

УДК 618.19-006.6-091.8

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-3-50-59>

Фенотипическая характеристика молекулярно-биологических вариантов отдельных Her2-положительных циркулирующих опухолевых клеток при люминальных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы

Перельмутер В.М.^{1,2}, Завьялов А.В.², Григорьева Е.С.¹, Савельева О.Е.³,
Гарбуков Е.Ю.¹, Письменный Д.С.^{1,2}, Завьялова М.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (НИМЦ) Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет (СПбГПМУ)
Россия, 194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2

РЕЗЮМЕ

Цель: изучить варианты коэкспрессии маркеров молекулярно-биологического подтипа (МБП) на отдельных циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) при люминальных подтипах рака молочной железы (РМЖ) и их связь с экспрессией маркеров стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода.

Материалы и методы. Исследовалась венозная кровь и биоптаты первичной опухоли от 51 больной РМЖ N1-4N0-3M0 (21 случай с люминальным А, 19 – с люминальным В HER2– и 11 – с люминальным В HER2+ МБП). Методом проточной цитометрии в ЦОК до начала терапии определяли экспрессию CD45, EpCAM, N-/E-кадгерина, CD44, CD24, CD133, Her2neu, ER, PR и Ki67. Статистический анализ выполнен в Statistica 10.0 ($p < 0,05$).

Результаты. При люминальных А и В HER2– МБП первичной опухоли выявлена конверсия фенотипа ЦОК с появлением HER2+, чаще ER-отрицательных с различными вариантами коэкспрессии маркеров стволовости. Ключевым практическим результатом является идентификация при люминальных HER2– МБП метастаз-ассоциированного фенотипа ЦОК: CD45–EpCAM+ER–PR–Her2neu+Ki67–, который соответствует классическому HER2+ подтипу на уровне отдельной клетки.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности определения экспрессии маркеров МБП на одной ЦОК с целью прогнозирования риска гематогенного метастазирования при люминальных А и В HER2– МБП первичной опухоли и оптимизации лечения.

Ключевые слова: рак молочной железы, люминальный молекулярно-биологический подтип, циркулирующие опухолевые клетки, Her2

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено независимым этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (протокол № 9594 от 27.11.2023).

Для цитирования: Перельмутер В.М., Завьялов А.В., Григорьева Е.С., Савельева О.Е., Гарбуков Е.Ю., Письменный Д.С., Завьялова М.В. Фенотипическая характеристика молекулярно-биологических вариантов отдельных Her2-положительных циркулирующих опухолевых клеток при люминальных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2026;25(3):50–59. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-3-50-59>.

Phenotypic Characterization of Molecular Biological Variants of Individual Her2-positive Circulating Tumor Cells in Luminal Molecular Subtypes of Breast Cancer

Perelmuter V.M.^{1,2}, Zavyalov A.V.², Pismenny D.S.^{1,2}, Grigoryeva E.S.¹, Savelieva O.E.³, Garbukov E.Yu.¹, Zavyalova M.V.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMС), Russian Academy of Sciences
5 Kooperativny St., 634009 Tomsk, Russian Federation

² Siberian State Medical University
2 Moskovsky trakt, 634050 Tomsk, Russian Federation

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University
2 Litovskaya St., 194100, Saint Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To study the co-expression patterns of molecular biological subtype (MBS) markers on individual circulating tumor cells (CTCs) in luminal subtypes of breast cancer (BC) and their association with the expression of stemness and epithelial – mesenchymal transition (EMT) markers.

Materials and methods. The study analyzed venous blood and primary tumor biopsies from 51 BC patients (N1–4N0–3M0), including 21 cases with luminal A, 19 cases with luminal B (HER2–), and 11 cases with luminal B (HER2+) MBS. Flow cytometry was used to assess the expression of CD45, EpCAM, N-/E-cadherin, CD44, CD24, CD133, Her2neu, ER, PR, and Ki67 in CTCs before therapy initiation. Statistical analysis was performed using Statistica 10.0 ($p < 0.05$).

Results. In luminal A and B (HER2–) primary tumor MBS, phenotypic conversion of CTCs was observed, characterized by the emergence of HER2+ CTCs, which were often ER-negative and exhibited various co-expression patterns of stemness markers. The key practical finding was the identification of a metastasis-associated CTC phenotype in luminal HER2– MBS: CD45–EpCAM+ER–PR–Her2neu+Ki67–. This phenotype corresponds to the classical HER2+ subtype at the level of a single cell.

Conclusion. The study results support the feasibility of determining MBS marker expression on a single CTC for predicting the risk of hematogenous metastasis in luminal A and B (HER2–) primary tumor MBS and for optimizing treatment strategies.

Keywords: breast cancer, luminal molecular biological subtype, circulating tumor cells, HER2

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All patients signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the Ethics Committee at Cancer Research Institute of Tomsk NRMС (Minutes No. 9594 dated November 27, 2023).

