

# ❖❖❖❖ ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE ❖❖❖❖

JANUSZ A. MADEJ

## Mechanizmy powstawania przerzutów nowotworowych

Katedra Anatomii Patologicznej, Fizjopatologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,  
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Wszystkie komórki organizmu, z wyjątkiem leukocytów i niektórych immunocytów patrolujących ustrój w poszukiwaniu drobnoustrojów i uszkodzonych tkanek, są pulą statyczną nie opuszczającą tkanki czy narządu i stanowią ich integralną część. Odmienne zachowują się komórki nowotworowe, które migrując i kolonizując inne tkanki tworzą przerzuty. Ekspresja fenotypu przerzutowego komórek nowotworowych jest procesem złożonym, związanym z pobudzeniem i hamowaniem wielu różnych genów, funkcja których jest regulowana niezależnie od genów warunkujących proliferację (40).

Przerzuty nowotworowe to główny, najgroźniejszy problem onkologii, decydujący o życiu lub śmierci pacjenta. To one między innymi determinują podział nowotworów na złośliwe lub niezłośliwe.

Nowotwory złośliwe rosną naciekowo, tzn., że ich komórki wnikają do przestrzeni pozakomórkowej (extracellular matrix – ECM), światła drobnych naczyń limfatycznych i krwionośnych, płynu mózgowo-rdzeniowego, przestrzeni wokół pni nerwowych, a także wszczepiają się do błon surowiczych jam ciała i przewodów wysłanych nabłonkiem. Stwarza to ogromne trudności kliniczne, ze względu na określenie zasięgu i operacyjne usunięcie nowotworu złośliwego w granicach zdrowych tkanek (3).

Komórka nowotworowa ma wiele cech zdecydowanie różnych od komórki prawidłowej, co warunkuje również jej inwazyjność (1, 4). Są to cechy powstałe wskutek transformacji nowotworowej, takie jak: utrata hamowania kontaktowego, zmniejszone przyleganie, wzrost szybkości migracji, zniesienie tzw. zakotwiczenia, czyli przytwierdzenie komórki do stałego podłoża oraz zdolność do produkcji enzymów ułatwiających inwazję i destrukcję tkanek otaczających nowotwór (kolagenazy, hydrolazy, aktywator plazminogenu). Czynnikiem ułatwiającym naciekanie nowotworu może być także odczyn immunologiczny tkanki prawidłowej wokół guza złośliwego. Specyficzne antygeny nowotworu wzbudzają bowiem zarówno reakcje typu humoralnego jak i komórkowego, z następowym odczynem zapalnym i obrzękiem, co toruje komórkom nowotworowym dalszą wędrówkę (13, 21).

Wnikanie komórek nowotworowych do naczyń limfatycznych odbywa się albo między komórkami śródbłonna i nosi miano „odwrotnej diapedezy” lub przez tzw. embolizację, a więc przenoszenie komórek podobnie jak zatory. Sprzyja temu wolny ruch chłonki. Komórki nowotworowe łatwo też wrastają do światła żył, co jest często spotykane w rakach. Trudno natomiast pokonać im ścianę tętnic, gdyż jej włókna elastyczne są bardziej odporne na niszczący naciek komórek niż kolagen. Wynika to z faktu, że komórki nowotworowe zawierają więcej kolagenazy aniżeli elastazy (2). Ochronę stanowią także inhibitory proteaz, występujące w dużej ilości w ścianie tętnicy, podobnie zresztą jak i w chrząstce, także wyjątkowo odpornej na powstawanie przerzutów nowotworowych (18).

Te same cechy tkanki nowotworowej, które prowadzą do naciekania, warunkują także tworzenie się przerzutów.

### Udział receptorów adhezyjnych w powstawaniu przerzutów nowotworowych

Receptory adhezyjne, czyli struktury powierzchni, służą do wzajemnego rozpoznawania się komórek, wiązania się ich z ligandami obecnymi na innych komórkach (interakcja typu komórka – komórka) lub w obrębie składników macierzy zewnątrzkomórkowej – interakcja typu komórka – podścielisko (16). Naprzemienna aktywacja i zanik funkcji cząsteczek adhezyjnych to typowa cecha komórek metastatycznych, pozwalająca na opuszczenie ogniska pierwotnego, ruch przez ECM, pokonanie barier łącznotkankowych oraz zakotwiczenie i proliferację w nowym miejscu (14). Receptory te spełniają także ważną rolę w interakcji komórek nowotworowych z immunocytami oraz trombocytami. Mechanizm inwazji tych komórek jest podobny do tego, jakim posługują się migrujące leukocyty do ogniska zapalnego, komórki endotelialne tworzące nowe naczynia krwionośne lub implantowane w macicy komórki trofoblastu (2).

Migracja komórki nowotworowej odbywa się na zasadzie chemotaksji i haptotaksji. Na początku wędrówki komórka kieruje się głównie gradientem rosnącej adhezji (haptotaksja), której źródło stanowią

adhezyjne domeny cząsteczek ECM (16). Degradacja i przechodzenie fragmentów tych cząsteczek do płynu międzykomórkowego powoduje, że komórka zaczyna intensywnie reagować na chemotaksję (36). Chemotaksję wywołują cytokiny, a także proteolitycznie rozłożone składowe ECM, tj. kolagen, fibronektyna, witronektyna, laminina i tenascyna. Przeciwnie, wymienione cząsteczki w formie nietkniętej stymulują migrację na drodze haptotaksji (20).

Komórki nowotworowe, opuszczając guz pierwotny, poruszają się ruchem ameboidalnym, który polega na tworzeniu się i zaniku pseudopodiów (nibynózek), czyli przejściowych struktur lokomocji. Komórki ciągle nawiązują i zrywają kontakt z podłożem, a więc od siły ich adhezji lub/i dynamiki nibynózek zależy szybkość poruszania się komórek (12). Komórki takie wędrują w dwu środowiskach, tj. środowisku płynnym (krew, limfa) i macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM).

