

А.А. Ковалев, д.м.н., профессор, Запорожская медицинская академия последипломного образования

## Циркулирующие опухолевые клетки

**М**етастазирование является отличительной чертой инвазивного рака. Этапы метастатического каскада (инвазия, интравазация, выживание опухолевых клеток в кровотоке, колонизация отдаленных органов и реализация клинического гематогенного метастаза) хорошо известны, однако механизмы их реализации до сих пор изучены недостаточно.



А.А. Ковалев

Наиболее загадочной является способность эпителиальной злокачественной клетки выживать в системном кровотоке, сопротивляясь негативному влиянию гемодинамического и иммунологического стресса. Отличительная особенность циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), которые приобрели в результате эволюции клона наиболее агрессивный метастатический потенциал, позволяет рассматривать их как основной механизм опухолевой прогрессии. Изучение биологических характеристик циркулирующих клеток в отличие от множества других злокачественных клеток, представленных в первичной опухоли, позволило говорить о принципиально новых онкомаркерах, обладающих высоким прогностическим значением.

### Выживание опухолевых клеток в кровотоке

Впервые инвазию злокачественными клетками вен и лимфатических сосудов у больного базальноклеточным раком кожи обнаружил К. Tirsch в 1865 г. В 1869 г. Ashworth сообщил о наличии злокачественных клеток в сосудах больного, умершего от метастатического рака. О циркулирующих клетках как о «метастазах в кровь» сообщал также Н.Н. Петров. Однако только в последнее время благодаря развитию методов молекулярной визуализации опухоли были раскрыты основные механизмы реализации программы метастатического каскада — биологического феномена, который начинается с процесса эпителиально-мезенхимального перехода, утраты клеточной адгезии, приобретения опухолевой клеткой свойств аномальной подвижности и инвазивности, циркуляции клеток в кровотоке и заканчивается колонизацией злокачественными клетками отдаленных органов с последующей реализацией гематогенных метастазов.

### Эпителиально-мезенхимальный переход

По сравнению с нормальным эпителием клетки карциномы характеризуются прогрессирующим уменьшением межклеточной адгезии и повышением миграционных способностей. Иницированная клетка на самых ранних стадиях канцерогенеза может разрушить базальную мембрану и проникнуть в кровотоки. Раскрыты молекулярные механизмы этих процессов, которые в первую очередь связаны с феноменом эпителиально-мезенхимального перехода, впервые описанным E.D. Nay в 1995 г.

Феномен эпителиально-мезенхимального перехода встречается в физиологических условиях (эмбриональный морфогенез), при различных видах воспаления, регенерации тканей, формировании фиброза, а также является неотъемлемой частью канцерогенеза (3 тип по классификации R. Weinberg).

После активации протоонкогенов и фазы инициации эпителиальные клетки активируют скрытые эмбриональные программы эпителиально-мезенхимальной трансформации, в результате чего клетка постепенно теряет набор эпителиальных антигенов и приобретает мезенхимальные антигены. В этом процессе участвуют несколько сигнальных путей: PGF, Src, Ras, Ets, integrin, Wnt/beta-catenin, Notch.

Феномен эпителиально-мезенхимального перехода имеет двойное значение для злокачественной опухоли. С одной стороны, эпителиальные клетки, получившие возможность трансформироваться в миофибробласты, теряют злокачественный фенотип и представляют собой основу для формирования собственной фиброзной стромы опухоли, что дает дополнительные преимущества для выживания клеток, ее составляющих. С другой стороны, по данным R. Weinberg (2010), клетки в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода приобретают свойства раковых стволовых клеток с реализацией своих основных функций — метастазирования, колонизации и пролиферации — в отдаленных органах.

Во время эпителиально-мезенхимального перехода происходят морфологические трансформации, проявляющиеся изменением размера и формы клеток, наблюдаются плеоморфизм клеток и ядер, гиперхроматизация и гиперплоидность, а также отмечается увеличение их митотической активности. Феномен эпителиально-мезенхимального перехода оказывает влияние на формирование гетерогенности ЦОК, а также обуславливает технические трудности их обнаружения и фенотипирования.

### Интравазация опухолевых клеток

В экспериментальных моделях было установлено, что ежедневно в кровотоки из 1 г опухолевой ткани поступает 1 млн клеток, при этом только 1 клетка из 40 может достигнуть премеастиатической ниши и только 0,01% клеток реализуются в макрометастаз.

