

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111



# Проявления апоптоза в субпопуляциях циркулирующих опухолевых клеток с фенотипами, ассоциированными со стволовостью и эпителиально-мезенхимальным переходом, при карциноме молочной железы

В.М. Перельмутер<sup>1</sup>, Е.С. Григорьева<sup>1</sup>, М.В. Завьялова<sup>1,2</sup>, Л.А. Таширева<sup>1</sup>, В.В. Алифанов<sup>1,2</sup>, О.Е. Савельева<sup>1</sup>, С.В. Вторушин<sup>1,2</sup>, Е.Л. Чойнзонов<sup>1,2</sup>, Н.В. Чердынцева<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; Россия, 634009 Томск, переулок Кооперативный, 5

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

<sup>3</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет; Россия, 634050, Томск, проспект Ленина, 36

**Контакты:** Владимир Михайлович Перельмутер [pvm@ngs.ru](mailto:pvm@ngs.ru)

**Введение.** Способность циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) инициировать метастазирование в отдаленных сайтах, прежде всего, связана с их резистентностью к апоптозу, что позволяет сохранить жизнеспособность в кровотоке. Знание фенотипических признаков, связанных с этой способностью, позволило бы прогнозировать риск развития метастазов и оптимизировать адъювантную терапию.

**Цель исследования** – изучение проявлений апоптоза в популяциях ЦОК с различными фенотипическими характеристиками.

**Материалы и методы.** В исследование включены 58 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа стадии T1–4N0–3M0. Клеточные концентраты, полученные из цельной крови пациентов, окрашены коктейлем антител к CK7/8, CD45, EpCAM, CD44, CD24, CD133, ALDH, N-кадгерину, что позволяет идентифицировать ЦОК с признаками стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода. Окрашивание аннексином V и 7-аминоактиномицином D использовали для оценки разных стадий апоптоза каждой из популяций ЦОК.

**Результаты.** Циркулирующие опухолевые клетки характеризуются выраженной гетерогенностью по проявлениям признаков стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода и ассоциации с наличием ранних и поздних признаков апоптоза и некроза. Для ЦОК с фенотипами, включающими коэкспрессию эпителиального маркера CK7/8 и маркера стволовости CD133 (но не CD44), более характерно отсутствие признаков апоптоза. Коэкспрессия CK7/8 и CD133 ЦОК с маркерами стволовости CD44+/CD24– ассоциирована с развитием ранних, но не поздних признаков апоптоза и некроза. Циркулирующие опухолевые клетки с отсутствием коэкспрессии CK7/8 и CD133 могли иметь и ранние, и поздние признаки апоптоза и некроза. Фенотипы ЦОК с признаками раннего апоптоза, экспрессирующие CD133, в отличие от ЦОК без экспрессии CD133, сохраняются в крови после неoadъювантной химиотерапии.

**Заключение.** Существуют фенотипические признаки ЦОК, имеющие отношение к стволовости и эпителиально-мезенхимальному переходу, сопряженные с устойчивостью к апоптозу или чувствительностью к нему.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки, апоптоз, влияние химиотерапии

**Для цитирования:** Перельмутер В.М., Григорьева Е.С., Завьялова М.В. и др. Проявления апоптоза в субпопуляциях циркулирующих опухолевых клеток с фенотипами, ассоциированными со стволовостью и эпителиально-мезенхимальным переходом, при карциноме молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):96–111. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111

## Signs of apoptosis in circulating tumor cell subpopulations with phenotypes associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma

V.M. Perelmuter<sup>1</sup>, E.S. Grigorieva<sup>1</sup>, M.V. Zavyalova<sup>1,2</sup>, L.A. Tashireva<sup>1</sup>, V.V. Alifanov<sup>1,2</sup>, O.E. Saveleva<sup>1</sup>, S.V. Vtorushin<sup>1,2</sup>, E.L. Choyazonov<sup>1,2</sup>, N.V. Cherdynitseva<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia;

<sup>3</sup>National Research Tomsk State University; 36 Lenin Prospekt, Tomsk 634050, Russia

**Contacts:** Vladimir Mikhailovich Perelmuter *pvm@ngs.ru*

**Introduction.** Ability of circulating tumor cells (CTC) initiate metastases in distant sites is associated primarily with their resistance to apoptosis which allows them to retain viability in the blood. Knowledge of phenotypical signs associated with this ability would allow to predict the risk of metastases and optimize adjuvant therapy.

**Aim.** To examine signs of apoptosis in CTC populations with various phenotypical characteristics.

**Materials and methods.** The study included 58 patients with invasive breast carcinoma of unspecified type, stages T1–4N0–3M0. Cell concentrates extracted from patients' whole blood were stained with an antibody cocktail against CK7/8, CD45, EpCAM, CD44, CD24, CD133, ALDH, N-cadherin which allowed to identify CTC with signs of stemness and epithelial-mesenchymal transition. Annexin V and 7-amino-actinomycin D staining was used for evaluation of apoptosis stage in CTC populations.

**Results.** Circulating tumor cells are characterized by heterogeneity in respect to signs of stemness and epithelial-mesenchymal transition and presence of early and late signs of apoptosis and necrosis. CTC phenotypes including co-expression of epithelial marker CK7/8 and stemness marker CD133 (but not CD44) are characterized by absence of signs of apoptosis. Co-expression of CK7/8 and CD133 in CTC with stemness markers CD44+/CD24– is associated with development of early but not late signs of apoptosis and necrosis. Circulating tumor cells without co-expression of CK7/8 and CD133 could have both early and late signs of apoptosis and necrosis. Circulating tumor cells phenotypes with signs of early apoptosis expressing CD133 remain in blood after non-adjuvant chemotherapy opposed to CTC without CD133 expression.

**Conclusion.** There are CTC phenotypical signs associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition and linked to apoptosis resistance or sensitivity.

**Keywords:** breast cancer, circulating tumor cells, apoptosis, the effect of chemotherapy

**For citation:** Perelmuter V.M., Grigorieva E.S., Zavyalova M.V. et al. Signs of apoptosis in circulating tumor cell subpopulations with phenotypes associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):96–111. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111

## ВВЕДЕНИЕ

Образование гематогенных метастазов — основная причина смерти онкологических больных — определяется наличием в кровотоке циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и особенностями органов-мишеней. Изучение условий появления ЦОК, а также определение их функциональной характеристики являются важнейшими задачами онкологии. Их решение поможет в профилактике метастазирования и лекарственной резистентности.

Хорошо известно, что ЦОК характеризуются выраженной гетерогенностью [1, 2]. В связи с этим важно выяснить, с какими свойствами связана адаптивность ЦОК к условиям преме́тастатической ниши, почему одни диссеминированные клетки способны к формированию метастазов в ранний период, а другие становятся их источником через большой отрезок времени, а также какое место в проявлении этих качеств играют свойства стволовости и состояние эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП).

Ключевой характеристикой ЦОК, от которой зависит любая функциональная активность, является их способность сохранять жизнеспособность в циркуляции. По образному выражению L.B. Krog и M.D. Henry, жизнь ЦОК «мерзкая, жестокая и короткая» [3]. S. Meng и соавт. (2004) изучили динамику ЦОК после хирургического удаления первичных опухолей молочной железы и пришли к выводу, что период полужизни

ЦОК составляет около 1–2 ч [4]. По другим данным, он равен 25–30 мин [5]. В то же время, по мнению R.A. Weinberg (2008), 97 % ЦОК исчезают в течение нескольких дней [6].

Биомеханические параметры условий пребывания ЦОК в циркуляции изучаются на разнообразных моделях и в условиях *in vivo* [3]. Циркулирующие опухолевые клетки могут погибать в циркуляции из-за отсроченного апоптоза, который развивается из-за отделения опухолевой клетки от внеклеточного матрикса [7]. Некоторые ЦОК подвергаются механической деструкции в связи с действием на клетку напряжения сдвига пристеночной крови относительно стенки сосуда (wall shear stress) и напряжения, возникающего при сдвиге слоев крови относительно друг друга (fluid shear stress). Полагают, что эффект зависит от исходного состояния опухолевой клетки [3, 8].

Важный аспект — изучение проявлений апоптоза в ЦОК с различными фенотипическими характеристиками, ассоциированными со свойствами стволовости и ЭМП. Существует множество исследований, демонстрирующих устойчивость к апоптозу клеток опухоли со стволовоподобными свойствами [9–11].

Остается открытым вопрос, обладают ли стволовые клетки с разными маркерами стволовости или их различным сочетанием (CD44+/CD24–, CD133 и альдегиддегидрогеназа (ALDH)) одинаковой устойчивостью

к апоптозу. Эпителиально-мезенхимальный переход – еще одно состояние, с которым связывают резистентность к апоптозу [12].

