ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

LATENT PERIOD OF METASTASIS

УДК 616

Королькова Ирина Денисовна, студент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Korolkova Irina Denisovna, student, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), irina.d.korolkova@yandex.ru

Аннотация

Проблема позднего рецидива опухолевого заболевания продолжает оставаться актуальной. Наиболее вероятной причиной метастазирования признается концепция пластичности диссеминированных раковых клеток, которые остаются сохранными в чужеродном микроокружении, обратимо останавливают клеточный рост, резистентны к цитотоксическому лечению. Идентификация диссеминированных раковых клеток основана на их физических и биологических отличиях от клеток крови. Знание механизмов перехода метастатических опухолевых клеток в латентное состояние и разработка методов выявления диссеминированных раковых клеток в периферической крови позволят разработать эффективные стратегии по предотвращению, своевременной диагностике и лечению большинства онкологических заболеваний.

Summary

The problem of late recurrence of tumor disease continues to be relevant. The most probable cause of metastasis is the concept of plasticity of disseminated cancer cells that remain intact in a foreign microenvironment, reversibly stop cell growth, and are resistant to cytotoxic treatment. The identification of disseminated cancer cells is based on their physical and biological differences from blood cells. Knowledge of the mechanisms of latent metastatic tumor cell transition and the development of methods for detecting disseminated cancer cells in peripheral blood will allow developing effective strategies for the prevention, timely diagnosis and treatment of most oncological diseases.

Ключевые слова: метастазирование, диссеминированные раковые клетки, циркулирующие опухолевые клетки, состояние покоя раковых клеток, активация p38, EpCAM.

Key words: metastasis, disseminated cancer cells, circulating tumor cells, resting state of cancer cells, p38 activation, EpCAM.

Введение

Результаты изучения современных медицинских исследований убедительно свидетельствуют, что проблема позднего рецидива опухолевого заболевания продолжает оставаться актуальной и требует дальнейшей детальной проработки, как на теоретическом уровне, так и на этапе раннего диагностирования онкологических заболеваний. Традиционно под поздним рецидивом опухолевого заболевания понимается латентный период времени между удалением первичной опухоли и последующим рецидивом рака - раковая спячка - следствие перехода опухолевых клеток или опухолевой массы в дремлющее состояние (или состояние покоя) [7]. Наличие латентного периода в больше мере характерно для рака простаты, рака молочной железы, также известны случаи спячки при меланоме и раке почки. Термин «дремлющий» введен австралийским патологом Рупертом Уиллисом, однако

общепринятой дефиниции данного термина, позволяющей выделить его существенные признаки, до настоящего времени не выработано.

Установлено, что периоду спячки предшествует метастатический каскад, являющийся непосредственной причиной появления метастазов в отдаленных органах. Актуален вопрос, какие именно клетки опухоли способны образовывать метастастазы в отдаленных органах и какие механизмы способствуют этому процессу. Исследователи сходятся во мнении, что при успешной резекции первичной опухоли наиболее вероятной причиной метастазирования признается концепция пластичности диссеминированных раковых клеток (ДРК), которые активируется после латентного периода и приобретают свойства мезенхимальных стволовых клеток [7]. На детальное рассмотрение данной концепции ориентирован обзор.

Метастазирование

Успешное метастазирование в отдаленные органы зависит от ряда факторов, в частности от способности раковых клеток проходить через стадии метастатического каскада. Является подтвержденным тот факт, что для опухолевой трансформации характерен эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который способствует инвазии, метастазированию и предотвращению контактного ингибирования пролиферации опухолевых клеток [1]. Однако вместо полного перехода в мезенхимальное состояние, клетки карциномы часто проявляют эпителиально-мезенхимальный фенотип. Такие гибридные раковые клетки в эпителиально-мезенхимальном состоянии в больших количествах присутствуют в первичных опухолях, метастазах, а также среди циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК). Таким образом ЭМП и обратный связанный с раком мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) отражают изменение фенотипа метастатических клеток в сравнении с исходными опухолевым клеткам. Фактически, подавление экспрессии Е-кадгерина приводит к развитию ассоциированного с раком ЭМП и запуску метастатического каскада [8].