For citation: Perelmuter V.M., Zavyalov A.V., Pismenny D.S., Grigoryeva E.S., Savelieva O.E., Garbukov E.Yu., Zavyalova M.V. Phenotypic Characterization of Molecular Biological Variants of Individual Her2-positive Circulating Tumor Cells in Luminal Molecular Subtypes of Breast Cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2026;25(3):50–59. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2026-3-50-59>.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в качестве объекта жидкостной биопсии имеет большие перспективы [1]. Исследование ЦОК при раке молочной железы (РМЖ) проводится с целью поиска прогностических маркеров метастазирования, рецидивирования и предсказания ответа на лечение [2, 3]. В периферической крови ЦОК находятся около 2–2,5 ч, характеризуются гетерогенностью и частично отражают клеточный состав первичной опухоли [4, 5].

Несовпадения фенотипов первичной опухоли и ЦОК могут быть обусловлены либо избирательностью интравазации, либо гибелью ЦОК в кровеносном русле, либо быстрой экстравазацией, конверсия фенотипа – эффектами терапии. Фенотипические различия ЦОК могут касаться экспрессии сурrogатных маркеров, определяющих молекулярно-биологический подтип клеток первичной опухоли и ЦОК.

В исследовании V. Müller и соавт. (2021) показана предсказательная ценность определения ЦОК, экспрессирующих HER2, ассоциированная с короткой общей выживаемостью [6]. Однако данные о клиническом значении определения ЦОК при РМЖ противоречивы. С одной стороны, экспрессия HER2+ ЦОК может не соответствовать показателю экспрессии HER2 первичной опухолью или метастазами [7].

С другой стороны, было высказано предположение, что нацеливание на HER2+ ЦОК может улучшить результаты лечения больных РМЖ [6]. Имеются рекомендации по оценке конверсии МБП РМЖ по наличию HER2+ ЦОК. Авторы полагают, что о конверсии можно судить в случаях, если не менее 50% ЦОК являются HER2+ или при наличии амплификации HER2, выявленным по результатам FISH, независимо от их количества (%) [8].

Как правило, появление HER2+ ЦОК при HER2– МБП первичной опухоли рассматривается без связи с экспрессией других маркеров МБП (ER, PR и Ki67). Это во многом связано с методическими трудностями корректной количественной оценки данных маркеров на совокупности ЦОК. Практически отсутствуют исследования, в которых оценивались бы варианты коэкспрессии маркеров МБП на отдельной (единичной) опухолевой клетке, в том числе и на ЦОК. Между тем такой подход представляется нам продуктивным. Целью исследования явилось изучение вариантов коэкспрессии маркеров МБП на отдельных ЦОК в сочетании с экспрессией маркеров стволости и ЭМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовалась венозная кровь и биоптаты первичной опухоли от 51 больной РМЖ стадии N1-4N0-3M0, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2019 по 2020 г. Биопсия ткани первичной опухоли и забор венозной крови осуществлялись до начала терапии. Диагноз устанавливался на основании данных гистологического и иммуногистохимического исследования ткани первичной опухоли, выполнявшихся по стандартной методике. Гистологический тип новообразования устанавливался согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (2019).

В исследование включали только случаи с инвазивной протоковой карциномой. Стадия устанавливалась на основании TNM-классификации AJCC (8-е издание, 2017 г.). Для иммуногистохимического исследования использовался иммуногистостейнер Bond-maX (Leica, Германия). Применялись антитела к Estrogen receptor (клон 1D5, Dako, Дания), Progesteron receptor (клон PgR636, Dako, Дания), c-erbB-2 (Her2/neu) (Polyclonal Rabbit, Dako, Дания) и Ki 67 (клон SP6, Cell Marque, Германия). Оценка рецепторного статуса проводилась по методу Allred [9].

