

Received: 2009.10.15
Accepted: 2009.11.16
Published: 2009.12.08

Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów?*

Angiogenesis and immune suppression: yin and yang of tumor progression?

Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Podczas progresji nowotworowej powstają swoiste warianty komórek nowotworowych, które mają zdolność rekrutowania ze szpiku i z krwiobiegu niektórych komórek hematopoetycznych i mezenchymalnych. Wśród rekrutowanych komórek hematopoetycznych są m.in. monocyty, makrofagi, granulocyty, komórki tuczne, komórki dendrytyczne i mieloblastyczne komórki supresorowe. Komórki nowotworowe rekrutują także wywodzące się z komórek mezenchymalnych komórki fibroblastów. Pod wpływem komórek nowotworowych niektóre z rekrutowanych komórek (zwłaszcza makrofagi i fibroblasty) podlegają fenotypowemu przeprogramowaniu: swoistej „edukacji”. W wyniku takiej „edukacji” powstają charakterystyczne dla nowotworów makrofagi (TAM) oraz fibroblasty (CAF). Komórki TAM, CAF, pozostałe komórki zrekrutowane oraz macierz pozakomórkowa (ECM) tworzą swoiste mikrośrodowisko nowotworowe. Komórki mikrośrodowiska wraz z komórkami nowotworowymi biorą udział w dwóch, ściśle ze sobą powiązanych, nierozdzielalnych procesach: angiogenezie i immunosupresji. Powstające podczas angiogenezy niesprawne naczynia krwionośne i związany z nimi zmienny przepływ krwi powodują powstawanie niedotlenienia, które ma istotny wpływ na metaboliczny profil komórek nowotworowych (np. niskie zużycie tlenu). W niedotlenionych komórkach zachodzą także inne procesy korzystne dla dalszej progresji: np. wzmożona, nasilona angiogeneza, przejście epithelialno-mezenchymalne, dzięki któremu komórki nowotworowe nabywają zdolności samodzielnego przemieszczania się. Niedotlenianie wpływa także na wzrost genetycznej niestabilności komórek nowotworowych. Komórki mikrośrodowiska mają także swój udział w powstaniu środowiska immunosupresyjnego, umożliwiającego ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. Tworząc wysoce swoiste otoczenie selekcyjne odpowiednie komórki nowotworowe (mające fenotyp angiogeny i immunosupresyjny) komórki mikrośrodowiska mają istotny wpływ na progresję komórek nowotworowych. Zahamowanie angiogenezy umożliwia powstanie odpowiedzi odpornościowej (zarówno swoistej jak i nieswoistej). Spostrzeżenia te mogą posłużyć do zaprojektowania nowych rozwiązań terapeutycznych, w których leki antyangiogenne będą kojarzone z lekami immunomodulacyjnymi.

Słowa kluczowe:

angiogeneza • immunosupresja • progresja nowotworowa

Summary

Specialized variants of neoplastic cells that appear in tumors during cancer disease progression possess the ability to recruit certain kinds of hematopoietic and mesenchymal cells from the bone marrow or bloodstream. These tumor-recruited hematopoietic cells include monocytes,

* Publikacja została sfinansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr NN 401 034 736.



macrophages, granulocytes, mast and dendritic cells, as well as myeloblastic suppressor cells. Fibroblasts derived from undifferentiated mesenchymal cells are also recruited. Some of these cells (especially macrophages and fibroblasts) then undergo “education-like” phenotype reprogramming under the influence of the neoplastic cell population, resulting in the appearance of tumor-associated macrophages (TAM) and fibroblasts (CAF). Together with the extracellular matrix (ECM) as well with the remaining types of recruited cells, they contribute to the formation of a specific tumor microenvironment. Both the cells forming the tumor microenvironment and neoplastic cells engage in the two intimately linked processes of angiogenesis and immune suppression. The network of defective blood vessels formed during tumor angiogenesis and the resulting fluctuations in blood flow lead to under-oxygenation of the surrounding neoplastic cells and have substantial impact on their metabolic profile. A number of processes triggered in these under-oxygenated neoplastic cells appear to strongly favor further tumor progression. Such processes result in lower oxygen demand, enhanced angiogenesis, and epithelial-mesenchymal transition, owing to which the neoplastic cells acquire the ability to translocate. Under-oxygenation also leads to augmented genetic instability of the neoplastic cells. The tumor environment-forming cells also have their share in the establishment of an immunosuppressive environment which enables the neoplastic cells to escape immune surveillance. By providing a sophisticated milieu for the selection of increasingly malignant neoplastic cells (i.e. with proangiogenic and immunosuppressive phenotypes), the tumor microenvironment-forming cells substantially contribute to the progression of a neoplasm. Inhibited angiogenesis thus makes an immune response, both nonspecific and specific, possible. The remarks presented here may prove helpful in devising novel anticancer strategies involving antiangiogenic in combination with immunomodulatory drugs.

Key words: angiogenesis • immune suppression • tumor progression

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=900108>

Word count: 5864

Tables: 3

Figures: 4

References: 109

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Szala, Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: szsala@io.gliwice.pl

Jin wg tradycyjnej kosmologii chińskiej: żeńska, negatywna zasada zawarta np. w pasywności, głębinach, ciemności, zimnie i wilgoci w przyrodzie, łącząca się i współpracująca ze swym przeciwieństwem jang.

W. Kopaliński „Słownik wyrazów obcych i zwrotów obcojęzycznych.” WP, Warszawa, 1989

1. WSTĘP

Podczas progresji, lub też inaczej mówiąc: swoistej ewolucji komórek nowotworowych, powstają komórki o różnych charakterystycznych właściwościach (tab. 1) [40,58,108]. Niektóre z tych właściwości: oporność na egzogenne inhibitory wzrostu, apoptozę, nieograniczony potencjał replikacyjny, zdolność wytwarzania własnych sygnałów wzrostowych czy ucieczka spod nadzoru immunologicznego pozwalają komórkom nowotworowym uzyskać swoistą autonomię. Ta niezależność od systemów kontrolnych gospodarza jest wynikiem zerwania pewnych więzi socjalnych z niektórymi komórkami gospodarza. Natomiast powstawanie naczyń krwionośnych i przerzutów, to procesy w których odgrywają rolę nowe socjalne relacje komórek nowotworowych (tab. 1). Komórki nowotworowe nawiązują swego rodzaju „dialog” m.in.: z komórkami śródbłonkowymi, fibroblastami, makrofagami, granulocytami,

komórkami tucznyymi. Komórki tworzące swoiste więzi z komórkami nowotworowymi, nazywa się komórkami zrębu (*stroma*) [79,92] lub komórkami mikrośrodowiska nowotworowego [8].

