

Для цитирования: Григорьева Е.С., Таширева Л.А., Алифанов В.В., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. Интегриновый профиль циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2024; 23(4): 86–95. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-4-86-95

For citation: Grigoryeva E.S., Tashireva L.A., Alifanov V.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M. Integrin profile of circulating tumour cells in breast cancer patients. Siberian Journal of Oncology. 2024; 23(4): 86–95. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-4-86-95

ИНТЕГРИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.С. Григорьева, Л.А. Таширева, В.В. Алифанов, М.В. Завьялова,
В.М. Перельмутер

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный
исследовательский медицинский центр Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

Аннотация

Интегрины как молекулы адгезии играют ключевую роль во взаимодействии клеток с базальной мембраной и межклеточным матриксом. Многочисленные исследования сообщают о повышенной экспрессии интегринов на опухолевых клетках при различных типах рака. Так, интегрины $\beta 3$ и αV ассоциированы со стволовыми признаками опухолевых клеток, интегрин $\beta 4$ в составе гетеродимера $\alpha \beta 4$ обеспечивает якорь-независимое выживание злокачественных эпителиальных клеток молочной железы. Однако все описанные функции интегринов исследованы исключительно на клетках первичных опухолей, тогда как функциональное значение и характер экспрессии интегринов на циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) остаются неясными. **Цель исследования** – оценка экспрессии интегринов $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha \nu \beta 5$ на ЦОК при раке молочной железы (РМЖ) и ее связи с проявлениями опухолевой болезни. **Материал и методы.** В исследование вошло 22 пациентки с инвазивной протоковой карциномой молочной железы T1–4N0–3M0 стадии. Венозную кровь брали у больных без неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) (группа 1) и получивших НАХТ (группа 2) утром натощак в объеме 12 мл в вакуумные пробирки с ЭДТА. Экспрессию интегринов ЦОК с учетом признаков стволовости CD44/CD24, CD133 и ALDH1 и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) (N-cadherin) оценивали методом проточной цитофлуориметрии. **Результаты.** Циркулирующие опухолевые клетки с фенотипами $\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5-$ и $\beta 3-\beta 4+\alpha \nu \beta 5+$ в сочетании с признаками стволовости были ассоциированы с большим размером опухоли (T4). При этом экспрессия интегрин $\beta 3$ была связана с более неблагоприятными молекулярно-биологическим подтипами РМЖ. Проведение неоадьювантной химиотерапии не влияло на характер экспрессии интегринов $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha \nu \beta 5$ в ЦОК. **Заключение.** Большинство ЦОК при РМЖ экспрессируют $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha \nu \beta 5$, несмотря на отсутствие связи с базальной мембраной и межклеточным матриксом. Экспрессия изученных интегринов на ЦОК сопряжена с проявлениями опухолевой болезни, в связи с чем ее оценка может рассматриваться в качестве одной из задач исследования жидкостной биопсии.

Ключевые слова: рак молочной железы, циркулирующие опухолевые клетки, интегрины, неоадьювантная химиотерапия.

INTEGRIN PROFILE OF CIRCULATING TUMOUR CELLS IN BREAST CANCER PATIENTS

E.S. Grigoryeva, L.A. Tashireva, V.V. Alifanov, M.V. Zavyalova, V.M. Perelmuter

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia

Abstract

Background. Integrins, as adhesion molecules, play a key role in the interaction of cells with the basal membrane and intercellular matrix. Numerous studies demonstrate evidence of increased expression of integrins on tumor cells in different types of cancer. Thus, $\beta 3$ and αv integrins are associated with stem-like features of tumor cells, and $\beta 4$ integrin as $\alpha 6\beta 4$ heterodimer provides anchorage-independent survival of malignant mammary epithelial cells. However, all the described functions of integrins have been investigated exclusively on primary tumor cells. The functional significance and expression pattern of integrins on circulating tumor cells (CTCs) remains unclear. **The aim of the study** was to evaluate the $\beta 3$, $\beta 4$ and $\alpha v\beta 5$ integrin expression on CTCs and its association with molecular subtype, stage and lymph node metastasis in breast cancer patients. **Material and Methods.** The study included 22 patients with T1–4N0–3M0 invasive ductal breast carcinoma. Venous blood was taken from patients without neoadjuvant chemotherapy (group 1) and after neoadjuvant chemotherapy (group 2) in the volume of 12 ml into vacuum tubes with EDTA. The expression of CTC integrins including stemness features CD44/CD24, CD133 and ALDH1, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) (N-cadherin) was evaluated by flow cytometry. **Results.** CTCs with $\beta 3+\beta 4-\alpha v\beta 5-$ and $\beta 3-\beta 4+\alpha v\beta 5+$ phenotypes and stemness properties were associated with larger tumor size (T4) in breast cancer patients. The $\beta 3$ integrin expression was associated with more aggressive molecular subtypes of breast cancer. Administration of neoadjuvant chemotherapy did not affect the expression pattern of $\beta 3$, $\beta 4$ and $\alpha v\beta 5$ integrins in CTCs. **Conclusion.** In breast cancer, most CTCs expressed $\beta 3$, $\beta 4$ and $\alpha v\beta 5$ integrins despite the lack of attachment to the basal membrane and intercellular matrix. The expression of the above integrins on CTCs was associated with breast cancer molecular subtype, stage and lymph node metastasis, and therefore its evaluation can be considered as one of the objectives of liquid biopsy study.

Key words: breast cancer, circulating tumor cells, integrins, neoadjuvant chemotherapy.

