

А.А. Ковалев
Т.В. Грудинская
Т.П. Кузнецова
К.А. Ковалев

ГУ Запорожская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины, Запорожье, Украина

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, апоптоз, метастазирование.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Резюме. Обобщены и проанализированы данные литературы и результаты собственных исследований о клиническом значении и методах выявления циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) при злокачественных опухолях различных локализаций. Обсуждаются причины и значение появления гетерогенных ЦОК, а также принципиальные технические аспекты, определяющие специфичность и чувствительность их обнаружения.

ВВЕДЕНИЕ

Отличительной чертой злокачественных опухолей является реализация программы метастатического каскада — биологического феномена, который начинается с процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), утраты межклеточной адгезии, приобретения опухолевой клеткой (ОК) свойств аномальной подвижности и инвазивности и заканчивается колонизацией раковыми клетками отдаленных органов с последующим развитием метастатических опухолей [2, 6, 7]. Между этими «ступенями» метастатического каскада лежит уникальное состояние ОК — циркуляция и выживание в системном кровотоке.

Впервые инвазию ОК вен и лимфатических сосудов у больного базально-клеточным раком кожи обнаружил Tirsch в 1865 г. В 1869 г. Ashworth сообщил о наличии ОК в сосудах больного, умершего от метастатического рака. О циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) как о «метастазах в кровь» сообщал также Н.Н. Петров. После того, как в XXI ст. стали доступны новые методы идентификации, подсчета и фенотипирования циркулирующих в крови ОК, предприняты многочисленные попытки оценить их роль в канцерогенезе, а также использовать в качестве прогностических и предиктивных показателей в клинической практике [3–5, 8]. Сегодня уже не вызывает сомнений, что ЦОК являются ключом к пониманию биологии метастазов и биологическим маркером, позволяющим неинвазивно изучать эволюцию генотипа опухоли во время ее прогрессии, а также под влиянием проводимого лечения [12, 14, 15].

Однако фактом является и то, что наши фундаментальные и клинические исследования в области изучения ЦОК ограничены неимением доступных технологий их обнаружения. Серьезным препятствием до сих пор остается отсутствие методологических стандартов выявления ЦОК; существующие методики, в том числе и коммерческие, не обладают надежной технологической платформой, высокой пропускной способностью, чувствительностью и специфичностью, а также сложны в воспроизведении и дороги, то есть не полностью отвечают задачам клиники [8–10]. Сложности в интерпретации полученных данных заключаются

и в том, что ЦОК гетерогенны по своей природе. Последнее обстоятельство зависит как от объективных молекулярно-клеточных процессов в популяции ОК, так и от повреждения клеток во время их изолирования из цельной крови [8, 15, 19].

Целью данной работы было оценить практическую ценность разработанного на кафедре онкологии ГУ «ЗМАПО МЗ Украины» метода идентификации и фенотипирования ЦОК.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служила цельная кровь 15 пациентов онкологического профиля (7 мужчин и 8 женщин в возрасте от 46 до 72 лет) с верифицированными эпителиальными злокачественными опухолями различной локализации и гистогенеза (рак молочной железы, рак желудка, рак прямой и ободочной кишки, рак яичника). Объединяющей характеристикой всех больных была категория M1, то есть наличие реализовавшихся гематогенных метастазов в висцеральные органы (легкие, печень, париетальную брюшину).

Изучали венозную кровь, полученную в объеме 50 мл из верхней полой вены после катетеризации внутренней яремной вены пациента. Во всех случаях забор крови производили после получения информированного письменного согласия больного. В работе использовали прямые методы детекции, впервые предложенные Wona и соавторами в 2000 г., основанные на физических особенностях злокачественных клеток (их плотности и размере).

