

## ИНТРАВАЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК – ВАЖНЕЙШЕЕ ЗВЕНО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

### Обзор

© 2019 М.В. Завьялова<sup>1,2</sup>, Е.В. Денисов<sup>1</sup>, Л.А. Таширева<sup>1\*</sup>, О.Е. Савельева<sup>1</sup>,  
Е.В. Кайгородова<sup>1,2</sup>, Н.В. Крахмаль<sup>1,2</sup>, В.М. Перельмутер<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный  
исследовательский медицинский центр РАН, 634009 Томск, Россия;  
электронная почта: tashireva@oncology.tomsk.ru

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 634050 Томск, Россия

Поступила в редакцию 20.02.2019

После доработки 10.04.2019

Принята к публикации 10.04.2019

В настоящем обзоре обсуждаются современные представления о механизмах интравазации опухолевых клеток в кровеносные и лимфатические сосуды. Интравазация – ключевой этап в метастазировании злокачественных новообразований, в ходе которого опухолевые клетки, проходя через стенку сосудов, попадают в циркуляцию, становясь циркулирующими опухолевыми клетками и потенциальными метастатическими «семенами». Понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе интравазации, является критически важным для разработки терапевтических стратегий предотвращения метастатической болезни. В качестве прототипов интравазации опухолевых клеток рассматривается выход зрелых тимоцитов в циркуляцию и дендритных клеток в регионарные лимфатические узлы. В условиях патологии прототипом данного процесса служит реверсная трансэндотелиальная миграция лейкоцитов в кровь из очагов воспаления с участием лиганд-рецепторного взаимодействия сфингозин-1-фосфата и его рецепторов. Отдельно обсуждаются механизмы интравазации, как связанные с инвазией, так и не зависящие от нее. Отмечается место опухолевой мезенхимальной и амёбовидной инвазии в интравазации, а также роль в этом процессе неоангиогенеза и ремоделирования сосудов. Особое внимание уделено участию макрофагов в интравазации через паракринную передачу сигналов CSF1–EGF (колониестимулирующий фактор 1 – эпидермальный фактор роста) и механизм, опосредованный ТМЕМ (Tumor MicroEnvironment of Metastasis – метастатическое микроокружение опухоли). Дополнительно рассматривается несколько механизмов интравазации: интравазация благодаря окружению кластеров клеток опухоли эндотелием, вследствие чего они попадают в сосудистое русло; кооперативная интравазация, при которой опухолевая клетка, не обладающая инвазивными свойствами, попадает в кровоток вслед за инвазивной клеткой опухоли; интравазация, связанная с васкулогенной мимикрией, которая проявляется в формировании каналов, высланных клетками опухоли, подобно эндотелию. В обзоре обращается внимание на возможность существования иных, не обсуждаемых в литературе, механизмов интравазации опухолевых клеток. В заключение подчеркивается важность разработки адресных терапевтических стратегий, препятствующих интравазации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** интравазация, инвазия, гематогенное метастазирование, карциномы, ТМЕМ, экстрюзия.

DOI: 10.1134/S0320972519070078

Термином «интравазация» обозначают проникновение опухолевых клеток в кровеносные (гематогенная интравазация) или лимфатические сосуды (лимфатическая интравазация) [1, 2].

Процессом, близким к интравазации, является экстравазация, т.е. выход клеток из сосудов в ткань. Однако интравазация и экстравазация имеют существенные различия. Интравазация

Принятые сокращения: VM – васкулогенная мимикрия; ДК – дендритные клетки; НАХТ – неоадьювантная химиотерапия; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; CSF1 – колониестимулирующий фактор 1; CSFR1 – рецептор колониестимулирующего фактора 1; CCL – С-хемокин; CCR – рецептор С-хемокина; CXCL – С-Х-хемокин; CXCR – рецептор С-Х-хемокина; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; ICAM1 – молекула межклеточной адгезии 1; MDSCs – миелоидные супрессоры костномозгового происхождения; MENA – актин-связывающий белок млекопитающих (actin binding protein Mammalian enabled); S1P – сфингозин-1-фосфат (Sphingosine-1-phosphate), S1PR – рецептор сфингозин-1-фосфата (Sphingosine-1-phosphate receptor); TGF-β – трансформирующий фактор роста β; TIE-2 – рецептор ангиопоэтина-2; ТМЕМ – метастатическое микроокружение опухоли (Tumor MicroEnvironment of Metastasis); VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов.

\* Адресат для корреспонденции.

происходит при условии формирования в опухолевых клетках инвадоподий, в то время как при экстравазации этот процесс не обязателен [3, 4]. В настоящем обзоре анализируется информация только об интравазации.

Интравазация опухолевых клеток является важным звеном в процессе метастазирования. Прямым следствием интравазации является появление циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), часть из которых может формировать метастазы, причем имеет значение их количество. Так, число ЦОК выше порогового значения (> 5 клеток в 7,5 мл крови) у больных метастатическим раком молочной железы ассоциировано с меньшими периодами выживаемости без прогрессии болезни и общей выживаемости [5].

### ПРОТОТИПЫ ИНТРАВАЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Процесс интравазации наблюдается не только при опухолевом процессе, но и в физиологических условиях. В качестве прототипа интравазации опухолевых клеток в процессе метастазирования можно рассматривать выход в кровеносные или лимфатические сосуды тимоцитов, дендритных клеток в коже и слизистых оболочках. В условиях патологии прототипом интравазации опухолевых клеток может служить трансэндотелиальная миграция лейкоцитов из очагов воспаления.

**Интравазация в тимусе и лимфоидных органах.** Имеются убедительные данные, свидетельствующие о том, что тимоциты покидают тимус и попадают непосредственно в кровь [6]. Выход тимоцитов из тимуса и лимфоцитов из лимфоидных органов происходит в результате взаимодействия сфингозин-1-фосфата (S1P — Sphingosine-1-phosphate) и его рецептора — S1PR (Sphingosine-1-phosphate receptor) [7]. S1P является биоактивным липидом, который регулирует разнообразные физиологические и иммунологические процессы путем взаимодействия с пятью рецепторами: S1PR1–S1PR5 [8, 9]. Благодаря высокому уровню S1P в крови и лимфе и быстрому разрушению в тканях у стенок сосудов создается градиент его концентрации.

S1PR1 экспрессируется зрелыми тимоцитами, благодаря чему они способны мигрировать по градиенту концентрации S1P, играющего роль хемокина [10]. Зрелые тимоциты концентрируются в кортико-медулярном соединении вблизи сосудов. Источником S1P в тимусе являются перициты [11]. Экспрессия S1PR1 свойственна Т- и В-лимфоцитам и необходима для

их выхода из лимфоидных органов, а также миграции зрелых Т-лимфоцитов из костного мозга и дальнейшей рециркуляции указанных клеток [12, 13].

Роль лиганд-рецепторного взаимодействия S1P–S1PR в интравазации была подтверждена с помощью иммуномодулятора FTY720 (финголимода), используемого для лечения рассеянного склероза. Будучи структурным аналогом сфингозина, FTY720 связывается с S1PR 1, 3 и 4-го типов на поверхности лимфоцитов, препятствуя тем самым их миграции по градиенту S1P и вызывая их секвестрацию в тимусе, вторичных лимфоидных органах и костном мозге [14].

**Интравазация дендритных клеток в коже и слизистых оболочках.** Прототипом интравазации опухолевых клеток в лимфатические сосуды может служить миграция дендритных клеток (ДК) из кожи и слизистых оболочек в регионарные лимфоузлы в процессе адаптивного иммуногенеза и воспаления.

ДК характеризуются функциональной гетерогенностью и пластичностью, позволяющей им индуцировать адаптивный иммуногенез разного типа. Например, эпидермальные клетки Лангерганса и дермальные CD14<sup>+</sup>-ДК при активации мигрируют в лимфатические узлы через афферентные лимфатические сосуды [15].

Созревание и инициация миграции ДК происходит под действием провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF- $\alpha$  и простагландина E2. Интравазация ДК в лимфатические сосуды кожи происходит при участии S1P, CCR7/CCL21, CXCR4/CXCL12, CX3CR1/CX3CL1, гепарин сульфата, CD31/CD99, VCAM-1, ICAM-1, LICAM-1, Plexin-A1/Sema3A и подоплатина [16]. Миграция ДК, как важный этап интравазации, также во многом обусловлена эффектами связывания S1P с разными типами рецепторов к этому лиганду [17, 18]. Зрелые ДК экспрессируют все пять форм S1PR. Миграция ДК костномозгового происхождения по градиенту S1P, например, возможна только при одновременном наличии у этих клеток двух типов рецепторов: S1PR1 и S1PR3. Взаимодействие S1P с S1PR1 вызывает активацию сигнального пути Rac/Cdc42 и образование филоподий и ламеллоподий, обеспечивая тем самым подвижность ДК. Кроме того, для миграции ДК костномозгового происхождения необходима одновременная S1PR3-опосредованная инициация сигнальных путей Rac/Cdc42 и Rho [19].