We krwi lub chłonce komórki nowotworowe płyną biernie i mogą ją łatwo opuszczać, co nosi miano ekstrawazacji (12). Natomiast w ECM komórki przemieszczają się czynnie tworząc miejscowe lub odległe przerzuty nowotworowe. Stąd zaburzenia w oddziaływaniu komórek nowotworowych ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej mają duże znaczenie w ich inwazyjności i zdolności do tworzenia przerzutów.

### **Zaburzenia w oddziaływaniu między ECM a migrującą komórką nowotworową**

Do głównych składników ECM, istotnych dla migracji komórek, należą: glikoproteiny (GP) – wpływające na adhezję komórek, kolageny (typ I, II, III i IV), elastyna – budujące włókniste rusztowanie ECM oraz proteoglikany (PG), ułatwiające migrację komórek po utworzeniu w macierzy zewnątrzkomórkowej uwodnionych domen (22).

Do grupy glikoprotein należą:

1. fibronektyna (FN), która ułatwia wiązanie komórek m.in. do kolagenów, żelatyn i fibryny oraz umożliwia rozplaszczanie komórek i stymuluje ich ruchliwość. Ma także liczne domeny, między innymi z sekwencją RGD (arginina – glicyna – asparagina) – rozpoznawane przez integryny oraz fibrynogen, witronektynę i czynnik von Willebrandta, jak również domeny wiążące heparynę, kolagen, fibrynę i proteoglikany (15, 19),

2. trombospondyna (TSP), która ma domeny wiążące się z integrynami, łączy się z fibrynogenem, FN, kolagenami, heparyną, lamininą i plazminogenem,

3. laminina (LN), która wraz z kolagenem typu IV tworzy sieć w błonie podstawowej i może być wiązana przez receptory wielu komórek (22),

4. tenascyna (TN), posiadająca zarówno domeny adhezyjne z sekwencją RGD jak i domeny antyadhezyjne, ułatwiające odrywanie się komórek od podłoża (11, 14).

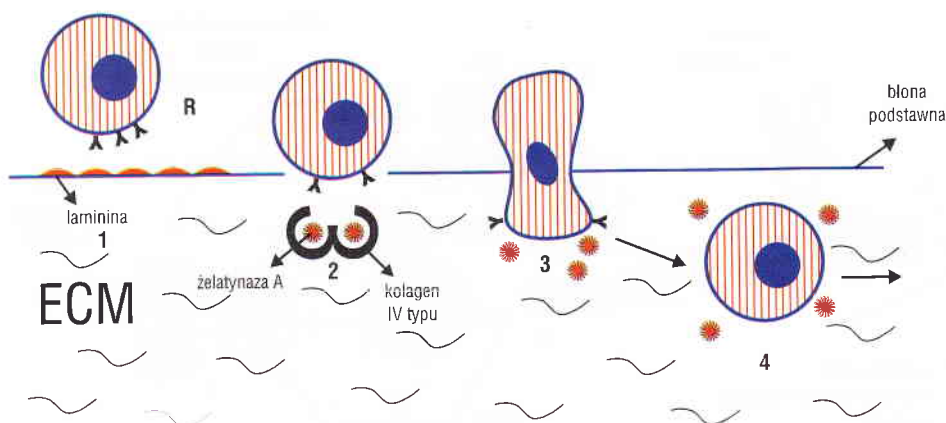
Fibronektyna, laminina i kolagen zwiększają adhezyjność komórek poprzez specyficzne receptory w błonie komórkowej. Np. w fibroblastach nowotworowo stransformowanych ilość fibronektyny i włókien rozprężeniowych spada, co powoduje nikłą ich przyczepność do podłoża. Po dodaniu FN do podłoża komórki adherują, a w ich cytoplazmie pojawiają się włókna naprężeniowe (23, 27).

Proteoglikany tworzą receptory, m.in. dla czynników wzrostowych i cytokin w ECM, a także kontrolują aktywność proteaz. Z kolei glikozaminoglikany (GAG) obecne w ECM to głównie siarczan heparanu, chondroityny, dermatanu i keratanu oraz kwas hialuronowy (11). Niektóre GAG tworzą uwodnione domeny ECM, co ułatwia migrację komórek nowotworowych w tak dodatkowo rozrzedzonym środowisku płynnym. Ważną rolę spełnia także kwas hialuronowy, który aktywizuje te komórki, natomiast jego rozpad pod wpływem hialuronidazy, wywiera działanie przeciwnie (23).

Na powierzchni komórek, zarówno prawidłowych jak i nowotworowych, jest proteoglikan CD 44, ekspresja którego ułatwia powstanie przerzutów, np. czerniaka złośliwego (30). Stwierdzono także, że PG tworzą wokół komórki nowotworowej płaszcz, który przytrzymuje nowo wytworzone kolageny i fibronektynę, jak również utrudnia wiązanie się sąsiadujących ze sobą komórek przez E-kadheryny i kontakt z podłożem (24). Ich częściowa lub całkowita utrata towarzyszy wielu nowotworom. Między innymi u myszy wykazano, że odblokowanie E-kadheryny w komórkach nowotworowych, wykazujących brak jej ekspresji, pozbawia je zdolności do wzrostu w formie guza. Odwrotnie, zablokowanie funkcji cząsteczek adhezyjnych może zmienić niezdolną do inwazyjnego wzrostu linię komórek w inwazyjną (31).

