

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ХЕМОКИНОВ CXCR4 И CXCR7 В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е. С. Григорьева¹✉, Л. А. Таширева¹, О. Е. Савельева², М. В. Завьялова¹, Н. В. Чердынцева¹, В. М. Перельмутер¹¹ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Хемокиновые рецепторы CXCR4 и CXCR7 в клетках первичной опухоли связаны с прогрессией опухолевого роста. Цель исследования — изучить экспрессию CXCR4 и CXCR7 в субпопуляциях ЦОК с положительной (EpCAM⁺) и отрицательной (EpCAM⁻) экспрессией EpCAM у пациентов с раком молочной железы (РМЖ), а также оценить их связь с клинико-патологическими параметрами и прогностической значимостью. Анализ белковой экспрессии и транскриптомное профилирование ЦОК, полученных из периферической крови, показали, что CXCR4 и CXCR7 преимущественно экспрессировались в EpCAM⁺ ЦОК, тогда как EpCAM⁻ клетки в основном не имели экспрессии CXCR4 и CXCR7 ($p < 0,001$). Важно, что увеличение количества EpCAM⁺ ЦОК, независимо от экспрессии CXCR4/7, было связано с прогрессированием заболевания в течение шестилетнего периода ($p = 0,0007$). Прогностическое значение показано для EpCAM⁺CXCR4/7⁻ ЦОК, при этом количество, превышающее 1,25 кл./мл периферической крови, предсказывало прогрессирование заболевания с чувствительностью 100% и специфичностью 95,1%. Отдельные субпопуляции ЦОК были дополнительно охарактеризованы по маркерам стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), что подчеркивает агрессивный фенотип EpCAM⁺ клеток, проявляющих признаки ЭМП. Транскриптомный анализ EpCAM⁺CXCR4/7⁻ ЦОК выявил повышенную экспрессию генов, участвующих в ферроптозе ($p = 3,315 \times 10^{-7}$) и сигнальных путях андрогенового рецептора ($p = 8,0 \times 10^{-5}$), а также генов, ассоциированных с прогрессированием (*HBB*, *IGLC2* и *IGHM*). Напротив, *MALAT1* был сверхэкспрессирован у пациентов без прогрессирования, что указывает на потенциальную подавляющую метастазирование функцию ($p = 1,52 \times 10^{-3}$). Результаты подчеркивают патогенетическую значимость EpCAM⁺ ЦОК в прогрессировании РМЖ и поддерживают смену парадигмы в исследованиях ЦОК в сторону этой субпопуляции.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, хемокиновые рецепторы, эпителиально-мезенхимальный переход, стволовые клетки, транскриптомика, прогрессирование рака молочной железы

Финансирование: исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00135).

Вклад авторов: Е. С. Григорьева, О. Е. Савельева, М. В. Завьялова — сбор и анализ данных, Е. С. Григорьева, Л. А. Таширева — написание и редактирование, В. М. Перельмутер — курирование исследования, Н. В. Чердынцева — финансирование проекта.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Томского национального исследовательского медицинского центра (протокол № 8 от 17 июня 2016 г.), проведено согласно требованиям Хельсинкской декларации. Все участники дали письменное информированное согласие.

✉ Для корреспонденции: Евгения Сергеевна Григорьева
пер. Кооперативный, д. 5, г. Томск, 634009, Россия; grigoryeva.es@gmail.com

Статья получена: 24.10.2025 Статья принята к печати: 29.11.2025 Опубликовано онлайн: 08.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.064

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/>).

EXPRESSION OF CHEMOKINE RECEPTORS CXCR4 AND CXCR7 IN CIRCULATING TUMOR CELLS OF BREAST CANCER

Grigoryeva ES¹✉, Tashireva LA¹, Saveliyeva OE², Zavyalova MV¹, Cherdynitseva NV¹, Perelmutter VM¹¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia² Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

It is known that chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in primary tumor cells are associated with tumor growth progression; however, the significance of their expression in circulating tumor cells (CTCs) remains insufficiently studied. The objective of this study was to investigate the expression of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in subpopulations of CTCs with positive (EpCAM⁺) and negative (EpCAM⁻) EpCAM expression in breast cancer patients, as well as assessed their correlation with clinicopathological parameters and prognostic relevance. The study methods included protein expression analysis and transcriptome profiling of CTCs obtained from peripheral blood. This study comprehensively characterized CXCR4 and CXCR7 expression across EpCAM⁺ and EpCAM⁻ CTC subsets and assessed their clinical relevance through protein-level detection, transcriptomic profiling, and long-term patient follow-up. CXCR4 and CXCR7 receptors were predominantly expressed in EpCAM⁺ CTCs, whereas EpCAM⁻ cells were largely negative. Importantly, an increased number of EpCAM⁺ CTCs, irrespective of CXCR4/7 status, was associated with disease progression over a six-year period ($p = 0,0007$). Prognostic significance was specifically attributed to EpCAM⁺CXCR4/7⁻ CTCs, with counts exceeding 1.25 cells/ml predicting progression with high sensitivity and specificity. Distinct CTC subpopulations were further characterized by stemness and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers, underscoring the aggressive phenotype of EpCAM⁺ cells exhibiting EMT traits. Transcriptomic analysis of EpCAM⁺CXCR4/7⁻ CTCs revealed upregulation of genes involved in ferroptosis ($p = 3.315 \times 10^{-7}$) and androgen receptor signaling pathways ($p = 8.0 \times 10^{-5}$), alongside identification of progression-associated genes (*HBB*, *IGLC2*, and *IGHM*). Conversely, *MALAT1* was overexpressed in patients without progression, indicating a potential metastasis-suppressive function ($p = 1.52 \times 10^{-3}$). These findings highlight the pathogenetic importance of EpCAM⁺ CTCs in breast cancer progression and support a paradigm shift in CTC research towards this subpopulation. Further investigations are warranted to elucidate the functional roles of these cells and their utility as prognostic biomarkers.

Keywords: circulating tumor cells, chemokine receptors, epithelial-mesenchymal transition, stemness, transcriptomics, breast cancer progression

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-15-00135).

Author contribution: Grigoryeva ES, Saveliyeva OE, Zavyalova MV — data collection and analysis; Grigoryeva ES, Tashireva LA — writing and editing; Perelmutter VM — research supervision; Cherdynitseva NV — project funding.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Local Ethics Committee of Tomsk National Research Medical Center (17 June 2016, the approval No. 8) and complied with the Declaration of Helsinki. All participants gave written informed consent.

✉ Correspondence should be addressed: Evgeniya S. Grigoryeva
per. Kooperativnyy, 5, Tomsk, 634009, Russia; grigoryeva.es@gmail.com

Received: 24.10.2025 Accepted: 29.11.2025 Published online: 08.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.064

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/>).

Рак молочной железы (РМЖ) остается одной из наиболее серьезных проблем современной онкологии из-за своей высокой распространенности, высокой смертности и частого метастазирования. Недавние достижения в области методов жидкостной биопсии открыли новые возможности для разработки подходов, позволяющих точнее прогнозировать клиническое течение заболевания. Среди наиболее перспективных объектов исследования — циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), представляющие собой опухолевые клетки, отделившиеся от первичной опухоли и циркулирующие в кровотоке. Повышенный уровень ЦОК в периферической крови часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом, что делает их ценным инструментом для стратификации пациентов и оптимизации стратегий лечения [1]. Однако клиническое применение ЦОК сталкивается с рядом проблем, включая их низкую концентрацию в крови и технические трудности обнаружения [2]. Большинство исследований ЦОК основаны на методах определения экспрессии EpCAM [3]. Это предпочтение во многом обусловлено доступностью коммерчески сертифицированных систем, предназначенных для обнаружения EpCAM-позитивных ЦОК [4]. Хотя опухолевые клетки, экспрессирующие EpCAM, традиционно считали основными драйверами метастазирования, все больше данных подчеркивает важную роль субпопуляций, не экспрессирующих EpCAM [5]. Потеря экспрессии мембранного EpCAM часто связана с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) — процессом, при котором эпителиальные клетки теряют полярность и межклеточную адгезию, приобретая мезенхимальные черты, такие как повышенная подвижность и устойчивость к апоптозу [6]. При прогрессировании опухоли ЭМП способствует подвижности опухолевых клеток, их инвазии, интравазации, выживанию в кровотоке и образованию метастазов после экстравазации в отдаленные органы [7]. Следовательно, ЦОК представляют собой гетерогенную популяцию, включающую клетки с различными эпителиальными и мезенхимальными фенотипами, а также свойствами, подобными свойствам стволовых клеток, что может лежать в основе их метастатического потенциала.

В контексте исследования гетерогенности ЦОК значительный интерес представляют хемокиновые рецепторы CXCR4 и CXCR7, активируемые их общим лигандом SDF-1 (CXCL12). Наиболее хорошо изученной функцией оси CXCR4–SDF-1 является опосредование направленной миграции клеток-предшественников костного мозга и иммунных клеток к местам воспаления. Хорошо известно, что CXCR4 и CXCR7 часто сверхэкспрессированы в опухолевых клетках, а их взаимодействие с SDF-1 играет решающую роль в прогрессировании рака и метастазировании [8]. Опухолевые клетки с повышенной экспрессией CXCR4 демонстрируют повышенную пролиферацию, обусловленную активацией сигнальных путей MAPK и PI3K/Akt, в то время как повышенные уровни антиапоптотических белков и сниженная экспрессия рецепторов клеточной гибели способствуют выживанию клеток [9]. Первоначально CXCR7 считали рецептором-ловушкой, который секвестрирует CXCL12, тем самым ослабляя активность CXCR4 [10]. Однако последние данные показывают, что CXCR7 может передавать сигнал через неканонический путь β -аррестина, что приводит к активации внутриклеточных каскадов, включая пути протеинкиназы B (AKT) и JAK/STAT, которые дополнительно стимулируют пролиферацию и миграцию

опухолевых клеток [11]. Согласно литературным данным, высокая экспрессия CXCR4 коррелирует с повышенным риском метастазирования РМЖ в лимфатические узлы и отдаленные органы, а также со снижением безрецидивной и общей выживаемости [12]. Подводя итог, можно сказать, что, хотя паттерны экспрессии CXCR4 и CXCR7 в первичных опухолях молочной железы были подробно описаны, число исследований, изучающих их экспрессию в ЦОК, остается крайне ограниченным.