Эпителиальные клетки в кровотоке имеют очень низкую выживаемость: 85% из них погибают, превращаясь в апоптотические тельца и попадая в «капиллярную ловушку» менее чем в течение 5 мин после интравазации. Этому способствуют гемодинамический стресс и взаимодействие с клетками иммунной системы, выполняющей роль иммунного надзора.

Выживание злокачественной клетки в кровотоке происходит в том случае, если во время эпителиально-мезенхимального перехода в ней активировались антиапоптотические программы, позволяющие избежать состояния апоиксис (одна из форм апоптоза, когда физиологическая смерть клетки происходит в результате нарушения межклеточной адгезии и взаимодействия с матриксом). Большинство выживших клеток с повышенным метастатическим потенциалом экспрессируют факторы, ингибирующие апоптоз, и являются устойчивыми к апоиксис.

Выжившие в кровотоке клетки меняют свои гемодинамические и метаболические свойства и могут обнаруживаться как в виде единичных циркулирующих клеток, так и в виде циркулирующих опухолевых микроэмболов (феномен коллективной миграции). Для описания солитарных ЦОК используют термин высокодиссеминированная ангиогенная болезнь (highly angiogenic and disseminated). Эти клетки, биология которых очень похожа на биологию стволовых клеток рака, не вступают в клеточный цикл (находясь в фазе покоя G<sub>0</sub>) и не пролиферируют. Этот факт объясняет устойчивость клеток к апоптозу.

В микроциркуляторном русле злокачественные клетки взаимодействуют с эндотелием сосудистой системы, активируя его. Активированный эндотелий совместно с опухолевой клеткой привлекают к себе эндотелиальные и стромальные клетки, клетки иммунной системы, опухолюассоциированные фибробласты, макрофаги и дендритные клетки. Именно стромальные клетки, циркулирующие совместно с опухолевыми, обеспечивают выживание, пролиферативные преимущества и скорейшую колонизацию тканей отдаленных органов.

ЦОК могут объединяться в кровотоке в циркулирующие опухолевые микроэмболы и демонстрировать таким образом феномен коллективной миграции. Микроэмболы имеют высокий пролиферирующий потенциал, устойчивы к апоптозу и обладают свойством агрессивного метастазирования. Выживанию опухолевых микроэмболов во многом способствует их коаптация с тромбоцитами, которые, с одной стороны, играют роль своеобразного щита, а с другой — приводят к состоянию гиперкоагуляции и формированию сосудистых тромбов, характерных для стадии гематогенного метастазирования.

Опухолевые микроэмболы не могут покинуть просвет сосуда экстравазацией, но они приводят к опухолевой эмболии, пермеации клеток в просвете сосуда,

разрыву стенки капилляра и пролиферации в интерстиции.

Таким образом, большинство ЦОК представлены в кровотоке в виде апоптотических телец, очень малое количество — в виде солитарных опухолевых клеток, а также в виде циркулирующих опухолевых микроэмболов.

Судьба выживших в кровотоке опухолевых клеток также различна. Часть клеток попадает в премеастиатическую нишу и колонизирует отдаленные органы с последующей реализацией гематогенного метастаза. Премеастиатической нишей для этих клеток могут быть ткани висцеральных органов и костный мозг.

Некоторые клетки, обогатившись во время циркуляции цитокинами и факторами роста (продукт активированных эндотелиальных и стромальных клеток), возвращаются в первичную опухоль (метастазируют «в себя»). Биологический смысл этого явления — стимуляция роста первичной опухоли. Таким образом, ткани первичной опухоли являются третьей премеастиатической нишей для ЦОК.

Наконец, некоторые клетки сохраняют способность циркулировать в кровотоке в течение длительного времени. Так, солитарные злокачественные клетки нередко обнаруживаются в крови больных раком молочной железы спустя 10 лет после завершения радикального лечения.

### Клиническое значение ЦОК

В настоящее время Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) рекомендует изучение ЦОК при солидных опухолях различных локализаций (раке молочной железы, раке предстательной железы, колоректальном раке и др.). Наиболее полно изучено клиническое значение циркулирующих клеток у больных раком молочной железы.

В настоящее время известно, что опухолевые клетки в периферической крови у больных ранним (N<sub>0</sub>) раком молочной железы обнаруживаются в 30% случаев, у больных местнораспространенным (N<sub>+</sub>) раком — в 36%, у больных метастатическим раком — в 70% случаев. Выявление клеток в периферической крови не зависит от возраста, менструальной функции, стадии, гистологического типа, уровня экспрессии рецепторов прогестерона, c-erbB2, p53 и Ki67. После завершения адьювантной химиотерапии в крови больных раком молочной железы I и II стадий в 27,3% случаев определяются циркулирующие клетки СК19+. У этих больных риск рецидива в 3,8 раза выше, а безрецидивный интервал короче: ожидаемая частота рецидива составила 70%.