Komórki mikrośrodowiska biorą udział w dwóch, ściśle ze sobą powiązanych procesach: powstawaniu naczyń krwionośnych (angiogenezie) oraz w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej (immunosupresji). Komórki uczestniczące w tych procesach (np. komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych, makrofagi, fibroblasty) od lat stanowią oczywiste cele terapeutyczne [26,42,69,97].

Niektóre dane wskazują, że kombinacja strategii antyangiogennej z immunoterapią może się okazać skutecznym rozwiązaniem terapeutycznym [47]. Zwrócenie uwagi na tego typu terapeutyczną możliwość było celem pracy.

2. REKRUTACJA PRZEZ KOMÓRKI NOWOTWOROWE KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH I MEZENCHYMALNYCH

W powstawaniu swoistego mikrośrodowiska nowotworowego wiodącą rolę odgrywają komórki nowotworowe. Niektóre z tzw. „wczesnych wariantów genetycznych” (zwłaszcza te, w których są aktywne onkogeny *RAS*, *RET*, *MYC*) mają zdolność wytwarzania różnych cząsteczek

Tabela 1. Siedem podstawowych właściwości komórek nowotworowych*

Zerwane więzi „socjalne”, autonomia komórek nowotworowych	Nowe więzi „socjalne”
• Własne sygnały wzrostu	• Tworzenie naczyń krwionośnych i limfatycznych
• Oporność na egzogenne inhibitory wzrostu	• Inwazyjny wzrost, przerzuty
• Oporność na apoptozę	
• Nieograniczony potencjał replikacyjny	
• Ucieczka spod nadzoru immunologicznego	

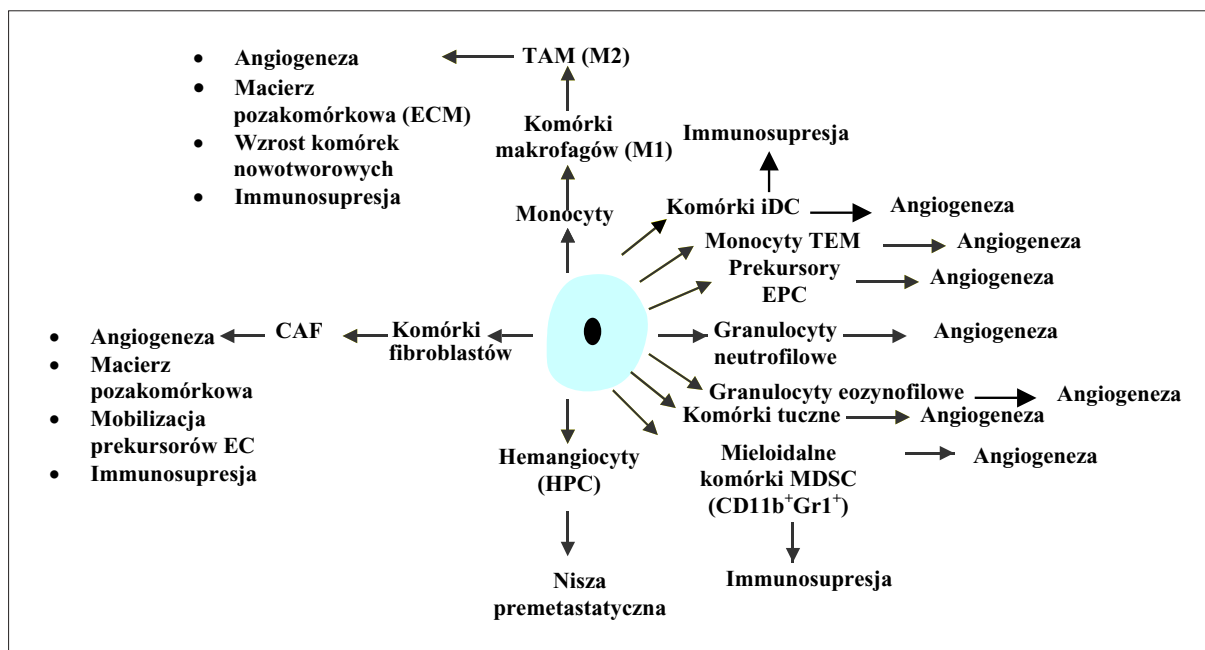
* Siedem głównych właściwości komórek nowotworowych [40,108] można przedstawić nie tylko jako „socjalne” cechy charakteryzujące komórki nowotworowe. Można je zinterpretować także jako „metaboliczne cechy komórek nowotworowych”. Na przykład zahamowanie oksydacyjnej fosforylacji może mieć wpływ na wzrost oporności na apoptozę; aktywacja HIF-1 może mieć wpływ na inwazyjność i powstawanie przerzutów itd. (zob. [58]). Siedem podstawowych właściwości komórek nowotworowych można również przedstawić jako cechy mające wpływ na odpowiedź immunologiczną. Na przykład zmutowane białko P53, które ma swój udział w powstaniu nieograniczonego potencjału replikacyjnego, jest także antygenem charakterystycznym dla nowotworów; zdolność wytwarzania własnych sygnałów wzrostu może być powiązana z wytwarzaniem przez komórki nowotworowe niektórych cytokin (np. IL-4, IL-6, IL-10) biorących udział np. w różnicowaniu limfocytów T (np. Th2) (zob. [108]). Limfocyty Th2 to limfocyty wytwarzające interleukiny: 4, 5, 10 i 13.

sygnałnych (cytokin, chemokin, prostaglandyn) [10]. Za ich pośrednictwem komórki nowotworowe rekrutują ze szpiku

i z krwiobiegu komórki reakcji zapalnej m.in.: różnego rodzaju monocyty, mieloidalne komórki supresorowe MDSC (myeloid- derived suppressor cell, u myszy określane symbolem: CD11b⁺Gr1⁺), granulocyty, komórki tuczne (ryc. 1) [66,73]. Niektóre z tych komórek, „edukowane” przez komórki nowotworowe, stają się komórkami „swoistymi” nowotworów (np. charakterystyczne dla nowotworów makrofagi czy fibroblasty).