Целью данного исследования было изучить экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в субпопуляциях ЦОК с положительной (EpCAM⁺) и отрицательной (EpCAM⁻) экспрессией EpCAM у больных РМЖ, а также оценить их связь с клинико-патологическими параметрами и прогностической значимостью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включены 65 пациенток с инвазивной протоковой карциномой молочной железы неспецифического типа, проходившие лечение в клинике НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра (табл. 1, 2). Исследование ЦОК выполняли до всех видов лечения. Пациенты получали лечение в полном объеме согласно клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ. Период наблюдения составил 6 лет.

Проточная цитометрия

Для выявления ЦОК использовали образцы венозной крови, полученные от больных РМЖ. Клеточные концентраты готовили методом седиментации с последующим сбором слоя лейкоцитов на границе раздела между осадком эритроцитов и отделенной плазмой, а также всей надосадочной жидкости по методу, описанному Р. А. Поспеловой [13].

Образцы для проточной цитометрии готовили следующим образом. Клеточный концентрат промывали добавлением 1 мл раствора CellWASH (BD Biosciences, США) и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Для лизирования эритроцитов добавляли 500 мкл буфера OptiLyse C (Beckman Coulter, Франция), образцы промывали 2 мл раствора CellWASH в течение 10 мин при 300 g, после чего надосадочную жидкость удаляли. После блокирования неспецифического связывания Fc-рецепторов с помощью раствора для блокирования Human TruStain FcX™ (BioLegend, США) к клеточному концентрату добавляли 5 мкл следующих моноклональных антител: BV570 против человеческого CD45 (клон HI30; Sony Biotechnology, США), BV650 против человеческого CD326 (EpCAM) (клон 9C4; Sony Biotechnology, США), BV510 против человеческого CD44 (клон G44-26; BD Horizon, США), PerCP/Cy5.5 против человеческого CD24 (клон ML5; Sony Biotechnology, США), BV421 против человеческого CXCR4 (клон 12G5; Sony Biotechnology, США), BV421 против человеческого CXCR7 (клон 10D1; BD Biosciences; США) и PE/Cy7 против человеческого N-кадгерин (клон 8C11; Sony Biotechnology, США). Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин.

После инкубации пробы промывали 2 мл раствора CellWASH в течение 10 мин при 300 g, удаляя надосадочную жидкость. Для внутриклеточного окрашивания к каждому неокрашенному и окрашенному образцу добавляли

Таблица 1. Клинико-патологические данные пациентов, вошедших в исследование субпопуляционного состава ЦОК

Параметр		Частота, % (n)
Возраст	≤ 50	26,67% (12/45)
	> 50	73,33% (33/45)
Размер опухоли (сТ)	1	35,56% (16/45)
	2	60,00% (27/45)
	4	4,44% (2/45)
Стадия	IA	28,89% (13/45)
	IIA	33,33% (15/45)
	IIB	33,33% (15/45)
	IIIB	4,44% (2/45)
Вовлеченность лимфоузлов (сN)	0	53,33% (24/45)
	1	46,67% (21/45)
Молекулярно-биологический подтип	Люминальный A	26,67% (12/45)
	Люминальный B (HER2 ⁻)	37,78% (17/45)
	Люминальный B (HER2 ⁺)	20,00% (9/45)
	Тройной негативный	6,67% (3/45)

250 мкл раствора BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) с последующей инкубацией в темноте при 4 °C в течение 20 мин. Затем образцы дважды промывали в 1 мл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США) путем центрифугирования при 300 g в течение 6 мин. Затем к каждому образцу добавляли 50 мкл буфера BD Perm/Wash и 5 мкл следующих антител: AF647-anti-human CK7/8 (клон CAM5.2; BD Pharmingen, США), AF488-anti-human Snail1 (клон 20C8; eBioscience, США) и AF750-anti-human Vimentin (R&D Systems, США). Образцы инкубировали при 4 °C в течение 20 мин.

Затем каждый образец промывали в 1 мл буфера CellWASH (BD Biosciences; США) центрифугированием при 300 g в течение 6 мин. На заключительном этапе к осадку добавляли 100 мкл буфера для окрашивания клеток (Sony Biotechnology; США) и ресуспендировали образец. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences; США) с использованием

программы NovoExpress 1.3.0 (ACEA Biosciences; США). Концентрацию циркулирующих клеток рассчитывали на 1 мл крови.

Статистический анализ проводили с использованием пакета Prism 10.4.1 (GraphPad Software; США). Для анализа независимых групп использовали критерий Краскела–Уоллиса, а для анализа двух независимых групп — критерий Манна–Уитни. Для оценки прогностической ценности точности прогноза использовали ROC-анализ. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Транскриптомное секвенирование единичных ЦОК

Для изучения транскриптомного профиля EPCAM⁻ и EPCAM⁺ ЦОК был использован набор данных РНК-секвенирования 20 пациентов с РМЖ (T1-4N0-3M0, все молекулярные подтипы), полученный в нашем предыдущем

Таблица 2. Клинико-патологические данные пациентов, вошедших в исследование транскрипционного профиля ЦОК

Параметр		Частота, % (n)
Возраст	≤ 50	30,0% (6/20)
	> 50	70,0% (14/20)
Размер опухоли (сТ)	1	5,0% (1/40)
	2	80,0% (15/40)
	3	5,0% (1/20)
	4	5,0% (3/20)
	4	5,0% (3/20)
Стадия	I	5,0% (1/20)
	IIA	20,0% (5/20)
	IIB	40,0% (8/20)
	IIIA	15,0% (3/20)
	IIIB	10,0% (2/20)
	IIIC	5,0% (1/20)
Вовлеченность лимфоузлов (сN)	0	30,0% (6/20)
	1	70,0% (14/20)
Молекулярно-биологический подтип	Люминальный A	10,0% (2/20)
	Люминальный B (HER2 ⁻)	65,0% (13/20)
	Люминальный B (HER2 ⁺)	10,0% (2/20)
	Тройной негативный (HER2 ⁺)	5,0% (5/20)
	(HER2 ⁺)	10,0% (1/20)

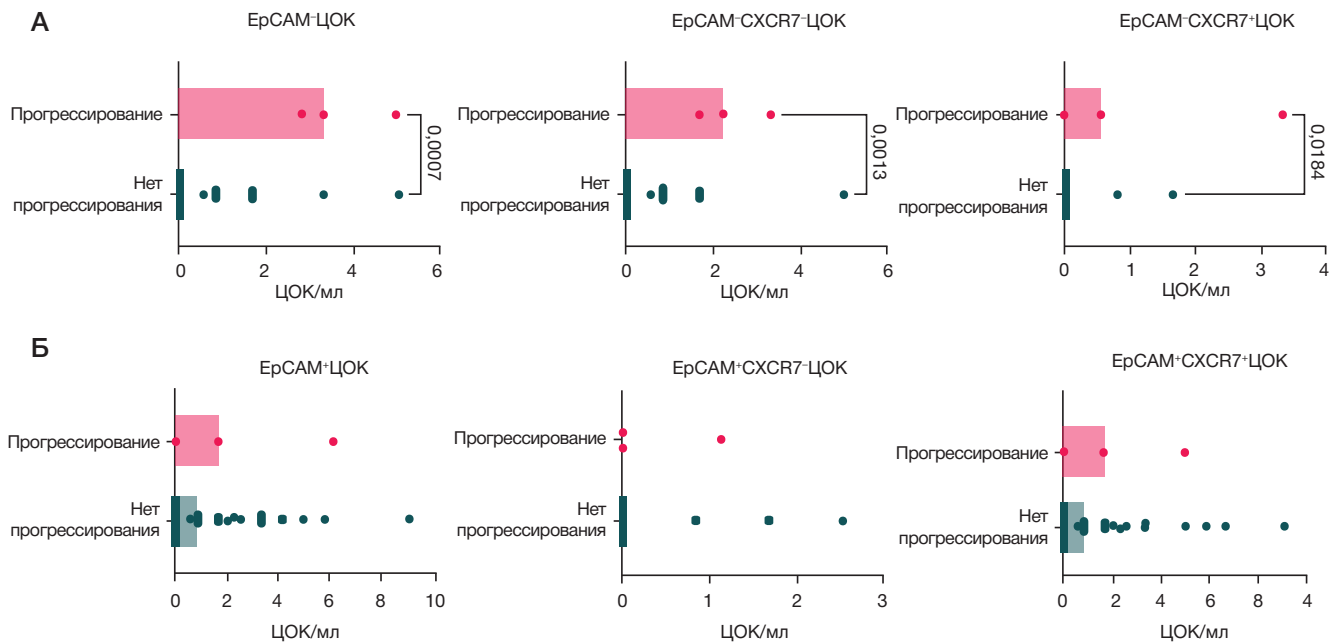


Рис. 1. Количество EpCAM⁺ (А) и EpCAM⁻ (Б) ЦОК в зависимости от экспрессии CXCR4/7 у пациентов с РМЖ с прогрессированием опухоли в течение шестилетнего периода наблюдения

исследовании [14], доступный через BioProject под регистрационным номером PRJNA776403.

Для контроля качества и анализа данных секвенирования РНК отдельных клеток использовали программный пакет Seurat версии 4.0.4 [15]. Дуплеты клеток идентифицировали с помощью DoubletFinder [16] и затем удаляли из каждого набора данных. Была проведена интеграция 20 наборов данных с параметрами по умолчанию. Агрегированные данные прошли предварительную обработку с исключением клеток с числом уникальных признаков менее 200 и процентом митохондрий более 25. Необработанные значения UMI РНК в агрегированных данных были нормализованы, после чего был проведен анализ главных компонент (PCA). Набор данных был визуализирован и исследован с помощью метода равномерного многообразия аппроксимации и проекции (UMAP), нелинейного метода редукции размерности.