Недавние исследования показали, что ЦОК, чтобы предотвратить повреждение от механической воздействий или цитотоксического действия иммунных клеток в кровеносном русле могут быть скрыты тромбоцитами, которые выполняют роль физического экрана. Кроме того, тромбоциты также могут переносить специфические маркеры на ЦОК, таким образом маскируя ЦОК как нормальные клетки крови, чтобы избежать атаки иммунной системы. Более того, тромбоцитарные факторы роста могут направлять процесс ЭМП в сторону снижения экспрессии EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) и способствовать прилипанию ЦОК на стенке сосуда с последующим созданием метастатической ниши [3]. Для облегчения прохождения через стенку сосуда метастатические клетки выделяют факторы, которые увеличивают проницаемость сосудов. В этом процессе участвуют различные медиаторы, включая трансформирующий фактор роста TGFß, эпидермальный фактор роста (EGF) и колониестимулирующий фактор (CSF-1). Интересно отметить тот факт, что экстравазация в кости или печень облегчается также за счет фенестрированного типа эндотелия капилляров [6].

Основные свойства диссеминированных раковых клеток

Ранее исследователи предполагали, что метастазирование является "поздним" событием в прогрессировании рака, так как для появления в первичной опухоли клеток, способных метастазировать должно пройти время, в течение которого накапливаются генетические мутации и клетки приобретают свойства, позволяющие им пройти через все стадии метастатического каскада. Однако на основании результатов последних исследований можно сделать вывод о том, что более агрессивные фенотипы, которые приобретают раковые клетки в процессе мутагенеза, становятся причиной ранней диссеминации и метастатического роста. По мимо этого также важно учитывать тот факт, что если ДРК, оставшиеся после лечения, непрерывно пролиферируют, то рецидив можно было бы ожидать гораздо раньше, чем это наблюдается на самом деле. Для объяснения несоответствия предполагаемых и наблюдаемых периодов возникновения

рецидива была предложена концепция, которая заключается в том, что опухолевые клетки обладают свойством, способствующим их переходу в дремлющее состояние.

На основание большого количества исследований можно выделить три основных свойства, которые характеризуют спящие ДРК: сохранность в чужеродном микроокружении, обратимая остановка клеточного роста, резистентность к таргетному и цитотоксическому лечению

Сохранность в чужеродном микроокружении

Для обеспечения выживаемости ДРК клетки первичной опухоли начинают предварительное формирование микроокружения, которое включает воспаление, иммуносупрессию, ангиогенез, увеличение сосудистой проницаемости, органотропизм, лимфангиогенез и клеточное перепрограммирование [8]. Факторы, выделяемые первичной опухолью, индуцируют синтез фибронектина рак-ассоциированными фибробластами (CAF). Фибронектин в свою очередь необходим для формирования преметастатической ниши путем связывания с гемопоэтическими клетками-предшественницами. Эти клетки при помощи производства ММП-9 воздействуют на синтез нейтрофилами ряда веществ, которые перестраивают микроокружение, а также стимулируют ангиогенез. Таким образом они формируют нишу для ДРК. Другие факторы такие, как гепараназа, остеопонтин и лизил оксидаза облегчают миграцию, выживание и пролиферацию метастатических клеток опухоли. В дальнейшем, прикрепление опухолевых клеток к нативной базальной мембране способствует их выживанию, функциональной дифференцировке и остановке роста. Исследователями было отмечено, что ДРК часто метастазируют в органы, базальная мембрана которых хорошо васкуляризирована (костный мозг, легкие, печень и мозг).

Прикрепление ДРК на поверхности клеток кровеносных сосудов при воздействии эндотелий-производного TSP-1 способствует переходу в спящие состояние, в то время как неоваскуляризация создает локальное

микроокружение, способствующее метастатической реактивации. После неоваскулярного прорастания эндотелиальные клетки начинают секретировать опухоль-стимулирующие сигналы и факторы роста - белки внеклеточного матрикса такие как периостин и активный TGFß, что приводит к росту микрометастазов. Сообщалось, что белки внеклеточного матрикса также запускают сигнальные пути Notch и Wnt, что, в свою очередь приводит, к усилению метастатического роста. TGFß запускает синтез периостина рак-ассоциированными фибробластами и клетками эндотелия в неоваскулярной области, поддерживая метастатический рост [14]. Кроме того, было недавно показано, что экзосомы, обнаруженные в меланоме, способствуют образованию предметастатической ниши путем воздействия на рецептор МЭП клеток-предшественниц костного мозга. [9].