**Интравазация лейкоцитов из очага воспаления.** Имеются убедительные доказательства способности разных лейкоцитов возвращаться из очагов воспаления в циркуляцию. Этот феномен назван обратной трансэндотелиальной миг-

рацией. На модели *Danio rerio* показано, что прежде чем подвергнуться обратной трансэндотелиальной миграции, нейтрофильные лейкоциты взаимодействуют с макрофагами. При отсутствии макрофагов обратная трансэндотелиальная миграция нейтрофилов резко уменьшается [20].

В эксперименте *in vitro* с эндотелиальными клетками человека установлено, что нейтрофилы, способные к обратной миграции, имеют особый фенотип. Они экспрессируют высокие уровни свойственной эндотелию молекулы клеточной адгезии ICAM1 и низкие уровни рецептора хемокина CXCR1. Предполагают, что совокупность этих признаков можно рассматривать как маркер обратной трансэндотелиальной миграции. Нейтрофилы с фенотипом ICAM1<sup>high</sup>CXCR1<sup>low</sup> были обнаружены в периферической крови пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями [21].

Joly E. и Hudrisier D. (2003) предположили, что наличие ICAM1 на поверхности нейтрофильных лейкоцитов в процессе обратной трансэндотелиальной миграции может быть обусловлено трогицитозом – захватом фрагмента мембраны эндотелиальной клетки с ICAM1 [22]. Необходимо проверить, могут ли ICAM1<sup>high</sup>CXCR1<sup>low</sup> являться универсальными маркерами интравазации как нейтрофильных лейкоцитов, так и опухолевых клеток. Интересно выяснить, может ли механизм трогицитоза реализоваться и в опухолевых клетках.

Свойствами обратной трансэндотелиальной миграции обладают также лимфоциты, макрофаги и ДК. В обзоре Burn T. и Alvarez J.I. (2017) приводятся данные о том, что моноциты, способные и не способные к обратной трансэндотелиальной миграции, различаются функционально. Моноциты, осуществляющие обратную трансэндотелиальную миграцию, могут дифференцироваться в ДК, которые участвуют в дифференцировке наивных Т-лимфоцитов. Моноциты, остающиеся в ткани, могут дифференцироваться в макрофаги, но не в ДК [23].

Если приспособительное значение обратной трансэндотелиальной миграции нейтрофилов из очагов хронического воспаления можно поставить под сомнение, то обратная трансмиграция макрофагов, способных к дифференцировке в ДК, определено целесообразна. По-видимому, благодаря способности к обратной трансэндотелиальной миграции макрофаги, захватившие антиген в очаге воспаления и достигнувшие лимфоидных органов, могут уже в качестве ДК поддерживать иммуногенез против соответствующих патогенов.

## ИНТРАВАЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, СВЯЗАННАЯ С ИНВАЗИЕЙ

Интравазация опухолевых клеток в лимфатические сосуды осуществляется с большей легкостью, чем в кровеносные. Это обусловлено отсутствием в лимфатических сосудах, в отличие от кровеносных, плотных межэндотелиальных контактов, а также более медленным, по сравнению с кровью, током лимфы. Когда опухолевые клетки проникают в лимфатические сосуды, они сначала оказываются в сторожевых лимфатических узлах (располагающихся ближе всего к месту локализации первичной опухоли), которые становятся первыми участниками метастазирования, затем достигают грудного лимфатического протока и попадают в венозную систему кровообращения. Sleeman et al. (2011) обсуждают возможность проникновения опухолевых клеток в кровеносные сосуды в самих лимфоузлах. При этом авторам не удалось установить связь между последовательным вовлечением лимфатических узлов в процесс лимфогенного метастазирования и появлением гематогенных метастазов [24]. В связи с этим предполагают, что гематогенные метастазы могут возникать за счет прямой интравазации опухолевых клеток в кровеносные сосуды – как в первичной опухоли, так и в лимфатических узлах [2].

При изучении механизмов интравазации представляется полезным различать две фазы: 1) инвазивное продвижение опухолевых клеток до стенки сосуда, 2) проникновение клетки через стенку сосуда. Инвазия в периваскулярную область происходит в ответ на хемотаксические сигналы, источником которых являются клетки микроокружения опухоли. Имеются экспериментальные данные, позволяющие говорить о том, что для интравазации опухолевых клеток в кровеносные сосуды необходимо переключение «коллективного» механизма инвазии на «индивидуальный». На модели аденокарциномы молочной железы крысы MTLn3E было продемонстрировано, что коллективная инвазия может сопровождаться развитием лимфогенных, но не гематогенных метастазов. Напротив, интравазация непосредственно в кровеносные сосуды осуществляется скорее одиночными клетками опухоли, способными к индивидуальному типу инвазии. Механизм переключения коллективной инвазии опухолевых клеток на индивидуальную реализуется благодаря TGF- $\beta$ -опосредованной экспрессии Smad4, EGFR, Nedd9, M-RIP, FARP и RhoC [25].

Первая фаза интравазации одиночными клетками осуществляется при участии мезенхимного механизма инвазии, благодаря которому опухоле-

вая клетка разрушает плотные грубоволокнистые участки межклеточного матрикса, или амебовидного механизма инвазии, посредством которого клетка опухоли движется в рыхлом межклеточном матриксе. Причем высокая пластичность биологических свойств позволяет одной и той же опухолевой клетке многократно менять механизмы движения [26, 27]. Если для первой фазы инвазивные свойства обязательны, то для второй – нет.

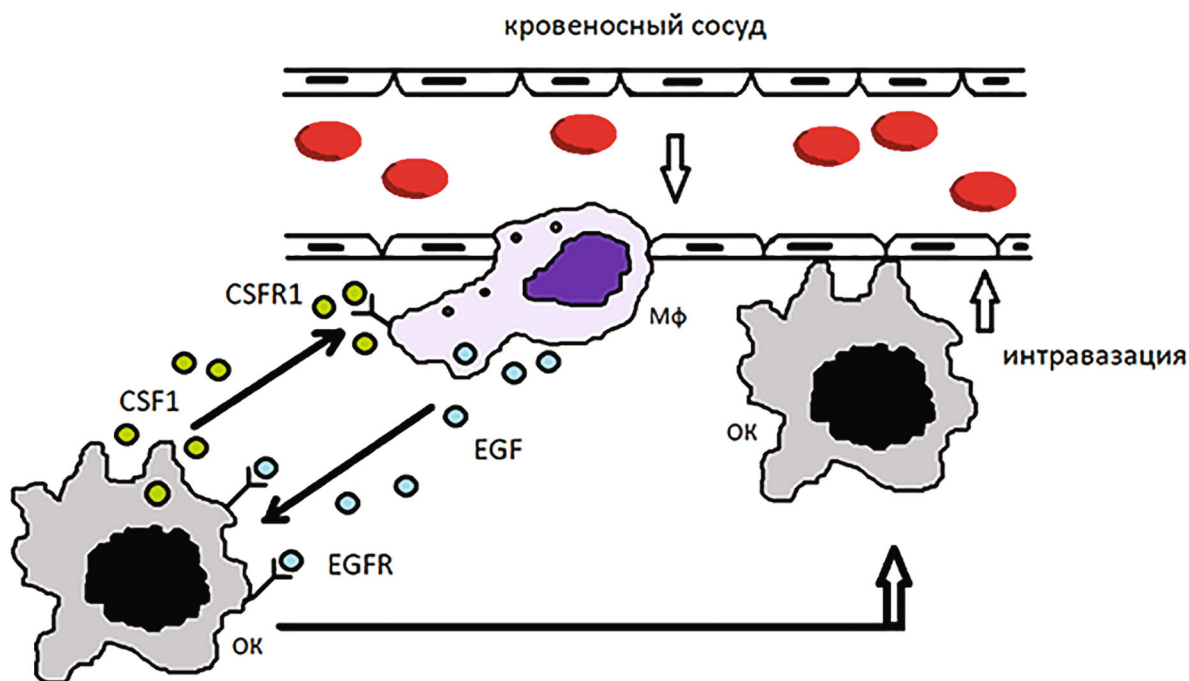
Способность к инвазии амебовидного типа, индуцируемая RhoC, характеризуется динамическим образованием протрузий и «блебов». Эти клеточные структуры проникают в сосуды в местах их ремоделирования, но не в интактных участках. Повышение проницаемости сосудов происходит благодаря экспрессии опухолевыми клетками фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) [28].

