

# Органоспецифічне метастазування: модель *in vitro* для передбачення перебігу захворювання

**О. В. Кайряк**

Донецький національний медичний університет, Лиман, Україна

**Ключові слова:** органоспецифічне метастазування, тромбоцити, нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити як промотори метастазування, вірогідність метастазування, модель *in vitro*

## Вступ

Органоспецифічне метастазування досі є загадковою проблемою сучасної теоретичної онкології. Опис цього феномену належить видатному онкологу минулого Stephen Paget [4]. Він звернув увагу на різний прогноз захворювання в ідентичних хворих і висловив думку про ґрунт та насіння. Ця думка походить з Євангелія, де говориться про те, що якщо насіння впало на родючий ґрунт, з нього виросте міцна рослина. Навпаки, якщо насіння впало на кам'янистий ґрунт, то воно не проросте. Наразі доведено, що вибірковість метастазування залежить від багатьох чинників, у тому числі кількості циркулюючих екзосом, формування преметастатичних ніш, фенотипу циркулюючих пухлинних клітин. Усі ці процеси здійснюються за участі молекул адгезії, у тому числі й інтегринів [1]. Фармацевтичними компаніями розробляються таргетні препарати, які на тваринах показали зменшення утворення метастатичних осередків при їх застосуванні [8]. Але потім постає інша клінічна проблема: як відокремити людей з високим та низьким ризиком метастазування? Тому конструювання моделей *in vitro* для визначення стану онкохворого в реальному часі є досить актуальною клінічною проблемою.

**Метою** дослідження є розробка моделі *in vitro* для визначення стану онкохворого в реальному часі та апробація моделі на пацієнтах з верифікованими метастазами для подальшого передбачення ризику метастазування та визначення референтних показників.

## Матеріал та методи

Кров хворого на злоякісну пухлину досліджували в LAI-тесті до початку терапії, після завершення кожного етапу і після закінчення комплексного лікування з періодичністю 1 раз на місяць. У якості антигенів у тесті використовували водно-солеві екстракти первісних та метастатичних пухлин органів можливої пухлинної прогресії. З вени досліджуваного забирали 8–10 мл крові в вакутанер з антикоагулянтном. Лейкоцити для дослідження отримували

відстоюванням крові за 37 °С протягом 15–60 хв залежно від індивідуального показника швидкості осідання еритроцитів. Домішок еритроцитів видаляли обробкою 0,5% розчином хлориду амонію, після чого клітини одноразово відмивали у середовищі 199 і доводили їх концентрацію до 2 млн/мл.

У парні ємності 96-лункової плейти вносили 50 мкл культурального середовища (199 або RPMI 1640, або ІГЛА), 100 мкл водно-солевого екстракту пухлинної тканини первинного осередку або тканин алогенних метастазів, притаманних метастазуванню пухлини цієї локалізації, у концентрації 2 мг/мл за білком, 100 мкл суспензії лейкоцитів хворого на культуральному середовищі. У контрольних лунках пухлинний екстракт заміняли середовищем 199 або RPMI 1640, або ІГЛА. У парні ємності додавали 50 мкл донорської сироватки IV (AB), попередньо прогрітої за 56 °С з метою інактивації комплементу. У непарні ємності плейти вносили 50 мкл аутосироватки хворого.

Пластини закривали кришкою та інкубували 1,5 години за 37 °С. Далі пластини виймали, обережно перевертали догори дном та інкубували 30 хвилин у перевернутому положенні, що давало змогу під впливом сили тяжіння відокремити неприлипли клітини від прилиплих.

У більш ранній розробці аналізували кількість неприлиплих клітин. Для цього акуратно переносили рідину з клітинами, прекомітованими до антигенної мозаїки пухлинних антигенів, та підраховували їх кількість на автоматичному гематологічному аналізаторі. Індекс афінності визначали за формулою, де в чисельнику представлена різниця між кількістю клітин в досліджуваній та контрольній пробах, а в знаменнику — кількість клітин в контрольній пробі. Далі відношення множили на 100%.