Swoiste dla nowotworów makrofagi TAM (tumor associated macrophages) mogą stanowić do 50% masy nowotworu [72]. Różnią się one swym fenotypem od makrofagów występujących w narządach prawidłowych. Makrofagi występujące w narządach prawidłowych (określane jako M1) pełnią głównie funkcje immunostymulujące (wytwarzają IL-12). Jako komórki reakcji zapalnej biorą udział w fagocytozie. Natomiast makrofagi TAM, określane jako M2, pełnią głównie funkcje immunosupresyjne (wytwarzają IL-10) i dzięki wytwarzanym przez siebie proangiogennym czynnikom (głównie: VEGF) biorą udział w powstawaniu naczyń krwionośnych (ryc. 1). Czynniki aktywujące makrofagi M1 są: lipopolisacharyd pochodzenia bakteryjnego LPS i interferon γ (IFN- γ). Natomiast czynnikami stymulującymi makrofagi M2 są cytokiny: IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- β . Monocytarne prekursorzy komórek TAM są rekrutowane z krwiobiegu przez komórki nowotworowe za pomocą chemokin CCL2 (MCP-1) i CCL3 (MIP-1 α), oraz czynników wzrostowych VEGF, PlGF [73]. W tabeli 2. przedstawiono omawiane w tej pracy cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostowe biorące udział w progresji nowotworów.

Komórki TAM tworzą złożone relacje z komórkami nowotworowymi, śródbłonkowymi i komórkami układu odpornościowego. TAM wydzielają wiele działających na komórki śródbłonkowe czynników proangiogennych (m.in.: VEGF, bFGF, IL-1 β , TNF- α , CXCL8 (IL-8), PDGF β)



Ryc. 1. Komórki nowotworowe rekrutują ze szpiku i z krwiobiegu szereg różnych komórek. Zrekrutowane komórki pełnią głównie rolę w stymulacji angiogenezy i indukcji immunosupresji



Tabela 2. Lista omawianych czynników wzrostu, cytokin, chemokin oraz ich receptorów (wg [73,101])

Czynniki wzrostu	Receptory
· VEGF (czynnik wzrostu śródbłonna naczyń)	VEGFR1, 2
· PlGF (czynnik wzrostu łożyska)	VEGFR1
· PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu)	PDGFR α , β
· bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów)	FGFR1-4
· EGF (czynnik wzrostu naskórka)	EGFR
· IGF (insulinopodobny czynnik wzrostu)	IGF-1/IIIR
· HGF (czynnik wzrostu hepatocytów)	c-Met
· Ang1, Ang2 (angiopoetyna 1 i 2)	TIE-2
· Osteopontyna	CD44, VLA-4, $\alpha_v\beta$
Chemokiny	Receptory
· CCL2 (MCP-1, białko chemotaktyczne dla monocytów)	CCR1, 2
· CCL3 (MIP-1a, białko zapalne makrofagów)	CCR1, 5
· CCL5	CCR1, 3, 4, 5
· CCL8	CCR1, 2, 3, 5
· CCL11	CCR3, 5
· CCL22	CCR4
· CXCL1 (MIP-2, białko zapalne makrofagów)	CXCR1, 2
· CXCL2	CXCR2
· CXCL3	CXCR2
· CXCL5	CXCR1, 2
· CXCL6	CXCR1, 2
· CXCL8 (interleukina 8)	CXCR1, 2
· CXCL12 (SDF1, czynnik pochodzący z komórek zrębowych)	CXCR4, 7
· SCF (KIT) (czynnik komórek macierzystych)	CD117 (KIT)
Cytokiny	Receptory
· IL-1 β	IL-1R1
· IL-3	IL-3R (CD123)
· IL-4	IL-4R
· IL-6	IL-6R
· IL-10	IL-10R
· IL-12	IL-12R
· IL-13	IL-13R
· TNF- α (czynnik martwicy nowotworów α)	TNFR1
· TGF- β (transformujący czynnik wzrostu β)	TGF- β R I/II
· IFN- γ (interferon γ)	IFNAR1
· G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów)	G-CSFR
· M-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów)	M-CSFR
· GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów)	GM-CSFR
· TRAIL (zbliżony do TNF ligand indukujący apoptozę)	TRAILR1, 2
· BV8	EG-VEGFR1, 2

[73]. Wytwarzają czynniki wzrostowe działające na komórki nowotworowe (EGF, IL-6, CXCL8) [2], czynniki immunosupresyjne (VEGF, IL-10, TGF- β , prostaglandynę PGE2). Za pomocą enzymów (MMP7, MMP9, MMP12, uPA) komórki TAM przekształcają macierz pozakomórkową (ECM). Wytwarzają białka ECM, takie jak fibryna i kolagen [2,73].

Komórki nowotworowe rekrutują ze szpiku także inne komórki reakcji zapalnej (ryc. 1). Monocyty TEM (TIE-2 – expressing monocytes), to subpopulacja monocytów zawierających receptory TIE-2 angiopoetyny 1 i 2 (Ang1 i 2) [73]. Komórki te są rekrutowane ze szpiku przez chemokiny CCL3, CCL5, CCL8, także przez Ang2. TEM wydzielają proangiogenne czynniki bFGF i Ang2. Czynniki Ang2 hamuje wydzielanie przez TEM antyangiogennej cytokiny IL-12.

Hemangiocyty to komórki zawierające receptory VEGFR1, CXCR4, TIE-2 i markery, takie jak SCA1 i CD117 [73]. Komórki te są rekrutowane przez komórki nowotworowe za pośrednictwem CXCL12 i VEGF. Hemangiocyty mają wszelkie cechy hematopoetycznych komórek progenitorowych (HPC) (receptory VEGFR1, zdolność do wydzielania MMP9) i mogą odgrywać rolę w powstawaniu tzw. niszy premetastatycznej [49].

Granulocyty neutrofilowe są rekrutowane ze szpiku z udziałem chemokin: CXCL8 (IL-8), CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 [73]. Pod wpływem TNF- α granulocyty te ulegają degranulacji i uwalniają VEGF, CXCL8, MMP9. Rekrutacja przez chemokinę CCL2 makrofagów hamuje rekrutację neutrofilów [80]. Natomiast zahamowana rekrutacja makrofagów zwiększa infiltrację guzów nowotworowych przez neutrofile wydzielające MMP9.