Актуальность

Интегрины представляют собой молекулы адгезии и являются гетеродимерными рецепторами для молекул базальной мембраны и межклеточного матрикса. Благодаря интегринам осуществляется взаимодействие между эпителием и межклеточным матриксом, которое необходимо для осуществления многообразных клеточных функций [1]. Из этого следует, что функции интегринов могут осуществляться благодаря взаимодействию с внешними сигналами – лигандами внеклеточного матрикса. Можно было бы ожидать, что экспрессия интегринов циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК), открепленными от матрикса, не имеет функционального значения для состояния самих ЦОК, однако это не так. Показано, что кроме внешней активации сигнальных путей через интегриновые рецепторы существуют внутренние пути активации. Например, имеются данные, что стволовость опухолевых клеток может инициироваться независимо от взаимодействия с матриксом. Причем эти независимые от адгезии функции интегринов запускают пути, отличные от типичного сигнального каскада [2]. Аберрантная экспрессия интегринов способствует возникновению, росту и метастазированию опухолей. Многочисленные данные показали, что экспрессия интегринов на опухолевых клетках повышается при многих типах рака [3]. Интегрин $\alpha v\beta 3$ признан маркером стволовых клеток во многих типах солидных опухолей [4]. Интегрин $\beta 4$ в составе гетеродимера $\alpha 6\beta 4$ является рецептором для ламинина и может опосредовать независимое от прикрепления выживание злокачественных эпителиальных клеток молочной железы [5]. Экспрессия интегрин αv связана с фенотипом

стволовости [2]. Описанные функции интегринов исследованы на клетках первичных опухолей. Исследований интегринового профиля ЦОК немного. В исследовании M. Sharifi et al. (2023) [6] у всех пациенток с наличием гематогенных метастазов при раке молочной железы (РМЖ) были выявлены ЦОК. При этом на значительной части ЦОК (61 %) обнаружена экспрессия $\beta 4$. Не было обнаружено какой-либо связи экспрессии этого интегрин с другими параметрами опухолевой болезни.

Целью исследования явилась оценка экспрессии интегринов $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha v\beta 5$ на ЦОК при РМЖ и ее связи с проявлениями опухолевой болезни.

Материал и методы

В исследование включено 22 пациентки с инвазивной протоковой карциномой молочной железы T1–4N0–3M0, получавших лечение на базе клиники НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2019 по 2022 г., у которых были обнаружены ЦОК. Венозную кровь брали у больных без неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) (группа 1) и после НАХТ (группа 2) утром натощак в объеме 12 мл в вакуумные пробирки с ЭДТА. Из всего объема крови готовили клеточный концентрат путем отстаивания при 37 °C в течение 90 мин под углом в 45° с последующим сбором белого кольца с клетками на границе осадка эритроцитов и отделившейся плазмы крови, а также всего надосадка, согласно методике Р.А. Поспеловой [7].

Цитофлуориметрический анализ проводили следующим образом. Для лизирования эритроцитов к образцам добавляли 500 мкл буфера OptiLyse C (Beckman Coulter, Франция) и отмывали в 2 мл раствора CellWASH (BD Biosciences, США) в течение

10 мин при 300 g с последующим удалением надосадка. После блокирования неспецифического связывания Fc-рецепторов раствором Human TruStain FcXTM Fc Receptor Blocking Solution (Biolegend, США) в клеточный концентрат добавляли по 5 мкл моноклональных антител BV570 anti-human CD45 (клон HI30, Sony Biotechnology, США), BV650 anti-human CD326 (EPCAM) (клон 9C4, Sony Biotechnology, США), BV510 anti-human CD44 (клон G44-26, BD Horizon, США), PerCP/Cy5.5 anti-human CD24 (клон ML5, Sony Biotechnology, США), PE/Cy7 anti-human N-Cadherin (клон 8C11, Sony Biotechnology, США), BV 421-anti- β 3 integrin (клон VI-PL2, BD Biosciences, США), Alexa Fluor 488-anti- β 4 integrin (клон 422325, R&D Systems, США), BV Alexa Fluor 750-anti- α v β 5 integrin (клон P5H9, R&D Systems, США) и инкубировали в темноте 20 мин при комнатной температуре. После инкубации, на этапе внутриклеточного окрашивания к каждому неокрашенному и окрашенному образцу добавляли 250 мкл раствора BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) и инкубировали в темноте 20 мин при 4 °C, затем дважды отмывали в 1 мл буфера BD Perm/ Wash (BD Biosciences, США), центрифугируя при 300 g 6 мин. К пробам добавляли 50 мкл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США), в окрашенную пробу добавляли по 5 мкл антител BV650 anti-human CD326 (EPCAM) (клон 9C4, Sony Biotechnology, США) и инкубировали при 4 °C в течение 20 мин. Затем отмывали каждую пробу в 1 мл буфера CellWASH (BD Biosciences, США) центрифугированием при 300 g 6 мин. На заключительном этапе к осадку добавляли 500 мкл Cell Staining Buffer (Sony Biotechnology, США) и ресуспендировали образец. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Novocyt 3000 (ACEA Biosciences, США) с помощью программного обеспечения NovoExpress 1.3.0 (ACEA Biosciences, США). Количество ЦОК рассчитывали на 1 мл периферической крови.

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета программ STATISTICA 10.0. Проверка нормальности распределения показателей осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Вилка. Учитывая ненормальное распределение изучаемых признаков, оценка достоверности различий медиан для сравнения независимых выборок проводилась с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Сравнение частоты выявления признаков выполнялось с использованием парного разностного теста. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Клинико-патологические параметры пациенток представлены в табл. 1. В CD45-EPCAM+ ЦОК определена коэкспрессия трех типов интегринов – β 3, β 4 и α v β 5, в каждой популяции оценены признаки стволовости по экспрессии CD44/CD24,

CD133 и ALDH1, а также проявления ЭМП по наличию экспрессии N-cadherin. Связь интегринового профиля с клинико-патологическими характеристиками оценивали в группе 1. Оценку влияния НАХТ проводили у больных с первично операбельным РМЖ в группах 1 и 2.