Вначале выполняли цитаферез с высоким коэффициентом центрифугирования (была использована платформа SmartPreP Harvest), в результате чего цельная кровь разделялась на слои соответственно градиенту плотности (эритроциты, нейтрофилы, мононуклеарные клетки, лимфоциты, моноциты, клетки эпителия, предположительно ОК и плазма, которая являлась верхним слоем). После седиментации, дезагрегации клеток и лизиса эритроцитов соответствующий слой подвергали микрофильтрации (используя полиуретановый фильтр Imugard III RC («Tegimo», Япония) с диаметром пор до 30 мкм). Клеточный материал, содержа-

ший слой обогащенных ОК, окрашивали по Романовскому — Гимзе и микроскопировали под увеличением $\times 200$ – 1000 , при котором мембранные, цитоплазматические и ядерные детали становились доступными для наблюдения. После идентификации ОК проводили их иммуноцитохимическое фенотипирование и окраску на панцитокератины (использовали реагенты и антитела Cytokeratin cocktail AE1/AE3 («Novocastra», Англия)).

Изоляция и обогащение ЦОК независимо от их происхождения из той или иной злокачественной опухоли позволяли минимально повреждать клетки во время всех этапов микроманипуляции и максимально точно отличать единичные ОК или опухолевые микроэмболы (ОМЭ) от «примесей» клеток крови и эпителиальных клеток неопухолевой природы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ЦОК были обнаружены у всех 15 пациентов. Количественный анализ ЦОК на данном этапе исследования не проводили. Обнаружены 3 варианта ЦОК: одиночные живые клетки, циркулирующие ОМЭ и ОК в состоянии апоптоза (рис. 1–3). У отдельных пациентов были обнаружены также циркулирующие эпителиальные клетки неопухолевой природы.

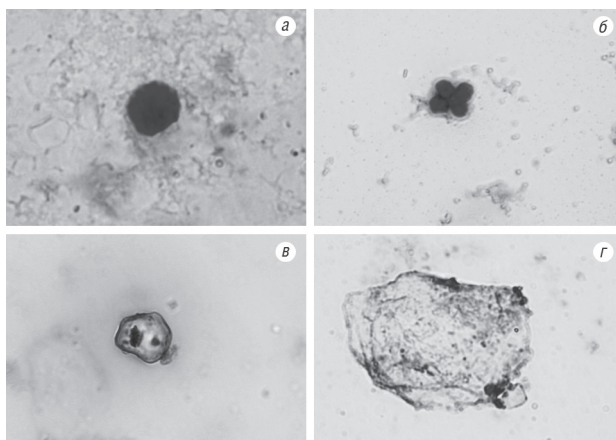


Рис. 1. Одиночные ЦОК у больных раком молочной железы, прямой кишки, желудка и яичника. Окраска по Романовскому — Гимзе (а, б, в) и реакция на панцитокератины (г). Ув. $\times 1000$

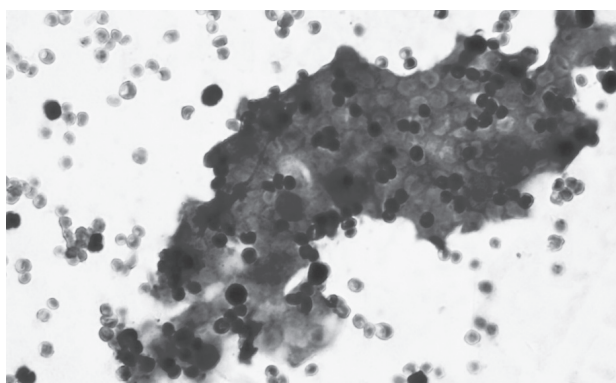


Рис. 2. Циркулирующие ОМЭ в «сопровождении» клеточных элементов крови. Больная С., 45 лет; рак сигмовидной кишки Т3N1M1. Окраска по Романовскому — Гимзе. Ув. $\times 400$

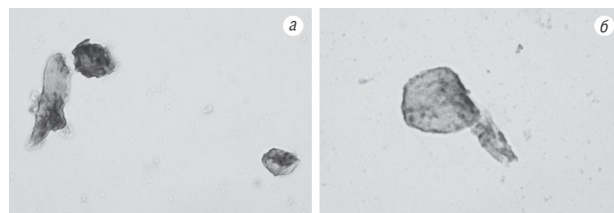


Рис. 3. ЦОК в состоянии апоптоза. Больной Х., 49 лет. Рак желудка Т2N2M1. 95% регрессия опухоли и метастазов после 6 курсов ПХТ (доцетаксел + оксалиплатин). Наличие циркулирующих «апоптотических тел» может свидетельствовать об эффективности лечения. Реакция на панцитокератины. Ув. $\times 400$

ЦОК были обнаружены в крови пациентов в различные сроки после постановки клинического диагноза (от 2 мес до 5 лет), перед хирургическим вмешательством и в различные сроки после него: от 2 нед до 3 лет (рис. 4) после выполнения резекции желудка по поводу аденокарциномы желудка G3.