Анализ данных пространственной транскриптомики ткани опухоли молочной железы

Набор данных пространственной транскриптомики, созданный в нашем предыдущем исследовании [17] и доступный в базе данных GEO под регистрационным номером GSE242311, был использован для исследования экспрессии генов в EpCAM⁻ и EpCAM⁺ опухолевых клетках в первичной опухоли пяти пациентов с РМЖ (инвазивная карцинома неспецифического типа, люминальные А и В, стадии I-IIA, степень злокачественности 2–3). Данные были отфильтрованы для исключения генов с ненулевой экспрессией менее чем в 10 регионах ткани и регионы ткани с менее чем 200 отфильтрованными генами. Первичные значения были нормализованы с помощью функции SCTransform [18] с параметрами по умолчанию. Затем к нормализованным с помощью SCTransform значениям был применен метод аппроксимации и проекции равномерного многообразия (UMAP) с использованием первых 30 главных компонент, определенных с помощью анализа главных компонент (PCA). Результаты визуализировали с помощью пакета Seurat.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Связь между количеством EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК, экспрессирующих CXCR4 и CXCR7, и клиническими параметрами у пациентов с РМЖ

Количество EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК оценивали в периферической крови пациентов с РМЖ. EpCAM⁺ ЦОК определялись как клетки, экспрессирующие EpCAM, но не экспрессирующие пан-лейкоцитарный антиген CD45, независимо от экспрессии цитокератинов 7/8. EpCAM⁻ ЦОК определялись как CD45-отрицательные клетки без экспрессии EpCAM, но позитивные по цитокератинам 7/8. Анализ показал, что количество EpCAM⁺ ЦОК было значительно выше, чем количество EpCAM⁻ ЦОК ($p = 0,0237$). Медиана количества EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК составила 0,00 (0,00–1,25) и 0,83 (0,00–3,32) кл./мл соответственно.

EpCAM⁺ ЦОК демонстрировали значительно более высокую экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 по сравнению с EpCAM⁻ ЦОК (25/45 против 6/45; $p < 0,001$). В частности, среди EpCAM⁺ ЦОК преобладали клетки, позитивные по CXCR4/7, тогда как среди EpCAM⁻ ЦОК чаще встречались клетки, негативные по CXCR4/7. Медианное количество CXCR4/7⁺ клеток составило 0,83 (0,00–2,12) кл./мл для EpCAM⁺ ЦОК и 0,00 (0,00–0,00) кл./мл для EpCAM⁻ ЦОК. Напротив, медианное количество CXCR4/7⁻ клеток составило 0,00 (0,00–0,00) кл./мл для EpCAM⁺ ЦОК и 0,00 (0,00–0,83) кл./мл для EpCAM⁻ ЦОК. Более того, количество ЦОК, экспрессирующих CXCR4/7, было значительно выше среди EpCAM⁺ ЦОК по сравнению с EpCAM⁻ ЦОК ($p < 0,001$), с медианными значениями 0,83 (0,00–2,12) кл./мл и 0,00 (0,00–0,00) кл./мл соответственно.

Анализ количества EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК, экспрессирующих CXCR4/7, в зависимости от клико-патологических параметров не выявил значимых ассоциаций с клиническими параметрами (Приложение, рис. 1А–Г).

В течение шестилетнего периода у трех пациентов наблюдали прогрессирование заболевания: у одного — рецидив опухоли, а у двух — отдаленные метастазы. Эти

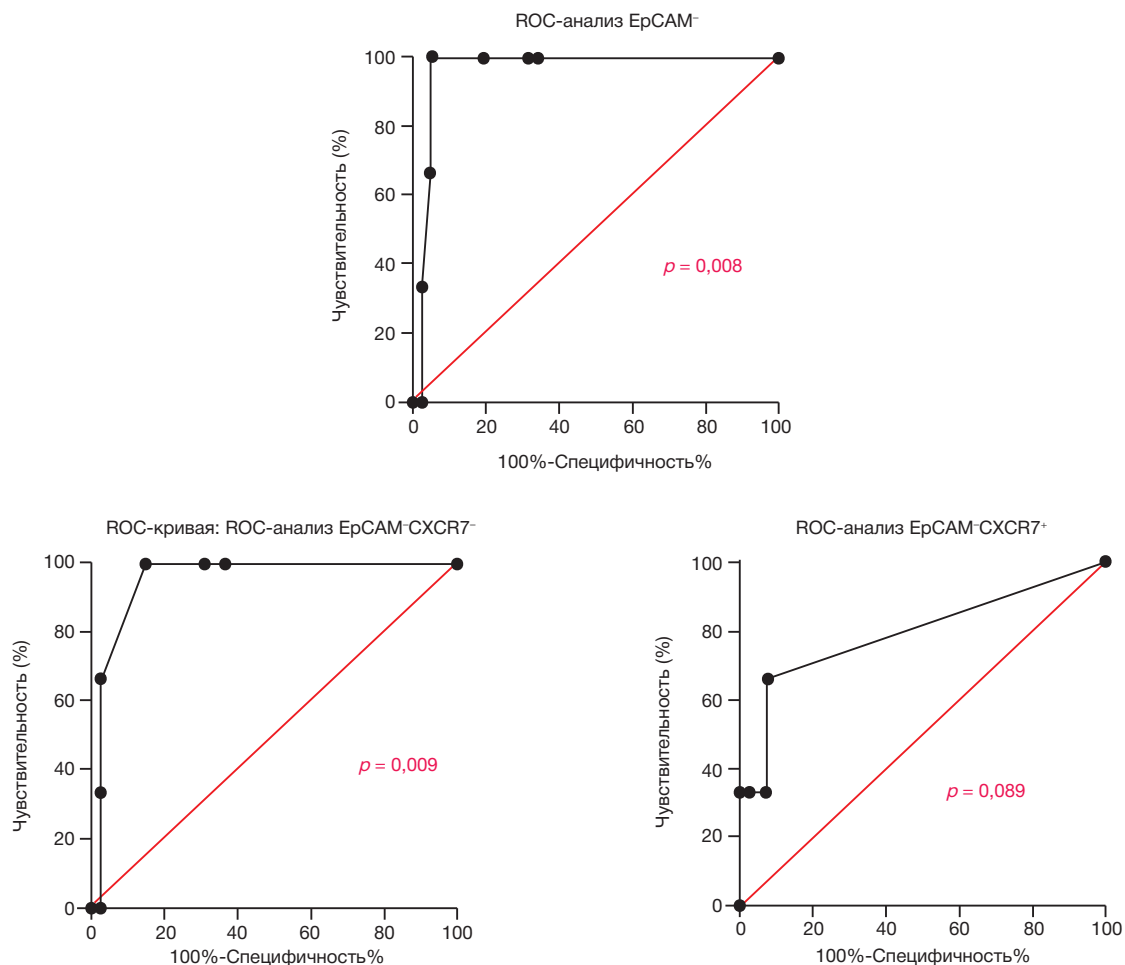


Рис. 2. ROC-анализ EpCAM⁺ ЦОК по экспрессии CXCR4/7 у больных PMЖ с прогрессированием заболевания в течение шестилетнего периода наблюдения

пациенты были отнесены к группе с прогрессированием, остальные — к группе без прогрессирования. Сравнительный анализ количества EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК, экспрессирующих CXCR4 и CXCR7, выявил значительное увеличение общей популяции EpCAM⁻ ЦОК, а также EpCAM⁻CXCR4/7⁺ и EpCAM⁻CXCR4/7⁻ субпопуляций у пациентов с прогрессированием ($p = 0,0007$, $p = 0,0184$ и $p = 0,0013$ соответственно) (рис. 1А). Значимых различий в количестве EpCAM⁺ ЦОК, независимо от экспрессии CXCR4/7, между пациентами с признаками прогрессирования и без них в течение периода наблюдения выявлено не было ($p > 0,05$) (рис. 1Б).

ROC-анализ количества EpCAM⁻ ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7 у пациентов с прогрессированием в течение 6 лет наблюдения продемонстрировал прогностическое значение как параметров EpCAM⁻, так и EpCAM⁻CXCR4/7⁻ (рис. 2). Количество EpCAM⁻ ЦОК $>2,23$ кл./мл периферической крови предсказывало прогрессирование со 100,0% чувствительностью и 95,1% специфичностью (AUC = 0,96, 95% ДИ: 0,91–1,00; $p = 0,008$). Аналогично, количество EpCAM⁻ CXCR4/7⁻ ЦОК $>1,25$ кл./мл предсказывало прогрессирование со 100,0% чувствительностью и 85,7% специфичностью (AUC = 0,96, 95% ДИ: 0,89–1,00; $p = 0,009$). Эти результаты свидетельствуют о том, что популяция EpCAM⁻CXCR4/7⁻ ЦОК имеет прогностическое значение, тогда как клетки EpCAM⁻CXCR4/7⁺ нет (AUC = 0,80, 95% ДИ: 0,47–1,00; $p = 0,089$).

Анализ маркеров стволовых клеток и ЭМП в EpCAM⁻ CXCR4/7⁻ ЦОК, ассоциированных с прогрессированием

опухоли, выявил наличие признаков стволовых клеток, основанных на экспрессии маркеров CD44/CD24, CD133 и ALDH1A1. Количество EpCAM⁻CXCR4/7⁻CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1A1⁺ ЦОК было значительно выше у пациентов с прогрессированием в течение периода наблюдения по сравнению с пациентами без прогрессирования ($p = 0,003$). Медиана количества ЦОК с фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1A1⁺ составила 0,00 (0,00–0,00) кл./мл у пациентов без прогрессирования и 1,66 (0,00–1,68) кл./мл — у пациентов с прогрессированием. При оценке особенностей ЭМП выявлена экспрессия N-кадгерина и Snail ($p = 0,003$). Медиана числа ЦОК с фенотипом N-cadherin⁺Snail⁺Vimentin⁻ у пациентов без признаков прогрессии и с их наличием составила 0,00 (0,00–0,00) и 2,24 (0,00–4,98) кл./мл соответственно.