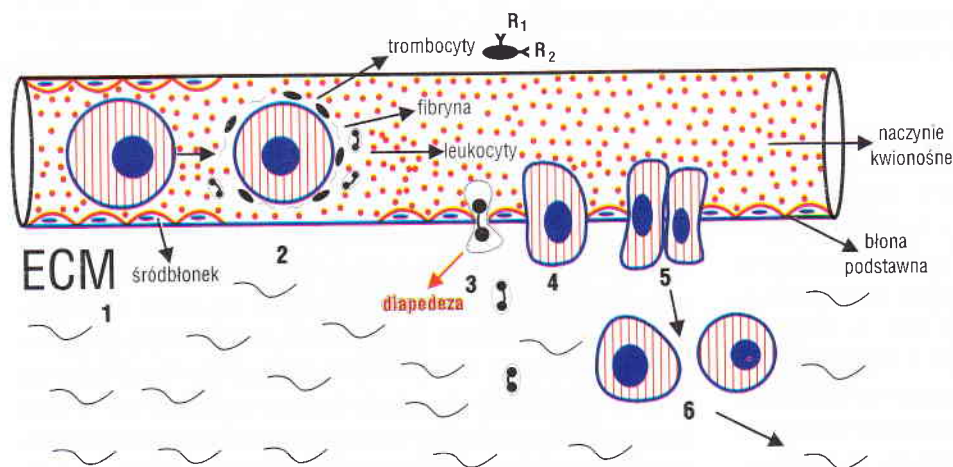
W błonie komórek są receptory, np. CSAT – cell surface attachment proteins, a także integryny, mające miejsce wiązania się ze składnikami ECM (fibronektyna, laminina) oraz z białkami mocującymi filamenty aktynowe w tej błonie (winkulina, talina, alfa-aktynina), co integruje ECM z błoną komórki (18, 25, 35). Np. winkulina, ulegając fosforylacji, powoduje reorganizację cytoszkieletu i włókien naprężeniowych. Reakcja ta kontrolowana jest przez kinazę białkową swoistą dla tyrozyny – produktu genu „src” obecnego w wirusie mięsaka Rousa (2, 37).

Wędrowka komórek nowotworowych przez ECM, zwłaszcza przez błonę podstawną, będącą jej składową, nie jest łatwa i wymaga udziału wielu enzymów proteolitycznych (ryc. 1). Na początku komórka przyczepia się dzięki odpowiednim receptorom do lamininy i rozkłada kolagen typu VI przy pomocy żelatynazy A (MMP-2), a następnie wydostaje się przez tak powstałą lukę na zewnątrz (17). Przypuszcza się, że taką wędrowkę ułatwiają czasem komórkom nowotworowym prawidłowe leukocyty przechodzące taką samą drogą, któremu to zjawisku towarzyszy wzrost produkcji żela-



**Ryc. 1. Mechanizm wnikania komórki nowotworowej do ECM (extracellular matrix) przez błonę podstawną**

Objaśnienia: 1 – kontakt receptorów powierzchniowych (R) komórki nowotworowej z lamininą błony podstawnej, 2 – wydzielanie żelatynazy A i rozluźnianie kolagenu IV typu, 3 – wędrowka komórki do ECM przez tak powstałą lukę, 4 – migracja komórki nowotworowej do ECM



**Ryc. 2. Mechanizm przechodzenia komórki nowotworowej z naczynia krwionośnego przez błonę podstawną do ECM w ślad za leukocytami**

Objaśnienia: 1 – bierny transport komórki nowotworowej, a następnie adhezja do komórek śródbłonek naczyniowego, 2 – otaczanie komórki trombocytami, fibryną i leukocytami,  $R_1$  – receptor dla lamininy,  $R_2$  – receptor dla fibrynogenu, 3 – przeciskanie się leukocytu między komórkami śródbłonek i degradacja błony podstawnej (diapedeza), 4 – przechodzenie komórki nowotworowej w ślad za leukocytami, 5 – poszerzenie luki i migracja wielu komórek nowotworowych, 6 – migracja komórek nowotworowych w ECM

tynazy i heparynazy aż o 50% (ryc. 2). Komórki nowotworowe czekają jakby na taką okazję i szybko z niej korzystają (42).

Ważną rolę w migracji komórek spełniają metaloproteazy (MMP), tj. kolagenazy, żelatynazy i stromelizyny, przy czym należy zaznaczyć, że w komórkach nowotworowych ekspresja genów kodujących MMP nie jest stała, ale indukowana przez czynniki wzrostowe lub inne cytokiny (12, 41).

Kolagenazy dzieli się na interstycjalne (MMP-1), produkowane przez makrofagi i fibroblasty oraz kolagenazy neutrofilowe (leukocyty obojętne) – MMP 5 (16). Wzrost ich poziomu wykryto w wielu nowotworach, co ma świadczyć o stymulowaniu ich

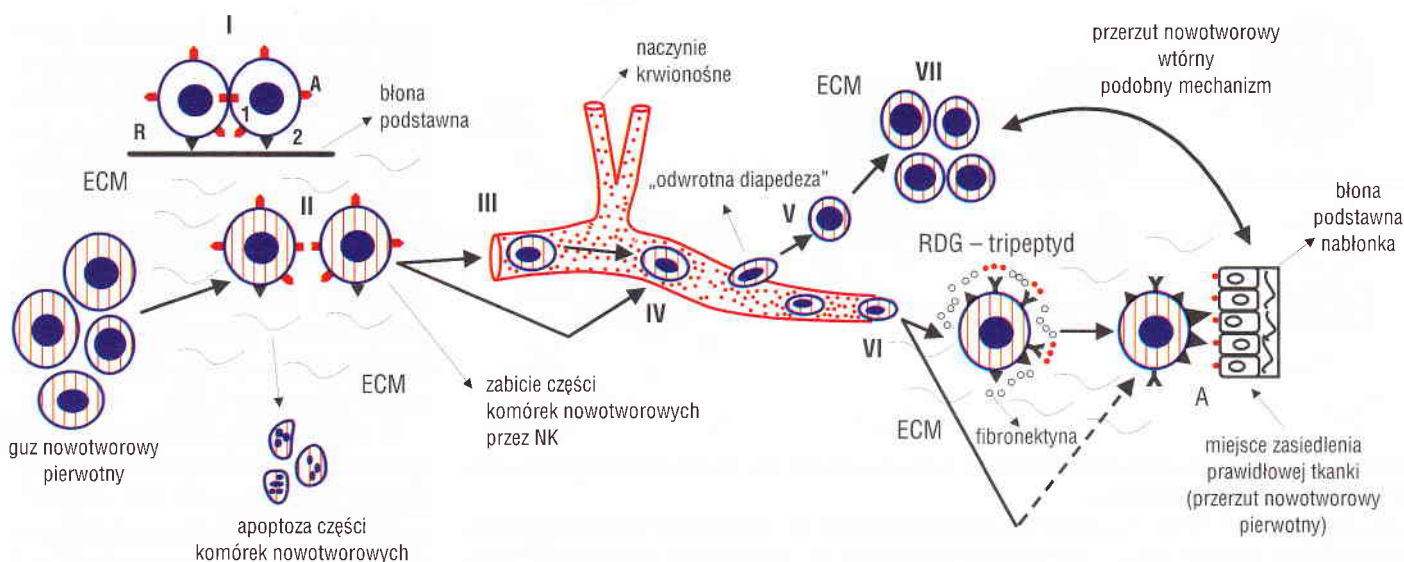
produkcji przez komórki guza (29). Komórki nowotworowe wytwarzają także żelatynazy (A i B), o czym już wspomniano, a poziom tych enzymów jest skorelowany ze stopniem inwazyjności komórek (49). Kolagenazy rozkładają nie tylko kolagen, ale także elastynę i fibronektynę. Metaloproteazy są proenzymami i muszą być aktywowane przez urokinazy i plazminy (12).