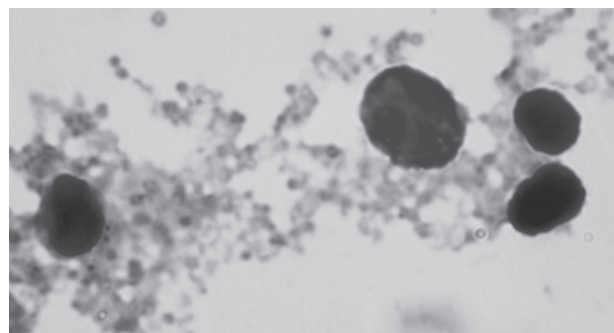


Рис. 4. ЦОК в периферической крови: «голаядерная» раковая клетка и лимфоциты. Больной Т, 60 лет; первичный диагноз — рак желудка Т3N1M0 G3, прогрессирование через 2 года после гастрэктомии; радиочастотная термоабляция метастаза в левом надпочечнике, продолжается ПХТ (доцетаксел + оксалиплатин). На момент обследования клинические опухолевые очаги отсутствуют. Окраска по Романовскому — Гимзе. Ув. $\times 1000$

Считают, что гетерогенность ЦОК обусловлена их «естественной историей» в канцерогенезе. По сравнению с нормальным эпителием клетки карцином характеризуются прогрессирующим снижением межклеточной адгезии и повышением миграционных способностей. Иницированная клетка уже на самых ранних стадиях канцерогенеза может разрушить базальную мембрану и проникнуть в кровоток. Молекулярные механизмы этих процессов в первую очередь связаны с феноменом ЭМП, впервые описанного Хау в 1995 г. После активации протоонкогенов (*Src*, *Ras*) и фазы инициации в эпителиальных клетках активируются «скрытые» эмбриональные программы ЭМП, в результате чего клетка постепенно теряет набор эпителиальных антигенов и приобретает мезенхимальные. Растворимые факторы роста (PDGF, NGF, EGF, FGF), цитокины, молекулы внеклеточного матрикса активируют сигнальные пути (Wnt/beta-catenin, Notch, сигнальные пути названных выше лигандов), ведущие к реализации программы ЭМП. Эти пути активируют ряд транскрипционных факторов (Snail, Twist,

Slug, ZEB1, ZEB2, Lef-1 и др.), которые связываются с промоторами генов, ответственных за ЭМП [2, 6, 7]. Во время ЭМП происходят морфологические изменения размера и формы клеток, наблюдается плеоморфизм клеток и ядер, гиперхроматизация и гиперплоидность, а также увеличивается митотическая активность.

Феномен ЭМП оказывает влияние на формирование гетерогенности ЦОК, а также обуславливает технические трудности их обнаружения и фенотипирования. Поскольку большинство методов идентификации ЦОК основаны на обнаружении экспрессии цитокератинов, значительная фракция этих клеток может быть не обнаружена именно из-за потери этих эпителиальных антигенов и приобретения новых, мезенхимальных, в частности виментина, не используемых в коммерческих тестах (Cell Search, проточная цитометрия, PCR-RT).