Положительной (3+) экспрессией HER2 в ткани первичной опухоли считалась полное, интенсивное циркумферентное мембранное окрашивание более чем в 10% опухолевых клеток. В случаях с неопределенным уровнем HER2 (2+) выполнялось исследование амплификации HER2 методом FISH. При оценке экспрессии Ki67 подсчитывалось количество (%) опухолевых клеток с позитивным ядерным окрашиванием во всем срезе опухолевой ткани. На основании данных иммуногистохимического исследования было сформировано три группы наблюдения: с люминальным А ($n = 21$), с люминальным В HER2– ($n = 19$) и с люминальным В HER2+ ($n = 11$) МБП РМЖ. К люминальному А МБП РМЖ относили случаи с сочетанием признаков: позитивная экспрессия ER, негативная экспрессия HER2, низкая ($\leq 20\%$) доля экспрессии Ki67, высокая ($\geq 20\%$) доля экспрессии PR. К люминальному В HER2– МБП РМЖ относили случаи с позитивной экспрессией ER, негативной экспрессией HER2 и наличием высокой ($\geq 30\%$) доли экспрессии Ki67 или низкой ($< 20\%$) доли экспрессии PR. К люминальному В HER2+ МБП РМЖ относили случаи с позитивной экспрессией ER, позитивной экспрессией HER2 и любой экспрессией Ki67 и PR. Выполнен сравнительный анализ трех групп пациенток, характеристика которых представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика исследуемых групп больных				
Показатель	Молекулярно-биологический подтип, <i>n</i> (%)			<i>p</i>
	Люминальный А (<i>n</i> = 21)	Люминальный В (HER2 отрицательный) (<i>n</i> = 19)	Люминальный В (HER2 положительный) (<i>n</i> = 11)	
Возраст, лет, <i>Me</i> [<i>Q</i> ₁ ; <i>Q</i> ₃]	56,0 [45,0; 61,0]	59,0 [44,0; 65,0]	38,0 [36,0; 53,0]	0,031
Менструальная функция, <i>n</i> (%)				
Сохранена	7/21 (33%)	5/19 (26%)	9/11 (82%)	0,007
Отсутствует	14/21 (67%)	14/19 (74%)	2/11 (18%)	
Стадия, <i>n</i> (%)				
IA	5/21 (23%)	7/19 (37%)	2/11 (18%)	0,345
IIA	12/21 (57%)	6/19 (32%)	5/11 (46%)	
IIIB	1/21 (5%)	5/19 (26%)	3/11 (27%)	
IIIB	1/21 (5%)	1/19 (5%)	1/11 (9%)	
IIIC	2/21 (10%)	0/19 (0%)	0/11 (0%)	
T, <i>n</i> (%)				
T1	7/21 (33%)	7/19 (37%)	2/11 (18%)	0,781
T2	13/21 (62%)	10/19 (53%)	8/11 (73%)	
T3	0/21 (0%)	1/19 (5%)	0/11 (0%)	
T4	1/21 (5%)	1/19 (5%)	1/11 (9%)	
Размер опухоли, мм, <i>Me</i> [<i>Q</i> ₁ ; <i>Q</i> ₃]	21,0 [15,0; 25,0]	20,0 [15,0; 25,0]	23,0 [10,0; 23,0]	0,893
Степень злокачественности, <i>n</i> (%)				
Grade1	8/21 (38%)	1/19 (5%)	2/11 (18%)	0,045
Grade 2	13/21 (62%)	14/19 (75%)	8/11 (73%)	
Grade 3	0/21 (0%)	4/19 (20%)	1/11 (9%)	
N, <i>n</i> (%)				
N0	15/21 (71%)	14/19 (74%)	7/11 (64%)	0,431
N1	4/21 (19%)	5/19 (26%)	4/11 (36%)	
N3	2/21 (10%)	0/19 (0%)	0/11 (0%)	
Лимфогенные метастазы, <i>n</i> (%)				
Нет	15/21 (71%)	14/19 (74%)	7/11 (64%)	0,903
Есть	6/21 (29%)	5/19 (26%)	4/11 (36%)	
Гематогенные метастазы, <i>n</i> (%)				
Нет	17/21 (81%)	16/19 (84%)	11/11 (100%)	0,542
Есть	4/21 (19%)	3/19 (16%)	0/11 (0%)	

Венозную кровь забирали перед проведением неoadъювантной химиотерапии или перед хирургическим вмешательством в вакуумные пробирки с веществом ЭДТА. Цельную кровь для анализа методом проточной цитометрии инкубировали при температуре 37 °C в течение 1 ч. После инкубации собирали весь надосажок до границы осаждения эритроцитов. Затем 3 мл полученного клеточного концентрата центрифугировали при 800 g в течение 15 мин, надосажок удаляли, к клеткам добавляли 100 мкл буфера для окрашивания (Sony Biotechnology, США). Иммунофенотипирование ЦОК проводили, как описано в нашем предыдущем исследовании [10].

Поверхностные маркеры (CD45, EpCAM, N-кадгерин, E-кадгерин, CD44, CD24, CD133, Her2neu) окрашивали с помощью коктейля антител: BV570-анти-CD45 (клон HI30, Sony Biotechnology, США),

R718-анти-EpCAM (клон EBA-1, BD Biosciences, США), PE-Dazzle594-анти-E-кадгерин (клон 67A4, Sony Biotechnology, США), PE-Cy7-анти-N-кадгерин (клон 8C11, Sony Biotechnology, США), BV 510-анти-CD44 (клон G44-26, BD Biosciences, США), PerCP-Cy5.5-анти-CD24 (клон ML5, Sony Biotechnology, США), BV 786-анти-CD133 (клон 293C3, BD Biosciences, США) и AF750-anti-HER2 (клон 24D2, BioLegend, США).

Внутриклеточные маркеры (EpCAM, CK7/CK8, panCK, ER, PR) окрашивали с помощью коктейля антител: BV 605-анти-EpCAM (клон 9C4, Sony Biotechnology, США), PE-CF594-анти-CK-7/CK-8 (клон CAM5.2, BD Biosciences, США), eFluor660-анти-цитокератин AE1/AE3 (panCK) (клон AE1/AE3, eBioscience, Германия), AF488-anti-ERα (клон AER314, Novus Biologicals, США) и APC-anti-PR

(клон PR484, Novus Biologicals, США). Оценка окрашенных образцов, неокрашенного и изотипического контроля проводилась с использованием проточного цитометра Novocyt 3000 (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США). Все варианты коэкспрессии четырех маркеров МБП в отдельных ЦОК оценивались с учетом наличия признаков стволовости и фенотипа эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП).