Все пациентки характеризовались наличием ЦОК с различными вариантами экспрессии трех типов исследуемых интегринов, при этом большая часть клеток экспрессировала один или более интегрин на своей поверхности (рис. 1). Наиболее редким вариантом была коэкспрессия интегринов β 3 и β 4 (β 3+ β 4+ α v β 5-). Наиболее частым был вариант коэкспрессии интегринов β 3 и α v β 5 (β 3+ β 4- α v β 5+) (табл. 2). Обнаружено, что 65,81 % ЦОК характеризовались экспрессией, как минимум, одного типа интегрин. При анализе доли клеток, экспрессирующих интегрины β 3, β 4 и α v β 5 без учета их коэкспрессии, оказалось, что большая часть ЦОК, экспрессировала интегрин β 3 и α v β 5 – 42,8 и 43,8 % клеток соответственно, в то время как интегрин β 4 экспрессировали только 12,6 % ЦОК.

В результате сравнения количества ЦОК с экспрессией интегринов β 3, β 4 и α v β 5 в зависимости от размера опухоли выявлено повышенное количество β 3+ β 4- α v β 5- и β 3- β 4+ α v β 5+ ЦОК у больных с большим размером опухоли (рис. 2). Так, у больных с T4 количество β 3+ β 4- α v β 5- и β 3- β 4+ α v β 5+ ЦОК составило 8,96 (0,00–17,92) и 18,30 (0,00–36,60) ЦОК/мл соответственно, тогда как у больных с T1 количество β 3+ β 4- α v β 5- и β 3- β 4+ α v β 5+ ЦОК составило 0,42 (0,00–2,75) и 0,00 (0,00–2,49) ЦОК/мл, а у больных с T2 – 0,83 (0,00–4,48) и 0,00 (0,00–0,83) ЦОК/мл соответственно.

Углубленный анализ фенотипических характеристик позволил установить наличие признаков стволовости и ЭМП у выявленных популяций клеток. Показано, что β 3- β 4+ α v β 5+ ЦОК обладали признаками стволовости по CD133 и ALDH1 и мезенхимного фенотипа ЭМП (N-cadherin+) (рис. 3). Количество β 3- β 4+ α v β 5+ ЦОК с фенотипом CD44-CD24+ CD133+ALDH1+N-cadherin+ тоже было

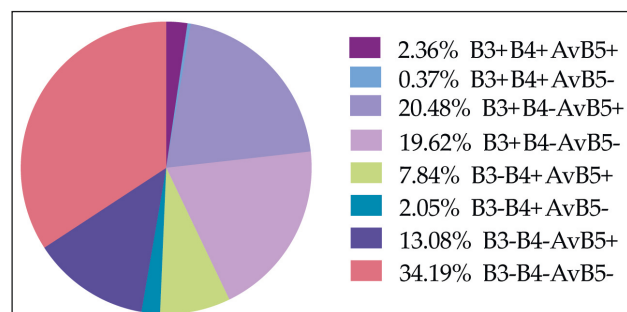


Рис. 1. Доли экспрессии интегринов β 3, β 4 и α v β 5 в ЦОК у больных раком молочной железы (Me, %).

Примечание: диаграмма выполнена авторами

Fig.1 Proportion of CTCs with β 3, β 4 and α v β 5 integrin expression in breast cancer patients (Me, %).

Note: created by the authors

Таблица 1/Table 1

Характеристика групп больных
Characteristics of the groups of patients

Параметр/Parameter		Частота/Frequency		p-value
		Группа 1	Группа 2	
		(без НАХТ)/ Group 1 (no NACT)	(с НАХТ)/ Group 1 (NACT)	
Возраст/Age	<35	5,9 % (1/17)	0,00 % (0/5)	
	35–50	41,2 % (7/17)	60,0 % (3/5)	
	>50	52,9 % (9/17)	40,0 % (2/5)	
Размер опухоли/Size of tumor	T1	47,1 % (8/17)	0,0 % (0/5)	0,04
	T2	41,2 % (7/17)	100,0 % (5/5)	
	T4	11,8 % (2/17)	0,0 % (0/5)	
Вовлеченность лимфоузлов/ Lymph node involvement	N0	70,6 % (12/17)	60,0 % (3/5)	
	N1	29,4 % (5/17)	40,0 % (2/5)	
Молекулярно-биологический подтип/ Molecular subtype	Люминальный А/Luminal A	47,1 % (8/17)	40,0 % (2/5)	
	Люминальный Б (HER2-)/ Luminal B (HER2-)	17,6 % (3/17)	20,0 % (1/5)	
	Люминальный Б (HER2+)/ Luminal B (HER2+)	17,6 % (3/17)	0,0 % (0/5)	
	ТН/Triple negative	11,8 % (2/17)	40,0 % (2/5)	
Экспрессия ERα/ERα expression	HER2+	5,9 % (1/17)	0,0 % (0/5)	
	Да/Yes	82,4 % (14/17)	60,0 % (3/5)	
	Нет/No	16,7 % (3/17)	40,0 % (2/5)	
Экспрессия PR/PR expression	Да/Yes	64,7 % (11/17)	60,0 % (3/5)	
	Нет/No	35,3 % (6/17)	40,0 % (2/5)	
HER2+	Да/Yes	23,5 % (4/17)	0,0 % (0/5)	
	Нет/No	76,5 % (13/17)	100,0 % (5/5)	