Z obecnością MMP wiąże się także istnienie w organizmie czynników hamujących ich działalność, czyli TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase) typu 1 i 2 (39, 44). Czynniki te chronią ustrój przed inwazją komórek nowotworowych, jak również mają zdolność blokowania tworzenia się nowych naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu (neoangiogenaza).

Adhezja komórek jest nie tylko warunkiem *sine qua non* ich wzrostu, ale głównie proliferacji. Brak proliferacji obserwuje się w komórkach *in vitro*, gdy nie przylegają one do jakiejś powierzchni. Jest to zjawisko tzw. zależności od zakotwiczenia (anchorage dependence) (13, 46). Pośredniczą w tym cząsteczki usadowione na powierzchni komórki, czyli integryny, mające także swój udział w wiązaniu się ich z ECM. Komórki nie przylegające do siebie przestają rosnąć, gdyż białko ich jądra, czyli kompleks cykliny E z CDK 2, regulujące wzrost i podział komórki, staje się mniej aktywne (43). Nie dotyczy to komórek nowotworowych, które mnożą się niezależnie od zakotwiczenia (anchorage independence).

Kompleks cykliny E z CDK 2 jest w nich aktywny, niezależnie czy komórki przylegają do siebie, czy też nie. Przyczyna tego zjawiska nie jest jeszcze dobrze poznana, ale uważa się, że ważną rolę odgrywają tu onkogeny komórkowe (38). Wykazano także, że komórki takie mogą częściowo ginąć śmiercią samobójczą na drodze apoptozy (47).

Apoptoza zapoczątkowana jest wzbudzeniem kaskady fosforylacji białek, polegającej na tym, że sfingomielina – fosfolipid błony komórek może być przeciwny przez sfingomielinazę i powstaje fosfocholina oraz ceramid, który uczynnia białkową kinazę jako informator II rzędu komórki (21, 34). To ona pobudza



**Ryc. 3. Wędrowka komórki nowotworowej z guza pierwotnego i powstanie ogniska przerzutowego pierwotnego i wtórnego**

Objaśnienia: 1 – adhezja komórki do komórki, 2 – adhezja komórki do ECM dzięki cząsteczkom adhezyjnym (A) i receptorom (R), I – komórki prawidłowe, II – komórki nowotworowe uwolnione z guza pierwotnego (utrata połączeń A i R), III – wniknięcie komórki do światła naczyń i bierny transport, IV – wnikanie k. nowotworowej do światła naczynia, V – migracja komórki z naczynia do ECM, VI – wędrowka komórki z prądem krwi i powstanie przerzutu wtórnego, VII – przerzut wtórny, RGD – arginina-glicyna-asparagina, NK – naturalni zabójcy

wspomnianą kaskadę fosforylacji. Z kolei powstanie ceramidu wzbudza czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor – TNF), FasL, czyli CD 95, promienie jonizujące i inne czynniki. Czynniki te doprowadzają do aktywacji genów kodujących swoiste białka, stymulujące apoptozę. Są to geny ced-3 i fas. Gen ced-3 koduje białko ICE (interleukin 1 beta-converting enzyme), a gen fas – receptor wiążący glikoproteinę, czyli CD 95. Natomiast genem hamującym apoptozę jest gen bcl-2, szczególnie aktywny w białaczkach (21).

Zjawisko apoptozy skorelowane jest z istnieniem telomerów (2, 38). Są one obecne na końcach ramion chromosomów i odgrywają rolę zegara biologicznego, odmierzającego czas życia komórek i odpowiadają za stabilność DNA. Wiadomo, że prawie wszystkie komórki dzielą się oraz odradzają i w trakcie kolejnych podziałów telomery systematycznie skracają się o 6 nukleotydów. W efekcie po osiągnięciu przez nie odpowiedniego rozmiaru, komórka przestaje się dzielić i obumiera.

Zauważono, że komórki organizmów długo żyjących dokonują więcej podziałów niż ma to miejsce u krótko żyjących, np. u człowieka (ok. 70), chociaż liczba „6” skracanych nukleotydów w telomerach jest w naszym organizmie dużo większa i wynosi 250-1500. Po 70-krotnym podziale komórka uzyskuje informację, że wyczerpała już swój limit podziałów i nie wolno jej dalej kontynuować tego procesu. W przypadku zignorowania przez komórkę otrzymanego sygnału następują dalsze jej podziały i powstaje nowotwór, czyli twór „nieśmiertelny” (immortalize).