Наличие признаков стволовости оценивали по вариантам коэкспрессии маркеров (CD44+CD24-), CD133 и ALDH. Варианты фенотипа ЭМП (при известной условности выделения дискретных фенотипов по ограниченному количеству маркеров) определяли по коэкспрессии мембранного EpCAM и N-cadherin. Коэкспрессию мембранного EpCAM и N-cadherin рассматривали как гибридный фенотип ЭМП. При отсутствии экспрессии N-cadherin считали, что клетка имеет эпителиальный фенотип.

Статистическую обработку выполняли с применением пакета программ Statistica 10.0. Для сравнения количественных показателей между тремя независимыми группами, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический критерий Краскела – Уоллиса. Сравнение частот качественных признаков между группами выполняли с помощью критерия χ^2 ; в случаях, когда ожидаемые частоты в ячейках таблицы сопряженности были менее 5, применяли точный критерий Фишера. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Me [Q_1; Q_3]$). Качественные признаки описывались абсолютными и относительными частотами ($n (\%)$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди ЦОК анализировали шесть вариантов коэкспрессии маркеров МБП и 12 вариантов коэкспрессии в CD45-EpCAM+ клетках CD44+/-CD24+/-N-cadh+/-CD133+/-ALDH+/- . Всего в работе

обсуждается 72 фенотипа ЦОК, которые встречаются в одном и большем количестве случаев (табл. 2).

Таблица 2

Фенотипы отдельных ЦОК, коэкспрессирующих Her2neu с различными вариантами коэкспрессии ER, PR и Ki67*						
№ п/п	ER+PR+ Her2neu+ Ki67–	ER+PR+ Her2neu+ Ki67+	ER-PR- Her2neu+ Ki67–	ER-PR- Her2neu+ Ki67+	ER-PR+ Her2neu+ Ki67–	ER-PR+ Her2neu+ Ki67+
	А	Б	В	Г	Д	Е
1	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133– ALDH–					
2	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133– ALDH–					
3	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133– ALDH–					
4	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–					
5	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh+CD133+ ALDH–					
6	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–					
7	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133+ ALDH–					
8	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133+ ALDH+					
9	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh+CD133+ALDH+					
10	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133– ALDH+					
11	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH+					
12	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133– ALDH+					

* здесь и далее обозначение каждого фенотипа складывается из порядкового номера строки и буквенного обозначения столбца. Примечание. В таблицу включены только фенотипы с экспрессией Her2neu, которые встречались хотя бы один раз, среди ER+PR- не встречались Her2neu+ ЦОК.

В группе больных с люминальным А МБП первичной опухоли ЦОК с экспрессией HER2 встречались в 90% случаев. Позитивная экспрессия HER2 в 50% и более ЦОК обнаруживалась у 43% больных. Фенотипы ЦОК были различными. Обсуждаются фенотипы, которые встречались в 3 и большем количестве случаев (табл. 3). Всего таких фенотипов было 6 из 7, встречавшихся при люминальном А МБП. Все эти ЦОК имели три варианта экспрессии маркеров МБП, объединенных отсутствием экспрессии ER- (В, Г, Д, см. табл. 3).

Таблица 3

Характеристика HER2 положительных ЦОК при люминальном А МБП РМЖ					
№ п/п	ER+PR+ Her2neu+ Ki67–	ER+PR+ Her2neu+ Ki67+	ER–PR– Her2neu+ Ki67–	ER–PR– Her2neu+ Ki67+	ER–PR+ Her2neu+ Ki67–
	А	Б	В	Г	Д
1	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133– ALDH–				
	0/20/10 (0%)	0/10 (0%)	7/20 (35%)	2/20 (10%)	10/20 (50%)
2	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133– ALDH–				
	2/17 (12%)	0/17 (0%)	7/17 (41%)	0/10 (0%)	6/17 (35%)
3	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133– ALDH–				
	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	3/11 (27%)

Окончание табл. 3

№ п/п	ER+PR+ Her2neu+ Ki67–	ER+PR+ Her2neu+ Ki67+	ER–PR– Her2neu+ Ki67–	ER–PR– Her2neu+ Ki67+	ER–PR+ Her2neu+ Ki67–
	А	Б	В	Г	Д
4	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–				
	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
6	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–				
	0/20 (0%)	0/20 (0%)	5/20 (25%)	4/20 (20%)	6/20 (30%)
7	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133+ ALDH–				
	0/15(0%)	0/15 (0%)	6/15 (40%)	3/15 (20%)	11/15 (73%)
9	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh+CD133+ALDH+				
	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