Granulocyty eozynofilowe są rekrutowane przez chemokinę CCL11 [73]. Chemokina ta jest wydzielana przez komórki nowotworowe, a także przez fibroblasty i komórki śródbłonkowe. Eozynofile zawierają w swych ziarnistościach VEGF, bFGF, IL-6, CXCL8, GM-CSF, PDGF, TGF- β i MMP9. Podobnie jak komórki TAM, eozynofile ulegają degranulacji w rejonach niedotlenowanych i martwiczych.

Komórki tuczne są rekrutowane ze szpiku przez SCF (ligand KIT) (stem cells factor), IL-3, CCL11 i adrenomedulinę [73]. Ziarnistości komórek tucznych zawierają m.in.: VEGF, bFGF, MMP9, TNF- α , TGF- β , CCL2, CXCL8, heparinę i histaminę. Niedotlenienie powoduje degranulację i wydzielanie proangiogennych czynników i chemokin.

Niedojrzałe mieloidalne komórki dendrytyczne tzw. iDC (immature dendritic cells) pochodzą ze szpiku i są rekrutowane przez komórki nowotworowe za pomocą CXCL12, CXCL8, β -defensyny i VEGF [73]. Komórki iDC biorą udział w angiogenezie (wydzielają TNF- α , CXCL8, osteopontynę, która uwalnia IL-1 β z monocytów). Wydzielane przez te komórki chemokiny: CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 rekrutują dodatkowo ze szpiku granulocyty neutrofilowe. Pod wpływem VEGF i onkostatyny M komórki iDC ulegają prawdopodobnie „transróżnicowaniu” do komórek śródbłonkowych (EC). „Zróżnicowane” komórki mają charakterystyczne markery komórek EC: VE kadherynę i czynnik von Willebranda.

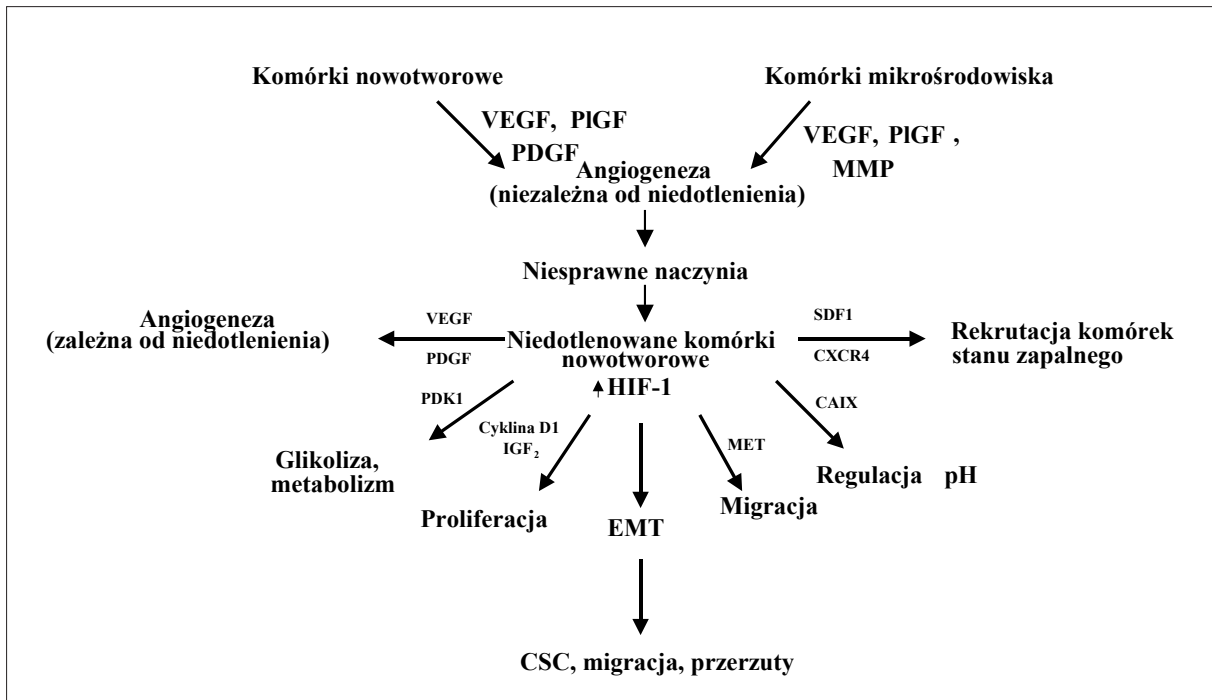
Czynnik proangiogeny VEGF hamuje dojrzewanie iDC [73]. Wpływ na dojrzewanie iDC mają także: TGF- β , PGE2, kwas mlekowy, osteopontyna. Niedotlenienie indukuje wydzielanie przez komórki iDC czynników VEGF i CXCL8, które z kolei hamują dojrzewanie innych komórek iDC.

Jedną z głównych ról w procesie kształtowania mikrośrodowiska nowotworowego odgrywają mieloidalne komórki supresorowe MDSC (CD11b⁺Gr1⁺) [92]. Komórki te są rekrutowane ze szpiku za pośrednictwem BV8, CCL2, CXCL12, SXCL5, SCF (ligand KIT) [73]. Komórki CD11b⁺Gr1⁺ są prekursorami trzech linii komórkowych. Z pierwszej wywodzą się monocyty i makrofagi, z drugiej neutrofile, z trzeciej komórki dendrytyczne. W różnicowaniu szpikowych komórek progenitorowych do komórek CD11b⁺Gr1⁺ i wywodzących się z nich: makrofagów, neutrofilów i komórek dendrytycznych biorą udział głównie cytokiny G-CSF i GM-CSF wydzielane m.in. przez komórki nowotworowe i komórki fibroblastów. Niedojrzałe komórki CD11b⁺Gr1⁺ oraz wywodzące się z nich makrofagi i niedojrzałe komórki dendrytyczne iDC mają zarówno właściwości proangiogenne jak i immunosupresyjne [92]. Istotną rolę w indukcji angiogenezy odgrywają proangiogenne cytokiny VEGF i BV8, wydzielane przez neutrofile, a także enzym MMP9, który uwalnia VEGF z macierzy pozakomórkowej (ECM). Niektóre dane wskazują na możliwość „transróżnicowania” komórek CD11b⁺Gr1⁺ do komórek EC [92]. Immunosupresyjne właściwości komórek CD11b⁺Gr1⁺ są związane głównie z aktywnością takich enzymów jak iNOS i arginaza 1, których produkty hamują aktywność limfocytów T i NK. W bezpośrednich kontaktach: komórka MDSC – limfocyt komórki MDSC dzięki wydzielanemu NO i nitrozytacji inaktywują receptor TCR znajdujący się na komórkach limfocytów T [74]. Czynniki VEGF wydzielany przez powstałe z komórek CD11b⁺Gr1⁺ makrofagi i neutrofile hamuje dojrzewanie komórek iDC [92].