Пізніше перейшли на аналіз прилиплої фракції, яка є більш репрезентативною, бо містить суміш клонів до різноманітних антигенів. Плейти виймали з термостату, акуратно струшували рідину

з неприлиплими клітинами на паперову серветку, фіксували прилиплу фракцію клітин 96% етанолом протягом 30 хв. Далі в ємності плейти додавали барвник (1% водний розчин метиленового синього або азур-еозин в стандартній концентрації), зафарбовували клітини упродовж години. Потім барвник струшували на серветку, тричі промивали фізіологічним розчином, знову струшували рідину, висушували. У сухі ємності плейти додавали димексид, який руйнує прилипли клітини і вивільняє фіксований ними барвник у рідину. Кількість фіксованих клітинами барвника в контрольних та дослідних ємностях оцінювали за допомогою спектрофотометричного вимірювання або за кольоровою шкалою.

Здатність запропонованого методу прогнозувати розвиток метастазів у майбутньому було досліджено в групі 189 хворих на рак молочної залози, які на момент обстеження вже мали віддалені метастази. Обстеження пацієнтів, які лікувалися в Донецькому обласному протипухлинному центрі, проводилося з 1989 до 2002 р. Контрольну групу становили 20 здорових донорів. Метастази в кістки мала 51 жінка, лімфатичні вузли — 21, шкіру — 1, паренхіму легень — 45, метастатичні плеврити — 25, метастатичне ураження паренхіми легень сукупно з плевритом — 8, метастатичне ураження печінки — 22, метастази в яєчники — 16.

Для оцінки значущості тесту було використано такі критерії, як діагностична чутливість та специфічність. Діагностична чутливість — здатність методу діагностувати захворювання у хворого, тобто давати позитивний результат у групі хворих. Обчислюється як відношення істинно позитивних результатів до всіх тестованих пацієнтів, помножене на 100%. Діагностична специфічність — здатність методу давати негативний результат у групі донорів. Розраховується як відношення істинно негативних результатів до всіх тестованих донорів, помножене на 100%.

Метод дає змогу порівняти результати, отримані на донорській та аутосіроватці. Щоб визначити суттєву різницю, скористалися 20% різницею у показниках на донорській та аутосіроватці. Якщо різниця не перевищувала 20%, вважали, що сироватка не впливає на результат. Якщо показник на донорській сироватці вищий на 20% і більше, то аутосіроватка блокує реакцію лейкоцитів до тестованого антигену. Якщо показник є вищим на аутосіроватці на ту ж саму величину (20% і більше), то мова йде про підсилення аутосіроваткою реакції лейкоцитів. Треба зазначити, що тест дає хибні результати, якщо кров у досліджуваного було взято заздалегідь.

### Результати та обговорення

Позитивну реакцію в тесті з антигенами метастазу в кістки на нормальній сироватці фіксували у 48 з 51 жінки, у лімфатичні вузли — у 17 з 21, у шкіру — в 1, у паренхіму легень — у 37 із 40, метастатичні плеврити — у 21 з 25, метастатичне ураження паренхіми легень сукупно з плевритом — у 5 із 7, метастатичне ураження печінки — у 17 з 18, метастази в яєчники — у 15 із 16.

Діагностична чутливість у тесті з кістковим антигеном на донорській сироватці дорівнює 94,12%,

з антигенами лімфатичних вузлів — 80,95%, паренхіми легень — 92,50%, антигенами метастатичних плевритів — 84,0%, сукупним ураженням легень (паренхіми та метастатичний плеврит) — 71,43%, антигенами печінкових метастазів — 94,44%, яєчників — 93,75%. Сукупна діагностична чутливість на донорській сироватці дорівнює 89,94%.

Проведення тесту на донорській сироватці дозволяє оцінити внесок клітин крові в кінцевий результат. До моделі залучені всі клітини крові, окрім еритроцитів. Зараз відомо, що в процесі метастазування беруть участь не тільки пухлинні клітини, але й туморасоційовані макрофаги, лімфоцити, нейтрофіли та тромбоцити. Завдяки методу, застосованому нами для виділення клітин, серед лейкоцитів можуть бути і крупні везикули, які осіли при такому режимі центрифугування.