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

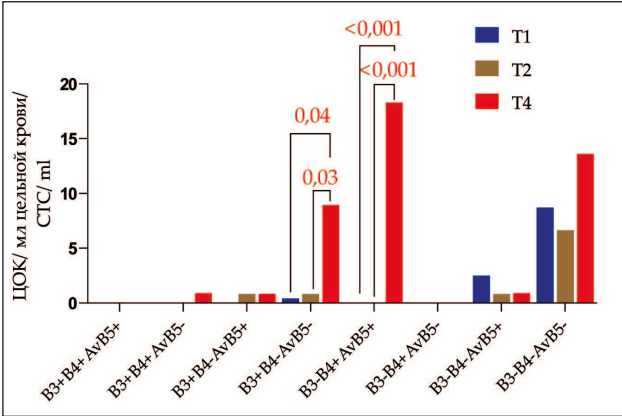


Рис. 2. Количество ЦОК с экспрессией интегринов β3, β4 и αvβ5 у больных с учетом размера первичной опухоли (критерий Т). Примечание: диаграмма выполнена авторами
Fig. 2. The number of CTCs with β3, β4 and αvβ5 integrin expression in breast cancer patients in relation to stage T. Note: created by the authors

выше у пациенток с Т4 по сравнению с Т1 и Т2 ($p<0,0001$ и $p<0,0001$ соответственно) и составляло 0,00 (0,00–18,30), 0,00 (0,00–0,00) и 0,00 (0,00–0,00) ЦОК/мл соответственно.

Другой субпопуляцией ЦОК, связанной с критерием Т, были клетки с интегриновым фенотипом β3+β4-αvβ5-. При Т4 такие ЦОК чаще демонстрировали стволовые свойства по маркерам CD44+CD24- и CD133, а также эпителиальный фенотип ЭМП (рис. 4).

При оценке количества ЦОК с экспрессией изучаемых интегринов с учетом лимфогенной распространенности обнаружено, что количество β3-β4-αvβ5+ ЦОК было ниже у больных с N1 по сравнению с N0 ($p=0,01$) (рис. 5). Количество β3-β4-αvβ5+ ЦОК при N0 и N1 составляло 3,74 (1,45–9,13) и 0,0 (0,0–0,92) ЦОК/мл соответственно. Детальный анализ фенотипических характеристик β3-β4-αvβ5+ ЦОК выявил, что обнаруженные различия были связаны с ЦОК без признаков стволовости по CD44/CD24, CD133 и ALDH1 ($p=0,04$, $p=0,03$, $p=0,03$ соответственно) (рис. 6).

Далее мы оценили различия в количестве ЦОК с учетом интегринового профиля у больных с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ (табл. 3). Больные были разделены на 2 группы: первая – с люминальными (HER2-) подти-

Таблица 2/Table 2

Количество ЦОК с экспрессией интегринов $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha \nu \beta 5$ у больных раком молочной железы
The number of CTCs with $\beta 3$, $\beta 4$ and $\alpha \nu \beta 5$ integrin expression in breast cancer patients

№	Фенотип/Phenotype	Me(Q1-Q3), ЦОК/мл/CTC/ml
1	$\beta 3+\beta 4+\alpha \nu \beta 5+$	0,00 (0,00–0,00)
2	$\beta 3+\beta 4+\alpha \nu \beta 5-$	0,00 (0,00–0,83)
3	$\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5+$	0,00 (0,00–1,68)
4	$\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5-$	0,83 (0,00–3,49)
5	$\beta 3-\beta 4+\alpha \nu \beta 5+$	0,00 (0,00–0,83)
6	$\beta 3-\beta 4+\alpha \nu \beta 5-$	0,00 (0,00–0,83)
7	$\beta 3-\beta 4-\alpha \nu \beta 5+$	1,66 (0,00–5,81)
8	$\beta 3-\beta 4-\alpha \nu \beta 5-$	8,30 (2,08–19,11)