Был сделан вывод о том, что ЦОК являются независимыми прогностическими признаками раннего рецидива, а стандартная химиотерапия не может улучшить прогноз у этих больных.

Содержание ЦОК в периферической крови изменяется в зависимости от эффективности проводимой химио- или гормонотерапии (были изучены режимы CMF, FEC, оценена эффективность доцетаксела, тамоксифена, летрозолола). Сделан вывод о том, что оценка наличия/отсутствия солитарных опухолевых клеток в периферической крови может быть использована в качестве мониторинга у больных, получающих системную химиотерапию или гормонотерапию.

### Методы обнаружения ЦОК

В 1 мл цельной крови единичные раковые клетки окружены примерно 10 млн лейкоцитов и 5 млрд эритроцитов. Соответственно, в 10 мл крови солитарные раковые клетки смешиваются со 100 млн лейкоцитов и 50 млрд эритроцитов. Однако обнаружение и идентификация в кровотоке ЦОК представляются очень непростой задачей не только из-за малого

количества эпителиальных клеток, окруженных многочисленными клетками крови, но и из-за гетерогенности опухолевых клеток. Это обстоятельство требует использования методов идентификации, характеризующихся не только очень высокой чувствительностью, но также точностью и специфичностью.

Для поиска ЦОК используют методы прямой или косвенной визуализации, основанные на микроскопическом анализе мембраны, цитоплазмы и ядра опухолевой клетки или же на анализе экспрессии клеткой специфических тканевых антигенов (чаще всего панцитокератинов). Современные методы молекулярной визуализации позволяют идентифицировать даже циркулирующую опухолевую ДНК и «осколки» раковых клеток. Для научных и практических целей наиболее часто используют следующие коммерческие технологии: CellSearch, Maintrac, CellPoint, Adnagen, а также RT-PCR, проточную цитофлуориметрию.

Несмотря на несомненные успехи в идентификации ЦОК, интерпретация полученных данных по-прежнему сложна и затрудняется сложностью биологии опухолевого роста. Как уже указывалось выше, на этапе интравазации опухолевая клетка теряет набор эпителиальных антигенов и приобретает мезенхимальные антигены (эпителиально-мезенхимальный переход). Потеря цитокератинов и эктопическая экспрессия виментина могут оказаться недостаточными для иммунной маркировки и детекции циркулирующих клеток в состоянии эпителиально-мезенхимальной трансформации. На этом этапе возможны как ложноположительные, так и ложноотрицательные заключения, а также серьезные смещения интерпретации, обусловленные инверсией фенотипа опухолевой клетки.

Сложности могут возникать и при идентификации фрагментов циркулирующих клеток, находящихся в состоянии апоптоза (апоптотических телец). Хотя фенотипически эти клетки расцениваются как злокачественные, очевидно, что колонизировать отдаленные органы и тем самым реализовать свой метастатический потенциал они не могут.

Длительное время считалось, что циркулировать в кровотоке могут только эпителиальные опухолевые клетки. В последнее время было показано, что доля цитокератинпозитивных неопухолевых клеток в крови в нормальных условиях может составлять от 0 до 20%.

Небольшое количество эпителиальных клеток было обнаружено в периферической крови пациентов с доброкачественными эпителиальными пролиферативными заболеваниями, а также у больных в случае воспаления, травмы, хирургических вмешательств. Таким образом, помимо ЦОК, в крови могут присутствовать циркулирующие эпителиальные клетки неопухолевой природы, также экспрессирующие цитокератины.

Большинство цитокератинпозитивных клеток представлены активированными лейкоцитами, которых у онкологических больных значительно больше, чем в общей популяции. Другие клетки крови (макрофаги, плазматические, ядродержащие гемопоэтические клетки-предшественники) также могут экспрессировать эпителиальные специфические антигены. В литературе встречается термин «циркулирующая эпителиальная клетка», что не является эквивалентом ЦОК. Это имеет принципиальное значение, поскольку существующие высокоточные методы идентификации ЦОК основаны не на цитологической микроскопической картине, а на выявлении цитокератинпрезентирующих клеток и других методах молекулярной идентификации.

