

ММСК опухолевой стромы инициируют процесс метастазирования

Причины приобретения опухолевыми клетками так называемого метастатического фенотипа (т.е. экспрессии белков, отвечающих за миграцию злокачественных клеток), позволяющего им покидать первичную опухоль и мигрировать в удалённые участки организма, являются объектом пристального внимания современных исследований. Часть работ, проведённых в этой области, указывает на то, что подобный фенотип является следствием изменений, происходящих непосредственно в опухолевых клетках. Другая точка зрения состоит в том, что метастатический фенотип является ответом на паракринные сигналы, получаемые опухолевыми клетками от клеток опухолевой стромы [1], но эта гипотеза до настоящего момента оставалась неподтверждённой экспериментально. В частности, это связано с тем, что в опухолевой строме присутствуют клетки различных типов, и сложно выделить ключевые паракринные факторы, участвующие в передаче сигналов между стромальными и собственно опухолевыми клетками. Однако известно, что мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК) активно мигрируют в зону первичной опухоли и присутствуют в её строме [2].

В октябре 2007 года в on-line версии журнала Nature была опубликована работа группы А.Е. Karnoub и соавт. Исследователи предположили, что основную роль в процессе метастазирования могут иметь именно ММСК. Несмотря на то, что основная ниша ММСК – костный мозг, эти клетки присутствуют в строме многих тканей, представляя собой резервную популяцию стволовых клеток [3]. Они участвуют в регенерации и ремоделировании тканей при повреждениях и хроническом воспалении. ММСК способны к миграции и хоумингу в зоны воспаления, продукции широкого спектра цитокинов и хемокинов. Кроме того, было показано их участие в формировании фиброзных рубцов на месте повреждения [4]. Следует отметить, что перечисленные процессы характерны для карцином молочной железы, сопровождающихся десмопластической реакцией, в ходе которой стромальные клетки продуцируют как про-, так и антитуморогенные факторы. Авторы работы сравнивают опухоль с «раной, которая никогда не заживает», поскольку в ней присутствуют постоянно повышенные концентрации ростовых факторов, цитокинов и матриксных протеиназ. Часть стромальных клеток опухоли представляют собой колониеобразующие единицы, что характерно для ММСК [5]. Для выяснения взаимодействий ММСК и опухолевых клеток исследователи использовали четыре линии опухолевых клеток карциномы молочной железы человека (MCF7/Ras, MDA-MB-231, MDA-MB-435 и HMLER), меченные зелёным флуоресцентным белком (GFP). Клетки каждой линии совместно с ММСК человека были подкожно введены иммунодефицитным мышам. ММСК человека были выделены из аспиринов костного мозга бедренных костей. В контрольных опытах использовались опухолевые клетки без ММСК. Была оценена кинетика формирования опухолей, а также степень их метастазирования. Было показано, что ММСК практически не влияют на кинетику образования опухоли, но существенно усиливают процесс её метастазирования, приводя к образованию вторичных очагов опухолевого роста в лёгких. Количество метастазов в сравнении с контрольными опытами было увеличено в два, три, четыре и семь раз в зависимости от использовавшейся опухолевой клеточной линии.

Для дальнейшей работы была выбрана линия MDA-MB-231, так как для данной линии усиление метастазирования было максимальным. Было показано, что инъекция совместно с опухолевыми клетками фибробластов не приводила к такому эффекту и никак не влияла на образование метастазов. При введении ММСК отдельно от опухолевых клеток (подкожное введение в контрлатеральную область или в область, близкую к месту введения опухолевых клеток) усиления метастазирования также не наблюдалось. Это указывает на то, что для влияния на опухолевые клетки ММСК должны находиться от них в непосредственной близости. В связи с этим возникает вопрос, влияют ли ММСК на опухолевые клетки, изначально способные к метастазированию, или же способствуют приобретению метастатического фенотипа клетками, не способными к метастазированию. Для определения этого исследователи выделили опухолевые клетки из индуцированной опухоли, очистили культуру от ММСК и ввели опухолевые клетки тем же животным повторно. Обнаружилось, что вторично образованные опухоли не образуют метастазов. Таким образом, способность к метастазированию оказалась обратимой и проявлялась у клеток опухоли только в присутствии ММСК. ММСК приводили к приобретению метастатического фенотипа клетками, в норме не способными к метастазированию. Сами ММСК не мигрировали вместе с опухолевыми клетками, оставаясь в строме опухоли. Это было показано методом внесения двойной флуоресцентной метки.

In vitro был проведён анализ паракринных факторов, секретируемых ММСК. В кондиционированной среде после культивирования смешанных культур ММСК с клетками линии MDA-MB-231 был в шестьдесят раз повышен уровень цитокина CCL5 (RANTES) по сравнению с чистыми культурами MDA-MB-231 и ММСК. Повышение концентрации CCL5 было пропорционально количеству ММСК, присутствовавшему в сокультуре, и было показано, что данный фактор продуцируется именно ММСК. Ингибирование его экспрессии в ММСК приводило к тому, что ММСК теряли способность усиливать метастазирование опухоли. Было также показано, что опухолевые клетки экспрессируют рецептор CCL5 – CCR5. Опухолевые клетки, трансфицированные геном CCL5, обладали повышенной способностью к миграции и не требовали для метастазирования присутствия ММСК.