Как уже говорилось ранее ДРК вначале перестраивают чужеродное микроокружение здоровых тканей, но при этом они метастатические клетки должны быть способными избежать запуска генетически заложенной программы апоптоза. Защита клеток от преждевременной смерти осуществляется при запуске β1-интегриновой сигнальной блокады, которая является мощным индуктором аутофагии, а также способствует поддержанию спящего состояния. Как известно, p27Kip1, циклинзависимый ингибитор киназы, участвует в остановке клеточного цикла G0/G1 ДРК [14]. В недавних исследованиях показано, что он индуцирует аутофагию и способствует выживанию клеток в ответ на метаболический стресс. Таким образом ДРК могут зависеть от p27-опосредованной аутофагии, чтобы выжить в чужеродном микроокружении и противостоять химиотерапии. Однако точная биологическая роль аутофагии во время состояния покоя остается по большей части неизвестной. Однако если аутофагия способствует подавлению роста в покоящихся клетках, можно дополнительно предположить, что она может ограничивать рост спящих клеток в макрометастазах [11].

В недавних исследованиях Цянь с соавтр. было показано, что метастаз-ассоциированные макрофаги (МАМ), обнаруженные в большом количестве в

метастазах рака молочной железы по сравнению с первичной опухолью, запускают сигнальный путь, при помощи которого осуществляется контроль экспрессии генов, необходимых для поддержания спячки [10]. Следовательно, метастатическое микроокружение играет ключевую роль в выживании, поддержании состояния покоя и реактивации ДОК.

Обратимая остановка клеточного роста

Для объяснения позднего рецидива была предложена модель «покоя опухоли», которая предполагала, что баланс между увеличением раковых клеток за счет пролиферации и уменьшением за счет гибели клеток находится в равновесии. «Покой опухоли» достигается двумя различными механизмами: ангиогенным покоем и иммуноопосредованным покоем.

Ангиогенный покой

Исследования показывают, что в опухолях, которые не способны обеспечить необходимый неоангиогенез, доля отмирающих клеток равна делящимся. Таким образом нет чистого прироста в опухолевой массе с течением времени, что, в свою очередь, приводит к ангиогенному покою. Увеличенное число раковых клеток вызывает гибель клеток в области, удаленной от ранее существовавших кровеносных сосудов, из-за недостатка кислорода и питательных веществ. Такое состояние индуцирует экспрессию гена HIF1, который подавляет окислительное фосфорилирование и продукцию активных форм кислорода. Следовательно, ген HIF1 поддерживает выживание раковых клеток в условиях сильной гипоксии и недостатка питательных веществ.

Также стоить отметь, что процесс поддержания ангиогенного покоя может зависеть от воздействия определенных клеточных посредников на ядерные рецепторы. Например, в недавних исследованиях было показано, что рецептор стероидных гормонов NR2F1 играет роль в поддержании покоя через ингибиторы SOX9, PARß и CDK в клетках карциномы. [6; 11] В последнее время NR2F1 появился в качестве клинического маркера покоя, его экспрессия помогает отличить больных раком молочной железы с кратковременным

системным рецидивом от пациентов с длительными безрецидивными интервалами [4].

Способность опухолевых клеток реагировать на гипоксию, инициировать неоваскуляризацию и прерывать ангиогенную спячку известна как ангиогенный переключатель. Баланс между проангиогенными факторами (сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF)) и антиангиогенными факторами (тромбоспондин, эндостатин, васкулостатин и ангиостатин), как полагают, контролирует этот переключатель, который в свою очередь регулирует транскрипционные программы [6; 11].

Иммуноопосредованный покой

Как известно, иммунный ответ способен подавить развитие и рост опухоли. Используя модель спонтанной меланомы у мышей, в различных исследованиях было показано, что CD8+ Т-клетки участвуют в поддержании покоя опухоли в месте метастазирования. В этой модели подавление иммунной системы антителом CD8+ значительно способствовало метастатическому росту. На основании исследований геномного однонуклеотидного полиморфизма было показано, что паттерны генетических изменений широко распространены среди первичных и метастатических участков, что указывает на то, что метастазы могут быть получены из опухолевых клеток, которые метастазировали из первичной опухоли в ранний момент времени. Эти результаты предполагали, что диссеминированные опухолевые клетки будут сохранять состояние спячки и избегать ответа со стороны иммунной системы [5].