Позитивну реакцію в тесті з антигенами метастазу в кістки на аутосіроватці фіксували у 42 з 51 жінки, у лімфатичні вузли — у 14 з 21, у шкіру — в 1, у паренхіму легень — у 32 з 45, метастатичні плеврити — у 19 з 23, метастатичне ураження паренхіми легень сукупно з плевритом — у 7 з 8, метастатичне ураження печінки — у 20 з 22, метастази в яєчники — у 13 із 16.

Діагностична чутливість у тесті з кістковим антигеном на аутосіроватці дорівнює 82,35%, з антигенами лімфатичних вузлів — 66,67%, паренхіми легень — 71,11%, антигенами метастатичних плевритів — 82,61%, сукупним ураженням легень (паренхіми та метастатичний плеврит) — 87,50%, антигенами печінкових метастазів — 90,91%, у яєчниках — 81,25%.

Сукупна діагностична чутливість на аутосіроватці дорівнює 78,72%.

Аутосіроватка онкохворого містить не тільки білки (у тому числі й імуноглобуліни), ліпіди та вільні нуклеїнові кислоти, але й екзосоми, у яких наявні різні види РНК і які мають таргетну спрямованість до цієї чи іншої тканини. У свою чергу, різні види екзосомальної мікроРНК мають як проонкогенну, так і антионкогенну властивості. Ідентифікація мікроРНК у конкретного хворого є досить дорогою процедурою і не може бути застосована як рутинне клінічне дослідження. Тому використання LAI-тесту на донорській та аутосіроватці дозволяє опосередковано оцінити вплив регуляторних послідовностей на пухлиноасоційований імунітет та події в рамках взаємодії «пухлина — організм», які передують росту метастазів. У ході аналізу впливу сироватки під час проведення тесту з кістковим антигеном встановлено, що аутосіроватка частіше за все не впливала на реакцію (52,94%). Частота блоку дорівнювала 31,37%, а посилення реєструвалося у 15,69% випадків.

У разі використання в тесті антигенів лімфатичних вузлів аутосіроватка також частіше не впливала на реакцію (47,62% випадків). На другому місці був варіант блоку (33,33%), а на останньому — варіант підсилення (19,05%). Аналогічний результат бачимо за наявності метастазів у паренхіму легень: аутосіроватка частіше за все не впливала на реакцію (53,84%), на другому місці реєструвався варіант

блоку (25,64%), а посилення реакції спостерігалось у 20,51% випадків. У разі наявності плевриту частіше за все сироватка не впливала на реакцію (52,17%), блок рееструвався у 21,74% випадків, а підсилення — у 26,08%. Сукупна патологія (ураження паренхіми легень з плевритом) дала такі результати: частіше за все рееструвався блок (42,86%), а підсилення та відсутність впливу відмічали у 28,57% випадків. При метастазах у печінку аутосіроватка частіше за все не впливала на реакцію (47,06%), блок рееструвався у 35,29%, а підсилення — у 17,65% випадків. Метастатичне ураження яєчників демонструвало варіанти відсутності впливу та підсилення реакції у 37,5%, блок рееструвався у 25% випадків.

Діагностична специфічність тесту в групі здорових донорів становила 80%.

Згідно з визначенням, під метастатичним каскадом розуміють «локальну інвазію клітин первісної пухлини в навколишні тканини, інтравазацію цих клітин в циркуляторну систему, виживання впродовж гематогенного транзиту, екстравазацію в паренхіму дистантних тканин, утворення мікротастатичних колоній, проліферацію та формування клінічно розпізнаваних метастатичних вогнищ» [3].