**Интравазация опухолевых клеток, связанная с макрофагами.** Показано, что миграция опухолевых клеток к кровеносным сосудам в строме происходит с участием ассоциированных с опухолью макрофагов. Имеются данные о том, что в результате хемотаксиса клетки метастазирующих опухолей обладают высокой скоростью движения вдоль коллагеновых волокон I типа в направлении кровеносных сосудов. Этот результат получен на 3D-модели коллагеновой сети [29, 30].

На моделях рака молочной железы у мышей обнаружено, что в процессе миграции опухолевой клетки к кровеносному сосуду в роли хемотактанта выступает эпидермальный фактор роста (EGF), секретируемый макрофагами, связанными с сосудами. Опухолевые клетки, экспрессирующие рецептор к EGF, в свою очередь, секретируют колониестимулирующий фактор-1 (CSF1), который привлекает макрофаги и стимулирует выработку ими EGF, тем самым замыкая паракриновую петлю (рис. 1). Значение макрофагов для процесса интравазации опухолевых клеток подтверждено их экспериментальным удалением из опухоли, приводящим к ингибированию метастазирования [30]. Показано, что избыточные уровни экспрессии CSF1 в опухолевых клетках и EGF в макрофагах являются независимыми прогностическими параметрами, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом [30, 31].

Подтверждая такой механизм, Wyckoff et al. (2004) указывают, что процесс интравазации опухолевых клеток может быть заблокирован путем фармакологического ингибирования сигналов от EGFR [32].

Прототипом взаимодействия клеток карцином с макрофагами может служить их участие в морфогенезе протоковых структур молочной



**Рис. 1.** Механизм интравазации опухолевых клеток с участием опухолевого CSF1 и макрофагального EGF. Мф – макрофаг, ОК – опухолевая клетка.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

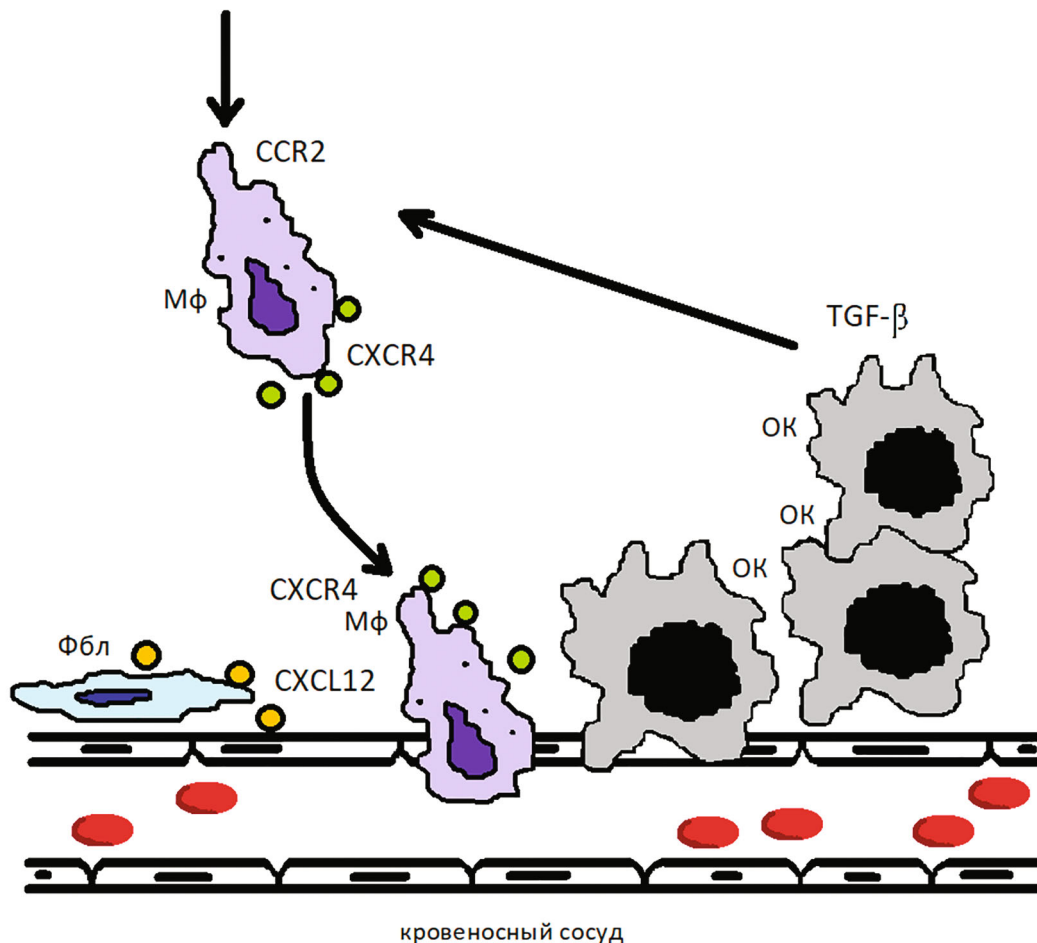
железы в постнатальный период. Макрофаги накапливаются около терминальных почек рудиментарных протоков в ответ на секрецию эпителием CSF1. Благодаря этому эпителий врастает в жировую ткань и формирует ветвящиеся протоки. Участие макрофагов является критичным для данного процесса [31, 33].

Взаимодействие между макрофагами и опухолевыми клетками влияет на активность регуляторов актина, таких как WASP и N-WASP, приводя к образованию подосом в макрофагах и инвадоподий в опухолевых клетках. Предполагают, что активация EGFR стимулирует формирование инвадоподий через сигнальный путь N-WASP/WIP/Arp2/3 [34].

Arwert et al. (2018) на экспериментальной модели рака молочной железы описывают следующие последовательные события, связанные с интравазацией. Моноциты попадают в опухоль

благодаря сигнальному пути, активированному через CCR2. TGF- $\beta$  опухолевого происхождения индуцирует экспрессию CXCR4<sup>+</sup> опухолевыми макрофагами, которые привлекаются в периваскулярную область, где периваскулярными опухоль-ассоциированными фибробластами продуцируется хемокин CXCL12. А уже неподвижные периваскулярные макрофаги изменяют проницаемость сосуда и способствуют интравазации опухолевой клетки [35] (рис. 2).

Для изучения роли CXCL12 фибробластического происхождения в интравазации была создана модель стромальных фибробластов, лишенных способности экспрессировать ген *CXCL12*. С ее помощью показано, что CXCL12 фибробластического происхождения привлекает клетки-предшественники эндотелия и усиливает интравазацию за счет нарушения связей



**Рис. 2.** Механизм интравазации опухолевых клеток с участием опухолевого TGF- $\beta$  и взаимодействия макрофагов с CXCR4 и периваскулярно расположенного CXCL12 фибробластического происхождения. Мф – макрофаг, ОК – опухолевая клетка, Фбл – фибробласт.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

между эндотелиальными клетками, что обеспечивает трансэндотелиальную миграцию опухолевых клеток. При использовании спонтанной трансгенной модели опухоли показано, что истощение синтеза CXCL12 в фибробластах тормозит рост опухоли, уменьшает число ЦОК и препятствует развитию гематогенных метастазов. Высокий уровень CXCL12 в фибробластах, но не в эпителии, коррелирует с увеличением плотности сосудов, а также с повышением частоты рецидивов и уменьшением общей выживаемости пациентов [36].

**Интравазация опухолевых клеток, опосредованная ТМЕМ.** При рассмотрении механизмов интравазации следует учитывать важный фактор, ограничивающий способность макрофагов или других клеток-участников микроокружения влиять на опухолевые клетки. Этим фактором является радиус действия цитокинов. В экспериментах *in vitro* показано, что опухолевые клетки способны следовать по градиенту хемотаксического сигнала от эндотелиальных клеток, расположенных не далее 500 мкм [37].