Ассоциация экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 с признаками стволовых клеток среди EpCAM⁺ и EpCAM⁻ CTC

Для оценки связи между признаками стволовости и экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 были проанализированы частота и количество ЦОК, экспрессирующих маркеры стволовости CD44/CD24, CD133 и ALDH1, среди EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7. Среди EpCAM⁺ ЦОК наибольшая частота наблюдалась для клеток с фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1⁺. В частности, частота встречаемости этих клеток составляла 51,1% (23/45) при экспрессии CXCR4/7

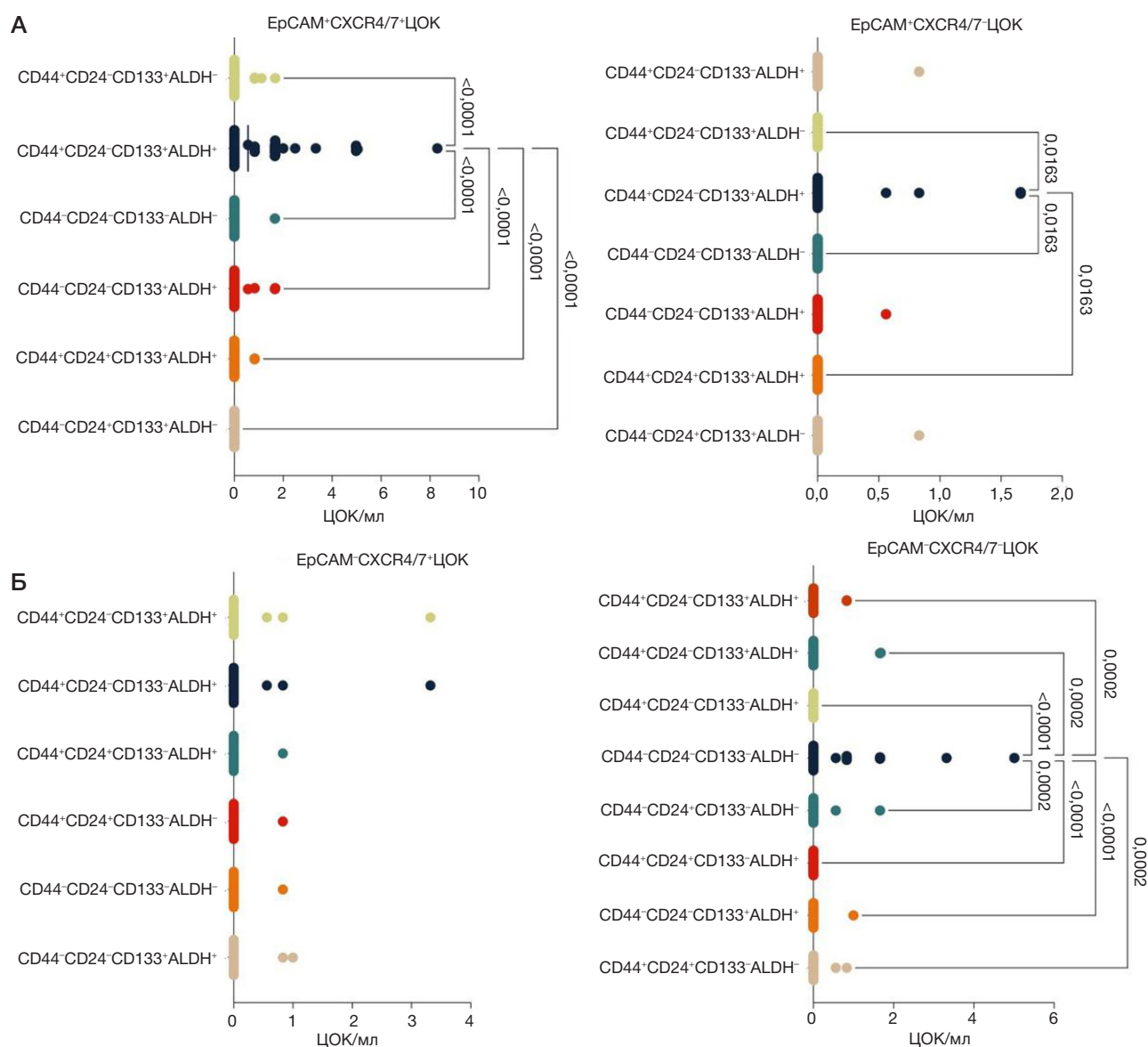


Рис. 3. Количество ErCAM^+ (А) и ErCAM^- (Б) ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7 со стволовыми признаками у пациентов с РМЖ

по сравнению с 11,1% (5/45) в отсутствие CXCR4/7. Таким образом, встречаемость клеток CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1⁺ была значительно выше в EpCAM⁺ ЦОК, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR4/7 ($p < 0,0001$). Наибольшее количество клеток также характеризовалось фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH⁺, независимо от экспрессии CXCR4/7 (рис. 3А). Количество клеток с этим стволовым фенотипом было выше среди EpCAM⁺CXCR4/7⁺ ЦОК ($p < 0,0001$). Медиана CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH⁺ среди EpCAM⁺CXCR4/7⁺ЦОК составила 0,56 (0,00–1,67) кл./мл и 0,00 (0,00–0,00) кл./мл среди EpCAM⁺CXCR4/7⁻ ЦОК. Среди EpCAM⁺CXCR4/7⁺ЦОК частота встречаемости и количество клеток с вариантами стволовости не различались ($p > 0,05$) (рис. 3Б).

Частота встречаемости EpCAM-CXCR4/7⁺ ЦОК была крайне низкой. Наиболее распространенным фенотипом среди этих клеток был CD44-CD24-CD133-ALDH⁻ (12 из 45 случаев), в то время как частота всех остальных фенотипов не превышала 2 из 45 ($p = 0,02$). Кроме того, количество клеток CD44-CD24-CD133-ALDH⁻ было значительно выше по сравнению с другими фенотипами, уровни значимости указаны на рисунке выше. Медианное количество клеток с этим фенотипом составило 0,00 (0,00–

–0,70) кл./мл (рис. 3Б). Оценка экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в EpcAM⁺ ЦОК с различными фенотипами стволовых клеток показала, что доля клеток CD44⁺CD24[–]CD133⁺ALDH1⁺, экспрессирующих CXCR4/7, значительно выше ($p < 0,0001$) (рис. 4А). Напротив, количество ЦОК с экспрессией CXCR4/7 и без нее достоверно не различалось среди клеток с другими фенотипами стволовых клеток ($p > 0,05$).

Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в EpCAM⁺ ЦОК с учетом признаков стволовости не выявил значимых различий в экспрессии CXCR4/7 среди ЦОК с признаками стволовости (рис. 4Б). Однако значительно большее количество клеток, лишенных признаков стволовости, характеризующихся фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁻ALDH⁻, были отрицательными по экспрессии CXCR4/7 ($p = 0,0011$).

Ассоциация экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 с признаками ЭМП в ЕpCAM⁺ и ЕpCAM⁻ ЦОК

В EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК оценивали экспрессию раннего маркера ЭМП Snail, который подавляет эпителиальные

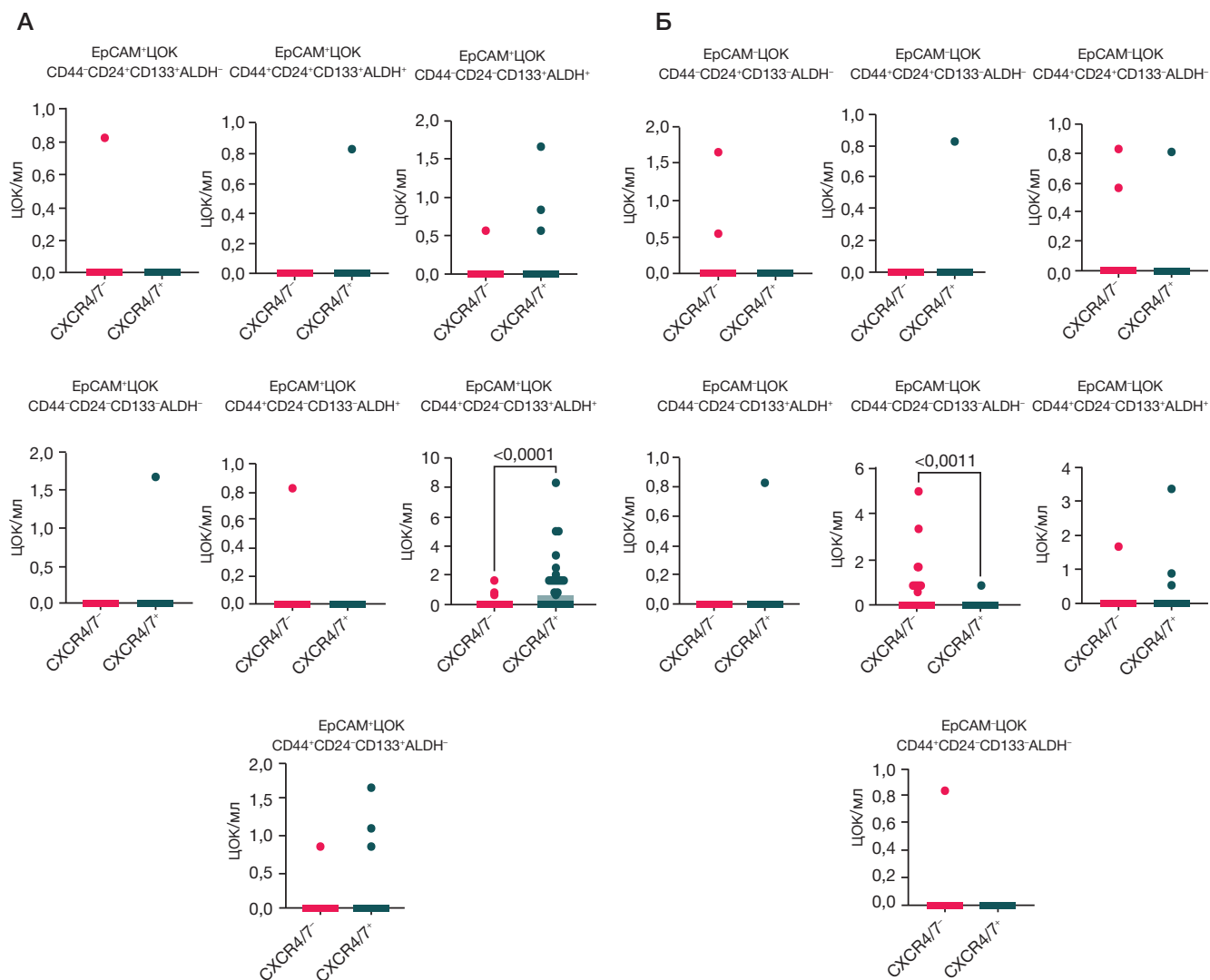


Рис. 4. Сравнение количества EpCAM^+ (А) и EpCAM^- (Б) ЦОК с признаками стволовости в зависимости от экспрессии CXCR4/7 при РМЖ

маркеры и стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров, а также поздних маркеров ЭМП N-кадгерина и виментина. Среди $\text{EpCAM}^+\text{CXCR4/7}^+$ ЦОК наибольшая частота наблюдалась в клетках, экспрессирующих поздние маркеры ЭМП N-кадгерин и виментин, что составило 35,6% (16/45). Более того, количество клеток $\text{N-cadherin}^+\text{Snail}^-\text{vimentin}^+$ было достоверно выше, чем у $\text{N-cadherin}^+\text{Snail}^-\text{vimentin}^-$ и $\text{N-cadherin}^-\text{Snail}^-\text{vimentin}^-$ ЦОК ($p = 0,0003$ и $p = 0,0009$ соответственно) (рис. 5А). Напротив, среди EpCAM^+ ЦОК, не экспрессирующих CXCR4/7 , распределение клеток с различными фенотипами ЭМП достоверно не различалось ($p > 0,05$). При этом среди CXCR4/7^- ЦОК практически не встречались клетки с фенотипом $\text{N-cadherin}^+\text{Snail}^-\text{Vimentin}^+$; их количество было выше среди CXCR4/7^+ ЦОК ($p < 0,0001$) (рис. 5Б).