Не было ни одного фенотипа ЦОК с экспрессией ER+, который встречался бы 3 и более раз. Анализ проявлений стволовости показал, что среди ЦОК с обсуждаемыми вариантами МБП имелись фенотипы как без признаков стволовости (1В, 1Д, 2В, 2Д), так и стволовые по маркерам CD44+/CD24– (3Д), или маркерам CD44+/CD24– и CD133+ (4В), или только по CD133+ (6В, 6Г, 6Д, 7В, 7Г, 7Д). Обращает внимание преобладание фенотипов стволовых ЦОК с экспрессией CD133 и отсутствие стволовых ЦОК по экспрессии ALDH. ЦОК как с эпителиальным, так и с гибридным фенотипом ЭМП наблюдаются как при отсутствии, так и при наличии признаков стволовости. Причем ЦОК с экспрессией CD44+/CD24– имеют эпителиальные признаки (3Д и 4В), а стволовые клетки с одним маркером CD133+ имеют как эпителиальные признаки (6В, 6Г, 6Д), так и гибридный фенотип ЭМП (7В, 7Г, 7Д).

При люминальном В HER2– МБП первичной опухоли выявлялись только два варианта коэкспрессии маркеров МБП на одной ЦОК, причем это был

как ER+ (4А), так и ER– фенотип (1Д и 2Д). Всего три фенотипа ЦОК встречались в 3 и в большем количестве случаев. Два из них не имели признаков стволовости (1Д и 2Д), один имел стволовые признаки по двум маркерам CD44+/CD24– и CD133+ (4А) и эпителиальный фенотип (табл. 4).

ЦОК в случаях с люминальным В HER2+ МБП первичной опухоли были только ER отрицательными и имели два фенотипа (В и Д). При данном варианте МБП первичной опухоли два фенотипа ЦОК обнаруживались с частотой 3 и более раз. Один из фенотипов не имел признаков стволовости и характеризовался эпителиальными признаками. Второй фенотип имел стволовые признаки по экспрессии CD133+ и гибридный фенотип ЭМП (табл. 5).

В нашем исследовании при всех вариантах люминального РМЖ обнаружена выраженная гетерогенность экспрессии маркеров МБП. Общими для трех вариантов люминальных МБП РМЖ было отсутствие экспрессии HER2 в ЦОК с фенотипом ER+PR– с экспрессией маркера стволовости ALDH.

Таблица 4

Характеристика HER2 положительных ЦОК при люминальном В HER2 негативном МБП РМЖ				
№ п/п	ER+PR+ Her2neu+Ki67–	ER–PR– Her2neu+Ki67–	ER–PR– Her2neu+ Ki67+	ER–PR+ Her2neu+Ki67–
	А	В	Г	Д
1	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133– ALDH–			
	1/18 (6%)	1/18 (6%)	2/18 (11%)	8/18 (44%)
2	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133– ALDH–			
	1/13 (8%)	1/13 (8%)	0 (0%)	5/13 (38%)
4	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–			
	3/14 (21%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
5	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh+ CD133+ ALDH–			
	0/10 (0%)	2/10 (20%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)
6	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–			
	0/17 (0%)	1/17 (6%)	1/17 (6%)	2/17 (12%)
11	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH+			
	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

Таблица 5

Характеристика HER2 положительных ЦОК при люминальном В HER2 позитивном МБП РМЖ					
№ п/п	Частота встречаемости фенотипов	ER–PR– Her2neu+ Ki67–	ER–PR– Her2neu+ Ki67+	ER–PR+ Her2neu+Ki67–	ER–PR+ Her2neu+Ki67+
		В	Г	Д	Е
1	81,8%	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133– ALDH–			
		1/9 (11%)	0/9 (0%)	2/9 (22%)	0/9 (0%)
2	63,6%	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133– ALDH–			
		0/7 (0%)	0/7 (0%)	5/7 (71%)	0/7 (0%)
6	81,8%	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH–			
		0/9 (0%)	0/9 (0%)	2/9 (11%)	2/9 (22%)
7	63,6%	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+CD133+ ALDH–			
		3/7 (43%)	0/7 (0%)	2/7 (29%)	0/7 (0%)
11	18,2%	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh– CD133+ ALDH+			
		0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)

При люминальном А МБП РМЖ имелось наибольшее число HER2+ фенотипов ЦОК (12 из 35 возможных), в то время как при люминальном В HER2– и при люминальном В HER2+ МБП первичной опухоли таких фенотипов было меньше – 3/24, $p = 0,059$ и 2/20, $p = 0,047$ соответственно (см. табл. 3). При люминальном А МБП первичной опухоли HER2+ ЦОК были ER– независимо от экспрессии PR: 12/21 против 0/14 в ER позитивных клетках ($p = 0,0006$). При люминальном В HER2– МБП таких различий не наблюдалось. В отличие от этого при люминальном В HER2+ МБП не отмечено ни одного случая, при котором бы имелись ЦОК с коэкспрессией ER и HER2.