Роль макрофагов в интравазации и значении радиуса действия цитокинов хорошо иллюстрируются концепцией ТМЕМ (Tumor MicroEnvironment of Metastasis – метастатическое микроокружение опухоли). Авторы продемонстрировали связь между частотой гематогенного метастазирования при раке молочной железы (как в эксперименте, так и при карциномах человека) и ассоциацией трех типов клеток: MENA<sup>+</sup>-клеток опухоли, CD68<sup>+</sup>-макрофагов и эндотелиальных CD31<sup>+</sup>-клеток. Причем абсолютными условиями для осуществления гематогенного метастазирования являются расположение клеток в непосредственной близости друг от друга и отсутствие между ними коллагеновых волокон или других клеток [38, 39].

Rohan et al. (2014) показали, что большое количество ТМЕМ было связано с повышенным риском отдаленного метастазирования при молекулярном подтипе ER<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup> рака молочной железы [40].

Известны некоторые свойства макрофагов в ТМЕМ, представляющих собой периваскулярные макрофаги с выраженной экспрессией TIE-2/VEGF-A. Рецептор ангиопоэтина TIE-2 является маркером эндотелиальных клеток. TIE-2-сигнальный путь в эндотелиальных клетках играет центральную роль в инициации ангиогенеза и ремоделировании сосудов [41].

TIE-2<sup>+</sup>-макрофаги привлекаются в опухоль в ответ на продукцию ангиопоэтина-2 эндотелиальными клетками [42]. Они накапливаются в гипоксических периваскулярных участках опухоли и очагах воспаления [43] и обуславливают

повышение проницаемости сосудов, в которых происходит интравазация опухолевых клеток [39]. Дефицит этого специализированного типа клеток приводит к заметному снижению ангиогенеза в опухоли и вызывает ее регрессию [44]. При раке молочной железы VEGF-A TIE-2<sup>hi</sup>-макрофагального происхождения вызывает повышение сосудистой проницаемости в пределах ТМЕМ и способствует интравазации опухолевых клеток [39].

Было обнаружено, что неоадъювантная терапия рака молочной железы по схеме: паклитаксел после доксорубина в комбинации с циклофосфамидом, несмотря на уменьшение размеров опухоли, увеличивает в них количество ТМЕМ и повышает риск развития гематогенных метастазов. Параллельно описанным событиям, неоадъювантная химиотерапия приводит к экспрессии опухолевыми клетками (как предполагают, вблизи ТМЕМ) изоформы актин-регулирующего белка млекопитающих MENA (mamalian enabled) – MENA<sup>INV</sup>. В результате появляется субпопуляция высокоинвазивных опухолевых клеток, способных к метастазированию. Уменьшение риска гематогенной диссеминации достигается введением ингибитора TIE-2 – ребастинаба [45, 46].

Важной особенностью периваскулярных макрофагов, в отличие от подвижных опухолеассоциированных макрофагов, является их стационарность и связь с кровеносным сосудом. Периваскулярные макрофаги, вероятно, играют роль не только в повышении проницаемости сосуда, но и в формировании инвадоподий в опухолевых клетках, осуществляющих интравазацию. Инвадоподии необходимы для преодоления базальной мембраны и трансэндотелиальной миграции. Ключевым событием в формировании инвадоподий при раке молочной железы служит индукция макрофагами активности RhoA в опухолевых клетках. Такое взаимодействие требует физического контакта макрофага и опухолевой клетки. Авторы считают, что результаты их исследования подтверждают справедливость концепции ТМЕМ и демонстрируют ценность этого параметра для предсказания развития отдаленных метастазов [23]. Неблагоприятные эффекты неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) доксорубицином, циклофосфамидом и паклитакселом совпадали с увеличением в опухоли количества ТМЕМ и MENA<sup>INV</sup>. Авторы предлагают две стратегии для предотвращения вызванной химиотерапией ТМЕМ/MENA-опосредованной диссеминации опухолевых клеток и последующего метастазирования: использование селективных ингибиторов TIE-2<sup>+</sup>-макрофагов либо прекращение НАХТ в случаях,

когда первые два курса химиотерапии приводят к увеличению в опухоли количества ТМЕМ и MENA<sup>INV</sup> [45].

TIE-2<sup>+</sup>-макрофаги обладают иммуносупрессорными свойствами, являясь источниками IL-10, способного подавлять CD8<sup>+</sup>-клетки и увеличивать количество Т-регуляторных лимфоцитов [47, 48].

Проангиогенные периваскулярные макрофаги TIE-2<sup>hi</sup>/VEGF-A<sup>hi</sup> являются прямыми потомками клеток-предшественников [44]. Действительно, гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники, которые в основном находятся в костном мозге, в очень небольшом количестве обнаруживаются в крови и могут поступать как в гемопоэтические, так и в негемопоэтические органы, где они пролиферируют и дифференцируются [49, 50]. Одна из форм костномозговых клеток-предшественников – моноцитарная субпопуляция миелоидных супрессоров костномозгового происхождения (MDSCs) (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) – характеризуется выраженной экспрессией TIE-2 [51, 52]. Кроме этого, ~20% CD14<sup>+</sup>-моноцитов крови экспрессируют TIE-2, коэкспрессируют CD16 (FcγRIII) и не экспрессируют CD34. MDSCs секретируют высокий уровень протеолитических ферментов, которые приводят к деградации внеклеточного

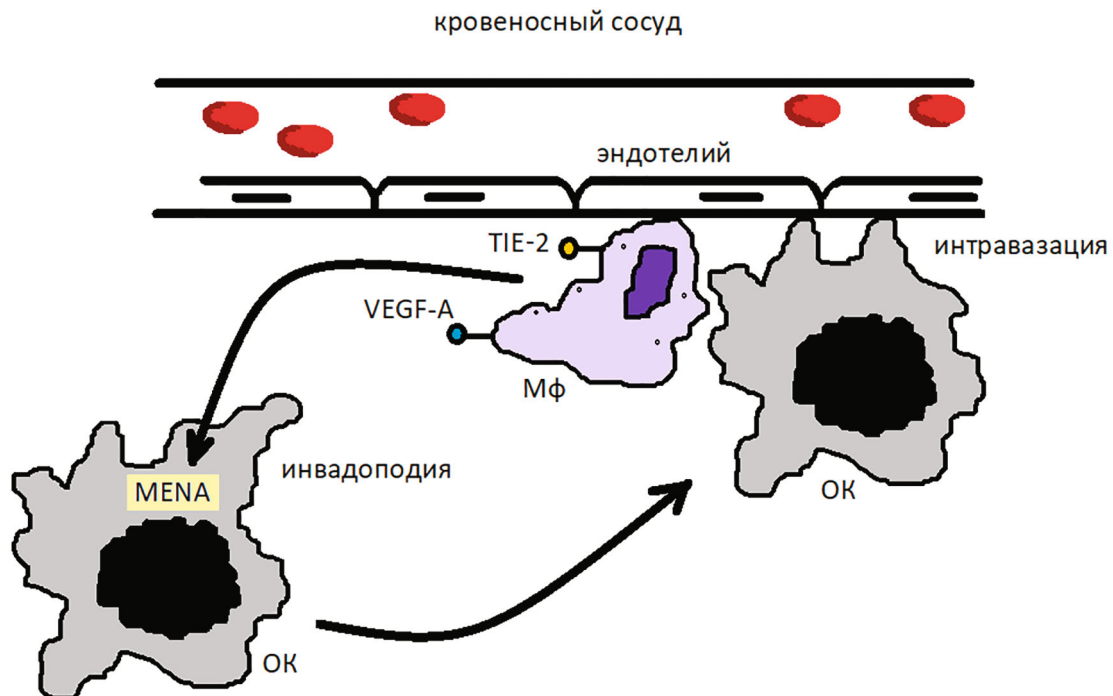
матрикса и могут способствовать интравазации опухолевых клеток через базальную мембрану капилляров и увеличению количества ЦОК [53, 54].

По-видимому, моноцитарная субпопуляция MDSCs и TIE-2<sup>+</sup>-моноциты крови действительно могут быть прямыми источниками макрофагов, участвующих в формировании ТМЕМ.

В конечном итоге, при карциноме молочной железы опухолевые клетки, достигнув ТМЕМ, проникают через эндотелий в участках, где макрофаги TIE-2<sup>hi</sup>/VEGF-A<sup>hi</sup> через активацию сигнального пути VEGF-A локально разрушают межэндотелиальные соединения (рис. 3). Причем предполагают, что миграция опухолевых клеток в участки ТМЕМ происходит через паракриновую петлю EGFR/CSF1R [39].