Данные о связи апоптоза с иными фенотипическими признаками опухолевых клеток немногочисленны. Согласно результатам исследования N. V. Jordan и соавт. (2016), несмотря на то, что HER2-положительные ЦОК (human epidermal growth factor receptor 2 – рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) обладают более выраженной пролиферативной активностью и чаще формируют метастазы, чем HER2-отрицательные ЦОК, показатели апоптоза у этих клеток одинаковы [13].

Клиническое значение наличия ЦОК в апоптозе оценивается неоднозначно. Чаще указывают на то, что наличие большего количества апоптотических ЦОК у онкологических больных коррелирует с лучшим исходом [14, 15]. Однако имеются данные, согласно которым сохранение апоптотических ЦОК при раке молочной железы (РМЖ) является свидетельством отсутствия ответа на химиотерапию [16].

Апоптоз может быть неудачным (failed apoptosis) [17]. Существуют свидетельства обратимости апоптоза. Важным обстоятельством является то, что опухолевые клетки с обратимым апоптозом приобретают более агрессивные свойства [18].

**Цель исследования** – изучение проявлений апоптоза в популяциях ЦОК с различными фенотипическими характеристиками.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включены 58 пациенток с инвазивной протоковой карциномой молочной железы неспецифического типа стадии T1–4N0–3M0, получавших лечение в Научно-исследовательском институте онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. Из них 16 пациенток с люминальным А молекулярно-биологическим подтипом, 32 пациентки – с люминальным Б, 8 пациенток – с трижды негативным. У 1 больной выявлен HER2-положительный подтип, у 1 пациентки данные не уточнены.

В группе без неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) ( $n = 43$ ) образцы венозной крови забирали в вакуумные пробирки, обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) перед операцией и НАХТ, в группе с НАХТ ( $n = 15$ ) – в вакуумные пробирки, обработанные ЭДТА перед операцией и после проведения 6 курсов НАХТ. Полученные образцы инкубировали при 37 °C в течение 1,5 ч. Клеточный концентрат отбирали на границе раздела фаз между осажденными эритроцитами и плазмой. Полученный клеточный концентрат отмывали в 2 мл буфера Cell Wash (BD Biosciences, США) с помощью центрифугирования при 800 x g в течение 15 мин.

Цитофлуориметрическое исследование проводили посредством окрашивания полученного клеточного

концентрата антителами против поверхностных и внутриклеточных маркеров. На 1-м этапе окрашивали маркеры CD45, EpCAM (CD326), CD44, CD24, CD133, N-кадгерин (N-cadh), а также аннексин V (AnnV) и 7-амино-актиномицин D (7-AAD). На 2-м этапе проводили внутриклеточное окрашивание маркерами EpCAM (CD326), CK7/8 и ALDH1A1. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин с 5 мкл раствора, блокирующего свободные Fc-рецепторы, для устранения неспецифического связывания антител (Human TruStain FcX, Sony Biotechnology, США). Далее к поверхностным маркерам добавляли моноклональные антитела – APC-Cy7-анти-CD45 (клон HI30, IgG1, Sony Biotechnology, США), BV650-анти-CD326 (клон 9C4, IgG2b, Sony Biotechnology, США), PE-Cy7-анти-N-cadh (клон 8C11, IgG1, Sony Biotechnology, США), BV510-анти-CD44 (клон G44–26, IgG2b, BD Horizon, США), PerCP-Cy5.5-анти-CD24 (клон ML5, IgG2a, Sony Biotechnology, США), BV786-анти-CD133 (клон 293C3, IgG2b, BD Pharmingen, США), а также FITC-конъюгированный AnnV (Sony Biotechnology, США) и 7-AAD (Sony Biotechnology) – и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Соответствующие изотипические антитела добавляли к контрольному образцу в той же концентрации. После инкубации оставшиеся эритроциты лизировали 250 мкл буфера OptiLyse C (Beckman Coulter, Франция) при комнатной температуре в течение 10 мин в темноте и промывали 1 мл буфера Cell Wash (BD Biosciences, США) при 800 x g в течение 6 мин.

Для внутриклеточного окрашивания клетки пермеабилizировали 250 мкл BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) при 4 °C в течение 30 мин в темноте и дважды промывали в 1 мл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США) при 800 x g в течение 6 мин. После этого образцы разводили в 50 мкл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США) и инкубировали при 4 °C в течение 10 мин в темноте с 5 мкл Fc Receptor Blocking Solution (Human TruStain FcX, Sony Biotechnology, США). Далее добавляли моноклональные антитела AF647-анти-CK7/8 (клон CAM5.2, Mouse IgG2a, BD Pharmingen), BV 650-анти-CD326 (клон 9C4, IgG2b, Sony Biotechnology, США) и PE-анти-ALDH1A1 (клон 03, IgG1, Sino Biological, Китай) и инкубировали при 4 °C в течение 20 мин. К контрольному образцу добавляли соответствующие изотипические антитела в той же концентрации. После инкубации образцы промывали 1 мл буфера Cell Wash (BD Biosciences, США) при 800 x g в течение 6 мин. Затем образцы разводили в 100 мкл Stain buffer (Sony Biotechnology, США). Клетки MCF-7 использовали в качестве положительного контроля, а клетки U937 – в качестве отрицательного контроля. Частицы VersaComp Antibody Capture Bead (Beckman Coulter, США) применяли для настройки компенсации. Иммунофлуоресценцию анализировали на точном цитофлуориметре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США).

В результате мы оценили фенотипы ЦОК:

- хотя бы с 1 из эпителиальных маркеров (EpCAM+CK7/8–; EpCAM–CK7/8+; EpCAM+CK7/8+);
- стволовые и нестволовые (CD44+CD24–; CD44–CD24–);
- с признаками ЭМП и без них (N-cadh+; N-cadh–).

В каждой из указанных популяций ЦОК оценивали экспрессию дополнительных маркеров стволовости – ALDH1A1 и CD133 – с одновременным окрашиванием AnnV и 7-AAD.

Негативное окрашивание AnnV и 7-AAD (AnnV–7-AAD–) в ЦОК расценивали как отсутствие признаков апоптоза, позитивное окрашивание AnnV и негативное 7-AAD (AnnV+7-AAD–) – как наличие ранних признаков апоптоза, позитивное окрашивание AnnV и 7-AAD (AnnV+7-AAD+) – как наличие поздних признаков апоптоза и/или некроза в ЦОК, негативное окрашивание AnnV и позитивное окрашивание 7-AAD (AnnV–7-AAD+) – как наличие признаков некроза [19].

Статистическую обработку проводили с помощью GraphPad Prism9. Для сравнения частот встречаемости использовали точный критерий Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Характеристика фенотипов циркулирующих опухолевых клеток при инвазивной протоковой карциноме молочной железы неспецифического типа в зависимости от окрашивания аннексином V и 7-амино-актиномицином D.** В 43 случаях НАХТ не назначалась, в 15 случаях ЦОК исследовали после нее. Циркулирующие опухолевые клетки при оценке различных вариантов экспрессии EpCam, CK7/8, CD44, CD24, N-cadh, ALDH, CD133 и окрашивания 7-AAD и AnnV характеризовались крайней степенью гетерогенности.

Циркулирующие опухолевые клетки с одним и тем же фенотипом могли обнаруживаться в разных состояниях в зависимости от наличия или отсутствия признаков клеточной гибели: без признаков гибели (AnnV–7-AAD–), с ранними (AnnV+7-AAD–) или поздними (AnnV+7-AAD+) признаками апоптоза и/или

некроза или только некроза (AnnV–7-AAD+). Причем встречались разные сочетания состояний одного и того же фенотипа ЦОК.

Частота встречаемости фенотипов ЦОК и их состояний варьировала в широких пределах. Одни фенотипы встречались не более чем в 5 % случаев, другие фенотипы обнаруживались с частотой, равной или в значительной степени превышающей 6 % (табл. 1, 2). Следует отметить, что количество часто и редко обнаруживаемых фенотипов ЦОК не различалось. Не было значимых различий и количества ЦОК между группами с наличием и отсутствием ранних признаков апоптоза (см. табл. 1).

Три фенотипа ЦОК без признаков апоптоза (AnnV–7-AAD–) обнаруживались с частотой, превышающей 60 %. Один из этих фенотипов (фенотип 69), составляющий 63 %, характеризовался наличием признаков стволовости по 2 маркерам и ЭМП по экспрессии N-cadh (CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–), т.е. признаков, ожидаемо повышающих резистентность клеток к гибели. Однако 2 других фенотипа (фенотипы 12 и 18 – 60 и 88 % соответственно) не имели ни признаков стволовости, ни признаков ЭМП – экспрессии N-cadh (CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD– и CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–) (см. табл. 2).