С помощью сверхточных методов молекулярной визуализации (RT-PCR, проточной цитофлуориметрии) сегодня стало возможно выявлять даже ничтожно малое количество циркулирующих опухолевых нуклеиновых кислот в кровотоке, т. е. изучать не только клеточные, но и молекулярные механизмы метастазирования. Основным преимуществом не прямых молекулярных методов является высокая чувствительность, превышающая таковую при использовании методов иммуноцитохимии. При использовании PCR можно обнаружить одну клетку-мишень среди  $10^6$ - $10^7$  нормальных клеток в 0,1 мл крови.

Действительно, связь между количеством циркулирующей ДНК и количеством ЦОК, по-видимому, существует. Однако происхождение нуклеиновых кислот в кровотоке может зависеть и от других причин: некроза клеток первичной опухоли, лизиса клеток в кровотоке, наличия клеточных фрагментов или производных экзосом, т. е. не от самого процесса эффективного метастазирования. Важным моментом, ограничивающим

использование PCR при выявлении циркулирующих клеток, является то, что в процессе этапов идентификации и извлечения РНК циркулирующие клетки будут уничтожены, что делает невозможным их последующий подсчет и цитологический анализ по отдельности. Эти обстоятельства снижают клиническую ценность молекулярных технологий обнаружения ЦОК как ведущих к гипердиагностике и ложноположительному избыточному заключению.

Несомненно: наиболее ценным и достоверным методом обнаружения ЦОК является тот, который позволяет провести светооптическую визуализацию с использованием мембраны, цитоплазмы и ядра клетки и исключить тем самым как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты исследований. Фенотипирование и определение индивидуальных биологических характеристик клетки проводятся после ее идентификации.

На базе кафедры онкологии Запорожской медицинской академии последипломного образования (база Запорожского областного онкологического диспансера) для поиска и идентификации ЦОК используется модифицированный метод Vona и соавт. (2000), основанный на физических особенностях злокачественных клеток (их плотности и размере). Метод предполагает центрифугирование, цитаферез, седиментацию, дезагрегацию и микрофильтрацию клеток через полиуретановый фильтр с диаметром пор до 30 мкм. После обогащения клеточного состава выполняются микроскопия и фенотипирование опухолевых клеток. Этапы выделения клеток проведены врачами Т.В. Грудинской и Т.П. Кузнецовой.

На рисунках 1-4 представлены примеры гетерогенности ЦОК при злокачественных опухолях различных локализаций. Идентификация и фенотипирование циркулирующих клеток произведены по оригинальной методике, разработанной на кафедре онкологии ЗМАПО.

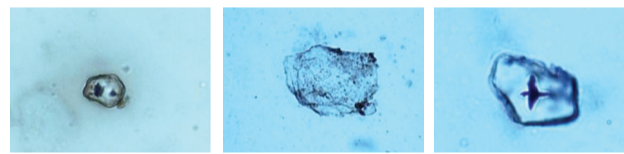


Рис. 1. Солитарные ЦОК у больных раком молочной железы, желудка и ободочной кишки

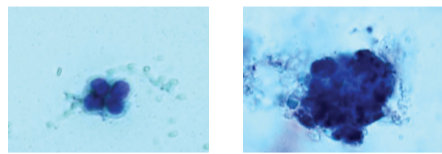


Рис. 2. Циркулирующие опухолевые микроэмболы у больных раком молочной железы

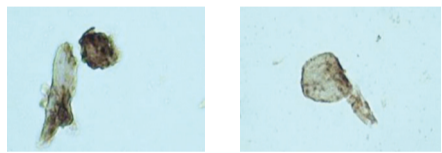


Рис. 3. ЦОК в состоянии апоптоза после успешной химиотерапии (доцетаксел + оксалиплатин) у больного диссеминированным раком желудка

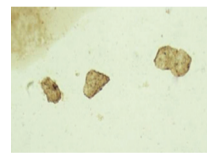


Рис. 4. Циркулирующие в крови эпителиальные неопухолевые клетки

Таким образом, наличие ЦОК в крови свидетельствует о приобретении опухолью принципиально новых качеств — инвазивности и способности к метастазированию. Несомненно, что ЦОК не только являются ключом к пониманию биологии метастазов, но также представляют собой прогностический и предиктивный онкомаркер нового поколения, отражающий эффективность противоопухолевого лечения. Клинические онкологи нуждаются в доступности подобных технологий для ежедневного использования.