В экспериментальных моделях было установлено, что ежедневно в кровотоке из 1 г опухолевой ткани поступает 1 млн клеток, при этом только 1 клетка из 40 может достигнуть премеастатической ниши и только 0,01% клеток реализуются в макростазе. Эпителиальные клетки в кровотоке имеют очень малую выживаемость: 85% погибают после интраваскулярной в течение менее 5 мин, попадая в «капиллярную ловушку», и превращаются в апоптотические тельца. Этому процессу способствуют гемодинамический стресс и взаимодействие ОК с клетками иммунной системы [2, 11, 13]. Апоптотические тельца не могут реализоваться в виде отдаленных гематогенных метастазов и с этой точки зрения не являются опасными для больного. В то же время апоптотические ОК могут быть источником циркулирующих опухолевый ДНК и РНК, которые могут быть обнаружены с помощью многочисленных сверхчувствительных методов молекулярной визуализации (PCR-RT). Использование этих методов позволяет улавливать «осколки» ОК и отображать их количество с помощью компьютера в виде компьютерных графиков, но не дает возможности провести световую микроскопию и визуализацию клетки (ее мембраны, цитоплазмы, ядра), что может привести к гипердиагностике и ложным клиническим прогнозам. Следует также отметить, что появление нуклеиновых кислот в кровотоке может зависеть не только от апоптоза ЦОК, но и от гибели клеток первичной опухоли (спонтанной или под влиянием терапии).

Выживание ОК в кровотоке происходит в том случае, если во время ЭМП в клетке активировались антиапоптотические программы. Большинство выживших ЦОК с повышенным метастатическим потенциалом экспрессируют факторы, ингибирующие апоптоз, и являются устойчивыми к апоптозу (одна из форм апоптоза, когда гибель клетки происходит в результате нарушения межклеточной адгезии и взаимодействия с матриксом) [13, 17, 19].

Выжившие ЦОК меняют свои гемодинамические и метаболические свойства и могут обнаруживаться

как в виде единичных клеток, так и в виде циркулирующих ОМЭ (феномен коллективной миграции). ОМЭ имеют высокий пролиферативный потенциал и обладают свойством агрессивного метастазирования. Они не могут покинуть просвет сосуда путем экстравазации, но приводят к опухолевой эмболии, пермеации клеток в просвете сосуда, разрыву стенки капилляра и пролиферации в интерстиции.

Длительное время считалось, что циркулировать в кровотоке могут только эпителиальные ОК. В последнее время было показано, что доля цитокератин-позитивных неопухолевых клеток в крови в нормальных условиях может составлять от 0% до 20% [1, 20, 21]. В литературе встречается термин «циркулирующая эпителиальная клетка», что не является эквивалентом «циркулирующей опухолевой клетки». Небольшое количество эпителиальных клеток может быть обнаружено в периферической крови неонкологических пациентов с доброкачественными эпителиальными пролиферативными заболеваниями, а также при воспалении, травме, хирургических вмешательствах. Большинство цитокератин-позитивных клеток представлены лейкоцитами. Другие клетки крови (макрофаги, плазматические, ядродержащие гемопоэтические клетки-предшественники) также могут экспрессировать специфические эпителиальные антигены.

Этот факт имеет принципиальное значение, поскольку существующие высокоточные методы идентификации ЦОК основаны не на цитологической микроскопической картине, а на выявлении цитокератин-экспрессирующих клеток и других методах молекулярной идентификации. Таким образом, молекулярная визуализация циркулирующих цитокератин-позитивных клеток еще не является основанием для окончательного заключения об их опухолевой природе. Обязательным является дополнительное окрашивание для выявления CD45. Во всех случаях окончательного заключения необходима микроскопическая характеристика всей клетки и ее компонентов (мембраны, цитоплазмы, ядра).

Визуализация ЦОК представляет собой сложную задачу. Одиночная ОК в 1 мл крови окружена примерно 10 млн лейкоцитов и 5 млрд эритроцитов. В связи с этим методы идентификации ЦОК должны обладать и очень высокой специфичностью, и очень высокой чувствительностью. В фундаментальных и клинических исследованиях для идентификации ЦОК наиболее часто используют коммерческие технологии CellSearch, Maintrac, CellPoint, Adnagen, RT-PCR, которые основаны на выявлении в крови цитокератин-позитивных, CD45-негативных клеток. В ряде случаев клетки обнаруживают с помощью других молекулярных маркеров — HER2, MUC1, GA73.3. Поиск единичных ОК осуществляется с помощью сложных и дорогих компьютерных программ [8, 10, 13, 16, 18, 20].