**Характеристика фенотипов циркулирующих опухолевых клеток в зависимости от сочетания признаков стволовости, эпителиально-мезенхимального перехода и ранних признаков апоптоза.** Можно было ожидать, что вероятность развития апоптоза в клетках с наличием и отсутствием стволовоподобных свойств должна быть различной. Поскольку ЦОК различались по экспрессии 3 маркеров стволовости, представляло интерес сопоставление спектра вариантов стволовости среди ЦОК без признаков апоптоза и с их наличием. Проведено сравнение наличия ранних признаков апоптоза среди ЦОК, различающихся вариантом

**Таблица 1.** Частота обнаружения и количество циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с наличием (AnnV+7-AAD–) или отсутствием (AnnV–7-AAD–) ранних признаков апоптоза

**Table 1.** Frequency and number of early apoptotic (AnnV+7-AAD–) and non-apoptotic (AnnV–7-AAD–) circulating tumor cells (CTCs)

Фенотип ЦОК Phenotype of CTC	Часто встречающиеся ЦОК (≥6 %), Me (Q1–Q3) Common CTC (≥6 %), Me (Q1–Q3)		Редко встречающиеся ЦОК (<5 %), Me (Q1–Q3) Rare CTC (<5 %), Me (Q1–Q3)	
	Частота (%) Frequency (%)	Количество ЦОК (на 100 мкл) Number of CTC (in 100 μL)	Частота, % Frequency, %	Количество ЦОК (на 100 мкл) Number of CTC (in 100 μL)
AnnV–7-AAD– (n = 39)	18,5 (12,0–51,0) (n = 33)	0,83 (0,83–1,68)	2,0 (2,0–2,0) (n = 6)	1,66 (0,83–3,32)
AnnV+7-AAD– (n = 28)	9,0 (7,0–35,0) (n = 10)	1,24 (0,83–2,36)	2,0 (2,0–5,0) (n = 18)	1,01 (0,83–1,24)

**Примечание.** AnnV – аннексин V; 7-AAD – 7-амино-актиномицин D.

*Note.* AnnV – annexin V; 7-AAD – 7-amino-actinomycin D.

**Таблица 2.** Частота встречаемости фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и их состояний, отражающих ранние (AnnV+7-AAD-), поздние (AnnV+7-AAD+) признаки апоптоза или некроза (AnnV-7-AAD+) и их отсутствие (AnnV-7-AAD-) с учетом проведения неoadъювантной химиотерапии (НАХТ)

**Table 2.** Frequency of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes and their constitution of early apoptosis (AnnV+7-AAD-), late apoptosis (AnnV+7-AAD+) or necrosis (AnnV-7-AAD+), non-apoptosis (AnnV-7-AAD-) depending on neoadjuvant chemotherapy (NACT)

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
<b>1-я группа – AnnV-7-AAD-</b> Group 1 – AnnV-7-AAD-			
1	CD45-EpCam+CK7/8+CD44-CD24-N-cadh-ALDH-CD133+AnnV-7-AAD-	3 (7)	2 (13)
2	CD45-EpCam+CK7/8+CD44-CD24-N-cadh+ALDH-CD133+AnnV-7-AAD-	1 (2)	1 (7)
3	CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-N-cadh-ALDH-CD133+AnnV-7-AAD-	14 (33)	7 (47)
4	CD45-EpCam+CK7/8+CD44+CD24-N-cadh-ALDH-CD133-AnnV-7-AAD-	1 (2)	2 (13)
5	CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-N-cadh-ALDH+CD133+AnnV-7-AAD-	4 (9)	0 (0)
6	CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-N-cadh+ALDH+CD133+AnnV-7-AAD-	4 (9)	1 (7)
7	CD45-EpCam+CK7/8-CD44+CD24-N-cadh+ALDH+CD133-AnnV-7-AAD-	1 (2)	0 (0)
8	CD45-EpCam+CK7/8+CD44+CD24-N-cadh+ALDH+CD133+AnnV-7-AAD-	3 (7)	0 (0)
<b>2-я группа – AnnV-7-AAD+</b> Group 2 – AnnV-7-AAD+			
9	CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-N-cadh-ALDH-CD133-AnnV-7-AAD+	1 (2)	0 (0)
10	CD45-EpCam+CK7/8-CD44+CD24-N-cadh-ALDH+CD133-AnnV-7-AAD+	2 (5)	1 (7)
11	CD45-EpCam-CK7/8+CD44+CD24-N-cadh-ALDH+CD133-AnnV-7-AAD+	2 (5)	0 (0)
<b>3-я группа – AnnV-/7-AAD-</b> Group 3 – AnnV-/7-AAD-			
12	CD45-EpCam+CK7/8-CD44-CD24-N-cadh-ALDH-CD133-AnnV-7-AAD-	26 (60)	9 (60)
13	CD45-EpCam+CK7/8-CD44-CD24-N-cadh-ALDH-CD133-AnnV+7-AAD-	2 (5)	0 (0)
14	CD45-EpCam+CK7/8-CD44-CD24-N-cadh+ALDH-CD133-AnnV-7-AAD-	2 (5)	2 (13)
15	CD45-EpCam+CK7/8-CD44-CD24-N-cadh+ALDH-CD133-AnnV+7-AAD-	1 (2)	0 (0)
16	CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-N-cadh+ALDH-CD133-AnnV-7-AAD-	9 (21)	2 (13)
17	CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-N-cadh+ALDH-CD133-AnnV+7-AAD-	3 (7)	0/15 (0)

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
18	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	38 (88)	13 (87)
19	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	4 (9)	2 (13)
20	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV–7-AAD–	6 (14)	1 (7)
21	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
22	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–	21 (49)	12 (80) $\chi^2 = 4,40$ ; $p_a = 0,034^*$
23	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133+AnnV+7-AAD–	5 (12)	1 (7)
24	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–	16 (37)	3 (20)
25	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
26	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV–7-AAD–	6 (14)	0 (0)
27	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133–AnnV+7-AAD–	3 (7)	0 (0)
28	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV–7-AAD–	6 (14)	5 (33)
29	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH–CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
30	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	5 (12)	3 (20)
31	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
32	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	1 (2)	1 (7)
33	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	1 (2)	0 (0)
34	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV–7-AAD–	24 (56)	10 (67)
35	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH–CD133–AnnV+7-AAD–	2 (5)	1 (7)
36	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	9 (21)	3 (20)
37	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
38	CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	4 (9)	1 (7)

Продолжение табл. 2

Continuation of table 2

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
39	CD45–EpCam+CK7/8–CD44– CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	0 (0)
40	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	3 (7)	1 (7)
41	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
42	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	24 (56)	10 (67)
43	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	12 (28)	5 (33)
44	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	5 (12)	2 (13)
45	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	3 (7)	0 (0)
46	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	3 (7)	2 (13)
47	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
48	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	6 (14)	2 (13)
49	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
50	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	23 (53)	10 (67)
51	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
52	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	6 (14)	3 (20)
53	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
54	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	9 (21)	7 (46,7) $\chi^2 = 3,6;$ $p_a = 0,05^*$
55	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	1 (2)	1 (7)
56	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	0 (0)	2 (13) $\chi^2 = 5,9;$ $p_a = 0,01^*$
57	CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	2 (5)	0 (0)
58	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	7 (16)	1 (7)
59	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	0 (0)	1 (7)

Окончание табл. 2

The end of table 2

Номер фенотипа Phenotype number	Фенотип Phenotype	Число случаев с данным фенотипом, абс. (%) Frequency events, abs. (%)	
		Без НАХТ (n = 43) Without NACT (n = 43)	С НАХТ (n = 15) With NACT (n = 15)
60	CD45–EpCam– CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	6 (14)	5 (33)
61	CD45–EpCam– CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	2 (5)	1 (7)
<b>4-я группа AnnV–/+7-AAD–/+</b> Group 4 AnnV–/+7-AAD–/+			
62	CD45–EpCam+CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	9 (21)	5 (33)
63	CD45–EpCam+CK7/8+CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133– AnnV–7-AAD+	0 (0)	1 (7)
64	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV–7-AAD–	10 (23)	3 (20)
65	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV+7-AAD–	4 (9)	0 (0)
66	CD45–EpCam–CK7/8+CD44–CD24–N-cadh+ALDH+CD133– AnnV+7-AAD+	1 (2)	0 (0)
67	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV–7-AAD–	4 (9)	0 (0)
68	CD45–EpCam–CK7/8+CD44+CD24–N-cadh+ALDH–CD133– AnnV–7-AAD+	1 (2)	0 (0)
69	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD–	27 (63)	8 (53)
70	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV+7-AAD–	19 (44)	6 (40)
71	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh+ALDH– CD133+AnnV–7-AAD+	1 (2)	0 (0)
72	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD+	0 (0)	1 (7)
73	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	23 (53)	5 (33)
74	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	15 (35)	5 (33)
75	CD45–EpCam+CK7/8–CD44+CD24–N-cadh– ALDH+CD133+AnnV+7-AAD+	2 (5)	1 (7)
76	CD45–EpCam+CK7/8– CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV–7-AAD–	24 (56)	0 (60)
77	CD45–EpCam+CK7/8– CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD–	18 (42)	9 (60)
78	CD45–EpCam+CK7/8– CD44+CD24–N-cadh+ALDH+CD133+AnnV+7-AAD+	2 (5)	0 (0)

\*Указаны только значения p, свидетельствующие о статистически значимых различиях между сравниваемыми группами.