Таким образом, на основании весьма тщательно проведённых экспериментов и анализа данных, авторы сделали несколько существенных выводов. ММСК способствуют метастазированию опухолевых клеток, не влияя на их пролиферацию и выживаемость. Опухолевые клетки стимулируют продукцию в ММСК хемокина CCL5, который, взаимодействуя со своим рецептором CCR5 на мембране опухолевых клеток, приводит к их метастазированию. То есть создаётся система с положительной обратной связью, в которой ключевую роль играет взаимодействие CCL5–CCR5. Способность клеток опухоли к метастазированию является обратимой. Обладают ли способностью индуцировать метастатический фенотип другие стромальные клетки помимо ММСК, остаётся невыясненным. Однако на данный момент можно заключить, что определение метастатического потенциала опухоли может оказаться неэффективным в связи с тем, что за метастазирование ответственны факторы, продуцируемые опухолевой стромой и традиционно не связываемые с процессом метастазирования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bissell M., Radisky D. Putting tumors in context. *Nature Rev. Cancer* 2001; 1: 46–54.
2. Hall B., Andreeff M., Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2007; 180: 263–83.

3. Young H. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat. Rec.* 2001; 263: 350–60.
4. Fox J., Chamberlain G., Ashton B., Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br. J. Haematol.* 2007; 137: 491–502.
5. Pittenger M. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143–7.

Подготовила А.С. Григорян

По материалам: Karnoub A., Dash A., Vo A. et al.

Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature 2007; 449: 557–65

Хемокины, экспрессируемые мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, в терапии острой печёночной недостаточности

Острая печёночная недостаточность – заболевание, характеризующееся быстро развивающимися нарушениями синтетических функций печени, часто сочетающееся с системной воспалительной реакцией. Его терапия связана с множеством проблем, так как болезнь быстро приводит к развитию у пациентов энцефалопатии, сепсиса, почечной недостаточности, кровотечений в желудочно–кишечном тракте, общих метаболических нарушений. Клинические испытания, в которых тестировалась эффективность применения биосинтетической печени перед трансплантацией печени в случае быстро развивающейся острой печёночной недостаточности, показали, что, несмотря на многообещающие результаты этого метода, его использование не всегда возможно. В основном это связано с отсутствием постоянного источника функционально стабильных гепатоцитов [1], а также с воспалительной реакцией, развивающейся в тканях печени.

Мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (ММСК) играют ключевую роль в поддержании гемопозеза [2], а также обладают иммуномодулирующими функциями [3]. Исследователи из группы В. Parekkadan предположили, что паракринные функции ММСК могут оказать существенный терапевтический эффект при острой печёночной недостаточности в случае, когда потеря большой массы клеток паренхимы сочетается с системной воспалительной реакцией. В опытах на животных было продемонстрировано, что внутривенное введение лизатов ксеногенных ММСК увеличивает выживаемость мышей с острой печёночной недостаточностью.

Гистологические исследования печени таких животных показали, что после терапии снижается степень инфильтрации печёночной паренхимы лейкоцитами, а также восстанавливается структура желчевыводящих протоков. В дополнение к этому авторы выяснили, что экстракт ММСК приводит к миграции лейкоцитов из повреждённого органа в кровеносное русло, а также провели анализ секретируемых ММСК молекул.

В эксперименте использовались крысы линии Sprague–Dawley, которым был инъецирован гепатотоксин D–галатозамин (Gal–N) [4]. Это приводило к обширному некрозу ткани и последующей лейкоцитарной инфильтрации печени, в результате чего в зоне повреждения значительно возрастала концентрация провоспалительных факторов.

В течение 72 часов после инфузии в периферическую вену 2×10^6 ксеногенных ММСК не было отмечено значительных улучшений в состоянии животных. Авторы связывают это с иммунным отторжением ксеногенных клеток. Также отсутствие эффекта может быть связано с тем, что ММСК не достигали тканей органа–мишени. В то же время внутривенное введение лизатов тех же клеток приводило к значительному (до 50%) повышению выживаемости животных. В качестве контроля использовались физиологический раствор и лизаты фибробластов.

Авторы предположили, что введение лизатов ММСК приводит к тому, что лейкоциты мигрируют из зоны инфильтрации обратно в кровоток. Чтобы проверить эту гипотезу, исследователи ввели радиоактивно меченные лейкоциты крысам, получившим инъекции Gal–N, а затем провели терапию лизатами ММСК. После введения лизатов интенсивность радиоактивной метки в печени постепенно снижалась. Авторы считают, что основная роль в этом процессе принадлежит многочисленным хемокинам, экспрессируемым ММСК. Было продемонстрировано, что терапевтическим эффектом обладает фракция лизата, связывающая гепарин–сульфат, который является лигандом большинства хемокинов. Эта фракция составляла до 30% объёма лизата.

Анализ протеома ММСК показал, что они экспрессируют большое число молекул, ответственных за иммуносупрессию и за регенерацию печени, однако авторы не указывают, каких именно. Исследователи планируют продолжить данную работу и определить, какие из хемокинов играют ключевую роль в восстановлении печени при острой печёночной недостаточности. Также следует отметить тот факт, что к гепарин–сульфат–связывающей фракции могут относиться не только различные хемокины, но и такие факторы, как HGF (фактор роста гепатоцитов). Исследователи считают, что использование метаболических функций ММСК может послужить началом нового этапа в иммунотерапии заболеваний печени. Однако в представленной работе недостаточно данных для такого вывода – например, не указан спектр экспрессируемых ММСК белков, не проведено сравнение полученных данных с данными других авторов. Возможность использования этого подхода в лечении рассмотренной и других типов патологий, включающих воспалительный и аутоиммунный компонент, остаётся вопросом для дальнейших исследований.