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

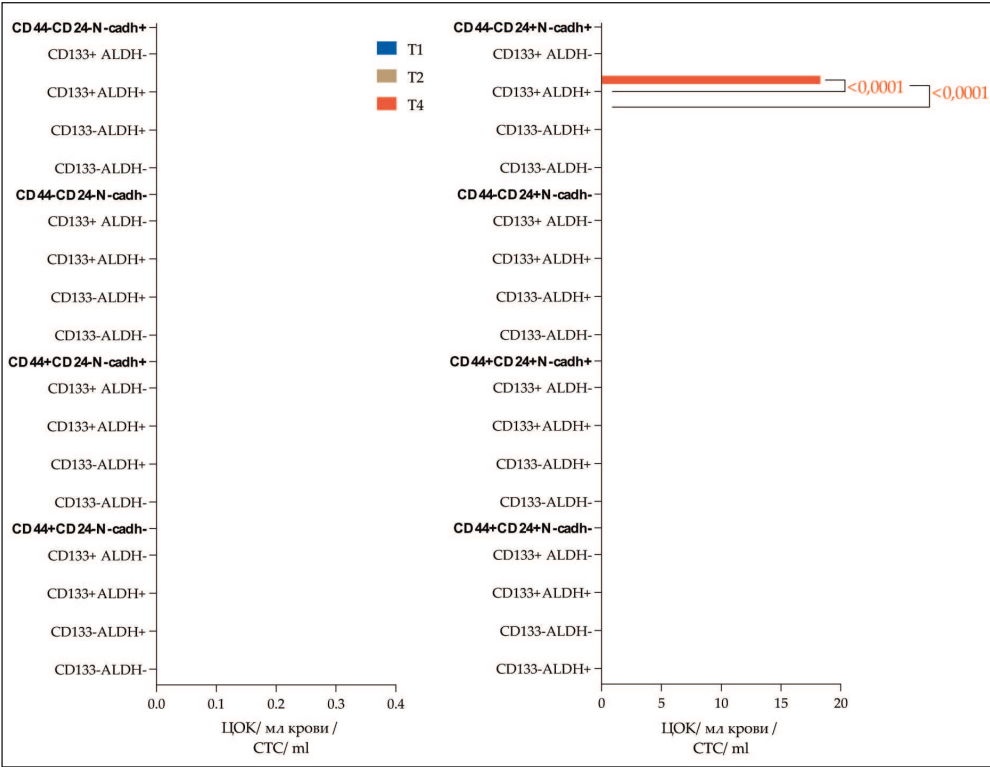


Рис. 3. Признаки стволовости и ЭМП в $\beta 3-\beta 4+\alpha \nu \beta 5+$ ЦОК в зависимости от критерия Т. Примечание: диаграммы выполнены авторами
Fig. 3. Features of stemness and EMT in $\beta 3-\beta 4+\alpha \nu \beta 5+$ CTCs in breast cancer patients in relation to stage T. Note: created by the authors

пами; вторая – с HER2+ подтипами (люминальный Б (HER2+), HER2+) и трижды негативным (ТН). Оказалось, что в группе больных с молекулярно-биологическими подтипами, характеризующимися неблагоприятным течением болезни, отмечалось более высокое количество ЦОК с экспрессией $\beta 3$, без учета сочетаний с другими исследуемыми интегринами. Более глубокий анализ признаков стволовости и ЭМП в ЦОК в этих сравниваемых группах значимых различий не выявил.
У пациенток с первично операбельным РМЖ было оценено влияние НАХТ на профиль интегрinov ЦОК. Поскольку у всех больных группы 2 опухоль соответствовала стадии Т2, в анализ были включены пациентки из группы 1 только со стадией Т2. При оценке интегринаов профилей ЦОК у больных в группах до и после НАХТ

различий не обнаружено (табл. 4). Углубленный анализ фенотипических характеристик с учетом признаков стволовости и ЭМП каждой из популяции ЦОК также не выявил значимых различий. Таким образом, проведение НАХТ не влияло на характер экспрессии интегрinov ЦОК у больных раком молочной железы.
Обсуждение
Полученные результаты свидетельствуют, что около 31 % ЦОК не экспрессируют изучаемые интегрины. Чаще других наблюдаются варианты коэкспрессии $\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5+$ (20,5 %), $\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5-$ (19,6 %) и $\beta 3-\beta 4-\alpha \nu \beta 5+$ (13,1 %). Если не учитывать коэкспрессию, то доля ЦОК, экспрессирующих $\beta 3$ и $\alpha \nu \beta 5$, наиболее высока и составляет 42,8 и 43,8 % соответственно. Существенно реже выявлялась

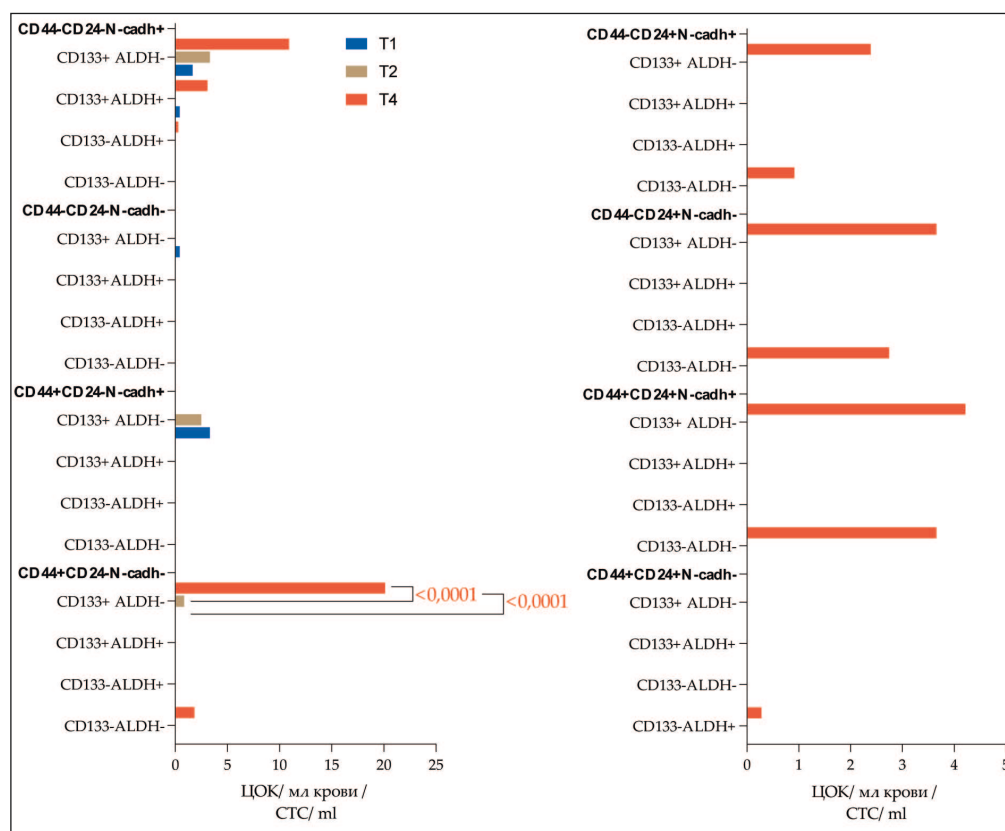


Рис. 4. Наличие признаков стволовости и ЭМП в $\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5$ - ЦОК у пациентов в зависимости от критерия Т.