Резистентность к химиотерапии

Терапевтическая резистентность ДРК в состоянии покоя является свойством, требующим изучения. Предположение о том, что спящие ДРК становятся резистентными к общим методам лечения, появляется при их обнаружении в аспирационных биоптатах костного мозга пациентов, прошедших курс химиотерапии. Одно из обоснований химиорезистентности

заключается в том, что по мере того, как клетки карциномы подвергаются ЭМП, количество и скорость активно пролиферирующих клеток уменьшается. Поскольку большинство химиотерапевтических и биологических препаратов нацелены на делящиеся клетки, это ограничивает эффективность всех этих методов лечения. Даже препараты, которые вызывают повреждение клеток оказывались бы менее эффективными, так как у покоящейся клетки снижена скорость всех метаболических процессов и увеличен период восстановления [8].

Еще одной причиной индукции химиорезистентности в различных опухолях может быть активация протеинкиназы p38. Исследования показывают, что в спящих клетках баланс между пролиферацией и покоем определяется соотношением между активностью p38 и ERK1/2. Стрессовые состояния клетки, такие как гипоксия, развернутый белковый ответ, стресс эндоплазматического ретикулума и аутофагия активируют протеинкиназы p38. Дальнейшие исследования p38-активированных путей показывают, что ядерный рецептор NR2F1 при активации p38 индуцирует спячку, как было сказано ранее, через ингибиторы SOX9, RARß, CDK и репрессию хроматина. Наиболее интересно, что факторы, участвующие в пути рецепторов p38/NR2F1, возможно, появляются как часть общей программы покоя / лекарственной устойчивости, активной в нескольких типах рака [4].

Методы выявления спящих опухолевых клеток

Идентификация ЦОК/ДРК в периферической крови и костном мозге имеет важную клиническую ценность для некоторых видов рака. Для определения ДРК в периферической крови использовались характеристики, по которым их можно отличить от клеток крови. Так, физические методы выделения основаны на следующих отличительных признаках ДРК: большой размер (>10 мм), более слабая деформируемость и большая плотность. Эти отличия позволяют разрабатывать и применять микрофлюидные чипы для изоляции ЦОК на основе физических свойств [3].

Важным биологическим отличием ЦОК является экспрессия молекул адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), во врем прогрессирования онкологического заболевания. EpCAM присутствует на поверхности клеток ЦОК, но отсутствует на мембранах клеток крови. Таким образом, EpCAM может быть использован в качестве специфического биомаркера для выделения ЦОК. Однако захват ЦОК осуществляется за счет взаимодействие между клеткой и специфическим антителом, иммобилизованным на субстратах, поэтому ЦОК без EpCAM или с низкой экспрессией EpCAM будут пропущены. Также возможно использование тромбоцитов в качестве маркера для выделения ЦОК. Некоторые методы основаны на выделении кластеров ЦОК связанных с нейтрофилами, в таком случае выделение основано на больших размерах кластеров [3]. Другие эпителиальные антигены как MUC1 и Ep-CAM были использованы для обнаружения ЦОК в периферической крови и ДРК в костном мозге.

В большинстве исследований обнаружение ЦОК осуществлялось с помощью иммуноцитохимии (ICC). Недавно разработанная методика эпителиального иммуноспота (Epispot) была успешно использована для идентификации секретируемых продуктов ЦОК /ДРК у больных раком молочной железы и предстательной железы. В настоящее время такие методики, как ICC, достаточно чувствительны для обнаружения 1-2 опухолевых клеток на два миллиона протестированных клеток [13].

Заключение

Результаты детального рассмотрения механизмов перехода метастатических опухолевых клеток в состояние спячки убедительно свидетельствуют об необходимости дальнейшего изучения вопросов связанных с метастазированием, сохранностью в чужеродном микроокружении, обратимой задержкой роста раковых клеток и их резистентности к таргетной и цитотоксической терапии, выработки и реализации новых научно-исследовательских, теоретических и методологических подходов. Данные практические результаты имеют

первостепенное значение, поскольку раковая спячка может часто, если не всегда (т. е. в случае синхронных метастазов), являться причиной рецидива, метастатической диссеминации и, наконец, приобретения ДРК общих раковых "отличительных признаков" под воздействием сигналов со стороны микроокружения. Исчерпывающие знания в этом вопросе позволят разработать эффективные стратегии по предотвращению, своевременной диагностике и лечению большинства онкологических заболеваний.