**Примечание.** AnnV – аннексин V; 7-AAD – 7-амино-актиномицин D; N-cadh – N-кадгерин.

Note. AnnV – annexin V; 7-AAD – 7-amino-actinomycin D; N-cadh – N-cadherin.

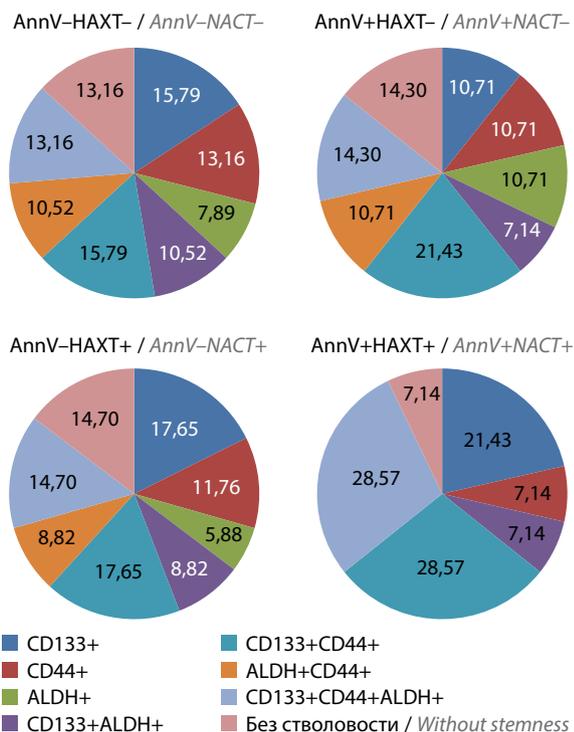
коэкспрессии маркеров стволовости. Рассмотрены 7 вариантов коэкспрессии маркеров стволовости (CD44+CD24-, CD133+, ALDH+, CD133+ALDH+, CD133+CD44+CD24-, ALDH+CD44+CD24-, CD133+CD44+CD24-ALDH+) и 1 – без признаков стволовости (CD133-CD44-CD24-ALDH-). Сумма таких вариантов ЦОК в каждой из 4 групп сравнения (AnnV-7-AAD-HAXT-, AnnV+7-AAD-HAXT-, AnnV-7-AAD-HAXT+ и AnnV+7-AAD-HAXT+) принималась за 100 %. Результаты сравнения показали, что процент ЦОК с разными вариантами коэкспрессии маркеров стволовости не различался в группах с наличием и отсутствием ранних признаков апоптоза в группе как без HAXT, так и с HAXT (рис. 1).

Экспрессия N-cadh – признак мезенхимального фенотипа ЭМП. В таком состоянии клетка приобретает резистентность к аноикису. В связи с этим ранние признаки апоптоза могли проявляться с разной частотой среди ЦОК с экспрессией N-cadh и ее отсутствием. Рассмотрены варианты сочетаний ранних проявлений апоптоза (AnnV+7-AAD-) и экспрессии N-cadh независимо от признаков стволовости. Как и при оценке связи ранних проявлений апоптоза с признаками стволовости, экспрессия N-cadh определялась в тех же 4 группах (AnnV-7-AAD-HAXT-, AnnV+7-AAD-HAXT-, AnnV-7-AAD-HAXT+ и AnnV+7-AAD-HAXT+). Сумма N-cadh+- и N-cadh--ЦОК

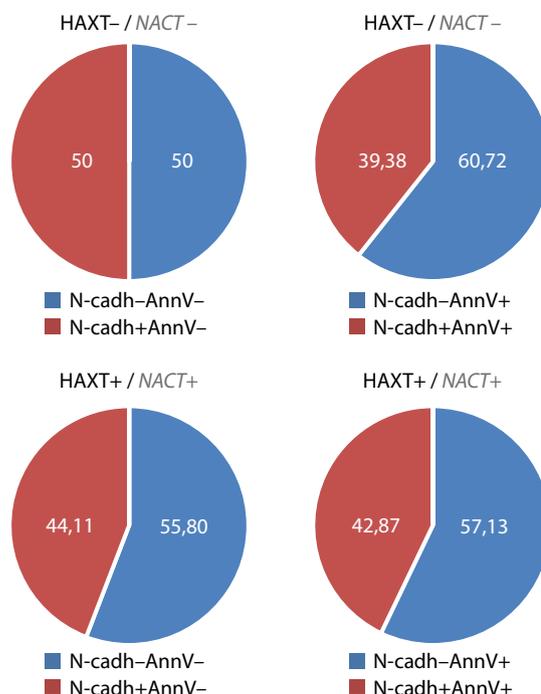
в каждой из групп принималась за 100 %. Оказалось, что различия в частоте проявления ранних признаков апоптоза в зависимости от экспрессии N-cadh в сравниваемых группах отсутствовали. Не было выявлено и различий в частоте признаков апоптоза при сравнении групп с HAXT и без нее как среди ЦОК с N-cadh-, так и ЦОК с N-cadh+ (рис. 2).

Таким образом, результаты оценки ассоциации проявлений стволовости и ЭМП в ЦОК с наличием и отсутствием ранних признаков апоптоза дали в определенной степени малоожидаемые результаты, поскольку равновероятно встречались в этих группах. Отсутствовали и различия в группах с HAXT и без нее.

**Характеристика фенотипических признаков циркулирующих опухолевых клеток в зависимости от наличия ранних и поздних признаков апоптоза.** В 1-ю группу были включены 8 фенотипов ЦОК, которые не имели признаков клеточной гибели (фенотипы 1–8; см. табл. 2), во 2-ю – 3 фенотипа ЦОК (фенотипы 9–11; см. табл. 2), которые имели только признаки некроза (AnnV-7-AAD+). Третья группа, самая многочисленная, включала 25 популяций ЦОК в 2 состояниях (всего 50 фенотипов – фенотипы 12–61; см. табл. 2): без признаков апоптоза и с его ранними признаками (AnnV-7-AAD-). В 4-ю группу были включены 6 фенотипов ЦОК, которые могли быть в 4 состояниях: без признаков апоптоза (AnnV-7-AAD-), с ранними (AnnV+7-AAD-), поздними (AnnV+7-AAD+) признаками апоптоза



**Рис. 1.** Наличие признаков апоптоза (по окрашиванию аннексином V (AnnV)) в циркулирующих опухолевых клетках с разной коэкспрессией маркеров стволовости в зависимости от проведения неоадьювантной химиотерапии (HAXT)  
**Fig. 1.** Features of apoptosis (annexin-V (AnnV) positive/negative staining) in circulating tumor cells with different co-expression of stemness markers depending on neoadjuvant chemotherapy (NACT)