Примечание: диаграммы выполнены авторами
Fig. 4. Features of stemness and EMT in $\beta 3+\beta 4-\alpha \nu \beta 5$ - CTCs in breast cancer patients in relation to stage T. Note: created by the authors

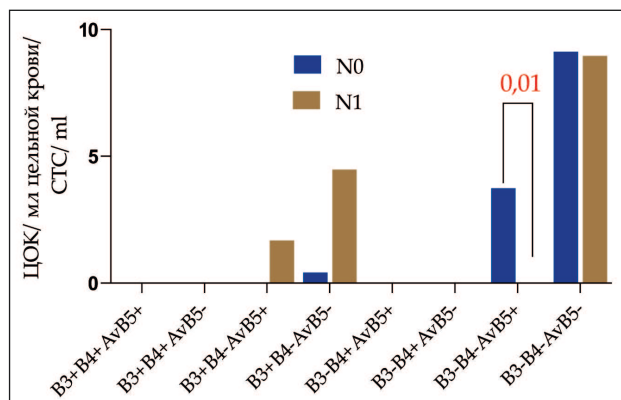


Рис. 5. Количество ЦОК с экспрессией интегринов $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha \nu \beta 5$ у больных с учетом лимфогенного метастазирования.

Примечание: диаграмма выполнена авторами
Fig. 5. The number of CTCs with $\beta 3$, $\beta 4$ and $\alpha \nu \beta 5$ integrin expression in breast cancer patients in relation to lymph node metastasis. Note: created by the authors

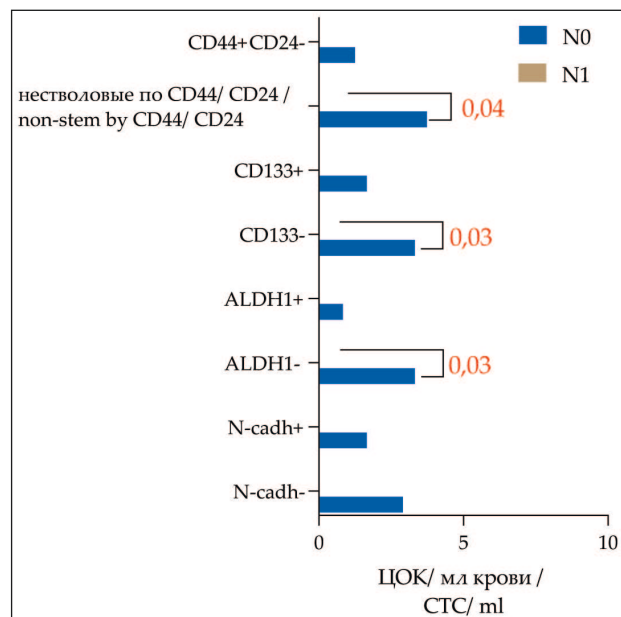


Рис. 6. Наличие признаков стволовости и ЭМП в $\beta 3-\beta 4-\alpha \nu \beta 5$ + ЦОК у пациентов в зависимости от лимфогенного метастазирования.

Примечание: диаграмма выполнена авторами
Fig. 6. Features of stemness and EMT in $\beta 3-\beta 4-\alpha \nu \beta 5$ + CTCs in breast cancer patients in relation to lymph node metastasis. Note: created by the authors

субъединица $\beta 4$ (12,4 %). Столь выраженное многообразие вариантов коэкспрессии исследуемых интегринов на ЦОК позволяет предполагать, что, достигнув отдаленных органов и тканей в качестве диссеминированных или покоящихся, такие клетки уже имеют рецепторный аппарат, который

способен обеспечивать адекватное для адаптации и пролиферации взаимодействие с межклеточным матриксом.

Фенотипические признаки ЦОК, включая экспрессию интегринов, формируются еще в первичной опухоли, благодаря чему ЦОК в значительной

Таблица 3/ Table 3

Количество ЦОК с учетом интегринавого профиля у больных с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ

Number of CTCs with integrin expression in patients with different molecular subtypes of breast cancer

№	Фенотип/ Phenotype	Me(Q1-Q3), ЦОК/мл/CTC/ml		p-value
		Люминальный А/Б/ Luminal A/B	HER2+, ТН	
		(а)	(б)	
1	β3+β4+αvβ5+	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,28)	
2	β3+β4+αvβ5-	0,00 (0,00–0,28)	0,42 (0,00–4,69)	
3	β3+β4-αvβ5+	0,42 (0,00–1,88)	0,42 (0,00–3,13)	
4	β3+β4-αvβ5-	0,42 (0,00–1,74)	0,83 (0,00–8,22)	
5	β3-β4+αvβ5+	0,00 (0,00–1,45)	0,00 (0,00–9,77)	
6	β3-β4+αvβ5-	0,00 (0,00–0,83)	0,00 (0,00–2,08)	
7	β3-β4-αvβ5+	2,49 (0,62–5,40)	0,92 (0,00–7,89)	
8	β3-β4-αvβ5-	7,06 (2,63–18,68)	13,63 (6,23–22,00)	
9	β3+	0,83 (0,00–7,73)	4,98 (1,79–18,60)	p _{а-б} =0,04
10	β4+	0,83 (0,00–2,91)	2,08 (0,00–22,06)	
11	αvβ5+	4,15 (1,68–10,58)	7,89 (1,26–17,70)	

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

Таблица 4/ Table 4

Количество ЦОК с учетом интегринавого профиля у больных РМЖ без НАХТ (группа 1) и получивших НАХТ (группа 2)

Number of CTCs with integrin expression in breast cancer patients without NAC (group 1) and with NAC (group 2)