Анализ экспрессии ранних и поздних маркеров ЭМП в EpCAM^- ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7 не выявил значимых различий ($p > 0,05$) (рис. 6А). Примечательно, что среди EpCAM^- субпопуляции, экспрессирующей CXCR4/7 , не было обнаружено клеток, коэкспрессирующих все три анализируемых маркера ЭМП.

Среди EpCAM^- ЦОК, лишенных N-кадгерина и экспрессирующих Snail, независимо от статуса виментина, значительно большее количество клеток были отрицательными по экспрессии CXCR4/7 ($p = 0,0061$ и $p = 0,0189$ соответственно) (рис. 6Б).

Экспрессия генов CXCR4 и CXCR7 в EpCAM^+ и EpCAM^- ЦОК

В 20 проанализированных образцах пациентов с РМЖ было идентифицировано 239 ЦОК. EpCAM^- ЦОК были определены как клетки, в которых отсутствовала экспрессия генов PTPRC (CD45) и EPCAM , но наблюдалась положительная экспрессия генов цитокератина (KRT7 , KRT8 или KRT18). Напротив, EpCAM^+ ЦОК были охарактеризованы как клетки без экспрессии PTPRC (CD45) и с уровнем экспрессии гена EPCAM выше нуля, независимо от экспрессии цитокератинов. Следовательно, группы EpCAM^+ и EpCAM^- ЦОК включали 11 и 228 клеток соответственно. Частота экспрессии генов рецепторов хемокинов SDF-1 — CXCR4 или CXCR7 — достоверно не различалась между клетками EpCAM^+ и EpCAM^- и составляла 54,5% (6/11) и 53,5% (122/228) соответственно.

Анализ дифференциальной экспрессии генов между клетками EpCAM^+ с экспрессией CXCR4/7 и без нее не выявил значимых различий ($p > 0,05$). Напротив, при сравнении внутри EpCAM^- субпопуляции различия были выявлены. Наиболее сверхэкспрессированные гены в $\text{EpCAM}^- \text{CXCR4/7}^+$ ЦОК включали POSTN ($p = 6,63 \times 10^{-13}$), FN1 ($p = 5,24 \times 10^{-14}$), COL3A1 ($p = 1,08 \times 10^{-11}$), VIM ($p = 2,33 \times 10^{-19}$), S100A6 ($p = 4,60 \times 10^{-9}$) и CD74 ($p = 1,11 \times 10^{-7}$). Активированные сигнальные пути в клетках

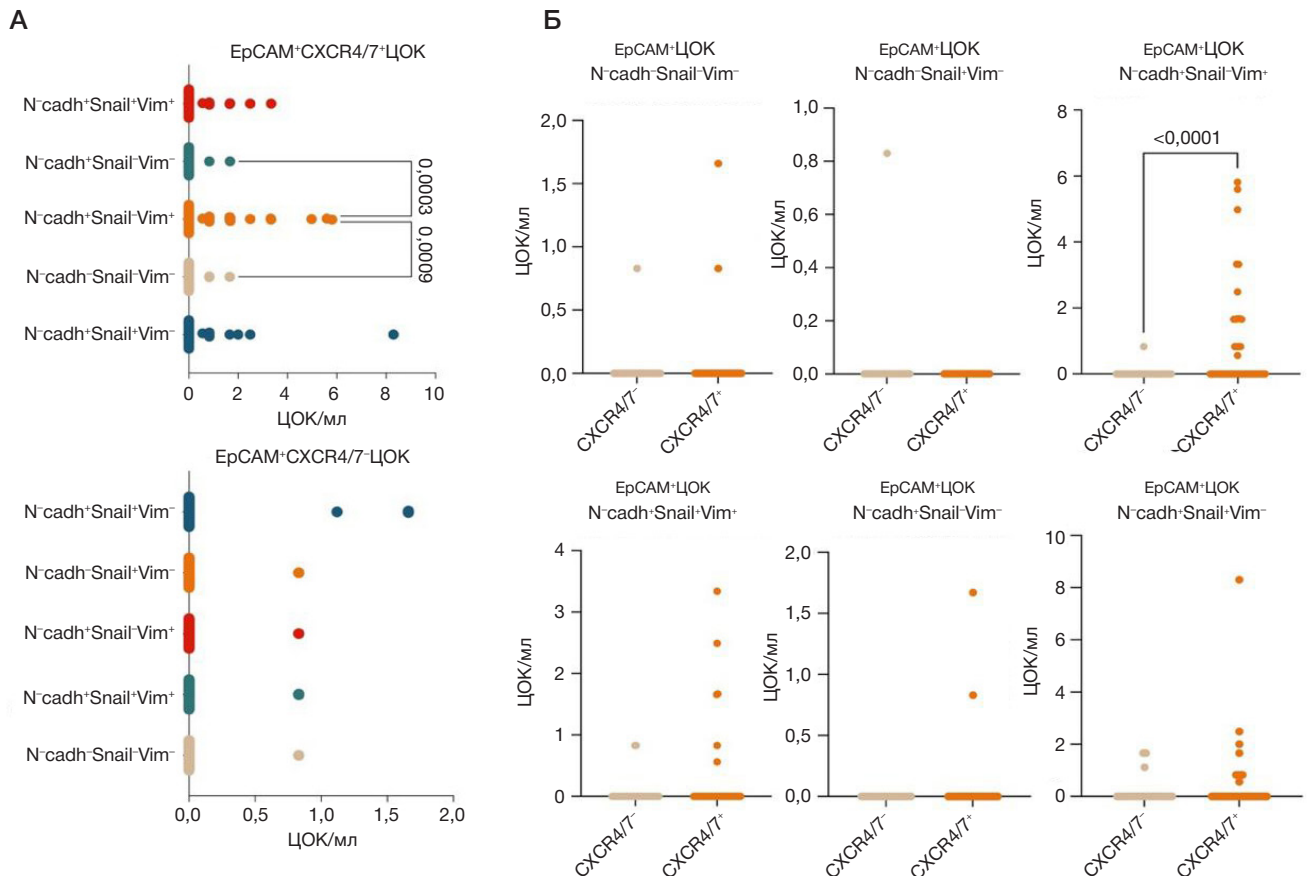


Рис. 5. Количество $EPCAM^+$ ЦОК с учетом экспрессии $CXCR4/7$ с признаками ЭМП у пациентов с РМЖ

$EPCAM^+CXCR4/7^+$ показаны на рис. 2 Приложения. Согласно базе данных KEGG 2021 Human, наибольшее количество сверхэкспрессированных генов было связано с метаболизмом рибосом ($p = 2,365 \times 10^{-143}$), тогда как база данных MSigDB Hallmark 2020 определила путь Myc Targets V1 как наиболее активированный ($p = 7,59 \times 10^{-11}$) (Приложение, рис. 2А).

В популяции $EPCAM^+CXCR4/7^-$ ЦОК наблюдалась повышенная экспрессия множества генов, причем наиболее выражена сверхэкспрессия была у $PF4$ ($p = 1,33 \times 10^{-24}$), $PPBP$ ($p = 5,40 \times 10^{-23}$) и $TUBB1$ ($p = 1,62 \times 10^{-20}$) и др. Согласно базе данных KEGG 2021 Human, наибольшая группа генов с повышенной экспрессией была связана с путем ферроптоза ($p = 3,315 \times 10^{-7}$), в то время как база данных MSigDB Hallmark 2020 выявила значительное обогащение сигнального пути андрогеновых рецепторов ($p = 8,0 \times 10^{-5}$) (Приложение, рис. 2Б). Сравнение профилей транскрипции $EPCAM^+$ и $EPCAM^-$ ЦОК, экспрессирующих $CXCR4/7$, не выявило значимых различий ($p > 0,05$).

В период наблюдения, начавшегося в 2020 г., прогрессирование заболевания наблюдалось у четырех из 20 пациентов. У троих из них развились метастазы в отдаленные органы, а у одного пациента — в регионарные лимфатические узлы. Распределение субпопуляций ЦОК в образцах, полученных от отдельных пациентов, представлено в Приложении, табл. 1.

Значимых различий в частоте и количестве $EPCAM^+$ и $EPCAM^-$ ЦОК, экспрессирующих гены хемокиновых рецепторов $CXCR4/7$, между пациентами с различными результатами лечения в течение шестилетнего периода наблюдения выявлено не было ($p > 0,05$). Кроме того, был проведен дифференциальный анализ экспрессии генов в $EPCAM^+CXCR4/7^-$ ЦОК у пациентов с прогрессированием

заболевания и без него в течение периода наблюдения. В группе пациентов с прогрессированием опухоли экспрессия трех генов была значительно повышена: HBB ($p = 1,34 \times 10^{-5}$), $IGLC2$ ($p = 7,49 \times 10^{-6}$) и $IGHM$ ($p = 1,05 \times 10^{-5}$). Напротив, среди пациентов без прогрессирования была значительно повышена экспрессия только гена $MALAT1$ ($p = 1,52 \times 10^{-2}$).