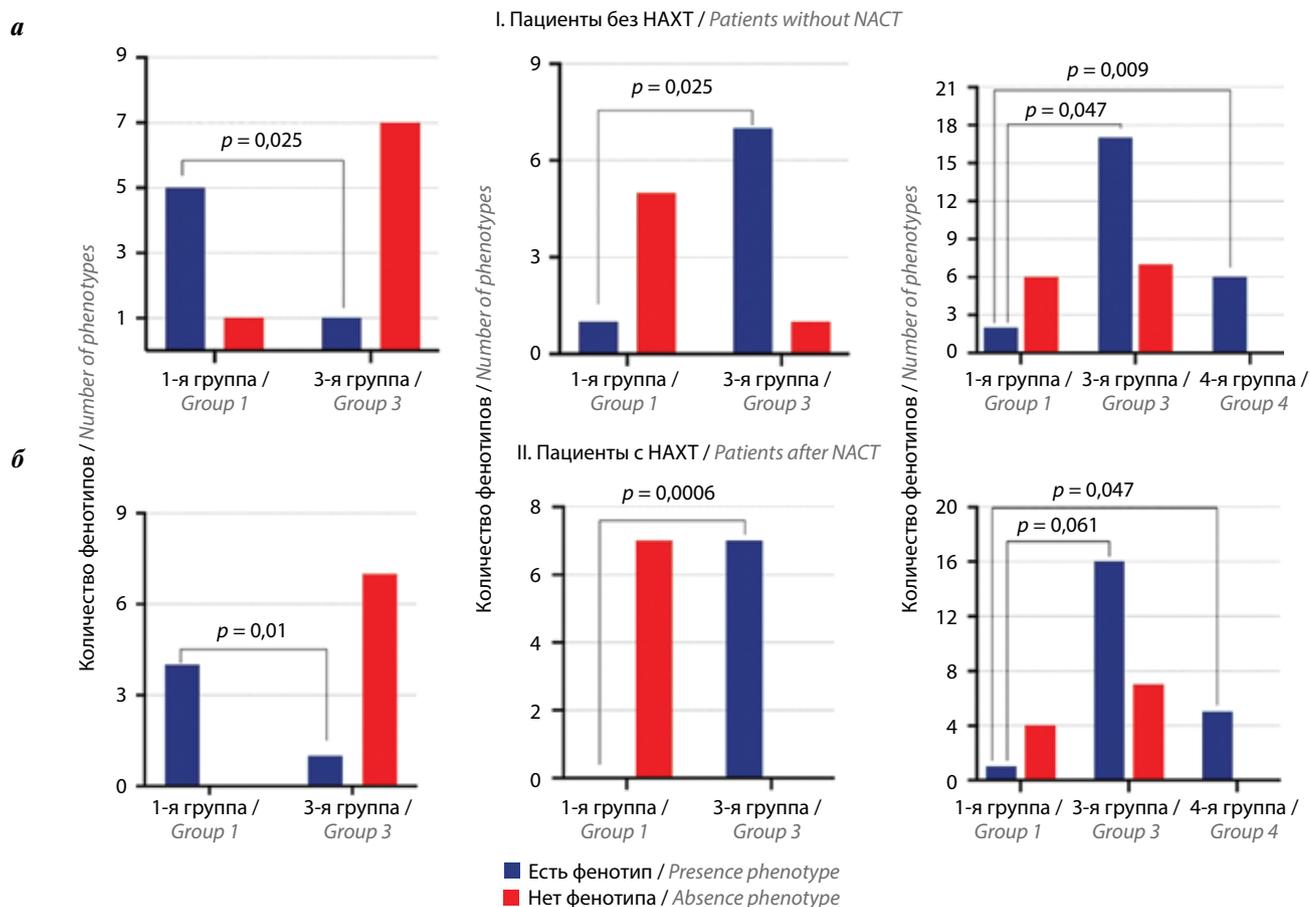
**Рис. 2.** Доля циркулирующих опухолевых клеток с ранними признаками апоптоза и различной экспрессией N-кадгерина в зависимости от проведения неоадьювантной химиотерапии (HAXT), %. N-cadh – N-кадгерин; AnnV – аннексин V  
**Fig. 2.** Proportion of early apoptotic circulating tumor cells with different expression of N-cadherin depending on NACT treatment, %. N-cadh – N-cadherin; AnnV – annexin V

или некроза (AnnV-7-AAD+) – всего 17 состояний ЦОК (фенотипы 62–78; см. табл. 2).

**Фенотипические различия между группами, сформированными по проявлениям апоптоза циркулирующих опухолевых клеток.** Проводилось сравнение фенотипов ЦОК 1-й группы (фенотипы 1–8) с фенотипами 3-й (фенотипы 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 58, 60) и 4-й (фенотипы 62, 64, 67, 69, 73, 76) групп (см. табл. 2). Из всех вариантов сравнения фенотипических признаков ЦОК, исследованных как в группе без НАХТ, так и в группе с НАХТ после лечения, различия между группами обнаружены по сочетанию экспрессии СК7/8, CD133 и CD44/CD24.

У пациенток 1-й группы, не получавших НАХТ, преобладали фенотипы ЦОК с коэкспрессией СК7/8 и CD133, но без экспрессии CD44 (СК7/8+CD44–CD24–CD133+), в то время как в 3-й группе среди

фенотипов с коэкспрессией СК7/8 и CD133 чаще обнаруживались ЦОК с фенотипом СК7/8+CD44+CD24–CD133+ (рис. 3, I, а;  $p_{1-3} = 0,025$ ). В отличие от 1-й и 3-й групп, в 4-й группе отсутствовали фенотипы с коэкспрессией СК7/8 и CD133, поэтому сравнение по частоте встречаемости описываемых фенотипов не проводили. Кроме 8 фенотипов с коэкспрессией СК7/8 и CD133 в 3-ю группу вошли 16 фенотипов, включающих другие варианты экспрессии СК7/8, CD133 и CD44, но без их коэкспрессии (СК7/8–CD44–CD24–CD133–, СК7/8+CD44–CD24–CD133–, СК7/8–CD44–CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133–, СК7/8+CD44+CD24–CD133–, СК7/8–CD44+CD24–CD133+). В 4-й группе все 6 фенотипов имели только такие варианты экспрессии обсуждаемых маркеров (без коэкспрессии СК7/8, CD133 и CD44) (см. табл. 2). Данных фенотипических вариантов ЦОК в 3-й и 4-й группах было



**Рис. 3.** Различия количества фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с вариантами коэкспрессии эпителиальных маркеров и маркеров стволовости в группах, сформированных по проявлениям апоптоза: а – фенотипы ЦОК с коэкспрессией СК7/8 и CD133 без экспрессии CD44 (СК7/8+CD44–CD24–CD133+); б – фенотипы ЦОК с коэкспрессией СК7/8 и CD133 с экспрессией CD44 (СК7/8+CD44+CD24–CD133+); в – фенотипы ЦОК без коэкспрессии СК7/8 и CD133 с любым вариантом экспрессии CD44 (СК7/8–CD44–CD24–CD133–, СК7/8+CD44–CD24–CD133–, СК7/8–CD44–CD24–CD133+, СК7/8+CD44–CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133–, СК7/8+CD44+CD24–CD133–, СК7/8–CD44+CD24–CD133+, СК7/8+CD44+CD24–CD133+). НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

**Fig. 3.** Differences in the number of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes with co-expression variants of epithelial markers and stemness markers in groups formed by apoptosis manifestations: а – CTCs phenotypes with co-expression of CK7/8 and CD133 without CD44 expression (СК7/8+CD44–CD24–CD133+); б – CTCs phenotypes with co-expression of CK7/8 and CD133 with CD44 expression (СК7/8+CD44+CD24–CD133+); в – CTCs phenotypes without co-expression of CK7/8 and CD133 with any expression of CD44 (СК7/8–CD44–CD24–CD133–, СК7/8+CD44–CD24–CD133–, СК7/8–CD44–CD24–CD133+, СК7/8+CD44–CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133–, СК7/8+CD44+CD24–CD133–, СК7/8–CD44+CD24–CD133+, СК7/8+CD44+CD24–CD133+). NACT – neoadjuvant chemotherapy

больше, чем в 1-й группе ( $p_{1-3} = 0,047$ ;  $p_{1-4} = 0,009$  соответственно) (см. рис. 3, I, в). Описанные различия встречаемости обсуждаемых фенотипических признаков ЦОК в 1-й, 3-й и 4-й группах сохраняются и у пациенток после проведения НАХТ (см. рис. 3, II).

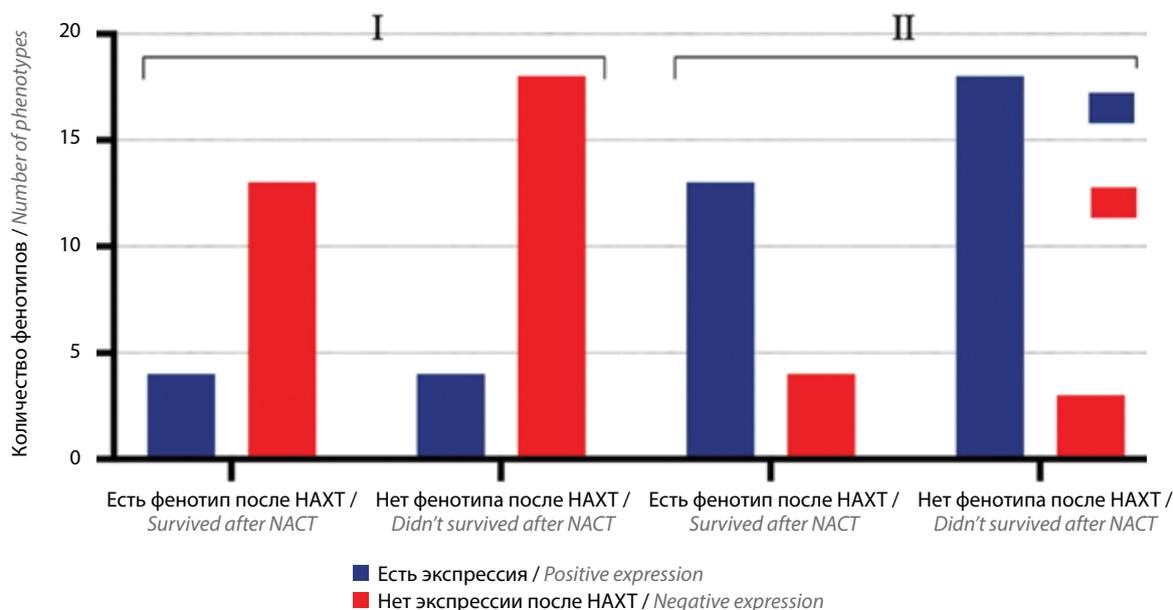
**Влияние неoadъювантной химиотерапии на фенотипический состав циркулирующих опухолевых клеток.** В группе больных, не получавших НАХТ, из 78 состояний ЦОК, выявленных в общей группе наблюдения, отсутствовали 4 фенотипа. Среди 15 пациенток, получавших НАХТ, из 78 состояний ЦОК не было 26. Среди 4 состояний ЦОК, отсутствующих в группе без НАХТ, 1 имело ранние признаки апоптоза, 2 – признаки необратимого апоптоза/некроза (окрашивание 7-AAD). Из 26 состояний ЦОК, отсутствовавших после проведения НАХТ, в 21 (образцы 9, 11, 13, 15, 17, 21, 27, 31, 33, 39, 41, 45, 49, 51, 53, 57, 65, 66, 68, 71, 78; табл. 2) наблюдались различные признаки клеточной гибели: из них в 15 – ранние признаки апоптоза, в 2 – его поздние признаки, в 4 – признаки некроза. Поскольку среди не выявленных после проведения НАХТ состояний ЦОК преобладали варианты с признаками клеточной гибели, можно предположить, что отсутствие фенотипов ЦОК в определенных состояниях после НАХТ (по сравнению со спектром состояний ЦОК у пациенток без НАХТ) не случайно. Это могло быть обусловлено тем, что опухолевые клетки с проявлениями апоптоза более чувствительны к химиотерапии. Однако среди ЦОК, которые обнаруживались в крови пациенток, получавших НАХТ,