№	Фенотип/Phenotype	Me (Q1-Q3), ЦОК/мл/ CTC/ml	
		Группа 1/Group 1	Группа 2/Group 2
		(а)	(б)
1	β3+β4+αvβ5+	0,00 (0,00–0,00)	0,00 (0,00–0,21)
2	β3+β4+αvβ5-	0,00 (0,00–0,83)	0,00 (0,00–1,94)
3	β3+β4-αvβ5+	0,42 (0,00–1,88)	0,00 (0,00–2,08)
4	β3+β4-αvβ5-	0,83 (0,00–1,74)	2,49 (1,25–30,47)
5	β3-β4+αvβ5+	0,00 (0,00–0,83)	0,00 (0,00–1,11)
6	β3-β4+αvβ5-	0,83 (0,00–1,74)	0,83 (0,28–1,23)
7	β3-β4-αvβ5+	0,83 (0,00–2,49)	0,00 (0,00–3,74)
8	β3-β4-αvβ5-	7,89 (2,63–20,13)	9,96 (0,42–28,29)

Примечание: таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

степени отражают биологические особенности опухоли и могут служить объектом для жидкостной биопсии. В нашем исследовании ЦОК с двумя фенотипами β3+β4-αvβ5 и β3-β4+αvβ5+ были ассоциированы с большим размером опухоли (Т4). По-видимому, такая ассоциация всех трех интегринов с Т4 обусловлена тем, что их экспрессия в ЦОК сочеталась с наличием признаков стволовости. ЦОК с интегриновым фенотипом β3+β4-αvβ5- экспрессировали маркеры стволовости CD44+CD24- и CD133, ЦОК с интегриновым фенотипом β3-β4+αvβ5+ имели другое сочетание маркеров стволовости, а именно CD133 и ALDH1. При этом β3-β4+αvβ5+ ЦОК характеризовались мезенхимным фенотипом ЭМП (N-cadherin+), а β3+β4-αvβ5- клетки не имели признаков ЭМП (N-cadherin-).

Еще одним свидетельством сопряженности экспрессии интегринов со злокачественным потенциалом опухолей было большее количество ЦОК с экспрессией интегрин β3 при трижды негативном, люминальном Б (HER2+) и HER2+ молекулярных подтипах РМЖ. Ассоциация исследуемых интегринов с продвинутой стадией и агрессивными молекулярными подтипами РМЖ объясняется известными функциональными ассоциациями. Известно, что интегрин β3 связывается с компонентами внеклеточного матрикса, формируя контакты фокальной адгезии между опухолевыми клетками и матриксом. Интегрин αvβ3 вовлечен в процессы пролиферации, инвазии, выживания опухолевых клеток в циркуляции [4]. Кроме того, по данным литературы, повышенная экспрессия интегрин αvβ3 обладает прогностиче-

ской значимостью в отношении метастазирования в кости [8].

Феномен связи экспрессии интегрина $\alpha v \beta 5$ с отсутствием лимфогенных метастазов может быть объяснен двумя гипотезами. Первая заключается в том, что ЦОК с экспрессией $\alpha v \beta 5$, сопряженные с отсутствием лимфогенных метастазов, не имели признаков стволовости по CD44/CD24, CD133 и ALDH, которая крайне важна для метастазирования. Другое объяснение состоит в том, что повышенная экспрессия интегрина αv , хотя и в составе гетеродимера $\alpha v \beta 3$, приводит к усилению в клетках трижды негативного рака эффектов TGF- β , что, в свою очередь, нарушает петлю обратной связи, которая ингибирует Zeb2, индуцируя при этом ЭМП и нарушая коллективную миграцию клеток [9]. Поскольку имеются исследования в пользу того, что именно коллективная инвазия, скорее, чем инвазия одиночными клетками опухоли, лежит в основе лимфогенного метастазирования [10], нарушение этого процесса и может быть причиной отсутствия лимфогенных метастазов при экспрессии на клетках опухоли интегрина $\alpha v \beta 5$.

Учитывая критическое значение отдельных интегринов для опухолевого прогрессирования,

исследование влияния НАХТ на изменение интегринового профиля является крайне важной задачей, в том числе и для клинической практики. Нами проведено изучение экспрессии интегринов $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha v \beta 5$ в ЦОК с учетом признаков стволовости и ЭМП, так как известно, что проведение НАХТ может индуцировать появление стволовых свойств опухолевых клеток [11]. Однако сравнение интегриновых профилей ЦОК пациентов с НАХТ и без НАХТ значимых различий не выявило.