W nowotworach występują także komórki pochodzenia mezenchymalnego, swoiste dla nowotworów fibroblasty (carcinoma associated fibroblasts – CAF) (ryc.1). Komórki te mają kilka charakterystycznych markerów m.in.: wimentynę, α -aktynę występującą w mięśniach gładkich, białko aktywujące fibroblasty (FAP) [48]. Ze względu na obecność α -aktyny fibroblasty CAF określa się często mianem miofibroblastów. Pod wpływem VEGF fibroblasty, komórki śródbłonkowe oraz komórki nowotworowe wydzielają czynnik aktywujący metaloproteiny MMP, tzw. EMMPRIN, który indukuje różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów [44]. Komórki śródbłonkowe (EC) mogą także ulec tzw. przejściu endotelialno-mezenchymalnemu (EndMT). W wyniku tego przejścia z komórek śródbłonkowych powstają komórki podobne do miofibroblastów [106]. W nowo powstałych komórkach pojawia się białko swoiste dla fibroblastów FSP1 (fibroblast specific protein 1), oraz maleje ekspresja białka CD31/PECAM charakterystycznego dla EC.

Fibroblasty CAF wytwarzają wiele czynników wzrostowych, m.in.: EGF, PDGF, FGF, HGF, IGF. Wydzielają enzymy degradujące macierz pozakomórkową, m.in.: MMP2, MMP3, MMP9. Wytwarzają białka ECM takie jak kolagen typ I i tenascynę. Aktywowane fibroblasty wytwarzają cytokinę IL-1 β , chemotaktyczne białko monocytów MCP-1, a także białko SDF1 (CXCL12), które mobilizuje ze szpiku progenitorowe komórki śródbłonkowe (endothelial





Ryc. 2. Komórki nowotworowe jak i komórki mikrośrodowiska biorą udział w stymulacji angiogenezy. Nowo powstałe naczynia krwionośne są w wysokim stopniu niesprawne. Wokół takich naczyń pojawia się niedotlenienie. W niedotlenianych komórkach nowotworowych, pod wpływem czynnika transkrypcyjnego HIF-1 indukowanych jest wiele różnych procesów, które modyfikują fenotyp komórek nowotworowych

progenitor cells – EPC). Fibroblasty mają się wywodzić z krążących w krwiobiegu prekursorów typu MSC (mesenchymal stem cells) [68]. Dzięki wydzielanym enzymom MMP i rekrutowanym przez siebie komórkom EPC fibroblasty biorą udział w angiogenezie, a poprzez wydzielany TGF- β , mogą mieć wpływ na immunosupresję.

Miofibroblasty mogą także wpływać na wzrost oporności komórek nowotworowych na leki. Dzięki niektórym wydzielanym czynnikom (NO, IL-1 β) hamują aktywność kaspaz biorących udział w apoptozie komórek nowotworowych. Zahamowanie aktywności kaspaz w komórkach nowotworowych zwiększa ich oporność na leki [71]. Miofibroblasty mogą także, poprzez metylację motywów CpG, inaktywować m.in. promotor czynnika transkrypcyjnego STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) oraz geny kodujące kaspazy znajdujące się w komórkach nowotworowych [71]. Czynniki STAT1 bierze głównie udział w transkrypcji genów kodujących cytokiny.

Rekrutowane przez komórki nowotworowe komórki hematopoetyczne (makrofagi, komórki dendrytyczne, iDC, komórki CD11b⁺Gr1⁺) oraz komórki mezenchymalne (fibroblasty) mają fenotyp proangiogeny i immunosupresyjny (ryc. 2). Ich udział w powstawaniu nowych naczyń nowotworowych polega na wytwarzaniu czynników proangiogeny i enzymów modyfikujących ECM. Są one zdolne do fenotypowego przekształcania się w komórki śródbłonkowe.

3. ANGIOGENEZA. NOWOTWOROWE NACZYNIA KRWIONOŚNE

Powstawanie naczyń krwionośnych jest uważane za warunek *sine qua non* progresji nowotworowej [31,32]. Nowotwory

bowiem nie mogą się rozwijać bez własnej sieci naczyń. I choć w angiogenezie bierze udział wiele czynników proangiogeny, to jednak główną rolę odgrywa VEGF (VEGF-A) i dwie jego podstawowe izoformy VEGF₁₂₁ i VEGF₁₆₅ [54]. VEGF-A należy do rodziny czynników VEGF [25]. Oprócz VEGF-A zalicza się do niej także VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i PIGF. Głównym receptorem VEGF-A jest błonowy receptor VEGFR2. Receptor ten występuje głównie na komórkach śródbłonkowych naczyń. Aktywacja tego receptora inicjuje dwa główne szlaki sygnałowe: PLC γ -PKC-Raf-MEK-MAPK oraz szlak: PI3K-Akt [54]. Szlak pierwszy stymuluje podziały komórkowe. Drugi reakcje związane z tzw. przeżyciem (survival) komórek śródbłonkowych. Aktywacja receptora VEGFR2 zwiększa przepuszczalność naczyń, wpływa na migrację komórek śródbłonkowych oraz na rekrutację ze szpiku progenitorowych komórek śródbłonkowych (EPC).

Receptor VEGFR1 występuje głównie na komórkach monocytów, makrofagów i hematopoetycznych komórkach macierzystych (HSC) [54]. Rola receptora VEGFR1 nadal nie jest dobrze poznana. Wiadomo, że wiąże on prawie 10 razy silniej czynniki VEGF-A, ale sygnał transdukcji generowany przez ten receptor jest wyjątkowo słaby. W pewnych wypadkach, pełni on funkcje tzw. receptora pułapkowego.