18 состояний (фенотипы 10, 19, 23, 25, 29, 35, 37, 43, 47, 55, 59, 61, 63, 70, 72, 74, 75, 77; см. табл. 2) тоже характеризовались ранними или поздними признаками апоптоза/некроза.

Для поиска фенотипических признаков, которые могли быть связаны с резистентностью или чувствительностью ЦОК с признаками апоптоза к НАХТ, сравнивали 18 состояний ЦОК с признаками апоптоза, сохранившихся после НАХТ, с 21 состояниями ЦОК с признаками апоптоза, не обнаруженных после проведения НАХТ. Оказалось, что варианты фенотипических признаков, включающих экспрессию СК7/8 и различные сочетания маркеров стволовости, характерных для ЦОК с разными проявлениями апоптоза, с одинаковой частотой встречались как в группе состояний ЦОК, сохранившихся после НАХТ, так и отсутствующих после проведения НАХТ (рис. 4).

Кроме того, в сравниваемых группах фенотипов оценивалась частота экспрессии каждого из исследованных маркеров. Оказалось, что по большинству маркеров различия отсутствовали. Исключение составляет экспрессия CD133. Она чаще встречается в 18 фенотипах ЦОК, сохранившихся после НАХТ ( $p = 0,0104$ ) (рис. 5). Эти результаты позволяют предположить, что, вероятно, после НАХТ ЦОК, в которых уже были начальные или поздние признаки апоптоза, но отсутствовала экспрессия CD133, с большей вероятностью погибают в периферической крови.

Наряду с описанными отличиями сравниваемых групп 3 фенотипа CD45–EpCam–СК7/8+CD44+



**Рис. 4.** Различия количества фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с коэкспрессией и с отсутствием коэкспрессии эпителиальных маркеров и маркеров стволовости, сохранившихся и не сохранившихся после неoadъювантной химиотерапии (НАХТ): I – фенотипы ЦОК с экспрессией СК7/8+, CD44+CD24–, CD133+; II – фенотипы ЦОК с вариантами экспрессии СК7/8–CD44–CD24–CD133–, СК7/8+CD44–CD24–CD133–, СК7/8–CD44–CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133–, СК7/8+CD44+CD24–CD133–, СК7/8–CD44+CD24–CD133+, СК7/8–CD44+CD24–CD133+

Fig. 4. Differences in the number of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes with and without coexpression of epithelial markers and stemness markers in cells which were survived/didn't survived after neoadjuvant chemotherapy (NACT) treatment: I – CTC phenotypes with expression of CK7/8+, CD44+CD24–, CD133+; II – CTC phenotypes with expression variants are listed below: CK7/8–CD44–CD24–CD133–, CK7/8+CD44–CD24–CD133–, CK7/8–CD44–CD24–CD133+, CK7/8–CD44+CD24–CD133–, CK7/8+CD44+CD24–CD133–, CK7/8–CD44+CD24–CD133+, CK7/8–CD44+CD24–CD133+

CD24–N-cadh+ALDH–CD133+7-AAD–AnnV– ( $x^2 = 3,6$ ;  $p = 0,05$ ), CD45–EpCam+CK7/8+CD44+CD24–N-cadh–ALDH+CD133+7-AAD–AnnV– ( $x^2 = 5,9$ ;  $p = 0,01$ ) и CD45–EpCam+CK7/8–CD44–CD24–N-cadh–ALDH–CD133+7-AAD–AnnV– ( $x^2 = 4,40$ ;  $p = 0,034$ ) выявлялись чаще у больных, получавших НАХТ. Все эти фенотипы характеризовались отсутствием ранних и поздних признаков апоптоза, а также наличием признаков стволовости по экспрессии CD133+, которая либо была единственным признаком стволовости, либо сочеталась с CD44+/CD24- и/или ALDH.

Таким образом, разделение обнаруженных у пациентов 78 субпопуляций ЦОК в зависимости от отсутствия/наличия у них ранних признаков апоптоза или поздних признаков апоптоза/некроза позволило выявить фенотипические признаки ЦОК, резистентных или склонных к развитию апоптоза и некроза. Более резистентными к апоптозу оказались СК7/8+CD44–CD24–CD133+–ЦОК. Напротив, если наряду с коэкспрессией СК7/8 и CD133 у ЦОК присутствовали признаки стволовости CD44+CD24– или отсутствовала коэкспрессия СК7/8 и CD133 независимо от экспрессии CD44, ЦОК имели признаки апоптоза. По-видимому, ЦОК, в которых уже были начальные или поздние признаки апоптоза, но отсутствовала экспрессия CD133, с большей вероятностью погибают в периферической крови. Напротив, фенотипы с признаками раннего апоптоза, но с экспрессией CD133, судя по их наличию в крови, более резистентны к НАХТ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Основная цель исследования состояла в выявлении связи фенотипических признаков ЦОК с проявлениями апоптоза. Результаты исследования продемонстрировали выраженную фенотипическую гетерогенность ЦОК по экспрессии маркеров эпителия (EpCam, CK7/8), стволовости (CD44+/CD24–, CD133 и ALDH) и мезенхимного фенотипа ЭМП (N-cadh). Из-за значительного разнообразия не удалось сгруппировать исследуемые случаи по общности фенотипов ЦОК, отражающих разные проявления апоптоза. В каждом случае количество состояний фенотипов варьировало от 2 до 31.