Привлечение предшественников TIE-2<sup>hi</sup>-макрофагов в периваскулярную зону при формировании ТМЕМ в какой-то мере напоминает образование опухолевых и метастатических ниш, представляющих собой кластеры костномозговых клеток-предшественников [55, 56].

Если амёбовидный тип инвазии происходит не через интактные сосуды, а только в местах их ремоделирования [28], то интравазация в структуре ТМЕМ объясняется нарушением межэндотелиальных связей. Однако остается нерешен-



**Рис. 3.** ТМЕМ – ассоциация эндотелиальной клетки, TIE-2<sup>hi</sup>/VEGF-A<sup>hi</sup> периваскулярного макрофага и опухолевой клетки, осуществляющей интравазацию (по данным Harney et al. [39]). Мф – макрофаг, ОК – опухолевая клетка.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

ным ряд вопросов. Происходит ли нарушение межэндотелиальных связей в зрелом сосуде или в участках неоангиогенеза? Возможна ли интравазация опухолевых клеток, обладающих инвазивными свойствами, через вновь образованные (незрелые) сосуды без участия TIE-2<sup>hi</sup>-макрофагов? В такой ситуации TIE-2<sup>hi</sup>-макрофаг является лишь маркером неоангиогенеза, хотя формально все компоненты TМЕМ имеются в наличии.

Поскольку MDSCs-макрофаги обладают проангиогенными свойствами при заживлении ран [57], в качестве прототипа TМЕМ правомерно рассматривать ангиогенез при заживлении раны.

### ИНТРАВАЗАЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, НЕ СВЯЗАННАЯ С ИНВАЗИЕЙ

**Метастазирование кластерами опухолевых клеток.** На моделях фибросаркомы (HT-hi/diss) и карциномы (HEP3) человека Deryugina E.I. и Kiosses W.B. (2017) пытались выяснить, происходит ли интравазация в инвазивном крае или внутри первичной опухоли. Используя оригинальный метод оценки, авторы пришли к выводу, что подавляющее количество событий интравазации (90–95%) происходит в центре первичной опухоли и только менее 10% случаев интравазации – в инвазивном фронте опухоли. Авторы подчеркивают важную роль в интравазации EGFR, которая состоит в регуляции образования сосудов. Причем активность EGFR выше в центре опухоли в сравнении с периферией, и его функция не связана с регуляцией пролиферации или с подвижностью опухолевых клеток. Одной из причин интравазации в центре опухоли, как полагают, является незрелость кровеносных сосудов. В связи с этим авторы пришли к выводу о независимости механизма интравазации опухолевых клеток от механизма их инвазии в окружающие ткани [58].

На первый взгляд интравазация опухолевых клеток, не связанная с инвазией, кажется парадоксом. Тем не менее получены данные, позволяющие обсуждать возможность существования такого механизма. Sugino et al. (1993) обосновывают парадигму интравазации, не связанной с активным проникновением опухолевых клеток в просвет сосудов. Результаты экспериментальных наблюдений позволили авторам заключить, что несколько опухолевых клеток могут окружаться эндотелиальными клетками новообразующихся сосудов синусоидного типа и, таким образом, оказываться внутри сосудистой системы, т.е. осуществлять интравазацию. Очевидно, что

в такой ситуации интравазация не связана со способностью опухолевых клеток к инвазивному росту. Эта точка зрения поддерживается рядом исследователей [59–61].

Образованию многоклеточных кластеров опухолевых клеток, окруженных эндотелием, способствует экспрессия в них VEGF-A. Такие кластеры осуществляют интравазацию посредством механизма, независимого от инвазивного роста, и формируют эмболы в легочных сосудах [62]. В частности, такой кластерный механизм выявлен при метастазировании в легкие почечноклеточного рака [63]. При раке молочной железы большое количество циркулирующих кластеров опухолевых клеток связано с неблагоприятным исходом [64]. Возможность метастазирования кластерами опухолевых клеток объясняет высокую частоту локализации метастазов различных карцином в печени и легких, что, по-видимому, обусловлено не только реализацией механизма «семена–почва», но и механической задержкой опухолевых клеток в капиллярной системе этих органов.

**«Кооперативный» механизм интравазации.** Интересны исследования, которые свидетельствуют о роли в метастазировании кооперативного взаимодействия между клоном опухолевых клеток, способных к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП), инвазивному росту и интравазации, и клоном опухолевых клеток, не обладающих этими способностями. Так, было показано, что клон клеток без признаков ЭМП не способен к инвазии, интравазации, а формирование гематогенных метастазов наблюдается только при внутривенном введении таких опухолевых клеток. Клетки же клона с фенотипом ЭМП, обладая инвазивными свойствами, проникали в сосуды, но не были способны образовывать метастазы. Причем метастазы в легких не возникали даже при внутривенном введении клеток в состоянии ЭМП. При смешивании опухолевых клеток с фенотипом ЭМП и клеток, не имеющих этих признаков, последние приобретали способность проникать из первичной опухоли в сосуды и формировать гематогенные метастазы, так же как и в случаях, когда такие клетки вводились внутривенно [65, 66].

Описанный механизм «кооперативной» интравазации ставит следующий вопрос: возможна ли интравазация опухолевой клетки, не обладающей инвазивными свойствами, без кооперации с инвазивной опухолевой клеткой? Хорошо известно, что в солидных структурах карцином всегда имеются участки соединительной ткани с микрососудами, с которыми непосредственно контактируют многие сотни опухолевых клеток. В такой ситуации первая фаза интравазации –



инвазивное продвижение опухолевых клеток до стенки сосуда — оказывается излишней. Не исключено, что интравазация опухолевых клеток, расположенных рядом с сосудами, может происходить в зонах TМЕМ с участием макрофагов TIE-2<sup>hi</sup>/VEGF-A<sup>hi</sup>.

**Интравазация в условиях васкулогенной мимикрии опухолевых клеток.** Механизм интравазации опухолевых клеток может быть связан с феноменом васкулогенной мимикрии (ВМ), которая возникает благодаря высокой пластичности опухолевых клеток. Данный феномен проявляется формированием каналов, выстланных клетками опухоли, имитирующими эндотелий. Сосудистоподобные каналы обеспечивают перфузию крови в опухоли. Наличие ВМ показано при раке легких, желудка, яичников, простаты, гепатоцеллюлярном раке и раке молочной железы. При раке молочной железы ВМ обнаружена почти у 24% пациентов. Наличие ВМ было сопряжено с большим размером опухоли, лимфогенным метастазированием и уменьшением общей выживаемости пациентов [67]. Контакт выстилающих опухолевых клеток с потоком крови делает их еще одним источником появления ЦОК. Таким образом, развитие васкулогенной мимикрии, по сути, можно рассматривать как механизм интравазации. Молекулярные механизмы, сигнальные пути, участвующие в развитии ВМ, а также возможные стратегии по разработке новых, нацеленных на ВМ, терапевтических подходов обсуждаются в обзоре Hong Ge и Hui Luo (2018) [68].

## ГИПОТЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНТРАВАЗАЦИИ

**Интравазация опухолевых клеток, связанная с экстружией.** Рассмотрение механизма продвижения Т- и В-лимфоцитов, а также ДК между эндотелиальными клетками в процессе обратной трансэндотелиальной миграции посредством лиганд-рецепторного взаимодействия S1P–S1PR1 наводит на мысль об определенной аналогии этого процесса с механизмом удаления умирающих эпителиальных клеток из эпителиального пласта в слизистых оболочках. Удаление стареющих эпителиальных клеток в процессе физиологической регенерации происходит посредством их экстружии и апоптоза. Экстружия осуществляется благодаря экспрессии S1P в погибающих клетках, инициирующей экспрессию S1PR2 в соседних эпителиальных клетках. В результате лиганд-рецепторного взаимодействия в соседних клетках происходит Rho-опосредованное сокращение кольца актомиозина, которое

выталкивает умирающую клетку из пласта эпителия [69, 70].

Нормально протекающий процесс удаления клеток, завершивших свой жизненный цикл, осуществляется посредством апикальной экстружии. Однако при нарушении экспрессии S1PR1, S1P или их лиганд-рецепторного взаимодействия апикальная экстружия становится невозможной, и развивается базальная экстружия с выходом клеток в строму [71].

В связи с этим можно предположить, что S1P-экспрессирующие опухолевые клетки, оказавшись в периваскулярной зоне, независимо от механизма их привлечения, после разрушения базальной мембраны могут взаимодействовать с эндотелиальными клетками, экспрессирующими S1PR2. Такое взаимодействие способно вызывать процесс, подобный экстружии, в результате чего происходит выталкивание опухолевой клетки в просвет сосуда, т.е. вполне вероятно, что интравазация может происходить за счет реверсной экстружии опухолевых клеток.