Обнаружено несколько фенотипов ЦОК, ассоциированных с величиной Т. Общей закономерностью является меньшая частота выявления соответствующих фенотипов при Т2 в сравнении с Т1. При люминальном А МБП первичной опухоли с Т2 связано уменьшение ЦОК с фенотипом ER–PR–Her2neu+Ki67–. Два рассматриваемых фенотипа ЦОК различались тем, что один был эпителиальным (EpCAM+N–cadh–), другой – гибридным (EpCAM+N–cadh+). ЦОК с фенотипом 7В были стволовыми по экспрессии CD133+ и встречались при Т1 с частотой 4/5 (80%), при Т2 – 2/10 (20%), $p = 0,025$. ЦОК с фенотипом 4В были стволовыми по экспрессии двух маркеров CD44+/CD24– и CD133+ и встречались при Т1 с частотой 3/5 (60%), при Т2 – 0/5 (0%), $p = 0,038$. При люминальном В HER2– МБП первичной опухоли МБП ЦОК, ассоциированных с Т, имеет фенотип ER–PR+Her2neu+Ki67–. В таких ЦОК отсутствовали признаки стволовости и определялся эпителиальный фенотип (1Д). При Т1 частота обнаружения такого фенотипа составляла 4/5 (80%) при Т1 – 0/7 (0%), $p = 0,0038$.

При люминальных МБП РМЖ наличие ER–PR+Her2neu+Ki67– ЦОК с гибридным фенотипом

ЭМП и отсутствием стволовых признаков (фенотип 2Д) было сопряжено с меньшей частотой поражения лимфатических узлов (N0– 14/28 (50%), N+ 2/12 (17%), $p = 0,048$).

Гематогенное метастазирование наблюдалось при люминальном А и люминальном В HER2– МБП в 7 из 40 случаев наблюдения. Из 11 случаев РМЖ с люминальным В HER2+ МБП первичной опухоли не отмечено ни одного случая с гематогенными метастазами. Представляло интерес выяснение связи с гематогенным метастазированием количества случаев, при которых HER2 позитивные ЦОК составляли 50% и более от всего количества опухолевых клеток в циркуляции. Оказалось, что при отсутствии метастазов их было 11/33 (33%), а при наличии – 5/7 (71%), $p = 0,069$.

Поскольку различия не были статистически значимыми, сравнили более полные фенотипы ЦОК. При люминальном А МБП первичной опухоли лишь один вариант коэкспрессии маркеров МБП на одной ЦОК оказался ассоциированным с развитием гематогенных метастазов. Это рецептор-негативные, HER2-позитивные, без признаков пролиферативной активности ЦОК (ER–PR–Her2neu+Ki67–). По наличию признаков стволовости и ЭМП эти метастаз-ассоциированные ЦОК были представлены тремя фенотипами (2В, 4В, 7В). Причем ассоциация указанных фенотипов с риском гематогенного метастазирования, по-видимому, существенно не зависела от проявлений стволовости, поскольку ЦОК с фенотипом 2В не имели признаков стволовости, 4В были стволовыми по экспрессии CD133, а 7В – по двум маркерам CD133+ и CD44+/CD24–. Тот же вывод можно сделать и относительно проявлений ЭМП, поскольку в двух фенотипах клетки имели эпителиальные признаки и в одном – гибридного фенотипа ЭМП (табл. 6).

Таблица 6

Ассоциация гематогенного метастазирования люминального А и люминального В HER2 отрицательного МБП первичной опухоли с фенотипом HER2 положительных ЦОК				
№	Фенотип	Гематогенные метастазы, n, %		p
		нет	есть	
2B	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133– ALDH– ER–PR– Her2neu+ Ki67–	6/33 (18%)	5/7 (100%)	0,004
4B	CD45–EpCAM+CD44+CD24–N–cadh– CD133+ ALDH– ER–PR– Her2neu+ Ki67–	0/33 (0%)	3/7 (45%)	0,001
7B	CD45–EpCAM+CD44–CD24–N–cadh+ CD133+ ALDH– ER–PR– Her2neu+ Ki67–	3/33 (9%)	5/7 (71%)	0,004

В каждом из трех фенотипов ЦОК из табл. 6, сопряженных с гематогенным метастазированием, имеется общий сокращенный фенотип (CD45–EpCAM+ER–PR–Her2neu+Ki67–) рассматриваемых МБП, ассоциированный с гематогенным метастазированием. При отсутствии метастазов такие ЦОК встречались в 9/33 (27%) случаев, при наличии метастазов – в 5/7(71%), $p = 0,026$. При наличии ЦОК с фенотипом CD45–EpCAM+ER–PR–Her2neu+Ki67– количество ЦОК в расчете на 1 мл также различалось. В группе без метастазов их было 0,8 [0,8; 0,8], $n = 9$, в группе с метастазами 2,6 [1,7; 2,5], $n = 5$; $p = 0,014$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие HER2+ ЦОК, обнаруживаемых в крови у больных с люминальным HER2– МБП первичной опухоли, отмечено в ряде исследований. Обнаружено, что 29% больных с HER2-отрицательным РМЖ имели HER2 положительные ЦОК, и, наоборот, в 42% случаев с HER2-положительной первичной опухолью обнаруживались HER2-отрицательные ЦОК [11]. Клиническое значение этого феномена трактуется неоднозначно. Одни авторы приводят данные о сопряженности наличия HER2+ ЦОК с короткой общей выживаемостью [6], другие не находят подобной ассоциации [10]. Имеются наблюдения, в которых при обнаружении амплификации гена HER2 назначали герцептин [12].