Wiązanie czynnika VEGF-C przez receptory VEGFR3 znajdujące się na komórkach LEC (lymphatic endothelial cells), stymuluje powstawanie naczyń limfatycznych: limfangiogenezę [1]. Rola czynnika VEGF-D w powstawaniu naczyń limfatycznych nie jest dobrze poznana. W wiązaniu czynnika VEGF-C przez receptory VEGFR3 biorą udział koreceptory neuropiliny 2 (NRP2). W limfangiogenezie odgrywają także rolę czynniki transkrypcyjny

FOXC2 (forkhead box transcription factor), sialoglikoproteina podobna PDPN (mucin-type sialoglycoprotein podobna), ligandy efryna-B2 i angiopoetyna 2 (Ang2). Sugeruje się, że w powstawaniu naczyń limfatycznych mogą odgrywać pewną rolę także czynniki wzrostu fibroblastów (FGF), czynniki wzrostu hepatocytów (HGF), PDGF oraz insulinopodobne czynniki wzrostu IGF1 i IGF2 [1]. Prawdopodobnie komórki LEC pochodzą z komórek mezenchymalnych. Nowotworowe naczynia limfatyczne mogą być wykorzystywane przez komórki nowotworowe w procesie przerzutowania [18].

Koreceptorami receptorów VEGFR1 i VEGFR2 są neuropilina 1 i 2 (NRP1 i NRP2) [95]. Neuropiliny odgrywają rolę w przyłączeniu czynnika VEGF₁₆₅. Nie wydają się natomiast odgrywać roli w wiązaniu czynnika VEGF₁₂₁. Wewnątrzkomórkowe receptory VEGFR2 wiążą VEGF-A i biorą udział w przeżyciu komórek śródbłonkowych (działanie intrakryne czynnika VEGF) [54].

Naczynia nowotworowe mogą powstawać z naczyń już istniejących (angiogeneza) [98]. Mogą powstawać z prekursorów komórek śródbłonkowych EPC, lub w wyniku transróznicowania komórek dendrytycznych iDC i mieloblastycznych komórek CD11b⁺ Gr1⁺ do komórek śródbłonkowych (waskulogeneza). Naczynia mogą powstawać wyłącznie z samych komórek nowotworowych (naczyńowa mimikra) bądź z komórek śródbłonkowych i nowotworowych (naczynia mozaikowe). Do swego wzrostu nowotwory mogą także wykorzystywać naczynia już istniejące (kooptowanie naczyń prawidłowych). Niektóre naczynia mogą powstawać przez podział naczyń już istniejących w wyniku nacisku tkanek pozanaczyniowych (wgłobienie – intussusception).

Udział prekursorów EPC w powstawaniu naczyń [76,88] budzi pewne wątpliwości [83]. Przypuszczalnie prekursorzy EPC odgrywają rolę w powstawaniu naczyń krwionośnych we wczesnych etapach powstawania nowotworów [92]. Niektóre dane wskazują, że w komórkach EPC może się ujawnić fenotyp proangiogeny w wyniku powstania tzw. przełącznika angiogenego (angiogenic switch) podczas powstawania przerzutów w płucach [34].

W początkowych fazach progresji nowotwory mają postać awaskularnych skupisk komórek nowotworowych (są to tzw. raki *in situ*) [6]. Objętość tych skupisk nie przekracza 1–2 mm³. Tlen, substancje odżywcze i czynniki wzrostu docierają do komórek nowotworowych głównie w wyniku dyfuzji. W takim stanie raki *in situ* mogą przetrwać przez długi okres (guzy „śpiące”). Dalszy rozwój śpiących guzów nowotworowych zależy od zdolności komórek nowotworowych do wytwarzania czynników proangiogenych.

Jeden z modeli angiogenezy [89] zakłada, że komórki nowotworowe, w których znajduje się aktywny gen *MYC*, wydzielają prozapalną cytokinę IL-1 β , która aktywuje enzymy typu MMP uwalniające z macierzy ECM czynniki VEGF. Niewykluczone, że w uwalnianiu VEGF z ECM odgrywają rolę enzymy MMP9 wydzielane przez komórki mikrośrodowiska nowotworowego. VEGF inicjuje kaskadę reakcji prowadzących do powstania naczyń krwionośnych (angiogeneza niezależna od niedotlenienia; zob. ryc. 2). Powstająca sieć naczyń krwionośnych w nowotworach to

sieć naczyń wyjątkowo niesprawnych, w niewystarczającym stopniu zaopatrująca komórki nowotworowe w tlen. Paradoksalnie, sieć takich naczyń oraz zmienny przepływ krwi w takich naczyniach sprzyja powstaniu niedotlenianych komórek nowotworowych [22]. Jednym ze sposobów kompensacji braku tlenu przez komórki nowotworowe jest uruchomienie na większą skalę procesu angiogenezy (rodzaj „błędnego koła”). W tej fazie, w powstawaniu naczyń nowotworowych bierze udział czynniki VEGF wydzielany przez niedotlenowane komórki nowotworowe, być może także przez niedotlenowane komórki mikrośrodowiska nowotworowego (angiogeneza zależna od niedotlenienia; zob. ryc. 2).

Inne modele angiogenezy [62,85] zakładają istnienie tzw. przełącznika angiogenego (angiogenic switch). W komórkach nowotworowych bądź w niektórych komórkach mikrośrodowiska (makrofagach), w sposób skokowy powstaje tzw. fenotyp proangiogeny: zdolność do wytwarzania i wydzielania różnych czynników proangiogenych [6]. U podłoża fenotypu angiogenego mają leżeć różne mutacje i zmiany epigenetyczne, dzięki którym indukowana jest synteza VEGF oraz innych czynników proangiogenych i zahamowane zostaje jednocześnie wytwarzanie czynników antyangiogenych (np. trombospondyny).

Proces powstawania nowego naczynia jest złożony i nie do końca poznany [1,51]. Etapy pierwsze wiążą się ze wzmożoną aktywnością różnych enzymów. Enzymy te, głównie metaloproteinazy, swobodne lub zakotwiczone, biorą udział w odsłonięciu naczyń (degradacji błony podstawnej) i rozluźnieniu struktury ECM. Etapy następne dotyczą swoistej selekcji komórek EC zdolnych do „pączkowania” (sprouting).

Komórki śródbłonkowe wypuszczają wypustki (filopodia) w kierunku źródła stymulacji (czynnika angiogenego VEGF wydzielanego przez komórki nowotworowe lub uwalnianego z ECM) [1]. Komórki EC z wypustkami (tip cell) „kierkują” w kierunku źródła sygnału (VEGF). Ważną rolę w tym procesie odgrywa gradient stężenia VEGF. Za komórkami z wypustkami przemieszczają się kolumny proliferujących komórek śródbłonkowych (stalk cell proliferation). W zależności od tego, czy VEGF jest związany z macierzą ECM czy też występuje w postaci niezwiązanej (swobodnej), reakcje komórek EC na ten czynnik są różne. VEGF związany (głównie VEGF₁₆₅) jest lepiej rozpoznawany (przyłączany) przez receptory znajdujące się na wypustkach EC. VEGF w postaci niezwiązanej (VEGF₁₂₁) jest dużo gorzej rozpoznawany przez pączkujące komórki EC. Stąd, sieć naczyń powstała z udziałem VEGF₁₆₅ jest bardziej gęsta niż sieć naczyń powstała z udziałem VEGF₁₂₁ [45].

