1002/jcla.25126. PMID: 39692703.
 7. Perelmutter VM, Grigoryeva ES, Savelieva OE, Alifanov VV, Andruhova ES, Zavyalova MV, et al. EpCAM-CD24+ circulating cells associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Sci Rep*. 2024; 14 (1): 12245. DOI: 10.1038/s41598-024-61516-2. EDN: XZHVTO.
 8. Chabot-Richards DS, George TI. White blood cell counts. *Clin Lab Med*. 2015; 35 (1): 11–24. DOI: 10.1016/j.clm.2014.10.007. PMID: 25676369.
 9. Wu T, Tan JHL, Sin WX, Luah YH, Tan SY, Goh M, et al. Cell granularity reflects immune cell function and enables selection of lymphocytes with superior attributes for immunotherapy. *Adv Sci*. 2023; 10 (28): e2302175. DOI: 10.1002/advs.202302175. PMID: 37544893.
 10. Watson D, Hagen N, Diver J, Marchand P, Chachisvilis M. Elastic light scattering from single cells: orientational dynamics in optical trap. *Biophys J*. 2004; 87 (2): 1298–306. DOI: 10.1529/biophysj.104.042135. PMID: 15298932.
 11. Grigoryeva ES, Tashireva LA, Alifanov VV, Savelieva OE, Vtorushin SV, Zavyalova MV, et al. Molecular subtype conversion in CTCs as indicator of treatment adequacy associated with metastasis-free survival in breast cancer. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 20949. DOI: 10.1038/s41598-022-25609-0. PMID: 36470982.
 12. Sterzynska K, Kempisty B, Zawierucha P, Zabel M. Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.5603/17845. PMID: 23264216.
 13. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumor cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC cancer*. 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.1186/1471-2407-12-178. PMID: 22591372.
 14. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol*. 2011; 50 (5): 700–10. DOI: 10.3109/0284186X.2010.549151. PMID: 21261508.
 15. Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, et al. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*. 2014; 33 (41): 4904–15. DOI: 10.1038/onc.2013.441. PMID: 24141784.
 16. Perelmutter VM, Mansikh VN, Prenisha as the missing link of the metastatic niche concept explaining selective metastasis of malignant tumors and the pattern of metastatic disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77 (1): 111–8. DOI: 10.1134/S0006297912010142. PMID: 22339641.
 17. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007; 137 (6): 491–502. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06610.x. PMID: 17539772.
 18. Huang Y, Chanou A, Kranz G, Pan M, Kohlbauer V, Ettinger A, et al. Membrane-associated epithelial cell adhesion molecule is slowly cleaved by γ -secretase prior to efficient proteasomal degradation of its intracellular domain. *JBC*. 2019; 294 (9): 3051–64. DOI: 10.1074/jbc.RA118.005874. PMID: 30598504.
 19. Schreier S & Triampo W. The blood circulating rare cell population. What is it and what is it good for? *Cells*. 2020; 9 (4): 790. DOI: 10.3390/cells9040790. PMID: 32218149.
 20. Holtorf S, Boyle J, Morris R. Evidence for EpCAM and cytokeratin expressing epithelial cells in normal human and murine blood and bone marrow. *JoVE*. 2023; (194): 10.3791/65118. DOI: 10.3791/65118. PMID: PMC10653199.
 21. Kassmer SH & Krause DS. Detection of bone marrow-derived lung epithelial cells. *Exp Hematol*. 2010; 38 (7): 564–73. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.04.011. PMID: 20447442.
 22. Van Amam JS, Herzog E, Grove J, Bruscia E, Ziegler E, Swenson S. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Stem Cell Rev*. 2005; 1 (1): 21–7. DOI: 10.1385/SCR:1:1:021. PMID: 17132871.
 23. Borue X, Lee S, Grove J, Herzog EL, Harris R, Diflo T, et al. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol*. 2004; 165 (5): 1767–72. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63431-1. PMID: 15509544.
 24. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *JBC*. 2005; 280 (2): 1336–45. DOI: 10.1074/jbc.M406968200. PMID: 15485828.
 25. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol*. 2010; 11 (8): 734–42. DOI: 10.1038/ni.1908. PMID: 20639876.
 26. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate

- immunity. Nat Commun. 2018; 9 (1): 5379. DOI: 10.1038/s41467-018-07387-4. PMID: 30568188.
27. Lambert C, Preijers FW, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2017; 92 (3): 180–8. DOI: 10.1002/cyto.b.21280. PMID: 26332381.
28. Johansson J, Tabor V, Wikell A, Jalkanen S, Fuxe J. TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. Front Oncol. 2015; 5: 3. DOI: 10.3389/fonc.2015.00003. PMID: 25674539.