Okazało się, że komórka nowotworowa ma enzym – telomerazę, który powoduje, że telomery nie skra-

cają się, a komórka może stale się dzielić. Przyjmuje się, że wspomniany enzym jest także w komórkach prawidłowych i nowotworach niezłośliwych, ale pozostaje w formie nieczynnej. Gdyby można było uaktywnić ten enzym, co już częściowo się udało lub wprowadzić go sztucznie do komórki, to telomery przestałyby się skracać, a komórka teoretycznie dzieliłaby się stale. Prowadzi to do odmłodzenia się komórek, a więc proces starzenia byłby zatrzymany, chociaż niebezpieczeństwo niekontrolowanej proliferacji może w każdej chwili grozić powstaniem nowotworu.

Onkogeny kodują białka, które wysyłają do jądra fałszywy sygnał informacyjny, że komórka przylega właściwie, mimo że jest właśnie odwrotnie, efektem czego jest brak hamowania wzrostu i apoptozy. Wyosobniono geny wirusowe, powodujące transformację komórek zakażonych oraz ich homologów komórkowych, czyli protonkogeny (10). Onkogeny to geny, których aktywacja doprowadza do transformacji nowotworowej, natomiast antyonkogeny, czyli geny supresorowe to geny działające recesywnie, utrata których prowadzi do złośliwej transformacji (8, 28). Obie wymienione grupy genów, tj. onkogeny i antyonkogeny, biorą udział w różnych zaburzeniach genetycznych, efektem których jest inicjacja i progresja nowotworowa (32).

Onkogeny wywodzą się z protonkogenów, biorących udział w regulacji procesów wzrostu i różnicowania prawidłowej komórki, natomiast w procesie nowotworzenia mogą być aktywowane, np. w wyniku mutacji czy amplifikacji (4, 33). Onkogeny dzieli się na grupy zdeterminowane funkcjonalnie, tj. na: a – czynniki wzrostu i ich receptory (EGFR, PDGF, Tgf, IL-2, sis), b – kinazy proteinowe (erb B, neu), c – białka wiążące

nukleotydy guaninowe, czyli białka G (ras), d – onkogeny jądrowe (myc, fos, p 53) oraz inne, np. bcl-2 (7, 9).

Identyfikacja cząsteczek adhezyjnych służąca komórkom nowotworowym, a także leukocytom do znalezienia odpowiedniej do zasiedlenia tkanki, została potwierdzona doświadczalnie (6). Po inkorporowaniu fragmentów DNA do genu fagowego, kodującego białko powierzchniowe, fag może wykazać na swej powierzchni odpowiedni peptyd. Podanie myszom różnych wirusów powoduje wiązanie się go z odpowiednim peptydem. Zauważono jednocześnie, że do fibronektyny i innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej wszystkie komórki przylegają w miejscu zawierającym tylko 3 aminokwasy, tj. wspomniane RGD (ryc. 3). Ten tripeptyd działa jak przynęta, wiążąc się z receptorami komórkowymi dla fibronektyny i tym sposobem blokuje ich przyleganie do ECM. Np. podanie myszom komórek czerniaka donaczyniowo wraz z RGD zapobiega osiedlaniu się ich w płucach, jak również guz przeszczepiony podskórnie nie daje przerzutów. Ponadto zauważono, że cząsteczki zawierające RGD hamują neoangiogenezę, a więc upośledzają mikrokrajenie nowotworu (8, 26, 46).

Ważną rolę w procesie powstania przerzutów odgrywa heterogenność nowotworu, odzwierciedlająca poliklonalne jego pochodzenie, a także jest następstwem nabytych mutacji w czasie podziałów niestabilnych genetycznie komórek pochodzenia monoklonalnego (5). Heterogenność wiąże się ściśle z progresją nowotworu, tj. nabyciem w czasie rozwoju cech coraz bardziej złośliwych, czyli zwiększonej szybkości wzrostu, naciekania i dawania przerzutów. Choć jest to cecha charakterystyczna dla wszystkich nowotworów złośliwych, to jedne z nich dają przerzuty wcześniej niż inne. Heterogenność i progresja nowotworów warunkują niepewność klinicznego rokowania (15).

### **Wędrownica komórki nowotworowej przez ścianę naczynia krwionośnego**

Następną barierą do pokonania, po sforsowaniu ECM, jest dla komórki nowotworowej przekroczenie błony podstawnej naczynia krwionośnego, na ogół obecnego w pobliżu nowotworu (ryc. 3). Waskularyzacja nowotworu jest bowiem konieczna dla jego rozwoju.

Angiogeneza obejmuje takie procesy jak: hydroliza błon podstawnych nabłonka i śródbłonka, zaburzenia hamowania kontaktowego i dysocjacja strukturalna tkanki, rozplem multipotencjalnych komórek mezenchymalnych i ich różnicowanie w kierunku naczynia krwionośnego, tworzenie połączeń między komórkami śródbłonka i wytworzenie błony podstawnej naczynia, tworzenie światła naczyń, a także angioblastów (5). Należy także zaznaczyć, że cała sieć naczyniowa nowotworu nie jest wytworem guza, ale pochodzi z otaczającej go tkanki. Młode naczynia w nowotworze pochodzą wyłącznie z odnóg naczyń włosowatych,

przedwłosowatych i zawłosowatych gospodarza. W przeszczepie nowotworu najpierw powstaje krajenie żyłne i dominuje ono w trakcie ciągłego rozwoju łożyska naczyniowego. Oznacza to, że odpływ krwi jest sprawniejszy niż jej dopływ. Prawdopodobnie jest to wynik braku sieci naczyń chłonnych w obrębie nowotworów zarówno spontanicznych, jak i przeszczepialnych. Obliczono, że w nowotworach istnieje co najmniej osiem układów mikroangiograficznych, pojawiających się z różną częstością w zależności od typu histologicznego guza (10). W końcu należy dodać, że naczynia nowotworowe są pozbawione unerwienia, a elementy kurczliwe są bardzo nieliczne lub w ogóle nie występują (20).