Действительно, для реверсной экстружии опухолевых клеток в сосуды имеются основные условия:

- 1) опухолевые клетки синтезируют S1P [72];
- 2) все пять типов S1PR экспрессируются на эндотелиальных клетках [73];
- 3) в эндотелии S1P функционально связан с актином (S1P организует актин в «кортикальное кольцо» и усиливает сцепление — как между эндотелиальными клетками, так и между эндотелием и межклеточным матриксом) [74, 75].

Таким образом, есть все предпосылки считать реверсную экстружию одним из вероятных механизмов интравазации.

**Интравазация опухолевых клеток, гибридизированных с макрофагами.** Вполне логично допустить, что обратная трансэндотелиальная миграция может лежать в основе механизма интравазации особой субпопуляции опухолевых клеток — гибридных клеток опухоли. Это CD45LCA<sup>+</sup>-клетки опухоли, которые обнаруживаются среди ЦОК при метастатическом раке молочной железы [76], а также в асците при раке яичника [77]. Исходной клеткой, с которой происходит гибридизация опухолевой клетки, является макрофаг [76]. В связи с этим можно предположить, что гибридная опухолевая клетка приобретает свойства макрофага (синтез металлопротеиназ, цитокинов и совокупность лигандов и рецепторов на клеточной мембране), которые позволяют ей осуществлять интравазацию посредством обратной трансэндотелиальной миграции.

**Механизм интравазации, связанный с трогитозом.** Можно предположить существование еще одного механизма приобретения опухоле-

вой клеткой способности к интравазации. Поскольку показано, что посредством трогоцитоза нейтрофильные лейкоциты могут захватывать фрагмент мембраны эндотелиальной клетки с ICAM1 [22], нельзя исключить, что и опухолевая клетка может посредством такого механизма захватывать лиганды и рецепторы из мембран клеток микроокружения. Среди них могут быть и молекулы, способствующие интравазации.

Многочисленные работы, касающиеся интравазации, обычно посвящены изучению какого-либо одного из вероятных механизмов этого явления. Однако практически нет комплексных исследований, в которых на одной модельной системе одновременно изучались бы описанные в разных работах варианты интравазации. Проведение таких работ позволило бы выявить взаимосвязь и значимость разных механизмов. Важно при этом понять, как происходит рекрутирование опухолевых клеток к сосуду, уточнить значимость для проникновения в кровеносные сосуды мезенхимального и амебовидного механизмов инвазии. Были бы полезны исследования, позволяющие проверить справедливость предположений о вероятности существования обсуждаемых в обзоре гипотетических механизмов интравазации.

Уже сейчас знания механизмов интравазации позволяют оптимизировать химиотерапию злокачественных новообразований. В группах

высокого риска гематогенного метастазирования наряду с персонифицированной химиотерапией появляется возможность использовать препараты, направленные на предотвращение интравазации. Особенно актуален такой подход при неоперабельных карциномах. В случаях, когда высок риск увеличения количества ТМЕМ, и обнаруживается усиление экспрессии МЕНА в опухолевых клетках, предлагается оценить целесообразность назначения НАХТ. Другой подход заключается в проведении комплексной неoadъювантной терапии с включением селективных ингибиторов ТГЕ-2, которые, как предполагают, могли бы быть полезными при лечении не только локализованного, но и метастатического рака молочной железы [45].

Более полная расшифровка механизмов интравазации опухолевых клеток позволит не только прогнозировать развитие метастазов карцином, но и уменьшить вероятность их развития.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-30016).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dua, R.S., Gui, G.P., and Isacke, C.M. (2005) Endothelial adhesion molecules in breast cancer invasion into the vascular and lymphatic systems, *Eur. J. Surg. Oncol.*, **31**, 824–832, doi: 10.1016/j.ejso.2005.05.015.
- Chiang, S.P.H., Cabrera, R.M., and Segall, J.E. (2016) Tumor cell intravasation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **311**, 1–14, doi: 10.1152/ajpcell.00238.2015.
- Gil-Henn, H., Patsialou, A., Wang, Y., Warren, M.S., Condeelis, J.S., and Koleske, A.J. (2012) Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer *in vivo*, *Oncogene*, **32**, 2622–2630, doi: 10.1038/onc.2012.284.
- Roh-Johnson, M., Bravo-Cordero, J.J., Patsialou, A., Sharma, V.P., Guo, P., Liu, H., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2014) Macrophage contact induces RhoA GTPase signaling to trigger tumor cell intravasation, *Oncogene*, **33**, 4203–4212, doi: 10.1038/onc.2013.377.
- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., and Hayes, D.F. (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, *N. Engl. J. Med.*, **351**, 781–791, doi: 10.1056/NEJMoa040766.
- Weinreich, M.A., and Hogquist, K.A. (2008) Thymic emigration: when and how T cells leave home, *J. Immunol.*, **181**, 2265–2270, doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2265.
- Schwab, S.R., and Cyster, J.G. (2007) Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs, *Nat. Immunol.*, **8**, 1295–1301, doi: 10.1038/ni1545.
- Sanchez, T., and Hla, T. (2004) Structural and functional characteristics of S1P receptors, *J. Cell. Biochem.*, **92**, 913–922, doi: 10.1002/jcb.20127.
- Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P.J., Sanna, M.G., and Brown, S. (2009) Sphingosine 1-phosphate receptor signaling, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 743–768, doi: 10.1146/annurev.biochem.78.072407.103733.
- Resop, R.S., Douaisi, M., Craft, J., Jachimowski, L.C., Blom, B., and Uittenbogaart, C.H. (2016) Sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 1 signaling is required for migration of naive human T cells from the thymus to the periphery, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**, 551–557, doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1339.
- Zachariah, M.A., and Cyster, J.G. (2010) Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction, *Science*, **328**, 1129–1135, doi: 10.1126/science.1188222.
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor, *Nature*, **427**, 355–360, doi: 10.1038/nature02284.