Як уже було зазначено вище, метастатичний каскад є дуже складною біологічною особливістю поведінки злоякісних пухлин. У клітинах материнської пухлини мають «заснути» гени, продукти яких забезпечують щільні контакти в епітеліальному пласті, та активуватися гени, що забезпечать відривання від щільної пухлинної маси окремих клітин, здатних пройти тканинно-судинний бар'єр. Далі пухлинні клітини повинні зберегтися в кровообігу, подолати судинно-тканинний бар'єр та осісти в тканині, яка буде найбільш спорідненою з мембранним фенотипом циркулюючої пухлинної клітини і найбільш придатною для розвитку метастазу. На всіх цих етапах пухлинна клітина не могла б вижити, якби не «допомога» нормальних тканин організму, у першу чергу клітин крові. Тканинно-судинний бар'єр осередкам пухлинних клітин допомагають подолати нейтрофіли, які здатні вивільняти в міжклітинне середовище гранули з літичними ферментами. Літичні ферменти утворюють у бар'єрі пролами, через які пухлинні осередки долають бар'єр та опиняються в кровообігу. Вижити пухлинному осередку в кровообігу допомагають в першу чергу тромбоцити, які, наче плащем, накривають скупчення пухлинних клітин чи поодинокі клітини [11]. Таким чином пухлинні клітини зменшують вплив турбулентних течій в крові та уникають тісного контакту з імунокомпетентними клітинами, які можуть їх знищити [7, 11]. Тромбоцити не мають ядра, але зберігають матричну РНК, яку успадкували від мегакаріоцитів, у тому числі й пухлинної природи. Ідентифікували до 6000 матричних РНК у цих без'ядерних клітинах. Крім РНК, успадкованих від мегакаріоцитів, тромбоцити можуть поглинати РНК з інших клітин шляхом екзосомальної передачі [6]. Активовані тромбоцити здатні здійснювати транскрипцію та секретувати вироблені протеїни в навколишнє середовище [6]. Можна припустити, що обмін

РНК між пухлинною клітиною та тромбоцитами може здійснюватися на етапі спільної циркуляції в кровообігу. Надбані пухлинною клітиною РНК можуть надавати більший ступінь злоякісності майбутнім метастатичним осередкам.

На мишачих моделях було показано, що краще утворюють метастази не поодинокі циркулюючі пухлинні клітини (ЦПК), а кластери ЦПК. У деяких випадках кластери ЦПК склалися не тільки з пухлинних клітин, а й з лейкоцитів. Ці випадки корелювали з більш коротким часом виживаності до прогресування, ніж випадки, коли кластери склалися лише з пухлинних клітин. Цікаво, що, крім нейтрофілів, у кластерах виявляли лімфоцити [2]. Генетична або фармакологічна інгібіція ферменту арахідонат 5-оксигенази (Alox5) припиняла прометастатичну активність нейтрофілів та редукувала метастази [10].

Далі пухлинний осередок чи пухлинна клітина долають гематотканинний бар'єр. У цьому пухлинному осередку допомагають нейтрофіли. Наприкінці метастатичного каскаду пухлинні клітини опиняються в середовищі іншої тканини і формують так звані сплячі метастази, пухлинні клітини в яких не проліферують. Сплячі метастази можуть залишатися в такому стані упродовж місяців, років та десятиліть [9]. Визначення чинників, які спричиняють пробудження метастазів і перехід їх до мітотичного циклу, сформує нові мішені для таргетної терапії, за допомогою якої можна буде підтримувати їх у сплячому вигляді, а людина в цей час буде жити повноцінним життям.

Метастатичні ураження з'являються інколи через десятки років. Можливо, упродовж усіх цих років нуклеїнові кислоти, притаманні злоякісній пухлині, зберігалися в клітинах пам'яті лімфоцитів і переходили в кістковому мозку. У разі появи метастатичних уражень лімфоцити генерують вторинну імунну відповідь, яка виступає у якості тригера при формуванні метастатичного осередка. Інший погляд на розвиток метастатичних пухлин полягає в тому, що лімфоцити спричиняють «прокидання» мікротастазу зі сплячого стану шляхом вивільнення цитокінів та підтримки хронічного запалення [5].

Приклади використання способу. Хворій Ц. (історія хвороби № 106052) 22.09.1999 р. після 3 курсів неоад'ювантної терапії проведено надпіхвову ампутацію матки з додатками та резекцією великого сальника. Патогістологічне дослідження № 26546-58: у яєчниках — недиференційована аденокарцинома, у сальнику — хронічне запалення. Протягом 2 років та 4 місяців після оперативного втручання пацієнтці було проведено 8 курсів хіміотерапії. Строки проведення лікування визначалися на підставі LAI-тесту. Далі упродовж 3 років тест був «спокійним», і спеціальне лікування не проводилося. Підвищення показників у тесті відбулося влітку 2004 р., але проведення чергового курсу хіміотерапії хворій було заборонено вищою особою як безглузде, тому що онкомаркера СА 125 був у нормі. Рівень онкомаркера підвищився в лютому 2005 р. (СА 125 від 10.02.2005 р. — 235,921) водночас з появою клінічних проявів подовження хвороби — наявністю асцити, метастазу в пупок.