Kluczową rolę w neowaskularyzacji nowotworu odgrywają komórki śródbłonka, które *in vitro* po okresie wzrostu jednowarstwowego, mogą tworzyć kielkowane wypustki pod i nad jednolitą warstwą ściany. Przypomina to fazy angiogenezy nowotworowej i wybitnie nasila się po działaniu aktywatorów cyklicznej adenylowej i wzroście stężenia cAMP w środowisku hodowlanym. Angiogeneza nowotworowa pobudzana jest przez TAF (tumor angiogenesis factor), będący produktem różnych nowotworów złośliwych zarówno u ludzi jak i zwierząt. Ostatnio przyjmuje się, że stanowi on produkt rozpadu tkanek, podobny do innych substancji wyzwalających waskularyzację ran, obszarów pozawałowych itp. (45).

Do innych czynników wpływających na angiogenezę zalicza się nabłonkowy czynnik angiogenezy (EAF – epithelial angiogenesis factor), który jest aktywowany przez gen zdrowej komórki mezenchymalnej, doprowadzając do jej różnicowania się w śródbłonek. W nowotworach złośliwych EAF jest wydzielany stale, i w sposób ciągły aktywuje odpowiedni gen tychże komórek, natomiast w przypadku rozrostów naprawczych aktywacja ta zachodzi okresowo. Np. w tkance chrzęstnej, tj. pozbawionej fizjologicznie naczyń, stwierdzono czynnik „antyangiogenezy”, hamujący nowotworzenie (23). Właściwości pobudzania angiogenezy ma heparyna, natomiast jej antagonistą prostamina, hamuje ten proces, a nawet zatrzymuje wzrost nowotworu (10).

Komórki nowotworowe po przedostaniu się do światła naczynia krwionośnego mogą zostać tu zdiagnozowane dzięki obecności na ich powierzchni cząstek markerowych, pozwalających na precyzyjne określenie jaki jest rodzaj nowotworu i z jakiej tkanki on się wywodzi. Czułymi testami jest np. metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) oraz przeciwciała monoklonalne. Ma to doniosłe znaczenie praktyczne, gdyż wykazanie komórek nowotworowych we krwi znacznie wyprzedza objawy kliniczne choroby, tj. symptomy procesu nowotworowego. Ponadto jest to sygnał dla celowości immuno- i/lub radioterapii po zabiegu usunięcia guza nowotworowego (1).

Jednocześnie należy zaznaczyć, że prawdopodobnie jedna tylko na 10 tysięcy komórek nowotworowych, uwolniona z pierwotnego ogniska nowotwo-

rowego, przeżyje i skolonizuje inną tkankę (13). Doświadczalnie wykazano, że tylko od 0,1 do 1% komórek podanych dożylnie przeżywa 24 godz., gdyż pozostałe giną wskutek obrony immunologicznej, zabite przez aktywowane makrofagi i komórki NK (natural killers). Podobnie chorzy, u których w czasie operacji pierwotnego ogniska nowotworowego stwierdzono we krwi komórki nowotworowe, przeżywają od 5 do 9 lat po zabiegu (43, 48). Takie komórki nowotworowe nazywa się klonogennymi, gdyż w wyniku ich rozmnażania powstaje klon, czyli jednorodna genetycznie populacja komórek. Tym tłumaczy się, że przerzuty mają znacznie bardziej jednolity skład komórkowy niż pierwotne guzy nowotworowe.

Pokonanie bariery naczyniowej i skolonizowanie tkanki okolicznej lub w odległym narządzie, to kolejna, trudna bariera dla komórki nowotworowej. Uważa się, że komórki te, aby przeżyć muszą ściśle przylgnąć do śródbłonna naczyń krwionośnych. Pierwszym miejscem zatrzymania komórki są naczynia włosowate, a to ze względu na znaczne wymiary tych komórek.

Kierunek przepływu krwi determinuje tworzenie się przerzutów nowotworowych, tzn. pierwszym korytem naczyniowym spływu krwi z różnych narządów są naczynia płucne, a dla zlewiska jelit – naczynia wątroby. Stąd przerzuty spotyka się głównie w płucach i w wątrobie.

### **Rola trombocytów w powstawaniu przerzutów nowotworowych**

Rozmiary komórek nowotworowych mogą ulec zwielokrotnieniu po agregacji na ich powierzchni trombocytów oraz fibryny w procesie krzepnięcia krwi. Takie wiązanie się z płytkami krwi zwiększa lepkość komórek nowotworowych, a także pozwala im dłużej przeżyć dzięki czynnikom wzrostu trombocytów (5).

Trombocyty zawierają ziarnistości alfa, z których uwalniane są: fibrynogen, fibronektyna, trombospondina, czynniki wzrostu (PDGF – platelet derived growth factor), czynniki antyheparynowe (PF 4, LA-PF 4), beta- tromboglobulina, czynnik bakteriobójczy i czynnik von Willebrandta, ziarnistości o dużej gęstości, z których uwalnia się: serotonina, histamina, ATP, ADP oraz jony potasu i wapnia, a z lizosomów – proteazy i glikozydazy (5, 22).

Obecność komórek nowotworowych w organizmie powoduje zaburzenia procesu krzepnięcia krwi, manifestujące się zużyciem osoczowych czynników krzepnięcia, aktywacją płytek i przekształceniem większej ilości fibrynogenu w fibrynę (44). Np. z mięsaka Walkera 256 i komórek białaczki szczurów izolowano substancje o cechach tromboplastycznych, które po dostaniu się do krążenia powodują aktywację kaskadowego układu krzepnięcia i wytworzenia enzymu trombiny indukującego agregację płytek i ich sekrecję. Inne nowotwory wzmagają działanie stymulatorów płytek, np. ADP, serotoniny (45).

Powstanie agregatów płytowych wokół komórek nowotworowych zwiększa rozmiary tworzących się zatorów, a sekrecja zmagazynowanych związków, np. białek zasadowych, czynnika chemotaktycznego, czynnika zwiększającego przepuszczalność, może ułatwić adhezję tych komórek do ściany naczynia, migrację poprzez naczynie i rozrost w ECM (32). W sytuacji zwolnienie ruchu lub adhezji przez komórkę nowotworową gromadzą się wokół niej leukocyty.