Na etapie „kierkowania” istotną rolę odgrywa receptor Notch i jego ligand Dll4 [1]. Notch i VEGF kontrolują wzajemne relacje między komórkami czołowymi a komórkami przemieszczającymi się za nimi. To dzięki receptorowi Notch i ligandowi Dll4 komórki czołowe nie dzielą się. Dzielą się natomiast pod wpływem VEGF komórki przemieszczające się. W ukierunkowanym wzroście komórek śródbłonkowych ważną rolę odgrywają oddziaływania typu: przyciągania i odpychania. W oddziałyvaniach tych biorą udział cząsteczki „sterujące”: Semaforyny i ich receptory; Neuropiliny/Pleksyny, Netrina i jej receptory:



UNC5B/DCC i Neogenina A2b, oraz białka Slits i receptor ROBO4 [75]. W dojrzewaniu naczyń, w powstaniu błony podstawnej, przyłączeniu perycytów oraz komórek mięśni gładkich do nowo powstałych naczyń biorą udział inhibitory proteinaz MMP, takie jak TIMP2 i TIMP3 [87].

Wiele danych wskazuje także na udział w powstawaniu naczyń innych białek [98]. Angiopoetyny i ich receptor TIE-2 biorą udział w stabilizacji (Ang1) i destabilizacji (Ang2) naczyń. Natomiast efryna B2 i jej receptor EphB4 mają decyduwać o fenotypie komórek śródbłonkowych (fenotypie tętniczym lub żylnym). W regulacji angiogenezy i limfangiogenezy znaczną rolę odgrywają także integryny [4].

Naczynia krwionośne występujące w nowotworach różnią się znacznie od naczyń prawidłowych [67,98]. Naczynia nowotworowe to naczynia niedojrzałe (tylko częściowo pokryte perycytami), o niezwykle chaotycznej organizacji. Naczynia mają ślepe zakończenia i nieprawidłowe połączenia (anastomozy). Zwiększona przepuszczalność naczyń ma wpływ na wzrost ciśnienia śródmiąższowego w guzach nowotworowych [63]. Spowolniony, a także zmienny kierunek przepływu krwi powoduje powstawanie cyklicznie pojawiającego się i zanikającego niedotlenienia (hipoksji) [22]. Niedotlenienie to określane jest jako tzw. niedotlenienie ostre. Natomiast niedotlenienie spowodowane niewystarczającą dyfuzją tlenu (malejącą w miarę oddalania się od światła naczyń) określane jest jako tzw. niedotlenienie przewlekłe.

4. NIEDOTLENIE. ROLA W PROGRESJI NOWOTWORÓW

Komórki nowotworowe uruchamiają dwa procesy kompensujące brak tlenu. Pierwszym z nich jest angiogeneza (ryc. 2). Powstająca sieć naczyń ma zapewnić lepsze utlenowanie komórek nowotworowym. Drugim procesem jest glikoliza.

Brak tlenu powoduje, że w komórkach dochodzi do zahamowania fosforylacji oksydacyjnej i indukcji glikolizy [58]. Glikoliza jest stosunkowo mało wydajnym procesem energetycznym. Generuje zaledwie 2 cząsteczki ATP z jednej cząsteczki glukozy, podczas gdy fosforylacja oksydacyjna 36. Stąd, w komórkach nowotworowych obserwuje się wzmożony metabolizm glukozy [58].

W indukcji angiogenezy, a także i glikolizy istotną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny HIF-1 [52]. Czynnik HIF-1 jest heterodimerem składającym się z dwóch podjednostek. Podjednostką sensoryczną, reagującą na obecność tlenu w środowisku, jest jednostka α . W obecności tlenu podjednostka ta ulega hydroksylacji, a po przyłączeniu białka VHL (białko von Hippel-Lindaua) ubikwitinacji i degradacji w proteosomach. W warunkach beztlenowych podjednostka α jest stabilna i łączy się z podjednostką β tworząc aktywną postać czynnika transkrypcyjnego. Znane są trzy czynniki HIF (HIF-1, HIF-2, HIF-3). Różnią się między sobą podjednostką α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α). Podjednostka β u wszystkich trzech czynników HIF jest ta sama i występuje w wielu typach komórek. Podjednostka HIF-1 α występuje w komórkach nowotworowych oraz w wielu komórkach prawidłowych. Podjednostka HIF-2 α występuje głównie w komórkach śródbłonkowych. Występowanie podjednostki HIF-3 α jest stosunkowo słabo zbadane.

Głównym czynnikiem transkrypcyjnym jest czynnik HIF-1. Przypuszcza się, że 1–2% genomu jest pod jego kontrolą [11]. Wśród genów kontrolowanych przez HIF-1 są m.in. geny kodujące białka glikolizy, białka biorące udział w metabolizmie mitochondriów, regulujące wewnętrzne pH, biorące udział w angiogenezie, proliferacji, rekrutacji komórek reakcji zapalnej, w samodzielnym przemieszczaniu się komórek [11] (ryc. 2).

Stosunkowo największą grupą genów kontrolowanych przez HIF-1 stanowią geny kodujące białka biorące udział w glikolizie [11]. HIF-1 aktywuje transkrypcję genów kodujących: białka transportujące glukozę do wnętrza komórek, enzymy biorące udział w konwersji glukozy do pirogronianu oraz rozkładające pirogronian do kwasu mlekowego. Kwas mlekowy jest usuwany z komórek do przestrzeni pozakomórkowej. HIF-1 ogranicza dopływ pirogronianu do mitochondriów i hamuje fosforylację oksydacyjną. Czynnik HIF-1 ma także wpływ na funkcjonowanie samych mitochondriów [11]. Optymalizuje zużycie tlenu przez niektóre enzymy (np. przez oksydazę cytochromu c). Zmniejsza wydzielanie toksycznych reaktywnych form tlenu (ROS). Uruchamia zależną od białka BNIP3 autofagię, która usuwa z komórek zbędne mitochondria. HIF-1 hamuje także kontrolowane przez MYC powstawanie mitochondriów [19].