Таким чином LAI-тест передуює підвищенню онкомаркера СА 125. Цей тест є *in vitro*-моделлю ситуації, яка склалася в організмі онкохворого.

LAI-тест не спрацьовує, якщо кров взято не *ex tempore*, а заздалегідь.

### Висновки

1. Запропонована нами модель прогнозування органоспецифічного метастазування у хворих на рак молочної залози має доволі високу діагностичну чутливість та специфічність. Діагностична чутливість на донорській сироватці дорівнює

89,94%, а на аутосироватці становить 78,72%. Специфічність — 80%.

2. Тест дозволяє визначити кількість та оптимальний час проведення курсів хіміотерапії в конкретного хворого.

3. Ми висловлюємо думку, що сенсом проведення ад'ювантної хіміотерапії є вплив не тільки на сплячі мікрометастази, але й на нормальні клітини системи крові, які виконують роль ад'ювантів у метастатичному каскаді та пробудженні сплячих метастазів.

### Література:

- Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T. L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015. Vol. 527, No 7578. P. 329–335.
- Iriondo O., Yu M. Unexpected friendship: neutrophils help tumor cells en route to metastasis. *Developmental cell*. 2019. Vol. 49, No 3. P. 308–310.
- Lambert A. W., Pattabiraman D. R., Weinberg R. A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*. 2017. Vol. 168, No 4. P. 670–691.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 1989. Vol. 8. P. 98–101.
- Park S. Y., Nam J. S. The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020. Vol. 52. P. 569–581.
- Rowley J. W., Schwertz H., Weyrich A. S. Platelet mRNA: the meaning behind the message. *Curr. Opin. Hematol.* 2012. Vol. 19, No 5. P. 385–391.
- Schmied L., Höglund P., Meinke S. Platelet-mediated protection of cancer cells from immune surveillance — possible implications for cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2021. Vol. 12. P. 640578.
- Sökeland G., Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Molecular Cancer*. 2019. Vol. 18. P. 12.
- Summers M. A., McDonald M. M., Croucher P. I. Cancer cell dormancy in metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2020. Vol. 10, No 4. P. a037556.
- Wculek S. K., Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature*. 2015. Vol. 528, No 7582. P. 413–417.
- Zhou L., Zhang Z., Tian Y., Li Z., Liu Z., Zhu S. The critical role of platelet in cancer progression and metastasis. *European Journal of Medical Research*. 2023. Vol. 28. P. 385.

УДК 616-006.6:57.083

doi: 10.33149/vkr.2024.04.10

## UA Органоспецифічне метастазування: модель *in vitro* для передбачення перебігу захворювання

**О. В. Кайряк**

Донецький національний медичний університет, Лиман, Україна

**Ключові слова:** органоспецифічне метастазування, тромбоцити, нейтрофіли, макрофаги, лімфоцити як промотори метастазування, імовірність метастазування, модель *in vitro*

**Вступ.** Проблема органоспецифічного метастазування досі хвилює уми дослідників. З'ясування закономірностей цього явища є важливим як для теоретичної онкології, так і для практики, оскільки сучасна клінічна онкологія тяжіє до індивідуалізації тактики лікування пацієнтів. До метастатичного каскаду залучені сотні генів, і їх ідентифікація є громіздким дослідженням, малоімовірним за умов клініки. Тому в клініці необхідно мати простий, швидкий, дешевий метод для визначення високої та низької імовірності органоспецифічного метастазування. Метод повинен мати досить високу діагностичну специфічність і чутливість.

**Метою** дослідження є розробка моделі *in vitro* для визначення стану конкретного хворого в реальному часі та апробація моделі на пацієнтах з верифікованими метастазами для подальшого прогнозування ризику метастазування та визначення референтних показників.