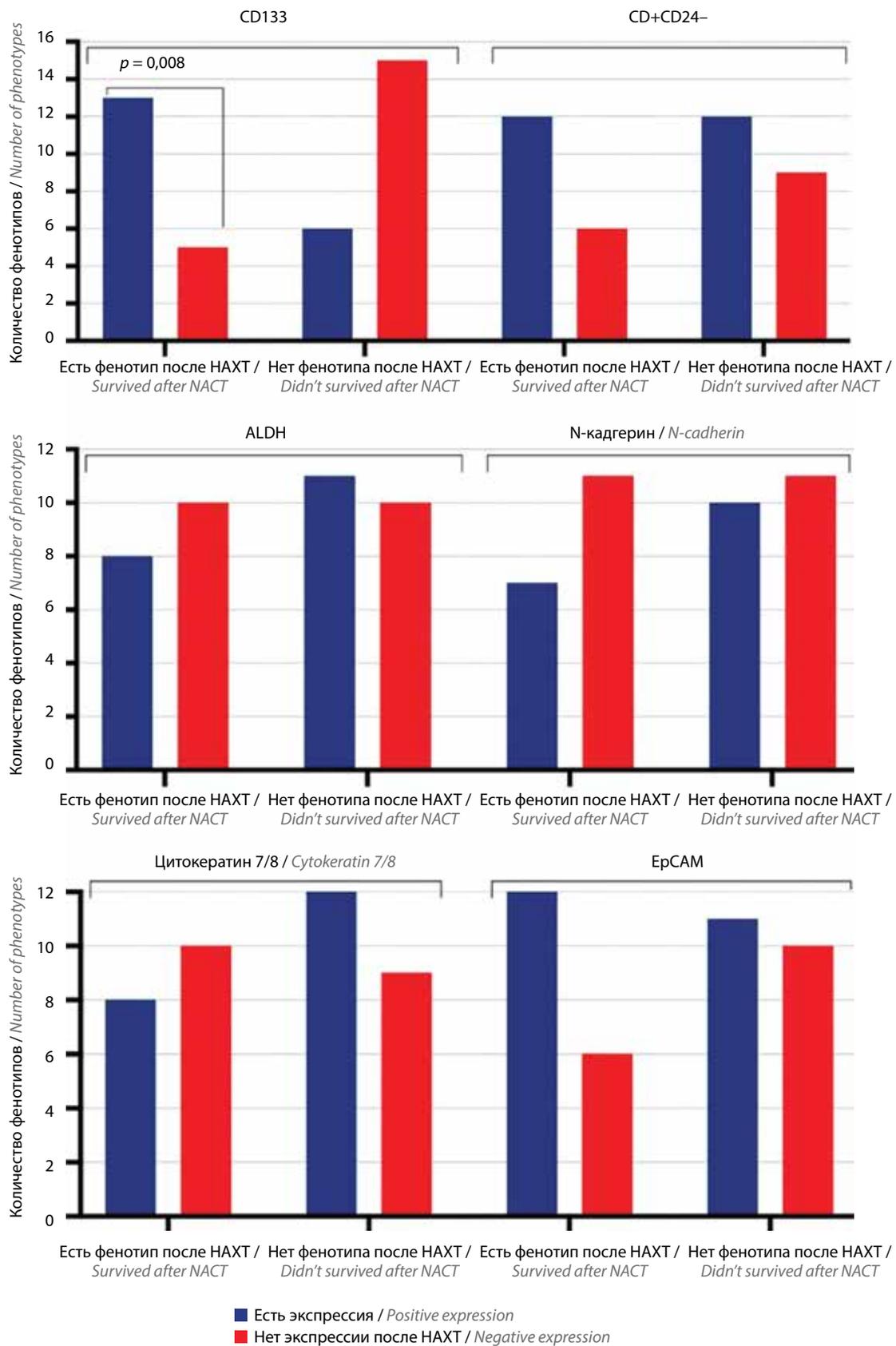
В связи с этим исследуемые фенотипы ЦОК были разделены на группы по объединяющим их признакам. В основу группировки было положено наличие/отсутствие ранних или поздних признаков апоптоза/некроза. Сорок два выявленных фенотипа были разделены на 4 группы. Восемь фенотипов ЦОК встречались только в жизнеспособном состоянии, 3 – были только в 1 состоянии (имели проявления некроза). Шесть фенотипов характеризовались как отсутствием признаков апоптоза, так и наличием ранних или поздних его признаков. В самой многочисленной группе (25 фенотипов) ЦОК обнаруживались в 2 состояниях: без признаков апоптоза и с ранними его признаками.

В соответствии с целью исследования основное внимание было уделено определению связи проявлений апоптоза с фенотипическими признаками ЦОК. Прежде всего сравнивалась частота обнаружения 1, 2 или 3 маркеров стволовости в ЦОК с наличием/отсутствием признаков апоптоза. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что стволовые клетки более устойчивы к развитию апоптоза. Это показано для стволовых клеток, экспрессирующих CD44+/CD24<sup>(–/low)</sup> [12].

Высокую степень резистентности к апоптозу клеток опухоли, экспрессирующих CD44+, связывают с более высокой экспрессией Bcl-2 [20]. CD133 также обладает способностью ингибировать развитие апоптоза [10]. Например, показано, что экспрессия CD133 подавляет гибель клеток рака толстой кишки через активацию Akt-опосредованного пути, препятствующего апоптозу [21]. Ингибирует апоптоз и экспрессия ALDH в клетках. Блокирование ALDH усиливает индукцию апоптоза в клетках карциномы яичников [11]. Остается неизвестным, как соотносится способность CD133 и ALDH ингибировать апоптоз в стволовых клетках с экспрессией разных маркеров стволовости или их различных сочетаний.

Результаты исследования демонстрируют более сложные отношения между характеристиками стволовости ЦОК и проявлениями апоптоза. Против ожидания признаки стволовости по 1 маркеру (или CD44+/CD24–, или CD133, или ALDH) или по различным вариантам коэкспрессии маркеров стволовости с равной вероятностью встречались как в ЦОК без признаков апоптоза, так и в ЦОК с ранними его признаками.

В то же время в определенных условиях проявлялась протективная по отношению к апоптозу роль CD133. Это было обнаружено при сопоставлении 4 групп фенотипов ЦОК. Результаты сравнения 1-й группы фенотипов, не имеющих признаков апоптоза, с 3-й и 4-й группами фенотипов (как без признаков апоптоза, так и с разными его проявлениями) позволяют предположить, что коэкспрессия CD133 с СК7/8 может рассматриваться в качестве одного из существенных факторов, повышающих резистентность к апоптозу. Этот феномен трудно объяснить стволовыми свойствами клеток, экспрессирующих CD133, поскольку в клетках, экспрессирующих CD133, но не экспрессирующих СК7/8, наблюдались проявления апоптоза. Почему коэкспрессия СК7/8 с CD133 сообщает описанные признаки? Если о связи экспрессии цитокератинов 8/18 с апоптозом имеется информация, то данных о связи экспрессии СК7 с апоптозом нет. Поскольку в нашем наблюдении в некоторых фенотипах коэкспрессия СК7/8 и CD133 сочеталась с отсутствием в ЦОК экспрессии EpCam – признака ЭМП, сохранение экспрессии СК7/8 можно рассматривать как проявление эпителиального фенотипа ЭМП, который в сочетании с экспрессией CD133, вероятно, сообщает клеткам опухоли устойчивость к апоптозу.



**Рис. 5.** Различия количества фенотипов циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) с экспрессией CD133, CD44+CD24-, ALDH, N-кадгерина, цитокератина 7/8 и EpCAM, сохранившихся и не сохранившихся после неoadъювантной химиотерапии (HAXT)  
**Fig. 5.** Differences in the number of circulating tumor cells (CTCs) phenotypes with expression of CD133, CD44+CD24-, ALDH, N-cadherin, cytokeratin 7/8 and EpCAM in cells which were survived/didn't survived after neoadjuvant chemotherapy (NACT)

Вместе с тем, по-видимому, CD133 ассоциирован с резистентностью ЦОК с проявлениями апоптоза при НАХТ. Такое предположение можно сделать после сопоставления фенотипов ЦОК с признаками апоптоза, которые обнаруживались или отсутствовали после НАХТ. Оказалось, что ЦОК с признаками апоптоза, исчезнувшие после НАХТ, в отличие от сохранившихся в циркуляции характеризовались редкостью экспрессии CD133. Эти факты позволяют предположить, что экспрессия CD133 в опухолевых клетках с ранними признаками апоптоза способствует их выживанию в условиях НАХТ и что ЦОК, в которых уже были начальные или поздние признаки апоптоза, но отсутствовала экспрессия CD133, с большей вероятностью погибают в периферической крови.

Сложный характер связи с проявлениями апоптоза имели наиболее изученные маркеры стволовости CD44+/CD24-. Если отсутствие этого признака ЦОК при коэкспрессии СК7/8 и CD133 было ассоциировано с отсутствием признаков апоптоза, то фенотипы ЦОК с вариантом экспрессии СК7/8+CD44+/CD24-CD133+ находились в 2 состояниях: без признаков апоптоза и с наличием только ранних его признаков. Отсутствие таких фенотипических проявлений в 4-й группе фенотипов, которые были представлены разными состояниями (как без признаков апоптоза, так с ранними и поздними признаками апоптоза/некроза), позволяет предположить, что наличие стволовости по CD44+/CD24 при коэкспрессии СК7/8 и CD133 не препятствует инициации апоптоза, но может иметь отношение к его обратимости.

Следует отметить, что в соответствии с результатами исследования не только проявления стволовости в ЦОК сочетались с проявлениями апоптоза, но и определенные признаки ЭМП. Одни и те же фенотипы ЦОК в состояниях без и с наличием ранних признаков апоптоза с одинаковой частотой экспрессировали N-cadh (признак мезенхимного фенотипа ЭМП), и, следовательно, проявления апоптоза не сочетались с экспрессией N-cadh, хотя известна его способность ингибировать апоптоз [22].