Заключение

Интегрины $\beta 3$, $\beta 4$ и $\alpha v \beta 5$ в различных сочетаниях экспрессируются при РМЖ на большинстве ЦОК. Различные варианты коэкспрессии изученных интегринов на ЦОК ассоциированы с молекулярным подтипом, стадией и лимфогенным метастазированием РМЖ. Наличие разных интегринов на ЦОК, с одной стороны, свидетельствует о том, что якорь-независимое существование опухолевых клеток не является препятствием для их экспрессии, с другой стороны, наличие интегринового интерфейса на ЦОК делает их готовыми к взаимодействию с межклеточным матриксом в местах развития метастазов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Su C.Y., Li J.Q., Zhang L.L., Wang H., Wang F.H., Tao Y.W., Wang Y.Q., Guo Q.R., Li J.J., Liu Y., Yan Y.Y., Zhang J.Y. The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers. *Front Pharmacol.* 2020; 11. doi: 10.3389/fphar.2020.579068.
2. Cooper J., Giancotti F.G. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell.* 2019; 35(3): 347–67. doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.007.
3. Liu F., Wu Q., Dong Z., Liu K. Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther.* 2023; 247. doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108458.
4. Seguin L., Kato S., Franovic A., Camargo M.F., Lesperance J., Elliott K.C., Yebra M., Mielgo A., Lowy A.M., Husain H., Cascone T., Diao L., Wang J., Wistuba I.I., Heymach J.V., Lippman S.M., Desrosiers J.S., Anand S., Weis S.M., Cheres D.A. An integrin $\beta 3$ -KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol.* 2014; 16(5): 457–68. doi: 10.1038/ncb2953.
5. Zahir N., Lakins J.N., Russell A., Ming W., Chatterjee C., Rozenberg G.I., Marinkovich M.P., Weaver V.M. Autocrine laminin-5 ligates $\alpha 6 \beta 4$ integrin and activates RAC and NF κ B to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol.* 2003; 163(6): 1397–407. doi: 10.1083/jcb.200302023.
6. Sharifi M., Zarrin B., Bahri Najafi M., Hakimian M.R., Hosseini N., Talebi K., Javanmard S.H. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ on Circulating Tumor Cells of Metastatic Breast Cancer Patients. *Adv Biomed Res.* 2021; 10. doi: 10.4103/abr_76_21.
7. Поспелова Р.А. Лейкоконцентрация в клинической практике: диагностическое значение. М., 1973. 88 с. [Pospelova R.A. Leukocyte concentration in clinical practice: diagnostic value. M., 1973. 88 p. (in Russian)].
8. Kovacheva M., Zepp M., Berger S., Berger M.R. Conditional knock-down of integrin beta-3 reveals its involvement in osteolytic and soft tissue lesions of breast cancer skeletal metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021; 147(2): 361–71. doi: 10.1007/s00432-020-03428-y.
9. Parvani J.G., Galliher-Beckley A.J., Schiemann B.J., Schiemann W.P. Targeted inactivation of $\beta 1$ integrin induces $\beta 3$ integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- β . *Mol Biol Cell.* 2013; 24(21): 3449–59. doi: 10.1091/mbc.E12-10-0776. Erratum in: *Mol Biol Cell.* 2014; 25(4): 548.
10. Giampieri S., Manning C., Hooper S., Jones L., Hill C.S., Sahai E. Localized and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(11): 1287–96. doi: 10.1038/ncb1973.
11. Liu L., Yang L., Yan W., Zhai J., Pizzo D.P., Chu P., Chin A.R., Shen M., Dong C., Ruan X., Ren X., Somlo G., Wang S.E. Chemotherapy Induces Breast Cancer Stemness in Association with Dysregulated Monocytosis. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(10): 2370–82. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2545.

Поступила/Received 23.11.2023

Одобрена после рецензирования/Revised 18.03.2024

Принята к публикации/Accepted 16.08.2024

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Григорьева Евгения Сергеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной терапии рака, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: grigoryeva.es@gmail.com. SPIN-код: 7396-7570. Researcher ID (WOS): C-8571-2012. Author ID (Scopus): 21934560600. ORCID: 0000-0003-4737-8951.

Таширева Любовь Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 4371-5340. Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Алифанов Владимир Валерьевич, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр

Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7943-5548. Researcher ID (WOS): AAW-8959-2021. Author ID (Scopus): 57225891731. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1229-0323. Researcher ID (WOS): C-8580-2012. Author ID (Scopus): 36711031100. ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 6252-5319. Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

ВКЛАД АВТОРОВ

Григорьева Евгения Сергеевна: планирование концепции публикации, получение первичных данных, интерпретация результатов исследования, оформление и подготовка текста статьи.

Таширева Любовь Александровна: планирование концепции публикации, интерпретация результатов исследования.

Алифанов Владимир Валерьевич: получение первичных данных, интерпретация результатов исследования.

Завьялова Марина Викторовна: интерпретация результатов исследования.

Перельмутер Владимир Михайлович: проверка критически важного интеллектуального содержания, утверждение текста статьи.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

Финансирование

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 21-15-00140 «Прогнозирование локализации гематогенных метастазов при раке молочной железы»).

Конфликт интересов

Автор Перельмутер В.М. (доктор медицинских наук, профессор) является членом редколлегии «Сибирского онкологического журнала». Авторам неизвестно о каком-либо другом потенциальном конфликте интересов, связанном с этой статьей.

Соответствие принципам этики

Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации, одобрено независимым этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии (Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5), протокол № 8 от 17.06.2016 г.

Информированное согласие

Все пациенты подписали письменное информированное согласие на публикацию данных в медицинском журнале, включая его электронную версию.

ABOUT THE AUTHORS

Evgeniya S. Grigoryeva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8571-2012. Author ID (Scopus): 21934560600. ORCID: 0000-0003-4737-8951.

Lyubov A. Tashireva, MD, DSc, Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Vladimir V. Alifanov, MD, PhD, Junior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): AAW-8959-2021. Author ID (Scopus): 57225891731. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Marina V. Zavyalova, MD, Professor, Leading Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8580-2012. Author ID (Scopus): 36711031100. ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Vladimir M. Perelmutter, MD, Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Evgeniya S. Grigoryeva: planning the concept of publication, obtaining primary data, interpretation of research results, design and preparation of the manuscript.

Lyubov A. Tashireva: planning the concept of publication, interpretation of research results.

Vladimir V. Alifanov: obtaining primary data, interpretation of research results.

Marina V. Zavyalova: interpretation of research results.

Vladimir M. Perelmutter: verification of critical intellectual content, final approval of the manuscript text.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 21-15-00140).

Conflict of interests

Prof. Perelmutter V.M. is a member of the editorial board of Siberian Journal of Oncology. The authors are not aware of any other potential conflicts of interest related to this manuscript.

Compliance with Ethical Standards

The study was conducted in accordance with ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki approved by Ethics Committee of Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (5, Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia), protocol No. 8 dated June 17, 2016.

Voluntary informed consent

Written informed voluntaries consents were obtained from the patients for the publication of data in medical journal.