Пространственный транскриптомный анализ $EPCAM^+$ и $EPCAM^-$ опухолевых клеток в зависимости от экспрессии генов $CXCR4$ и $CXCR7$

Была проведена ручная аннотация регионов в пяти образцах РМЖ для выявления регионов, содержащих опухолевые клетки. Регионы, состоящие исключительно из стромальных клеток, или регионы, в которых количество стромальных клеток превышало количество опухолевых, были исключены из анализа. Впоследствии с помощью инструмента Gene Filter все регионы были разделены на две группы в зависимости от уровня экспрессии гена $EPCAM$. Участки с экспрессией $EPCAM \leq 2$ единиц были обозначены как $EPCAM^-$, пятна с экспрессией $EPCAM \geq 3$ единиц были классифицированы как $EPCAM^+$. В каждой группе $EPCAM^+$ и $EPCAM^-$ регионов оценивали экспрессию генов хемокиновых рецепторов $CXCR4$ и $CXCR7$, что привело к выявлению кластеров, включающих регионы, отрицательные по обоим генам ($CXCR4/7^-$), и кластеров, содержащих регионы, экспрессирующие по крайней мере один из двух генов ($CXCR4/7^+$). Транскрипционные профили регионов $EPCAM^+$, экспрессирующих $CXCR4$ и/или $CXCR7$, сравнивали с профилями регионов, не экспрессирующих $CXCR4/7$. Регионы $EPCAM^+CXCR4/7^+$ демонстрировали значительное количество дифференциально

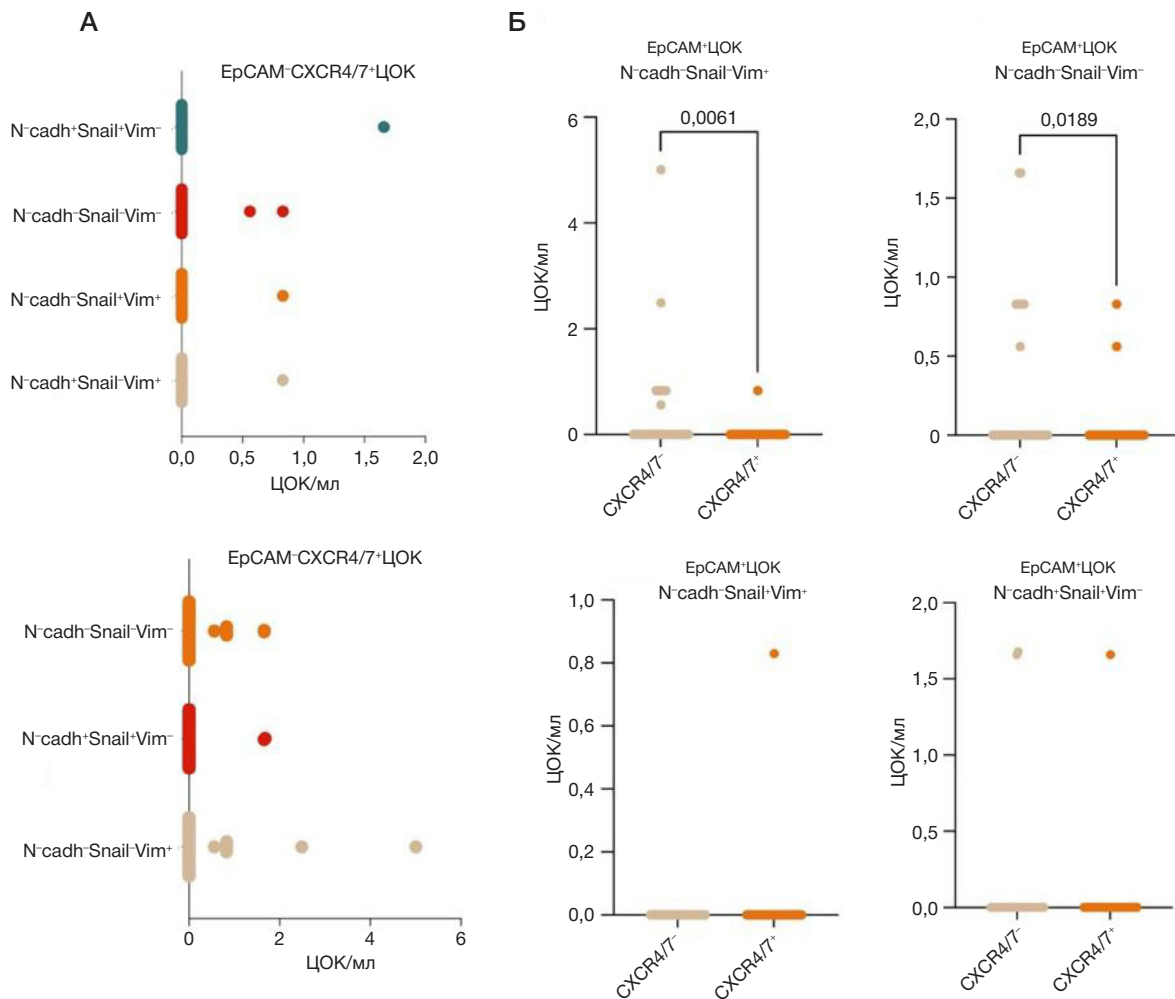


Рис. 6. Количество EpCAM-ЦТ с учетом экспрессии CXCR4/7 с признаками ЭМП у пациентов с РМЖ

экспрессируемых генов, большинство генов с повышенной экспрессией были связаны с сигнальными путями эстрогена ($p = 0,0039$) и процессами клеточной адгезии ($p = 0,0039$) (Приложение, рис. 3А). В то время как регионы $EPICAM^+CXCR4/7^-$ демонстрировали активацию эндцитоза ($p = 0,0359$) и раннюю реакцию на эстроген ($p = 1,435 \times 10^{-7}$) (Приложение, рис. 3Б).

Сравнение $EPICAM^+$ регионов, основанное на экспрессии генов хемокиновых рецепторов CXCR4/7, выявило значительную активацию ЭМП ($p = 1,6223 \times 10^{-58}$) и путей деградации и абсорбции белка ($p = 5,723 \times 10^{-13}$) в $EPICAM^+CXCR4/7^+$ участках (Приложение, рис. 4А). Кроме того, в участках $EPICAM^+CXCR4/7^+$ наибольшее количество сверхэкспрессированных генов было связано с ранним ответом на эстроген ($p = 1,442 \times 10^{-13}$) (Приложение, рис. 4Б).

Мы также сравнили транскрипционные профили $EPICAM^+$ и $EPICAM^-$ регионов, экспрессирующих CXCR4 и/или CXCR7 (Приложение, табл. 7 и 8). Анализ выявил активацию контрольной точки G2-M в $EPICAM^+CXCR4/7^+$ в опухолевых регионах ($p = 1,086 \times 10^{-5}$) (Приложение, рис. 5А). $EPICAM^+CXCR4/7^+$ опухолевые регионы характеризовались активацией сигнатуры деградации и абсорбции белков ($p = 4,231 \times 10^{-16}$) и ЭМП ($p = 3,952 \times 10^{-30}$) (Приложение, рис. 5Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования позволили выявить выраженную гетерогенность ЦОК у пациентов с РМЖ с различными фенотипическими и транскрипционными

характеристиками, которые коррелируют с клиническими исходами. Объединив данные проточной цитометрии и транскриптомики, мы расширили представление о субпопуляциях ЦОК в зависимости от экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 и их функционального значения.

В литературе относительно мало исследований, посвященных экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в ЦОК. В частности, в одной из работ была выделена ЦОК из периферической крови с использованием CD45-негативной селекции и последующей ОТ-ПЦР для оценки экспрессии целевых генов [19]. Авторы идентифицировали ЦОК, экспрессирующие эпителиальные маркеры (*KRT19*), а также мезенхимальные маркеры (*TWIST1*, *SNAIL1*, *SLUG* и *ZEB1*), и дополнительно охарактеризовали экспрессию генов различных хемокиновых рецепторов в этих популяциях. Результаты исследования показали, что эпителиальные *KRT19*⁺ ЦОК демонстрируют более высокий уровень экспрессии рецептора CXCR4 и его лиганда SDF-1 по сравнению с мезенхимальными ЦОК. В нашем исследовании анализ методом проточной цитометрии позволил выявить четкую дихотомию в экспрессии CXCR4/7 между различными субпопуляциями эпителиальных ЦОК. В то время как CXCR4/7⁺ ЦОК преобладали среди EpCAM⁺ ЦОК, популяция EpCAM⁻ была обогащена CXCR4/7⁻ клетками. Такая сегрегация позволяет предположить, что эти маркеры определяют отдельные субпопуляции эпителиальных ЦОК с различными биологическими характеристиками.

Важно отметить, что в литературе опухолевые клетки, экспрессирующие CXCR4, часто ассоциируются с опухолевыми стволовыми клетками [20]. Действительно, CXCR4⁺ опухолевые клетки демонстрируют ключевые характеристики стволовых клеток, включая высокую скорость пролиферации, устойчивость к традиционным методам лечения и повышенный метастатический потенциал [21]. В нашем исследовании не выявлена корреляция между признаками стволовости и экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR4/7 ни в популяциях EpCAM⁺, ни в EpCAM⁻ ЦОК. Однако выявлены признаки стволовых клеток, характерные для субпопуляций EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК. EpCAM⁺ ЦОК преимущественно характеризовались фенотипом стволовых клеток, определяемым как CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH⁺, тогда как EpCAM⁻ ЦОК в основном состояли из клеток, не имеющих маркеров стволовости (CD44⁻CD24⁻CD133⁻ALDH⁻). Анализ экспрессии ранних (Snail) и поздних (N-кадгерин и виментин) маркеров ЭМП выявил ассоциацию между экспрессией N-кадгерина и виментина и наличием хемокинового рецептора CXCR4/7 в клетках EpCAM⁻ ЦОК. Фенотип N-кадгерин⁺Snail⁺виментин⁺ преимущественно наблюдался в субпопуляции EpCAM⁻ CXCR4/7⁺ ЦОК. Это согласуется с существующими данными, указывающими на то, что активация сигнальной оси CXCL12/CXCR4 может индуцировать ЭМП в клетках рака молочной железы посредством стимуляции сигнальных путей Wnt/ β -катенин и mTOR [22].