Wzrost przepuszczalności naczynia uzależniony jest także od prostaglandyny PGE<sub>2</sub>, syntetyzowanej z arachidonu w aktywowanych trombocytach, a chemotaksję leukocytów wywołuje kwas hydroksyeikozotetranowy, powstający z arachidonianu na drodze przemiany aktywowanej lipooksygenazą (34). Istotną rolę w tworzeniu przerzutów nowotworowych pełni również czynnik PDGF, który powoduje proliferację fibroblastów i miocytów oraz jest mitogenem dla komórek guza. Ma on sekwencję zbliżoną do sekwencji PDGF wytworzonego przez komórki transformowane wirusem.

Trombospondina – białko z ziarnistości alfa trombocytów, umożliwia tworzenie się agregatów składających się nie tylko z samych płytek, ale i komórek nowotworowych. Ponadto, łącząc się z fibryną, umacnia skrzep zatrzymujący komórki nowotworowe. Z kolei enzymy lizosomalne, tj. glikozydazy i proteazy, modyfikują powierzchniowe glikoproteiny, co ułatwia interakcję między trombocytami a komórką nowotworową (47). Ponadto glikozydazy i proteazy płytek mogą współdziałać z enzymami pochodzącymi z komórek nowotworowych np. z czerniaka B 16 izolowano endoglikozydazę degradującą siarczan heparanu (40).

### **Aktywatory plazminogenu (PA) w inwazji komórek nowotworowych**

PA są serynowymi proteinami hydrolizującymi wiązanie peptydowe między arginina i walina (Arg – Val) w plazminogenu, w wyniku czego tworzy się proteinaza-serynowa plazmina, zasadniczy enzym powodujący rozpuszczanie fibryny i fibrynogenu *in vivo* (20, 39). PA dzielą się na urokinazowe (uPA) i tkankowe (tPA).

Aktywacja plazminogenu to jeden z ważniejszych, indukowanych, zewnątrzkomórkowych systemów proteolitycznych, związanych z kontrolą interakcji komórki nowotworowej z ECM (5). Wzrost poziomu PA spotyka się w komórkach nowotworowych, m.in. w raku płuc czy raku sutka, zwłaszcza aktywatora typu urokinowego (w ok. 90%). Zjawisko to obserwuje się zarówno w przypadku transformacji wywołanej cancerogenami chemicznymi, jak i onkowirusami, np. wirusem mięsaka Rousa (12). Wzrost aktywności fibrynolitycznej komórek następuje już po 2 tyg. działania, czyli wyraźnie wcześniej niż można zaobserwować zmiany nowotworowe (47).

Komórki nowotworowe wydzielają prawdopodobnie do przestrzeni pozakomórkowej większe ilości PA niż komórki normalne, co ułatwia im zdolność do mi-

gracji i formowania się przerzutów. Stąd aktywatory plazminogenu mogą stymulować wzrost i szerzenie się nowotworów. Mogą także miejscowo produkować znaczne ilości plazminy, a ponadto aktywować kolagenazę – enzym, który obok innych proteaz stymuluje wzrost i inwazję nowotworów. Niezależnie od tego, układ aktywator – plazminogen/plazmina może odgrywać rolę mediatora w inwazji i rozprzestrzenianiu się nowotworów, poprzez modyfikowanie powierzchni komórki i hydrolizę złogów fibryny otaczających guz (14, 41).

### Podsumowanie

Mechanizm przerzutowania nowotworów jest bardzo złożony i stanowi wypadkową wielu procesów, tj. nadmiernej proliferacji komórek, czynników lokomocji komórek, działania enzymów trawiących ECM, angiogenezy, sygnalizacji komórkowej oraz regulacji funkcji genów związanych z indukcją tych składowych i receptorów adhezyjnych. W pewnym okresie rozwoju nowotworu następuje zanik cząsteczek adhezyjnych, co umożliwia uwolnienie się i migrację komórek nowotworowych do najbliższego naczynia. Komórki takie muszą eksponować czynne receptory pozwalające im na adhezję do śródbłonna i następnie przekroczenie ściany naczynia. W nowym środowisku, tj. w ECM, aktywność cząsteczek adhezyjnych ulega kolejnej zmianie związanej z proliferacją komórek tworzących przerzut nowotworu. Tym tłumaczy się zmienność fenotypową komórek tego samego nowotworu pod względem ekspresji receptorów adhezyjnych (2).

Niestety mimo znacznych osiągnięć mechanizm molekularny powodujący, że miejscowo rosnący nowotwór tworzy przerzuty nie jest jeszcze w pełni poznany. Stąd badania nad modyfikacją adhezji komórkowej, mogącej między innymi zapobiegać tworzeniu się przerzutów, muszą być wielokierunkowe, aby doprowadzić do efektywnej blokady kaskady metastatycznej na różnych jej etapach (16). Coraz lepsze poznanie czynników i mechanizmów zaangażowanych w procesie przerzutowania budzi oczekiwaną nadzieję na pełny sukces w tym zakresie.