13. Maeda, Y., Seki, N., Sato, N., Sugahara, K., and Chiba, K. (2010) Sphingosine 1-phosphate receptor type 1 regulates egress of mature T cells from mouse bone marrow, *Int. Immunol.*, **22**, 515–525, doi: 10.1093/intimm/dxq036.
14. Chiba, K., Matsuyuki, H., Maeda, Y., and Sugahara, K. (2006) Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus, *Cell Mol. Immunol.*, **3**, 11–19.
15. Ueno, H., Schmitt, N., Palucka, A.K., and Banchereau, J. (2010) Dendritic cells and humoral immunity in humans, *Immunol. Cell Biol.*, **88**, 376–380, doi: 10.1038/icb.2010.28.
16. Seyfizadeh, N., Muthuswamy, R., Mitchell, D.A., Nierkens, S., and Seyfizadeh, N. (2016) Migration of dendritic cells to the lymph nodes and its enhancement to drive anti-tumor responses, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **107**, 100–110.
17. Eigenbrod, S., Derwand, R., Jakl, V., Endres, S., and Eigler, A. (2006) Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells, *Immunol. Invest.*, **35**, 149–165, doi: 10.1080/08820130600616490.
18. Gollmann, G., Neuwirt, H., Tripp, C.H., Mueller, H., Konwalinka, G., Heufler, C., Romani, N., and Tiefenthaler, M. (2008) Sphingosine-1-phosphate receptor type-1 agonism impairs blood dendritic cell chemotaxis and skin dendritic cell migration to lymph nodes under inflammatory conditions, *Int. Immunol.*, **20**, 911–923, doi: 10.1093/intimm/dxn050.
19. Rathinasamy, A., Czeloth, N., Pabst, O., Forster, R., and Bernhardt, G. (2010) The origin and maturity of dendritic cells determine the pattern of sphingosine 1-phosphate receptors expressed and required for efficient migration, *J. Immunol.*, **185**, 4072–4081, doi: 10.4049/jimmunol.1000568.
20. Tauzin, S., Starnes, T.W., Becker, F.B., Lam, P., and Huttenlocher, A. (2014) Redox and Src family kinase signaling control leukocyte wound attraction and neutrophil reverse migration, *J. Cell Biol.*, **207**, 589, doi: 10.1083/jcb.201408090.
21. Buckley, C.D., Ross, E.A., McGettrick, H.M., Osborne, C.E., Haworth, O., Schmutz, C., Stone, P.C., Salmon, M., Matharu, N.M., Vohra, R.K., Nash, G.B., and Rainger, G.E. (2005) Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration, *J. Leukoc. Biol.*, **79**, 303–311, doi: 10.1189/jlb.090549621.
22. Joly, E., and Hudrisier, D. (2003) What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat. Immunol.*, **4**, 815, doi: 10.1038/ni0903-815.
23. Burn, T., and Alvarez, J.I. (2017) Reverse transendothelial cell migration in inflammation: to help or to hinder? *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 1871–1881, doi: 10.1007/s00018-016-2444-2.
24. Sleeman, J.P., Nazarenko, I., and Thiele, W. (2011) Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development, *Int. J. Cancer*, **128**, 2511–2526, doi: 10.1002/ijc.26027.
25. Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009) Localized and reversible TGF $\beta$  signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility, *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1287–1296, doi: 10.1038/ncb1973.
26. Spano, D., Heck, C., De Antonellis, P., Christofori, G., and Zollo, M. (2012) Molecular networks that regulate cancer metastasis, *Semin. Cancer Biol.*, **22**, 234–249, doi: 10.1016/j.semcancer.2012.03.006.
27. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., and Segall, J.E. (2012) Classifying collective cancer cell invasion, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 777–783, doi: 10.1038/ncb2548.
28. Stoletov, K., Montel, V., Lester, R.D., Gonias, S.L., and Klemke, R. (2007) High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 17406–17411, doi: 10.1073/pnas.0703446104.
29. Hana, W., Chenb, S., Yuanc, W., Fana, Q., Tianb, J., Wanga, X., Chend, L., Zhange, X., Weie, W., Liuf, R., Quc, J., Jiaob, Y., Austing, R.H., and Liuf, L. (2016) Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 11208–11213, doi: 10.1073/pnas.1610347113.
30. Pollard, J.W. (2008) Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer, *J. Leukoc. Biol.*, **84**, 623–630, doi: 10.1189/jlb.1107762.
31. Lin, E.Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A.V., and Pollard, J.W. (2002) The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, **7**, 147–162, doi: 10.1023/A:1020399802795.
32. Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004) A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors, *Cancer Res.*, **64**, 7022–7029, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1449.
33. Van Nguyen, A., and Pollard, J.W. (2002) Colony stimulating factor-1 is required to recruit macrophages into the mammary gland to facilitate mammary ductal outgrowth, *Dev. Biol.*, **247**, 11–25, doi: 10.1006/dbio.2002.0669.
34. Yamaguchi, H., Pixley, F., and Condeelis, J. (2006) Invadopodia and podosomes in tumor invasion, *Eur. J. Cell Biol.*, **85**, 213–218, doi: 10.1016/j.ejcb.2005.10.004.
35. Arwert, E.N., Harney, A.S., Entenberg, D., Wang, Y., Sahai, E., Pollard, J.W., and Condeelis, J.S. (2018) A unidirectional transition from migratory to perivascular macrophage is required for tumor cell intravasation, *Cell Rep.*, **23**, 1239–1248, doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.007.
36. Ahirwar, D.K., Nasser, M.W., Ouseph, M.M., Elbaz, M., Cuitino, M.C., Kladney, R.D., Varikuti, S., Kaul, K., Satoskar, A.R., Ramaswamy, B., Zhang, X., Ostrowski, M.C., Leone, G., and Ganju, R.K. (2018) Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation, *Oncogene*, **37**, 4428–4442, doi: 10.1038/s41388-018-0263-7.
37. Leung, E., Xue, A., and Wang, Y. (2017) Blood vessel endothelium-directed tumor cell streaming in breast tumors requires the HGF/C-Met signaling pathway, *Oncogene*, **36**, 2680–2692, doi: 10.1038/onc.2016.421.
38. Robinson, B.D., Sica, G.L., Liu, Y., Rohan, T.E., Gertler, F.B., Condeelis, J.S., and Jones, J.G. (2009) Tumor microenvironment of metastasis in human breast carcinoma: a potential prognostic marker linked to hematogenous dissemination, *Clin. Cancer Res.*, **15**, 2433–2441, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2179.
39. Harney, A.S., Arwert, E.N., Entenberg, D., Wang, Y., Guo, P., Qian, B.Z., Oktay, M.H., Pollard, J.W., Jones, J.G., and Condeelis, J.S. (2015) Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA, *Cancer Discov.*, **5**, 932–943, doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0012.
40. Rohan, T.E., Xue, X., Lin, H., D'Alfonso, T.M., Ginter, P.S., Oktay, M.H., Robinson, B.D., Ginsberg, M., Gertler, F.B., Glass, A.G., Sparano, J.A., Condeelis, J.S., and Jones, J.G. (2014) Tumor microenvironment of metastasis and risk of distant metastasis of breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **106**, dju136, doi: 10.1093/jnci/dju136.
41. Saharinen, P., Eklund, L., Pulkki, K., Bono, P., and Alitalo, K. (2011) VEGF and angiopoietin signaling in

- tumor angiogenesis and metastasis, *Trends Mol. Med.*, **17**, 347–362, doi: 10.1016/j.molmed.2011.01.015.
42. Wu, X., Giobbie-Hurder, A., Liao, X., Connelly, C., Connolly, E.M., and Li, J. (2017) Angiopoietin-2 as a biomarker and target for immune checkpoint therapy, *Cancer Immunol. Res.*, **5**, 17–28, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0206.
  43. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., and Lewis, C.E. (2007) Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2, *J. Immunol.*, **178**, 7405–7411, doi: 10.4049/jimmunol.178.11.7405.
  44. De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors, *Cancer Cell*, **8**, 211–226, doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.002.
  45. Karagiannis, G.S., Pastoriza, J.M., Wang, Y., Harney, A.S., Entenberg, D., Pignatelli, J., Sharma, V.P., Xue, E.A., Cheng, E., D'Alfonso, T.M., Jones, J.G., Anampa, J., Rohan, T.E., Sparano, J.A., Condeelis, J.S., and Oktay, M.H. (2017) Neoadjuvant chemotherapy induces breast cancer metastasis through a TMEM-mediated mechanism, *Sci. Transl. Med.*, **9**, eaan0026, doi: 10.1126/scitranslmed.aan0026.
  46. Karagiannis, G.S., Condeelis, J.S., and Oktay, M.H. (2017) Chemotherapy-induced metastasis in breast cancer, *Oncotarget*, **8**, 110733–110734, doi: 10.18632/oncotarget.22717.
  47. Coffelt, S.B., Chen, Y.Y., Muthana, M., Welford, A.F., Tal, A.O., Scholz, A., Plate, K.H., Reiss, Y., Murdoch, C., De Palma, M., and Lewis, C.E. (2011) Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion, *J. Immunol.*, **186**, 4183–4190, doi: 10.4049/jimmunol.1002802.
  48. Ibberson, M., Bron, S., Guex, N., Faes-van't Hull, E., Ificene-Treboux, A., Henry, L., Lehr, H.A., Delaloye, J.F., Coukos, G., Xenarios, I., and Doucey, M.A. (2013) TIE-2 and VEGFR kinase activities drive immunosuppressive function of TIE-2-expressing monocytes in human breast tumors, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 3439–3449, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3181.
  49. Si, Y., Tsou, C.L., Croft, K., and Charo, I.F. (2010) CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice, *J. Clin. Invest.*, **120**, 1192–1203, doi: 10.1172/JCI40310.
  50. Johns, J.L., and Christopher, M.M. (2012) Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals, *Vet. Pathol.*, **49**, 508–523, doi: 10.1177/0300985811432344.
  51. Matsubara, T., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Higashitani, K., Kakita, N., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Nagano, H., Hayashi, N., and Takehara, T. (2013) TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlates with angiogenesis, *Hepatology*, **57**, 1416–1425, doi: 10.1002/hep.25965.
  52. Talmadge, J.E., and Gabrilovich, D.I. (2013) History of myeloid-derived suppressor cells, *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 739–752, doi: 10.1038/nrc3581.
  53. Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., and Lin, P.C. (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis, *Cancer Cell*, **6**, 409–421, doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.031.
  54. Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matrisian, L.M., Richmond, A., Lin, P.C., and Moses, H.L. (2008) Abrogation of TGF $\beta$  signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloid cells that promote metastasis, *Cancer Cell*, **13**, 23–35, doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.004.
  55. Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J.L., Altorki, N., Port, E.R., Ruggero, D., Shmelkov, S.V., Jensen, K.K., Rafii, S., and Lyden, D. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche, *Nature*, **438**, 820–827, doi: 10.1038/nature04186.
  56. Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., Bissell, M.J., Cox, T.R., Giaccia, A.J., Erler, J.T., Hiratsuka, S., Ghajar, C.M., and Lyden, D. (2017) Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases, *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 302–317, doi: 10.1038/nrc.2017.6.
  57. Okuno, Y., Nakamura-Ishizu, A., Kishi, K., Suda, T., and Kubota, Y. (2011) Bone marrow-derived cells serve as proangiogenic macrophages but not endothelial cells in wound healing, *Blood*, **117**, 5264–5272, doi: 10.1182/blood-2011-01-330720.
  58. Deryugina, E.I., and Kiosses, W.B. (2017) Intratumoral cancer cell intravasation can occur independent of invasion into the adjacent stroma, *Cell Rep.*, **19**, 601–616, doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.064.
  59. Sugino, T., Kawaguchi, T., and Suzuki, T. (1993) Sequential process of blood-borne lung metastases of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice, *Int. J. Cancer*, **55**, 141–147, doi: 10.1002/ijc.2910550125.
  60. Sugino, T., Kusakabe, T., Hoshi, N., Yamaguchi, T., Kawaguchi, T., Goodison, S., Sekimata, M., Homma, Y., and Suzuki, T. (2002) An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model, *Am. J. Pathol.*, **160**, 1973–1980, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61147-9.
  61. Weidner, N. (2002) New paradigm for vessel intravasation by tumor cells, *Am. J. Pathol.*, **160**, 1937–1939, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61141-8.
  62. Kusters, B., Kats, G., Roodink, I., Verrijp, K., Wesseling, P., Ruiter, D.J., de Waal, R.M., and Leenders, W.P. (2007) Micronodular transformation as a novel mechanism of VEGF-A-induced metastasis, *Oncogene*, **26**, 5808–5815, doi: 10.1038/sj.onc.1210360.
  63. Kats-Ugurlu, G., Roodink, I., de Weijert, M., Tiemessen, D., Maass, C., Verrijp, K., van der Laak, J., de Waal, R., Mulders, P., Oosterwijk, E., and Leenders, W. (2009) Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma, *J. Pathol.*, **219**, 287–293, doi: 10.1002/path.2613.
  64. Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D.T., Donaldson, M.C., Wittner, B.S., Spencer, J.A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, B.W., Kapur, R., Stott, S.L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D.T., Lin, C.P., Toner, M., Haber, D.A., and Maheswaran, S. (2014) Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis, *Cell*, **158**, 1110–1122, doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013.
  65. Tsuji, T., Ibaragi, S., and Hu, G.F. (2009) Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis, *Cancer Res.*, **69**, 7135–7139, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1618.
  66. Lyons, J.G., Lobo, E., Martorana, A.M., and Myerscough, M.R. (2008) Clonal diversity in carcinomas: its implications for tumour progression and the contribution made to it by epithelial-mesenchymal transitions, *Clin. Exp. Metastasis*, **25**, 665–677, doi: 10.1007/s10585-007-9134-2.