Наши результаты подчеркивают необходимость выхода за рамки обнаружения ЦОК на основе EpCAM. Анализ экспрессии белка CXCR4/7 в ЦОК позволил идентифицировать связь между EpCAM⁻CXCR4/7⁻ и прогрессированием опухоли, что свидетельствует о потенциальной прогностической ценности этой субпопуляции. Хотя клетки, экспрессирующие EpCAM, традиционно считали основным драйвером метастазирования, накапливающиеся данные подчеркивают важность EpCAM⁻ субпопуляции [5]. Потеря экспрессии EpCAM часто связана с ЭМП, при этом гибридный фенотип ЭМП, характеризующийся одновременной экспрессией эпителиальных и мезенхимальных маркеров, считается наиболее агрессивным и метастатическим [23]. В соответствии с этим, EpCAM⁻ CXCR4/7⁻ популяция, выявленная в нашем исследовании, характеризовалась наличием экспрессии маркеров ЭМП N-кадгерин и Snail. Удивительно, но субпопуляция EpCAM⁻ CXCR4/7⁻, а не ожидаемая популяция CXCR4/7⁺, оказалась наиболее прогностически значимой, что указывает на то, что метастатический потенциал может не зависеть от путей распространения, управляемых хемокиновыми рецепторами.

Факт отсутствия прогностической ценности у EpCAM⁻ CXCR4/7⁺ ЦОК (несмотря на статистическую значимость в тестах Манна–Уитни) поднимает важные вопросы. Эти клетки могут находиться в транзитном или спящем состоянии, когда сигнализация CXCR4/7 способствует выживанию в кровотоке, но не напрямую стимулирует опухолевую диссеминацию. Напротив, EpCAM⁻CXCR4/7⁻ субпопуляция может содержать более агрессивные, ускользающие от иммунного надзора клоны, которые обходят традиционные методы обнаружения, но при этом стимулируют прогрессирование. Уточнение признаков стволовости и ЭМП в выявленной популяции ЦОК показало, что прогрессирование ассоциировано с клетками, характеризующимися стволовостью по экспрессии маркеров CD44/CD24, CD133 и ALDH1A1, а также с фенотипом ЭМП — N-cadherin⁺Snail⁺vimentin⁺. Полученные

результаты согласуются с данными мировой литературы, свидетельствующими о высоком метастатическом потенциале опухолевых клеток с признаками стволовости и ЭМП [24].

Транскриптомный анализ ЦОК выявил разительные различия между субпопуляциями. *EPICAM-CXCR4/7⁺* ЦОК демонстрировали выраженную сверхэкспрессию генов, связанных с ремоделированием внеклеточного матрикса и активацией стромы (*POSTN*, *FN1*, *COL3A1*, *VIM*, *S100A6*, *CD74*), что указывает на роль в формировании преметастатической ниши. Напротив, *EPICAM-CXCR4/7⁻* ЦОК демонстрировали повышенную экспрессию генов *PF4*, *PPBP* и *TUBB1*, связанных с динамикой тромбоцитов и микротрубочек, что потенциально указывает на альтернативные механизмы диссеминации. В частности, у пациентов с прогрессированием опухоли *HBB*, *IGLC2* и *IGHM* были значительно сверхэкспрессированы, что, возможно, отражало иммунный процесс уклонения или клональную селекцию, тогда как *MALAT1* был единственным геном, повышенным у пациентов без прогрессии в периоде наблюдения, что согласуется с его известной ролью в подавлении опухоли. Ген *HBB*, кодирующий бета-глобин (ключевой компонент гемоглобина), играет сложную и контекстно-зависимую роль в развитии РМЖ. Хотя экспрессия *HBB* традиционно ассоциируется с эритроцитами, он также был обнаружен в клетках РМЖ, где его функция, по-видимому, двойственна. В некоторых исследованиях сообщается, что повышенная экспрессия *HBB* коррелирует с повышенной агрессивностью опухоли, повышенным метастатическим потенциалом и неблагоприятным прогнозом для пациента [25]. Другие исследования, напротив, позволяют предположить, что *HBB* может оказывать опухолесупрессивное действие при определенных типах рака [26]. Два других идентифицированных дифференциально экспрессируемых гена связаны с синтезом иммуноглобулинов. Ген *IGLC2* кодирует константную область легкой цепи иммуноглобулина λ , которая участвует в связывании антигена. На сегодняшний день единственное доступное исследование, связывающее экспрессию *IGLC2* с РМЖ, указывает на его роль как предиктора благоприятного клинического исхода при подтипе трижды негативного РМЖ [27]. Напротив, в настоящее время нет данных относительно ассоциации экспрессии *IGHM*, который кодирует константную область тяжелой цепи иммуноглобулина M, с ростом или прогрессированием опухоли. В группе пациентов без признаков прогрессирования была обнаружена сверхэкспрессия только гена *MALAT1*. *MALAT1* представляет собой длинную некодирующую РНК, ассоциированную с метастазами при аденокарциноме легких. Ее функция связана с регуляцией подвижности клеток и инвазивного потенциала [28]. Сообщалось также о том, что *MALAT1* подавляет метастазирование РМЖ [29]. В частности, исследование показало, что *MALAT1* может связываться с прометастатическим фактором транскрипции TEAD, инактивируя его и тем самым ингибируя миграцию и инвазию опухолевых клеток. Кроме того, авторы наблюдали, что экспрессия *MALAT1* часто снижается при более агрессивных и метастатических формах РМЖ, что подтверждает его роль как супрессора метастазирования.

Пространственная транскриптомика первичных опухолей молочной железы дополнительно подтвердила эти результаты, показав, что регионы *EPICAM-CXCR4/7⁺* были обогащены генами, связанными с внеклеточным

матриксом (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *POSTN*, *SPARC*, *BGN*), что указывает на фиброзное, иммуномодулированное микроокружение. Напротив, регионы *EPCAM-CXCR4/7*-сверхэкспрессировали широкий спектр генов, среди которых *STC2*, *TFF3*, *NPNT* и *CD24* были наиболее функционально значимыми, по нашему мнению, что указывает на особенности, связанные с агрессивным фенотипом. Несмотря на противоречивую связь с прогнозом, по последним данным, *STC2*, секретлируемый ауто- или паракринно, функционирует как лиганд, способствуя выживанию клеток путем смягчения окислительного стресса [30]. Экспрессия фактора *Trefoil 3 (TFF3)* в опухолевой ткани считается прогностическим индикатором покоящегося ER⁺ рака молочной железы, при этом *TFF3* функционирует как эпигенетически регулируемый драйвер поведения, связанного с покоем [31]. Эксперимент продемонстрировал, что подавление *NPNT* снижает адгезию раковых клеток к остеобластам, что подтверждает его роль в метастазировании в кости при РМЖ [32]. Несколько генов в регионах *EPCAM-CXCR4/7* (*CDH1*, *CRABP2*, *THSD4*, *SERPINA1*, *SERPINA3*, *HSPB1*, *KRT8*, *CD9*, *NUPR1*, *AZGP1*) связаны с подавлением миграции и инвазии. Однако, существование механизмов интравазации, не требующих инвазии, и вышеизложенные данные могут указывать на функциональный метастатический фенотип, характерный для этой популяции. Вероятно, этот фенотип способен противостоять воздействию агрессивной среды, оставаясь в состоянии покоя и адаптируясь в преметастатической нише.

Эти результаты ставят под сомнение общепринятые представления о биологии ЦОК, поскольку субпопуляция *ErCAM⁺* оказалась ключевым предиктором прогрессирования. Примечательно, что *ErCAM⁺-CXCR4/7⁺* ЦОК демонстрируют способность к ремоделированию внеклеточного матрикса, тогда как *ErCAM⁺-CXCR4/7⁻* субпопуляция может содержать более агрессивные клоны. Необходимы дальнейшие функциональные исследования для выяснения механистической роли этих субпопуляций ЦОК в метастазировании и резистентности к терапии.

Несмотря на значимые результаты, данное исследование имеет ряд существенных ограничений. Основной целью была характеристика ЦОК на основе экспрессии хемокиновых рецепторов *CXCR4* и *CXCR7* и их роли в рецептор-опосредованных путях распространения. Однако проспективный дизайн исследования ограничил набор пациентов с прогрессией, в результате чего было выявлено только три случая прогрессирования заболевания. Хотя небольшой размер выборки не позволяет сделать окончательные выводы, полученные результаты служат ценной основой для будущих исследований, направленных на выявление патогенетически значимых субпопуляций ЦОК. В частности, наш повторный анализ транскриптомных данных отдельных клеток подтвердил функциональные профили ЦОК, связанные с прогрессированием. Дополнительное подтверждение

этому дают данные пространственной транскриптомики, которые выявили гетерогенность, связанную с *CXCR4/7*, в первичной опухоли, что согласуется с нашими результатами, полученными на материале ЦОК, и подчеркивает их биологическую значимость. Важно подчеркнуть, что данное наблюдательное исследование выявляет ассоциации между фенотипами ЦОК и клиническими исходами, однако требуют механистической валидации *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, пространственная транскриптомика, хотя и информативна в отношении микроокружения опухоли, имеет ограниченное разрешение (~55 мкм), что может привести к усреднению сигнала по разным типам клеток. Эти ограничения не умаляют значимости полученных результатов, а, напротив, подчеркивают необходимость дальнейших исследований с более крупными когортами, с использованием анализа отдельных клеток и функциональных экспериментов для подтверждения выявленных закономерностей. Полученные данные создают прочную основу для расширенных исследований роли ЦОК, экспрессирующих *CXCR4/7*, в прогрессировании РМЖ.