## Исследования в онкологии

### Исследование специфического домена фермента PARG-1 для разработки новых таргетных препаратов

Исследовательская группа из Университета Томаса Джефферсона (США) проводила детальное изучение молекулярной структуры фермента PARG-1 с целью дальнейшей разработки таргетных препаратов, ориентированных на функциональные домены этого фермента. Фермент PARG-1 участвует в репарации поврежденных ДНК и ремоделировании хроматина за счет поли-АДФ-рибозилирования гистонов. Соответственно, гиперэкспрессия этого фермента в злокачественных опухолях приводит к значительному уменьшению их чувствительности к повреждающим ДНК агентам. Основной целью исследователей было выявление новых сайтов на молекуле PARG-1, включая специализированные цинк-фингерные домены, для связывания различных таргетных препаратов с целью ингибирования фермента. На данный момент проведены доклинические и клинические испытания многих таргетных ингибиторов PARG-1, направленных на каталитический домен этого фермента.

Используя рентгеновскую кристаллографию, исследователи выявили механизмы взаимодействия между PARG-1 и участком поврежденной ДНК; также они определили домены, характерные только для фермента PARG-1. Связываясь с этими доменами, таргетные препараты могут опосредованно ингибировать каталитический домен, тем самым инактивируя всю молекулу фермента. Это исследование, возможно, будет способствовать созданию таргетных препаратов с более селективным действием, инактивирующих только PARG-1.

<http://www.cancer.gov>

### Лекарственная терапия пациентов с множественной миеломой

Исследовательская группа из Университета Южной Флориды (г. Тампа, США) изучала возможность предупреждения случаев переломов у больных множественной миеломой в результате применения бисфосфонатов. При этой патологии отмечают переломы в трубчатых костях, реже в плоских. Бисфосфонаты обладают способностью к ингибированию активности остеокластов, тем самым проявляя протекторное действие в отношении переломов. У больных множественной миеломой дополнительное введение бисфосфонатов обеспечивало значительное сокращение частоты переломов.

Из препаратов группы бисфосфонатов наиболее эффективным является золедронат. При его применении редко возникают побочные эффекты. Наиболее опасное осложнение после применения данного препарата — остеонекроз нижней челюсти. Доктор Кумар, куратор данного исследования, утверждает, что необходимо дальнейшее изучение золедроната с тем, чтобы оценить вероятность возникновения иных побочных эффектов, а также сравнить эффективность в сопоставлении с таковой других препаратов с подобным терапевтическим действием.

<http://www.medicalnewstoday.com>

### Абиратерон и увеличение выживаемости больных метастатическим РПЖ

Проведено клиническое исследование нового препарата, применяющегося в терапии рака предстательной железы (РПЖ), — абиратерона ацетата. Механизм противоопухолевого действия абиратерона основывается на его способности ингибировать 17 $\alpha$ -гидроксилазу (CYP17) — фермент, продуцирующийся яичками, надпочечниками и опухолевой тканью предстательной железы. CYP17 принимает участие в образовании тестостерона, который, в свою очередь, стимулирует пролиферацию клеток предстательной железы. Вместе с тем тестостерон способен стимулировать злокачественные клетки предстательной железы, способствуя опухолевому росту. Поэтому при возникновении РПЖ возникает необходимость в сокращении продукции тестостерона, особенно в контексте того, что на основании имеющихся данных дальнейшая продукция андрогенов может способствовать гормонрезистентности этого злокачественного новообразования.

В процессе проведенных исследований обнаружено значительное ингибирование роста опухолей у 80% пациентов с терминальной фазой заболевания. В испытании принимали участие 1195 больных РПЖ в терминальной стадии, которые предварительно получали доцетаксел: 797 пациентов принимали преднизолон в дозе 5 мг 2 р/день с абиратерона ацетатом (1000 мг), 397 пациентов входили в группу плацебо. Медиана наблюдения составила 12,8 мес.

Исследователи выявили, что медиана общей выживаемости была выше в группе больных, получавших абиратерон (14,8 vs 10,9 мес в группе плацебо; относительный риск смерти 0,65; 95% ДИ 0,54-0,77;  $p < 0,001$ ). Все дополнительные оцениваемые показатели, в том числе время до маркерного прогрессирования (10,2 vs 6,6 мес;  $p < 0,001$ ), время до прогрессирования (5,6 vs 3,6 мес;  $p < 0,001$ ) и уровень маркерного ответа на лечение (29 vs 6%;  $p < 0,001$ ), были лучше в группе абиратерона.

Таким образом, абиратерона ацетат позволяет значительно увеличить общую выживаемость пациентов с РПЖ IV стадии.

De Bono J.S. et al. N Engl J Med 2011. 1. 364

Подготовил Анатолий Мамчур