Представляется, что противоречия, связанные с сочетанием разных вариантов проявления стволовости и ЭМП с наличием признаков апоптоза, могут быть поняты с позиций обратимости ранних проявлений апоптоза. Возможность его обратимости иллюстрируется данными, согласно которым клетки карциномы молочной железы с индуцированным апоптозом могут восстанавливаться. При этом среди реверсированных клеток наблюдался большой процент стволовых клеток (CD44+/CD24-), которые обладали повышенной туморогенностью и метастазировали в лимфатические узлы [17, 23]. В свете этих данных в наших исследованиях экспрессию CD44+/CD24- можно рассматривать как фактор, не только не препятствующий появлению признаков апоптоза, но и имеющий отношение к его обратимости. Близок

к понятию «обратимый апоптоз» феномен «неудачного апоптоза» (failed apoptosis) с ограниченной активацией каспаз и повреждением генома, но с отсутствием гибели клеток. Выжившие клетки также приобретают агрессивные фенотипы с высокой частотой появления стволовоподобных свойств, повышенной подвижностью и увеличенной выживаемостью. Описанный феномен свойственен карциномам молочной железы с экспрессией рецепторов к эстрогенам и рассматривается как потенциальный механизм, с помощью которого неудавшийся апоптоз способствует агрессивному течению рака [18]. Судя по представленным результатам, можно предположить, что стволовость, проявляющаяся экспрессией разных ее маркеров, неодинаково сопряжена как с устойчивостью к апоптозу, так и с вероятностью его обратного развития.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка ЦОК с точки зрения анализа проявлений апоптоза в клетках с разными вариантами стволовости и ЭМП, несмотря на выраженную фенотипическую и межперсональную гетерогенность, позволила выявить фенотипические признаки ЦОК, сопряженные с большей или меньшей вероятностью развития апоптоза. Коэкспрессия СК7/8 и CD133 при отсутствии экспрессии CD44 более характерна для группы фенотипов ЦОК без признаков апоптоза. Напротив, клетки с коэкспрессией СК7/8 и CD133 ЦОК с маркерами стволовости CD44+CD24-, как и клетки с отсутствием коэкспрессии СК7/8 и CD133, могли иметь признаки апоптоза.

Фенотипы с признаками раннего апоптоза, но с экспрессией CD133, в отличие от ЦОК без экспрессии CD133 более резистентны к НАХТ. Кажущиеся противоречия, связанные с наличием в части фенотипов ЦОК признаков апоптоза, несмотря на экспрессию маркеров стволовости или N-cadh, по-видимому, разрешатся, если рассматривать результаты с учетом вероятности обратимости ранних проявлений апоптоза или развития «неудачного апоптоза». Это делает актуальным поиск признаков (маркеров) обратимости ранних проявлений апоптоза.

На наш взгляд, результаты исследования позволяют предполагать, что: 1) коэкспрессия CD133 и СК7/8 сопряжена или причинно-следственно связана с резистентностью к апоптозу; 2) ЦОК с предшествующей в первичной опухоли инициацией апоптоза при отсутствии экспрессии CD133 при проведении НАХТ менее устойчивы к гибели; 3) экспрессия CD133 в ЦОК с ранними признаками апоптоза делает клетки более резистентными к НАХТ; 4) экспрессия по маркерам CD44+CD24- может быть связана с обратимостью ранних проявлений апоптоза.

Можно заключить, что существуют фенотипические признаки ЦОК, сопряженные со склонностью или устойчивостью к апоптозу. Дальнейшие исследования,

направленные на сопоставление связи маркеров склонности или резистентности к апоптозу, обратимости апоптоза, с одной стороны, с непосредственно-

ми отсроченными эффектами химио/радиотерапии, с другой, позволят выделить эффективные прогностические маркеры с целью оптимизации терапии РМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Vismara M., Reduzzi C., Daidone M.G. et al. Circulating tumor cells (CTCs) heterogeneity in metastatic breast cancer: different approaches for different needs. *Adv Exp Med Biol* 2020;1220: 81–91. DOI: 10.1007/978-3-030-35805-1\_6
- Савельева О.Е., Таширева Л.А., Булдаков М.А. и др. Экспрессия CXCR4 в различных популяциях циркулирующих и одиночных опухолевых клеток рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал* 2018;17(4):75–80. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-75-80  
Savelieva O.E., Tashireva L.A., Buldakov M.A. et al. CXCR4 expression in different subsets of CTCs and single (detached) breast cancer cells. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2018;17(4):75–80. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-4-75-80
- Krog B.L., Henry M.D. Biomechanics of the circulating tumor cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2018;1092:209–33. DOI: 10.1007/978-3-319-95294-9\_11
- Meng S., Tripathy D., Frenkel E.P. et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8152–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110
- Aceto N., Bardia A., Miyamoto D.T. et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 2014;158(5):1110–22. DOI: 10.1016/j.cell.2014.07.013
- Weinberg R.A. Leaving home early: reexamination of the canonical models of tumor progression. *Cancer Cell* 2008;14(4):283–4. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.09.009
- Buchheit C.L., Weigel K.J., Schafer Z.T. Cancer cell survival during detachment from the ECM: multiple barriers to tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):632–41. DOI: 10.1038/nrc3789
- Yu T., Wang C., Xie M. et al. Heterogeneity of CTC contributes to the organotropism of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2021;137:111314. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111314
- Barzegar Behrooz A., Syahir A., Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target* 2019;27(3):257–69. DOI: 10.1080/1061186X.2018.1479756
- Guo F., Yang Z., Sehoul J. et al. Blockade of ALDH in cisplatin-resistant ovarian cancer stem cells in vitro synergistically enhances chemotherapy-induced cell death. *Curr Oncol* 2022;29(4):2808–22. DOI: 10.3390/currenco129040229
- Chen C., Zhao S., Karnad A. et al. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 2018;11(1):64. DOI: 10.1186/s13045-018-0605-5
- Cao Z.-Q., Wang Z., Leng P. Aberrant N-кадгерин expression in cancer. *Biomed Pharmacother* 2019;118:109320. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109320
- Jordan N.V., Bardia A., Wittner B.S. et al. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature* 2016;537(7618):102–6. DOI: 10.1038/nature19328
- Kallergi G., Konstantinidis G., Markomanolaki H. et al. Apoptotic circulating tumor cells in early and metastatic breast cancer patients. *Mol Cancer Ther* 2013;12(9):1886–95. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-1167
- Spiliotaki M., Mavroudis D., Kapranou K. et al. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy. *Breast Cancer Res*;16(6):485. DOI: 10.1186/s13058-014-0485-8
- Jansson S., Bendahl P.O., Larsson A.M. et al. Prognostic impact of circulating tumor cell apoptosis and clusters in serial blood samples from patients with metastatic breast cancer in a prospective observational cohort. *BMC Cancer* 2016;16:433. DOI: 10.1186/s12885-016-2406-y
- Pandya V., Githaka J.M., Patel N. et al. BIK drives an aggressive breast cancer phenotype through sublethal apoptosis and predicts poor prognosis of ER-positive breast cancer. *Cell Death Dis* 2020;11(6):448. DOI: 10.1038/s41419-020-2654-2
- Xu Y., So C., Lam H.M. et al. Flow cytometric detection of newly-formed breast cancer stem cell-like cells after apoptosis reversal. *J Vis Exp* 2019;143. DOI: 10.3791/58642
- Zimmermann M., Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol* 2011;740:57–63. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6\_8
- Majid Z., Mehrjerdi A.Z., Sharifi A.M. et al. CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun* 2009;9:4.
- Mori Y., Takeuchi A., Miyagawa K. et al. CD133 prevents colon cancer cell death induced by serum deprivation through activation of Akt-mediated protein synthesis and inhibition of apoptosis. *FEBS Open Bio* 2021;11(5):1382–94. DOI: 10.1002/2211-5463.13145
- Nguyen P.T., Nguyen D., Chea C. et al. Interaction between N-cadherin and decoy receptor-2 regulates apoptosis in head and neck cancer. *Oncotarget* 2018;9(59):31516–30. DOI: 10.18632/oncotarget.25846
- Xu Y., So C., Lam H.M. et al. Apoptosis reversal promotes cancer stem cell-like cell formation. *Neoplasia* 2018;20(3):295–303. DOI: 10.1016/j.neo.2018.01.005

**Вклад авторов**

Е.С. Григорьева, Л.А. Таширева, В.В. Алифанов: сбор данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи; В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, О.Е. Савельева, С.В. Вторушин, Е.Л. Чойнзон, Н.В. Чердынцева: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи.

**Authors' contribution**

E.S. Grigorieva, L.A. Tashireva, V.V. Alifanov: data collection for analysis, review of publications on the topic of the article, article writing; V.M. Perelmuter, M.V. Zavyalova, O.E. Savelyeva, S.V. Vtorushin, E.L. Choynzonov, N.V. Cherdyntseva: review of publications on the topic of the article, article writing.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

В.М. Перельмутер / V.M. Perelmuter: <https://orcid.org/0000-0002-7633-9620>

Е.С. Григорьева / E.S. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0003-4737-8951>

М.В. Завьялова / M.V. Zavyalova: <https://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

Л.А. Таширева / L.A. Tashireva: <https://orcid.org/0000-0003-2061-8417>

В.В. Алифанов / V.V. Alifanov: <https://orcid.org/0000-0002-3025-4445>

О.Е. Савельева / O.E. Saveleva: <https://orcid.org/0000-0002-0301-8455>

С.В. Вторушин / S.V. Vtorushin: <https://orcid.org/0000-0002-1195-4008>

Е.Л. Чойнзон / E.L. Choynzonov: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>

Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30016). В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

**Funding.** The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 19-75-30016). The equipment of the Center for Collective Use "Medical Genomics" of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences was used in the work.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен локальным комитетом Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

All patients gave written informed consent to participate in the study.