Литература

1. Мнихович М.В., Вернигородский С.В. [и др.]. Эпителиально-мезенхимальный переход, трансдифференциация, репрограммирование и метаплазия: современный взгляд на проблему 2018. № 2 (13).
2. Aguirre-Ghiso J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy // Nature reviews. Cancer. 2009. № 11 (7). С. 834–846.
3. Cheng S.-B. [и др.]. Current techniques and future advance of microfluidic devices for circulating tumor cells // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2019. (117). С. 116–127.
4. De Angelis M.L. [и др.]. Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance // Frontiers in Oncology. 2019. (9).
5. Endo H., Inoue M. Dormancy in cancer // Cancer Science. 2019. № 2 (110). С. 474–480.
6. Gomis R.R., Gawrzak S. Tumor cell dormancy // Molecular Oncology. 2017. № 1 (11). С. 62–78.
7. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. 2011. № 5 (144). С. 646–674.
8. Ma B., Wells A., Clark A.M. The pan-therapeutic resistance of disseminated tumor cells: Role of phenotypic plasticity and the metastatic microenvironment // Seminars in Cancer Biology. 2019. С. S1044579X19301968.

9. Peinado H. [и др.]. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET // Nature medicine. 2012. № 6 (18). С. 883–891.
10. Qian B.-Z. [и др.]. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis // The Journal of Experimental Medicine. 2015. № 9 (212). С. 1433–1448.
11. Sosa M.S. [и др.]. Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy // Advances in experimental medicine and biology. 2013. (734). С. 73–89.
12. Spiliotaki M. [и др.]. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy // Breast Cancer Research : BCR. 2014. (16).
13. Vessella R.L., Pantel K., Mohla S. Tumor cell dormancy: An NCI workshop report // Cancer Biology & Therapy. 2009. № 9 (6). С. 1492–1500.
14. Yadav A.S. [и др.]. The Biology and Therapeutic Implications of Tumor Dormancy and Reactivation // Frontiers in Oncology. 2018. (8).

Literature

1. Mnikhovich M.V., Vernigorodsky S.V. [and etc.]. Epithelial-mesenchymal transition, transdifferentiation, reprogramming and metaplasia: a modern view of the problem 2018. No. 2 (13).
2. Aguirre-Ghiso J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy // Nature reviews. Cancer 2009. No. 11 (7). C. 834–846.
3. Cheng S.-B. [and etc.]. Current techniques and future advance of microfluidic devices for circulating tumor cells // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2019. (117). C. 116–127.
4. De Angelis M.L. [and etc.]. Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance // Frontiers in Oncology. 2019. (9).
5. Endo H., Inoue M. Dormancy in cancer // Cancer Science. 2019.No 2 (110). C. 474-480.

6. Gomis R.R., Gawrzak S. Tumor cell dormancy // Molecular Oncology. 2017. No. 1 (11). C. 62–78.
7. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. 2011. No. 5 (144). C. 646–674.
8. Ma B., Wells A., Clark A.M. The pan-therapeutic resistance of disseminated tumor cells: Role of phenotypic plasticity and the metastatic microenvironment // Seminars in Cancer Biology. 2019.C. S1044579X19301968.
9. Peinado H. [et al.]. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET // Nature medicine. 2012. No. 6 (18). C. 883–891.
10. Qian B.-Z. [and etc.]. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis // The Journal of Experimental Medicine. 2015. No. 9 (212). C. 1433-1448.
11. Sosa M.S. [and etc.]. Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy // Advances in experimental medicine and biology. 2013. (734). C. 73–89.
12. Spiliotaki M. [et al.]. Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women with early breast cancer who are candidates for tumor dormancy // Breast Cancer Research: BCR. 2014. (16).
13. Vessella R. L., Pantel K., Mohla S. Tumor cell dormancy: An NCI workshop report // Cancer Biology & Therapy. 2009. No. 9 (6). C. 1492-1500.
14. Yadav A.S. [and etc.]. The Biology and Therapeutic Implications of Tumor Dormancy and Reactivation // Frontiers in Oncology. 2018. (8)