**Матеріал та методи.** Лейкоцити виділяли з 8–10 мл крові обстежуваного та доводили до концентрації 2 млн/мл. Як антигени використовували водно-сольові екстракти метастатичних пухлин органів можливого пухлинного прогресування. У парні лунки плейти вносили 50 мкл культурального середовища, 100 мкл екстракту первинної пухлини або алогенних метастатичних пухлин, 100 мкл суспензії лейкоцитів. У непарні лунки додавали 50 мкл сироватки IV (AB), а у парні — 50 мкл аутосироватки досліджуваного. У контрольні лунки замість екстракту пухлин додавали 50 мкл культурального середовища. Пластини закривали кришкою, інкубували 1,5 год за 37 °С. Далі пластини перевертали догори дном, інкубували 30 хв, що дало можливість відокремити прилиплі клітини від неприлиплих. Рідину з неприлиплими клітинами видаляли, а прилиплу фракцію фіксували 96% етанолом, забарвлювали метиленовим синім, тричі промивали фізрозчином, додавали димексид. Кількість барвника оцінювали за допомогою спектрофотометричного аналізу або за колірною шкалою.

**Результати та обговорення.** Спроможність запропонованого методу прогнозувати метастази була оцінена у 189 хворих на рак молочної залози з попередньо верифікованими метастазами, які лікувалися в Донецькому обласному протипухлинному центрі з 1989 до 2002 р. Контрольну групу становили 20 донорів. Метастази в кісткову систему було виявлено у 51 жінки, у лімфатичні вузли — у 21, у шкіру — в 1, у паренхіму легень — у 45, метастатичні плеврити — у 25, поєднане метастатичне ураження паренхіми легень з плевритом — у 8, у печінку — у 22, у яєчники — у 16.

Діагностична чутливість у тесті з кістковим антигеном на донорській сироватці становила 94,12%, з антигеном лімфовузлів — 80,95%, паренхіми легень — 92,50%, антигенами метастатичних плевритів — 84,0%, поєднаним ураженням легень (паренхіми та метастатичний плеврит) — 71,43%, антигенами метастазів у печінку — 94,44%, яєчників — 93,75%. Сукупна діагностична чутливість на донорській сироватці становила 89,94%. Додавання до тест-системи донорської сироватки дозволяє оцінити внесок клітин крові та великих везикул у процес метастазування.

Діагностична чутливість у тесті з кістковим антигеном на ауто сироватці становила 82,35%, з антигеном лімфовузлів — 66,67%, паренхіми легень — 71,11%, антигенами метастатичних плевритів — 82,61%, поєднаним ураженням легень (паренхіми та метастатичний плеврит) — 87,50%, антигенами метастазів у печінку — 90,91%, яєчників — 78,72%. Сукупна діагностична чутливість на ауто сироватці становила 78,72%. Сукупна діагностична чутливість на ауто сироватці є нижчою, ніж на донорській. Чим це викликано, залишається невідомим.

Метастатичний каскад не міг би реалізуватися, якби не допомога нормальних клітин організму, насамперед клітин системи крові. Нейтрофіли шляхом викиду літичних ферментів і нетозу допомагають метастатичним клітинам подолати тканинно-гематологічний і гематоканітинний бар'єри, тромбоцити зберігають пухлинні клітини в циркуляції, макрофаги та лімфоцити сприяють формуванню мікрооточення та спільно з нейтрофілами пробуджують «сплячі» метастази.

**Висновки.** 1. Запропонована нами модель прогнозування органоспецифічного метастазування у хворих на рак молочної залози демонструє досить високу діагностичну чутливість та специфічність. Діагностична чутливість на донорській сироватці становить 89,94%, а на ауто сироватці — 78,72%. Специфічність показала рівень 80%.

2. Тест дозволяє визначити кількість та оптимальний час проведення курсів хіміотерапії в конкретного хворого.

3. Ми припускаємо, що сенсом проведення ад'ювантної хіміотерапії є вплив не тільки на «сплячі» мікрOMETASTAZI, а й на нормальні клітини системи крові, які виконують роль ад'ювантів у метастатичному каскаді та пробудженні «сплячих» метастазів.