67. Shen, Y., Quan, J., Wang, M., Li, S., Yang, J., Lv, M., Chen, Z., Zhang, L., Zhao, X., and Yang, J. (2017) Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer, *Oncotarget*, **8**, 56408–56416, doi: 10.18632/oncotarget.16919.
68. Ge, H., and Luo, H. (2018) Overview of advances in vasculogenic mimicry – a potential target for tumor therapy, *Cancer Manag. Res.*, **10**, 2429–2437, doi: 10.2147/CMAR.S164675.
69. Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2011) Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway, *J. Cell. Biol.*, **193**, 667–676, doi: 10.1083/jcb.201010075.
70. Gudipaty, S.A., and Rosenblatt, J. (2017) Epithelial cell extrusion: pathways and pathologies, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **67**, 132–140, doi: 10.1016/j.semcd.2016.05.010.
71. Slattum, G., Gu, Y., Sabbadini, R., and Rosenblatt, J. (2014) Autophagy in oncogenic K-Ras promotes basal extrusion of epithelial cells by degrading S1P, *Curr. Biol.*, **24**, 19–28, doi: 10.1016/j.cub.2013.11.029.
72. Nakajima, M., Nagahashi, M., Rashid, O.M., Takabe, K., and Wakai, T. (2017) The role of sphingosine-1-phosphate in the tumor microenvironment and its clinical implications, *Tumour Biol.*, **39**, 1010428317699133, doi: 10.1177/1010428317699133.
73. Waeber, C., Blondeau, N., and Salomone, S. (2004) Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors, *Drug News Perspect.*, **17**, 365–382.
74. Saito, H., Minamiya, Y., Kitamura, M., Saito, S., Enomoto, K., Terada, K., and Ogawa, J. (1998) Endothelial myosin light chain kinase regulates neutrophil migration across human umbilical vein endothelial cell monolayer, *J. Immunol.*, **161**, 1533–1540.
75. McVerry, B.J., and Garcia, J.G. (2004) Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate, *J. Cell Biochem.*, **92**, 1075–1085, doi: 10.1002/jcb.20088.
76. Lustberg, M.B., Balasubramanian, P., Miller, B., Garcia-Villa, A., Deighan, C., Wu, Y., Carothers, S., Berger, M., Ramaswamy, B., Macrae, E.R., Wesolowski, R., Layman, R.M., Mrozek, E., Pan, X., Summers, T.A., Shapiro, C.L., and Chalmers, J.J. (2014) Heterogeneous atypical cell populations are present in blood of metastatic breast cancer patients, *Breast Cancer Res.*, **16**, R23, doi: 10.1186/bcr3622.
77. Akhter, M.Z., Sharawat, S.K., Kumar, V., Kochat, V., Equbal, Z., Ramakrishnan, M., Kumar, U., Mathur, S., Kumar, L., and Mukhopadhyay, A. (2018) Aggressive serous epithelial ovarian cancer is potentially propagated by EpCAM<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> phenotype, *Oncogene*, **37**, 2089–2103, doi: 10.1038/s41388-017-0106-y.

## INTRAVASATION AS A KEY STEP IN CANCER METASTASIS

M. V. Zavyalova<sup>1,2</sup>, E. V. Denisov<sup>1</sup>, L. A. Tashireva<sup>1\*</sup>, O. E. Savelieva<sup>1</sup>,  
E. V. Kaigorodova<sup>1,2</sup>, N. V. Krakhmal<sup>1,2</sup>, and V. M. Perelmuter<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,  
Russian Academy of Sciences, 634009 Tomsk, Russia; E-mail: tashireva@oncology.tomsk.ru

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 634050 Tomsk, Russia

Received February 20, 2019

Revised April 10, 2019

Accepted April 10, 2019

Intravasation represents a key step in cancer metastasis during which tumor cells penetrate the vessel wall and enter the circulation becoming circulating tumor cells and potential metastatic seeds. The understanding of molecular mechanisms governing intravasation is critically important to develop therapeutic strategies for the prevention of metastatic disease. This review presents an overview of the current data on the mechanisms of cancer cell intravasation into blood and lymphatic vessels. The entry of mature thymocytes into the circulation and of dendritic cells into the regional lymph nodes is considered as an example of intravasation in physiologically normal conditions. In the pathophysiological state, intravasation is illustrated by the example of reverse transendothelial migration of leukocytes into blood from inflammation sites with involvement of sphingosine 1-phosphate and its receptors. Additionally, the invasion-dependent and -independent mechanisms are considered to be involved in intravasation. In particular, mesenchymal and amoeboid cell migration, as well as neoangiogenesis and vascular remodeling, are noted to play a significant role in the appearance of tumor cells in the circulation. Special attention is given to the contribution of macrophages to intravasation through the CSF1-EGF (colony stimulating factor 1 – epidermal growth factor) paracrine signaling and the TMEM (tumor microenvironment of metastasis)-mediated mechanism. Other mechanisms are also postulated including intravasation of tumor cell clusters due to their surrounding by vessel wall elements, cooperative intravasation when non-invasive tumor cells enter the circulation following invasive tumor cells, and intravasation associated with vascular mimicry when tumor cells form vascular channels. The authors suggest additional intravasation-specific mechanisms that are not discussed in the literature. In conclusion, the importance of targeted therapeutic strategies to prevent cancer intravasation is emphasized.

**Keywords:** intravasation, invasion, hematogenous metastasis, carcinomas, TMEM, extrusion