ВЫВОДЫ

Принимая во внимание ограничения данного исследования, в частности, небольшой размер выборки пациентов с прогрессированием заболевания в период наблюдения, можно сделать несколько выводов. Прогрессирование опухоли, характеризующееся диссеминацией опухолевых клеток в отдаленные органы, может быть напрямую не связано с наличием рецепторов *CXCR4* и *CXCR7* в ЦОК. В то же время популяция *ErCAM⁺* ЦОК, по-видимому, имеет патогенетическое значение для прогрессирования опухоли. Количество *ErCAM⁺* ЦОК, независимо от экспрессии *CXCR4* и *CXCR7*, было выше у пациентов с прогрессированием в период наблюдения. Этот факт подчеркивает необходимость смещения фокуса исследований ЦОК с *ErCAM⁺*, которые на протяжении более двух десятилетий демонстрировали ограниченную прогностическую ценность при раннем РМЖ, на *ErCAM⁺* субпопуляцию. Транскриптомный анализ *EPCAM-CXCR4/7⁻* ЦОК выявил различные профили экспрессии генов; однако их точная роль в прогрессировании РМЖ остается недостаточно изученной. Учитывая как количественные, так и качественные изменения в этих клетках, вполне вероятно, что пациенты с неблагоприятным прогнозом характеризуются не только повышенным количеством *EPCAM-CXCR4/7⁻* ЦОК, но и изменениями их функциональных свойств.

Доступность данных

Наборы данных, проанализированные в данном исследовании, доступны в базе данных Gene Expression Omnibus (GEO) под номером доступа GSE242311 и в BioProject под номером доступа PRJNA776403.

Литература

1. Thomas-Bonafos T, Pierga JY, Bidard FC, Cabel L, Kiavue N, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: clinical validity and utility. *NPJ Breast Cancer*. 2024; 10: 103.
2. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, Chen Y, Zhou J, Ji F, Wang L, et al. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res*. 2022; 10: 58.
3. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*. 2020; 9: 1836.
4. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B,

- Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 920–28.
5. Ye F, Zhong X, Qiu Y, Yang L, Wei B, Zhang Z, Bu H. The presence of EpCAM-/CD49f⁺ cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. *J Breast Cancer.* 2015; 18: 242–8.
 6. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Cell. 2016; 166: 21–45.
 7. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med.* 2019; 216: 1016–26.
 8. Rueda A, Serna N, Mangues R, Vázquez E, Villaverde A. Targeting the chemokine receptor CXCR4 for cancer therapies. *Biomark Res.* 2025; 13: 68.
 9. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014; 124: 31–82.
 10. Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell.* 2008; 132: 463–73.
 11. Yang Y, Li J, Lei W. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. *Int J Biol Sci.* 2023; 19: 3341–59.
 12. Wu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 4953–64.
 13. Pospelova RA. Leukocyte concentration in clinical practice: diagnostic value. M.: Meditsina, 1973.
 14. Menyailo M, Zainullina V, Khozyainova A, Tashireva L, Zolotareva S, Gerashchenko T, et al. Heterogeneity of Circulating Epithelial Cells in Breast Cancer at Single-Cell Resolution: Identifying Tumor and Hybrid Cells. *Adv Biol (Weinh).* 2023; 7: e2200206.
 15. Satija Lab. Seurat: Tools for Single Cell Genomics. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/satijalab/seurat>.
 16. McGinnis CS. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/chris-mcginis-ucsf/DoubletFinder>.
 17. Tashireva L, Grigoryeva E, Alifanov V, et al. Spatial Heterogeneity of Integrins and Their Ligands in Primary Breast Tumors. *Discov Med.* 2023; 35: 910–20.
 18. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019; 20: 296.
 19. Mego M, Cholujova D, Minarik G, Sedlackova T, Gronesova P, Karaba M, et al. CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16: 127T.
 20. Shi Q, Yang W, Ouyang Y, Zhou S, Xu L, Liu J, et al. CXCR4 promotes tumor stemness maintenance and CDK4/6 inhibitors resistance in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2025; 27: 15.
 21. Nengroo MA, Maheshwari S, Singh A, Verma A, Arya RK, Chaturvedi P, et al. CXCR4 intracellular protein promotes drug resistance and tumorigenic potential by inversely regulating the expression of Death Receptor 5. *Cell Death Dis.* 2021; 12: 464.
 22. Garg P, Jallepalli VR, Verma S. Unravelling the CXCL12/CXCR4 Axis in breast cancer: Insights into metastasis, microenvironment interactions, and therapeutic opportunities. *Hum Gene.* 2024; 40: 201272.
 23. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018; 1870: 151–7.
 24. Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med.* 2016; 5: 37.
 25. Ponzetti M, Capulli M, Angelucci A, Delle Monache S, Sica AR, Festuccia C, et al. Non-conventional role of haemoglobin beta in breast malignancy. *Br J Cancer.* 2017; 117: 994–1006.
 26. Zhang X, Yang H, Zhang L, Li Y, Ma H. A Pan-Cancer Analysis of the Hemoglobin Subunit Beta (HBB) in Human Tumors. *Front Genet.* 2022; 13: 880647.
 27. Chang YT, Tsai WC, Lin WZ, Chen YS, Hou MF, Wu YC, et al. A Novel IGLC2 Gene Linked With Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022; 11: 759952.
 28. Tsyganov MM, Ibragimova MK. MALAT1 Long Non-coding RNA and Its Role in Breast Carcinogenesis. *Acta Naturae.* 2023; 15: 32–41.
 29. Kim J, Piao HL, Kim BJ, Yao F, Han Z, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet.* 2018; 50: 1705–15.
 30. Qie S, Xiong H, Liu Y, et al. Stanniocalcin 2 governs cancer cell adaptation to nutrient insufficiency through alleviation of oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2024; 15: 567. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06961-7>.
 31. Chen S, Zhang X, Basappa B, et al. TFF3 facilitates dormancy of anti-estrogen treated ER+ mammary carcinoma. *Commun Med.* 2025; 5: 45. <https://doi.org/10.1038/s43856-024-00710-9>.
 32. Wang D, Zhao C, Gao L, Wang Y, Gao X, Tang L, et al. NPNT promotes early-stage bone metastases in breast cancer by regulation of the osteogenic niche. *J Bone Oncol.* 2018; 13: 91–96. DOI: 10.1016/j.jbo.2018.09.006.

References

1. Thomas-Bonafos T, Pierga JY, Bidard FC, Cabel L, Kiavue N, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: clinical validity and utility. *NPJ Breast Cancer.* 2024; 10: 103.
2. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, Chen Y, Zhou J, Ji F, Wang L, et al. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res.* 2022; 10: 58.
3. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells.* 2020; 9: 1836.
4. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 920–28.
5. Ye F, Zhong X, Qiu Y, Yang L, Wei B, Zhang Z, Bu H. The presence of EpCAM-/CD49f⁺ cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. *J Breast Cancer.* 2015; 18: 242–8.
6. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Cell. 2016; 166: 21–45.
7. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med.* 2019; 216: 1016–26.
8. Rueda A, Serna N, Mangues R, Vázquez E, Villaverde A. Targeting the chemokine receptor CXCR4 for cancer therapies. *Biomark Res.* 2025; 13: 68.
9. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014; 124: 31–82.
10. Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell.* 2008; 132: 463–73.
11. Yang Y, Li J, Lei W. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. *Int J Biol Sci.* 2023; 19: 3341–59.
12. Wu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 4953–64.
13. Pospelova RA. Leukocyte concentration in clinical practice: diagnostic value. M.: Meditsina, 1973.
14. Menyailo M, Zainullina V, Khozyainova A, Tashireva L, Zolotareva S, Gerashchenko T, et al. Heterogeneity of Circulating Epithelial Cells in Breast Cancer at Single-Cell Resolution: Identifying Tumor and Hybrid Cells. *Adv Biol (Weinh).* 2023; 7: e2200206.
15. Satija Lab. Seurat: Tools for Single Cell Genomics. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/satijalab/seurat>.
16. McGinnis CS. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/chris-mcginis-ucsf/DoubletFinder>.
17. Tashireva L, Grigoryeva E, Alifanov V, et al. Spatial Heterogeneity of Integrins and Their Ligands in Primary Breast Tumors. *Discov Med.* 2023; 35: 910–20.

18. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019; 20: 296.
19. Mego M, Cholujo D, Minarik G, Sedlackova T, Gronesova P, Karaba M, et al. CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16: 127T.
20. Shi Q, Yang W, Ouyang Y, Zhou S, Xu L, Liu J, et al. CXCR4 promotes tumor stemness maintenance and CDK4/6 inhibitors resistance in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2025; 27: 15.
21. Nengroo MA, Maheshwari S, Singh A, Verma A, Arya RK, Chaturvedi P, et al. CXCR4 intracellular protein promotes drug resistance and tumorigenic potential by inversely regulating the expression of Death Receptor 5. *Cell Death Dis.* 2021; 12: 464.
22. Garg P, Jallepalli VR, Verma S. Unravelling the CXCL12/CXCR4 Axis in breast cancer: Insights into metastasis, microenvironment interactions, and therapeutic opportunities. *Hum Gene.* 2024; 40: 201272.
23. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018; 1870: 151–7.
24. Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med.* 2016; 5: 37.
25. Ponzetti M, Capulli M, Angelucci A, Delle Monache S, Sica AR, Festuccia C, et al. Non-conventional role of haemoglobin beta in breast malignancy. *Br J Cancer.* 2017; 117: 994–1006.
26. Zhang X, Yang H, Zhang L, Li Y, Ma H. A Pan-Cancer Analysis of the Hemoglobin Subunit Beta (HBB) in Human Tumors. *Front Genet.* 2022; 13: 880647.
27. Chang YT, Tsai WC, Lin WZ, Chen YS, Hou MF, Wu YC, et al. A Novel IGLC2 Gene Linked With Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022; 11: 759952.
28. Tsyganov MM, Ibragimova MK. MALAT1 Long Non-coding RNA and Its Role in Breast Carcinogenesis. *Acta Naturae.* 2023; 15: 32–41.
29. Kim J, Piao HL, Kim BJ, Yao F, Han Z, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet.* 2018; 50: 1705–15.
30. Qie S, Xiong H, Liu Y, et al. Stanniocalcin 2 governs cancer cell adaptation to nutrient insufficiency through alleviation of oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2024; 15: 567. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06961-7>.
31. Chen S, Zhang X, Basappa B, et al. TFF3 facilitates dormancy of anti-estrogen treated ER+ mammary carcinoma. *Commun Med.* 2025; 5: 45. <https://doi.org/10.1038/s43856-024-00710-9>.
32. Wang D, Zhao C, Gao L, Wang Y, Gao X, Tang L, et al. NPNT promotes early-stage bone metastases in breast cancer by regulation of the osteogenic niche. *J Bone Oncol.* 2018; 13: 91–96. DOI: 10.1016/j.jbo.2018.09.006.