Перечисленные методы молекулярной визуализации ЦОК отличаются очень высокой чувствитель-

ностью, однако, как отмечалось выше, не лишены некоторых недостатков (гипердиагностика). Световая микроскопия с последующим фенотипированием клеток, не обладая очень высокой чувствительностью, позволяет избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов при выявлении ЦОК. Различное биологическое значение одиночных живых ЦОК, циркулирующих микроэмболов, апоптотических ЦОК создает не только трудности их идентификации, но и делает сложным процесс интерпретации полученных данных применительно к клинике.

ВЫВОДЫ

1. Наличие ЦОК отражает способность опухоли к инвазии и метастазированию. Результаты подсчета количества и изучения биологических характеристик ЦОК являются ценными прогностическими и предиктивными маркерами, а также могут отражать эволюцию генотипа опухоли при ее прогрессии.

2. Идентификация ЦОК остается сложной задачей и до сих пор еще не доступна клиницистам для рутинного использования. Технологические стандарты выявления ЦОК отсутствуют.

3. При идентификации ЦОК следует учитывать наличие в крови клеток, утративших эпителиальные и приобретенные мезенхимальные антигены (феномен ЭМП), наличие апоптотических клеток, а также циркулирующих эпителиальных неопухолевых клеток. Возможность проведения микроскопического анализа мембраны, цитоплазмы и ядра должно быть обязательным компонентом диагностики ЦОК.

4. Разработанный в клинике метод идентификации ЦОК, основанный на центрифугировании, цитаферезе, перфузии, микрофльтрации и обогащении клеток на фильтре позволяет отчасти решить поставленные задачи.

5. Представляется перспективным дальнейшее изучение биологических свойств ЦОК после их выделения путем культивирования в присутствии факторов роста по технологии PRP.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crisan D, Ruark DS, Decker DA, *et al.* Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease. *Mol Diagn* 2000; **5**: 33–8.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
3. Schuler F, Dolken G. Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR. *Clin Chim Acta* 2006; **363**: 147–56.
4. Smerage JB, Hayes DF. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* 2006; **94**: 8–12.
5. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol* 2000; **11**: 785–92.
6. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; **66**: 8319–26.

7. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 131–42.

8. Pantel K, Woelfle U. Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anticancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1756**: 53–64.

9. Balic M, Dandachi N, G. Hofmann G, *et al.* Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; **68**: 25–30.

10. Kowalewska M, Chechlinska M, Markowicz S, *et al.* The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 2671–4

11. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 362–74.

12. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, *et al.* International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer*. 1999; **86**: 2668–73.

13. Rosenberg R, Gertler R, Friederichs J, *et al.* Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 2002; **49**: 150–8.

14. Ring I, Smith E, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol*. 2004; **5**: 79–88.

15. Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers, *Trends Mol Med* 2006; **12**: 130–9.

16. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis, *Clin Sci (Lond.)* 2005; **109**: 365–79.

17. Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9533–7.

18. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, *et al.* Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant, *Clin Cancer Res* 2002; **8**: 2073–84.

19. Fehm T, Solomayer EF, Meng S, *et al.* Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells, *Cytotherapy* 2005; **7**: 171–85.

20. Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood, *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; **42**: 155–96.

21. Allard WJ, Matera J, Miller MC, *et al.* Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases, *Clin. Cancer Res.* 2004; **10**: 6897–904.

HETEROGENEITY OF CIRCULATING TUMOR CELLS

A.A. Kovalyov, T.A. Grudinskaya, T.P. Kusnezowa, K.A. Kovalyov

Summary. *The literature and results of research on the clinical significance and methods for the detection of circulating tumor cells in malignant tumors of various localizations are summarized and analyzed. The particular importance the fact of heterogeneity circulating tumor cells are emphasized*

Key Words: circulating tumor cells, epithelial-mesenchymal transition, apoptosis, metastasis.

Адрес для переписки:

Ковалев А.А.

ГУ «ЗМАПО МЗ Украины»

69040, Запорожье, бульв. Винтера, 20

E-mail: kovalev-onco@yandex.ru