В настоящее время практически отсутствуют работы, в которых бы изучалась коэкспрессия маркеров МБП на одной ЦОК. Результаты нашего исследования демонстрируют заметные различия фенотипов ЦОК в группах больных с разными МБП первичной опухоли. Они проявились большим фенотипическим разнообразием при люминальном А. Кроме этого, HER+ ЦОК в группах больных с люминальным А и люминальным В HER2+ РМЖ были ER-. Различия касались и проявлений стволовости. Если при люминальном А МБП первичной опухоли HER2+ ЦОК имели три варианта коэкспрессии маркеров стволовости CD44+/CD24– и CD133+, то при люминальном В HER2– МБП первичной опухоли стволовость ЦОК проявлялась только одним фенотипом с экспрес-

сией двух маркеров стволовости (CD44+/CD24– и CD133+). При люминальном В HER2-позитивном МБП первичной опухоли единственный фенотип стволовости характеризовался экспрессией CD133+. Варианты стволовости с экспрессией CD44+/CD24– были ассоциированы с эпителиальным типом ЭМП (EpCAM+ N–cadh–).

Конверсия люминальных HER2-негативных опухолей, проявившаяся появлением в периферической крови HER2-положительных ЦОК, оказалась ассоциированной с важнейшими параметрами опухолевой прогрессии, такими как величина первичной опухоли, лимфогенное и гематогенное метастазирование. Такая ассоциация касалась только фенотипов ЦОК, общим признаком которых, наряду с экспрессией HER2, было отсутствие экспрессии ER. Большие значения Т и наличие лимфогенных метастазов оказались ассоциированными с меньшей частотой выявления ЦОК с фенотипами 4B, 7B и 1Д при Т2, а 2Д при лимфогенном метастазировании. В отличие от этого гематогенное метастазирование оказалось сопряжено с большей частотой обнаружения ЦОК с фенотипами 2B, 4B, 7B.

Общим для указанных ЦОК был фенотип CD45–EpCAM+ER–PR–Her2neu+Ki67–. По-видимому, имеет значение именно вариант ER–PR–Her2neu+Ki67– коэкспрессии маркеров МБП. Установлено, что количество ЦОК в группах статистически значимо различалось: в случаях с гематогенным метастазированием, оно было выше в 3,25 раза, чем при отсутствии гематогенных метастазов. Такой фенотип, как известно, является признаком Her2+ МБП опухоли, а в данном случае отдельных ЦОК. Можно полагать, что при люминальном А и люминальном В Her2– МБП первичной опухоли ЦОК с фенотипом ER–PR–Her2neu+Ki67– оказываются неуязвимыми, так как антигормональная терапия неэффективна из-за отсутствия экспрессии рецепторов к половым гормонам, а таргетная анти-Her2 терапия не назначается, так как первичные опухоли являются Her2–. Конвенциональная химиотерапия, назначаемая в части случаев при люминальном В Her2– МБП первичной опухоли оказывается так же не эффективной из-за отсутствия экспрессии маркера пролиферации Ki67, что делает такие ЦОК химиорезистентными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У больных с люминальным А и люминальным В HER2– МБП первичной опухоли обнаружена фенотипическая дискордантность ЦОК, которая проявляется конверсией HER2– статуса и появлением в крови HER2+ ЦОК. Для данных клеток характерна отрицательная экспрессия ER и различные варианты коэкспрессии маркеров стволовости (CD44, CD24, CD133). Ключевым результатом, имеющим практическую значимость, является идентификация при HER2– люминальных подтипах специфического метастаз-ассоциированного фенотипа ЦОК: CD45–EpCAM+ER–PR–Her2neu+Ki67–. Этот фенотип соответствует характеристикам классического HER2+ МБП, но на уровне отдельной опухолевой клетки в кровотоке. Полученные данные свидетельствуют о том, что рутинное определение статуса HER2– только в первичной опухоли может быть недостаточным для оценки риска гематогенного метастазирования.