### Piśmiennictwo

1. Akiyama S. K., Olden K., Yamada K. M.: *Cancer Res.* 3, 179, 1996.
2. Allen P. D., Bustin S. A., Newland A. C.: *Blood* 7, 63, 1993.
3. Barbera-Guillem E., Smith I., Weiss L.: *J. Cancer* 54, 880, 1993.
4. Bernstein L. D., Liotta L. A.: *Curr. Op. Oncol.* 6, 106, 1994.
5. Brooks P. C., Clark R. A. F., Chares D. A.: *Science* 264, 569, 1994.
6. Busso N., Masur S. K., Lazega D., Waxman S., Ossowski L.: *J. Cell Biol.* 125, 259, 1994.
7. Cowen S. E., Bibby M. C., Double J. A.: *Acta Oncol.* 34, 357, 1995.
8. Doolittle R. F., Hunhappiller M. W., Hood L. E., Deare S. G., Robins K. C., Aaronson S. A., Antonides H. N.: *Science* 224, 275, 1983.
9. Eastman A.: *Cancer Cells* 2, 275, 1990.
10. Gennett I. N., Cavenee W. K.: *Brain Pathol.* 1, 15, 1994.
11. Górski A.: *Immunol. Today* 15, 251, 1994.
12. Grębička L.: *Kosmos* 44, 405, 1995.
13. Groniowski J., Kuś S. (pod red.): *Podstawy patomorfologii*. PZWL, 1991.
14. Hart I. R., Goode N. T., Wilson R. E.: *Biochem. biophys. Acta* 65, 989, 1989.
15. Hockenber D. M., Oltvai Z. N., Yin X. M., Milliman C. L., Korseneyer S. J.: *Cell* 75, 241, 1993.

16. Janiak M. K.: *Centr. Europ. J. Immunol.* 21, 63, 1996.
17. Kanemoto T., Reich R., Royce L.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 87, 2279, 1990.
18. Keleti J., Queezado M. M., Abaza M. M., Raffeld M., Tsokos M.: *Am. J. Path.* 149, 143, 1996.
19. Kennedy A. R.: *Cancer Res.* 14, 185, 1992.
20. Klominek J., Robert K. H., Sundovist K. G.: *Cancer Res.* 53, 4376, 1993.
21. Kubota T.: *J. Cell Bioch.* 56, 4, 1994.
22. Lane D. A.: *Nature, Lond.* 358, 15, 1992.
23. Laurent T. C., Fraser R. E.: *FASEB J.* 6, 2397, 1992.
24. Lee G. M., Jonstone B., Jacobson K., Caterson B.: *J. Cell Biol.* 123, 1899, 1993.
25. Mangel W. F.: *Nature, Lond.* 344, 488, 1990.
26. Maye R., Brewton R. G.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 883, 1993.
27. Murray C.: *Nature Med.* 1, 117, 1995.
28. Oliner J. D., Pietenpol J. A., Monad J., Chen J., Romochi C., Levine A. J.: *Oncogene* 8, 2353, 1993.
29. Ossowski L.: *J. Cell Biol.* 48, 150, 1992.
30. Ponta H., Sleeman J., Herrlich P.: *Biochem. biophys. Acta* 1198, 1, 1994.
31. Rayen J. J., Prochownik E., Gottlieb C. A., Apel I. J., Merino R., Nuenze G., Clarke M. F.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 91, 5878, 1994.
32. Ruoslahti E., Reed J. C.: *Cell* 4, 477, 1994.
33. Rusciano D., Burger M. W.: *Cancer Res.* 14, 184, 1992.
34. Sikora E.: *Acta bioch. pol.* 40, 383, 1993.
35. Singh R. K., Tsen R., Radinsky R.: *Clin. Exp. Metastasis* 15, 140, 1997.
36. Stetler-Stevenson W. G., Aznooorian S., Liotta L. A.: *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 541, 1993.
37. Togo S., Shimada H., Kubota T., Moussa A. R., Hoffman R. M.: *Cancer Res.* 55, 681, 1995.
38. Tsubata T., Wu J., Honjo T.: *Nature, Lond.* 364, 645, 1992.
39. Tryggvason K.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 877, 1993.
40. Usmani B. A.: *Pathology* 61, 109, 1993.
41. Wang X., Fu X., Hoffmann R. M.: *Anticancer Res.* 12, 1399, 1992.
42. Walsh D. R., Schissel D. J., Royce L.: *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 87, 2270, 1990.
43. Williams A. F., Barclay A. N.: *An. Rev. Immunol.* 6, 381, 1988.
44. Xiang J., Lathti J. M., Green J., Kidol V. J.: *J. Biol. Chem.* 269, 1578, 1994.
45. Yamada Y., Kleinman H. K.: *Curr. Op. Cell Biol.* 4, 819, 1992.
46. Yashiro M., Chung Y. S., Nishimura S., Inoue T., Sowa M.: *Clin. Exp. Metastasis* 14, 43, 1996.
47. Yurchenco P. D., Cheng T. S., Clognats I. H.: *J. Cell Biol.* 117, 1119, 1992.
48. Zimmerman G. A., Prescott S. W., McIntyre T. M.: *Immunol. Today* 13, 93, 1992.
49. Zucker S., Lysik R. M., Zarrabi M. H., Molle U.: *Cancer Res.* 53, 140, 1993.

Adres autora: prof. zw. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław

**SUMPTION K. J., ARADOM G., LIBEAU G., WILSMORE A. J.: Wykrycie wirusa pomoru małych przeżuwaczy w wymazach z worka spojówkowego kóz metoda immunofluorescencji pośredniej. (Detection of peste des petits ruminants virus antigen in conjunctival smears of goats by indirect immunofluorescence). *Vet. Rec.* 142, 421-424, 1998 (16)**

Pomór małych przeżuwaczy atakuje kozy i owce w Zachodniej i Północno-Zachodniej Afryce, na Środkowym Wschodzie i subkontynencie indyjskim. Antygen wirusa (PPRV) tej choroby wykryto w komórkach nabłonka worka spojówkowego kóz we wczesnym oraz w późnym okresie rozwoju choroby. W badaniach wykorzystano odczyn immunofluorescencji pośredniej oraz przeciwciała monoklonalne dla PPRV. Badania przeprowadzono w ognisku choroby w Erytrei. Odczyn immunofluorescencji pośredniej okazał się znacznie czulszym testem aniżeli barwienie metodą Giemzy preparatów z worka spojówkowego na obecność syncytiów. W odczynie immunofluorescencji uzyskano 63% wyników dodatnich zaś w metodzie badania na obecność syncytiów 40% wyników pozytywnych. Test immunofluorescencji pozwala na odróżnienie zakażenia wywołanego przez wirus PPRV od zakażenia wirusem księgosuszu.