## EN Organ-specific metastasis: an *in vitro* model for predicting the course of disease

**O. V. Kayryak**

Donetsk National Medical University, Lyman, Ukraine

**Key words:** organ-specific metastasis, platelets, neutrophils, macrophages, lymphocytes as promoters of metastasis, metastasis probability, *in vitro* model

**Introduction.** The problem of organ-specific metastasis still captivates researchers. Elucidation of the patterns of this phenomenon is important not only for theoretical oncology but also for practice, since modern clinical oncology tends to individualize patient treatment tactics. Hundreds of genes are involved in the metastatic cascade, and their identification is a cumbersome study that is ineffective in a clinical setting. Therefore, the clinic needs a simple, fast, and cheap technique for determining the high and low probability of organ-specific metastasis. The technique should have sufficiently high diagnostic specificity and sensitivity.

The study's **aim** is to create an *in vitro* model that can show the condition of a specific patient in real time and then test the model on patients who already have metastases. This will allow the risk of metastasis to be predicted and reference indicators to be found.

**Materials and methods.** We isolated leukocytes from 8–10 ml of the patient's blood and brought them to a concentration of 2 million/ml. We used water-salt extracts of metastatic tumors from organs with possible tumor progression as antigens. In each paired well of the plate, 50  $\mu$ l of culture medium, 100  $\mu$ l of primary tumor extract or allogeneic metastatic tumors, and 100  $\mu$ l of leukocyte suspension were added. 50  $\mu$ l of serum IV (AB) were added to odd wells, and 50  $\mu$ l of the subject's autoserum were added to even wells. 50  $\mu$ l of culture medium were added to control wells instead of tumor extract. We covered the plates with a lid and incubated them for 1.5 h at 37 °C. We then turned the plates upside down and incubated them for 30 min, allowing us to separate adherent cells from non-adherent ones. We removed the fluid containing non-adherent cells, fixed the adherent fraction with 96% ethanol, stained it with methylene blue, washed it three times with saline, and added dimexide. We estimated the amount of dye using spectrophotometric analysis or a color scale.

**Results and discussion.** We assessed the proposed method's ability to predict metastases in 189 breast cancer patients with known metastases treated at the Donetsk Regional Antitumor Center from 1989 to 2002. The control group consisted of twenty donors. Fifty-one women had metastases in their bones, twenty-one to their lymph nodes, one to their skin, forty-five to their lungs, twenty-five to their pleurisy, eight to a pleurisy and lung parenchyma metastasis together, twenty-two to their liver, and sixteen to their ovaries. The diagnostic sensitiv-

ity was 94.12% for the bone antigen test on donor serum, 80.95% for lymph node antigens, 92.50% for lung parenchyma antigens, 84.0% for metastatic pleurisy antigens, 71.43% for combined lung lesions (parenchyma and metastatic pleurisy), 94.44% for liver metastasis antigens, and 93.75% for ovarian antigens. The combined diagnostic sensitivity on donor serum was 89.94%. The addition of donor serum to the test system allows for an assessment of the contribution of blood cells and large vesicles to the metastasis process.

The diagnostic sensitivity was 82.35% for the bone antigen test on autoserum, 66.67% for lymph node antigen, 71.11% for lung parenchyma antigens, 82.61% for metastatic pleurisy antigens, 87.50% for combined lung lesion (parenchyma and metastatic pleurisy), 90.91% for liver metastasis antigens, and 78.72% for ovarian antigens. The combined diagnostic sensitivity on autoserum was 78.72%. Autoserum has a lower combined diagnostic sensitivity than donor serum. The reason for this remains unknown.

Normal body cells, particularly those in the blood sys-

tem, played a crucial role in realizing the metastatic cascade. Because they release lytic enzymes and NETosis, neutrophils help metastatic cells get past the tissue-hematological and hemato-tissue barriers. Platelets keep tumor cells moving; macrophages and lymphocytes help create a microenvironment; and neutrophils and lymphocytes wake up dormant metastases.

**Conclusions.** 1. The model we proposed for predicting organ-specific metastasis in patients with breast cancer demonstrates a relatively high diagnostic sensitivity and specificity. On donor serum, the diagnostic sensitivity is 89.94%, and on autoserum, it is 78.72%. The specificity level was 80%.

2. The test allows us to determine the number and optimal timing of chemotherapy courses for a specific patient.

3. We think that the goal of adjuvant chemotherapy is to affect both dormant micrometastases and normal cells in the blood system. These cells help the metastatic cascade and wake up dormant metastases.