Обнаружение HER2-позитивного фенотипа ЦОК у пациенток с HER2– МБП первичной опухоли указывает на наличие агрессивного клона, потенциально ответственного за диссеминацию. Результаты исследования обосновывают целесообразность внедрения в клиническую практику комплексного фенотипирования отдельных ЦОК (с определением ER, PR, Her2neu, Ki67 и маркеров стволовости) для пациенток с люминальными HER2– формами РМЖ. Для окончательного подтверждения клинической ценности предложенного подхода необходима дальнейшая валидация на независимых и более многочисленных когортах пациентов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Mazzitelli C., Santini D., Corradini A.G., Zamagni C., Trerè D., Montanaro L. et al. Liquid biopsy in the management of breast cancer patients: where are we now and where are we going. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(7):1241. DOI: 10.3390/diagnostics13071241.
- US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). URL: <https://clinicaltrials.gov>. Available: 2024 Jan 20.
- Thomas-Bonafos T., Pierga J.Y., Bidard F.C., Cabel L., Kiavue N. Circulating tumor cells in breast cancer: clinical validity and utility. *NPJ Breast Cancer*. 2024;10(1):103. DOI: 10.1038/s41523-024-00706-7.
- Micalizzi D.S., Maheswaran S., Haber D.A. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes & Development*. 2017;31(18):1827–1840. DOI: 10.1101/gad.305805.117.
- Sayed Z.S., Khattap M.G., Madkour M.A., Yassen N.S., Elbary H.A., Elsayed R.A. et al. Circulating tumor cells clusters and their role in breast cancer metastasis; a review of literature. *Discover Oncology*. 2024;15(1):94. DOI: 10.1007/s12672-024-00949-7.
- Müller V., Banys-Paluchowski M., Friedl T.W., Fasching P.A., Schneeweiss A., Hartkopf A. et al. Prognostic relevance of the HER2 status of circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients screened for participation in the DETECT study program. *ESMO Open*. 2021;6(6):100299. DOI: 10.1016/j.esmoop.2021.100299.
- Nanou A., Zeune L.L., Bidard F.C., Pierga J.Y., Terstappen L.W.M.M. HER2 expression on tumor-derived extracellular vesicles and circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2020;22(1):86. DOI: 10.1186/s13058-020-01323-5.
- Nicolò E., Serafini M.S., Munoz-Arcos L., Pontolillo L., Molteni E., Bayou N. et al. Real-time assessment of HER2 status in circulating tumor cells of breast cancer patients: methods of detection and clinical implications. *J. Liquid. Biopsy*. 2023;2:100117. DOI: 10.1016/j.jlb.2023.100117.
- Allison K.H., Hammond M.E.H., Dowsett M., McKernin S.E., Carey L.A., Fitzgibbons P.L. et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2020;144(5):545–563. DOI: 10.5858/arpa.2019-0904-SA.
- Grigoryeva E., Tashireva L., Savelieva O., Zavyalova M., Popova N., Kuznetsov G. et al. The association of integrins $\beta 3$, $\beta 4$, and $\alpha V\beta 5$ on exosomes, CTCs and tumor cells with localization of distant metastasis in breast cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2929. DOI: 10.3390/ijms24032929.
- Paoletti C., Miao J., Dolce E.M., Darga E.P., Repollet M.I., Doyle G.V. et al. Circulating tumor cell clusters in patients with metastatic breast cancer: a SWOG S0500 translational medicine study. *Clin. Canc. Res.* 2019;25(20):6089–6097. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0208.
- Nakatani S., Hayashi T., Hosaka A., Maeda H. Prognostic value of HER2 discordance between primary and metastatic or recurrent breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2025:105016. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2025.105016.

Вклад авторов

Перельмутер В.М., Гарбуков Е.Ю. – написание статьи, концепция и дизайн статьи. Завьялов А.В., Письменный Д.С. – сбор и анализ литературы. Григорьева Е.С., Савельева О.Е. – проведение проточной цитометрии и интерпретация данных. Завьялова М.В. – выполнение иммуногистохимического исследования и оценка биопсийного материала, редактирование статьи.

Информация об авторах

Перельмутер Владимир Михайлович – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, отделение общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, pvmnngs@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7633-9620>

Завьялов Александр Васильевич – студент, лечебный факультет, СибГМУ, г. Томск, zavyalov.av@ssmu.ru, <http://orcid.org/0009-0009-0266-6707>

Григорьева Евгения Сергеевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория молекулярной терапии рака, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, grigoryeva.es@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-4671-6306>

Савельева Ольга Евгеньевна – д-р мед. наук, профессор, кафедра биологической химии, зав. лабораторией «Экспериментальной медицины» Научно-исследовательского центра, СПбГПУ, г. Санкт-Петербург, olga_chechina@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0301-8455>

Гарбуков Евгений Юрьевич – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск, maximum9@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-2917-8158>

Письменный Дмитрий Сергеевич – канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики, отделение общей и молекулярной патологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; доцент, кафедра патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск, pismenniy.dmitry@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8973-8439>

Завьялова Марина Викторовна – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, НИИ онкологии, Томский НИМЦ; зав. кафедрой патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск, zavyalovamv@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

(✉) **Письменный Дмитрий Сергеевич**, pismenniy.dmitry@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.12.2025;
одобрена после рецензирования 25.02.2026;
принята к публикации 05.03.2026