W komórkach nowotworowych występują także dwa inne systemy, które umożliwiają adaptację komórek nowotworowych do niedotlenienia [105]. Pierwszym z nich jest szlak sygnałowy mTOR (mammalian target of rapamycin), drugi to szlak UPR (unfolded protein response). Niedotlenienie hamuje szlak sygnałowy mTOR i zależną od niego biosyntezę białek (oszczędność energii). Natomiast w przypadku UPR niedotlenienie, oprócz hamowania biosyntezy białek, uruchamia także mechanizmy, które usuwają z komórek błędnie sfałdowane białka i agregaty [105].

Pojawiające się i zanikające niedotlenienie, określane także jako cykliczna hipoksja, ma wpływ na wzrost genetycznej niestabilności komórek niedotlenionych [12]. W komórkach tych są aktywowane białka ATM (ataxia telangiectasia mutated) i ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase). Białka te hamują proliferację komórek w tzw. punkcie restrykcyjnym i umożliwiają naprawę uszkodzeń DNA spowodowanych reaktywnymi formami tlenu. Nienaprawione uszkodzenia DNA w proliferujących komórkach zwiększają genetyczną niestabilność komórek nowotworowych, oraz powodują powstanie fenotypu mutatorowego.

W niedotlenionych komórkach nowotworowych dochodzi zatem do swoistego przeprogramowania metabolicznego, niezwykle korzystnego dla progresji komórek nowotworowych:

- komórki ograniczają oksydacyjną fosforylację przechodząc na glikolizę [58];
- w komórkach nowotworowych ograniczona jest aktywność mitochondriów oraz znacznie zmniejszone zużycie tlenu [21];
- pozakomórkowe środowisko, zakwaszone przez kwas mlekowy może stymulować inwazyjne właściwości komórek nowotworowych [96];
- kwas mlekowy może być dalej metabolizowany przez komórki śródbłonkowe i fibroblasty [57];

- zakwaszone środowisko ma właściwości immunosupresyjne, hamuje aktywność cytotoksycznych limfocytów T [28];
- zmniejszona aktywność mitochondriów ogranicza wytwarzanie toksycznych reaktywnych form tlenu (ROS) [21];
- zmniejszona aktywność mitochondriów powoduje zwiększenie puli anabolicznych substratów (np. produktów glikolizy, kwasów trikarboksylowych, acetyloCoA) [21];
- w niedotlenowanych komórkach nowotworowych ujawnia się fenotyp mutatorowy, który może mieć wpływ na powstawanie nowych wariantów genetycznych [12].

5. PRZEJŚCIE EPITELIALNO-MEZENCHYMALNE (EMT)

Najnowsze dane wskazują także na istotną rolę niedotlenowania komórek nowotworowych w procesie transróżnicowania zwanym przejściem epitelialno-mezenchymalnym (EMT) (ryc. 2) [36,81]. W warunkach niedotlenienia komórki nowotworowe, które tworzyły silne oddziaływanie komórka-komórka (z udziałem kadheryn), oraz oddziaływanie komórka-macierz pozakomórkowa (z udziałem integrity), uzyskują zupełnie nowe właściwości fenotypowe: połączenia między kadherynami zostają zerwane, komórki tracą kontakt z podłożem. Zmienia się także ich polarność. Komórki nowotworowe zyskują zdolność samodzielnego przemieszczania się. Proces EMT może być także indukowany za pomocą czynników wzrostu lub stymulatorów pochodzących z oddziaływań komórki nowotworowe-komórki mikrośrodowiska, aktywujących receptory Notch, TGF β R, WNTR, a nawet z udziałem MMP3 [81].

W „reprogramowaniu” funkcji komórek nowotworowych istotną rolę odgrywają rodziny czynników transkrypcyjnych (SNAIL, TWIST, SLUG, ZEB), które hamują ekspresję kadheryn, a także białek tworzących tzw. połączenia zamykające między komórkami (tight junctions) oraz białek desmosomów. Czynnikiem HIF-1 kontroluje transkrypcję czynnika TWIST, transkrypcyjnego represora E-kadheryn [41,52]. W komórkach nowotworowych w wyniku konwersji fenotypowej dochodzi do ekspresji białek charakterystycznych dla fibroblastów: wimentyny i N-kadheryny oraz zahamowania ekspresji E-kadheryny i cytokeratyny [15].

Proces transróżnicowania EMT ujawnia także kilka nowych właściwości komórek nowotworowych [64,70]. W komórkach pojawiają się charakterystyczne markery macierzystych komórek nowotworowych (cancer stem cells – CSC), jak np. białko Notch czy Oct-4. W transkrypcji genów kodujących te białka biorą udział czynniki HIF-1 α i HIF-2 α . HIF-1 α indukuje transkrypcję genu Notch, którego produkt hamuje różnicowanie komórkowe oraz genów CXCR4, MMP, uPAR i VEGF, których białka biorą udział w przemieszczaniu się komórek, inwazyjności i przerzutowaniu.

Natomiast czynnik HIF-2 α kontroluje transkrypcję czynnika Oct-4 aktywującego geny odpowiedzialne za tzw. samoodnawialność komórek macierzystych [41]. Czynnikiem HIF-2 α kontroluje także transkrypcję genu *c-MYC* biorącego udział w proliferacji komórek.

Reakcja EMT jest reakcją odwracalną [81]. Przerzutujące komórki nowotworowe, w odległych organach, stają się komórkami osiadłymi (tzw. przejście mezenchymalno-epitelialne,

MET). W wyniku tej reakcji komórki nowotworowe odzyskują fenotyp zbliżony do fenotypu komórek epitelialnych. Niewykluczone, że wpływ na tę reakcję mają komórki mikrośrodowiska. Być może brak w nowym środowisku czynników indukujących stan EMT, powoduje reakcję MET i rewersję do poprzedniego fenotypu [81].

Niedotlenowanie komórek nowotworowych ma więc istotny wpływ na progresję nowotworów:

- indukuje angiogenezę [22];
- zmienia profil metaboliczny komórek nowotworowych (małe zużycie tlenu jest niezwykle korzystne dla komórek nowotworowych) [58];
- za pomocą reakcji EMT zmienia w skokowy sposób fenotyp komórek nowotworowych, z komórek osiadłych powstają komórki ruchliwe ze zdolnością do przerzutowania, mające cechy opornych na leki komórek CSC [81];
- działa immunosupresyjnie [28];
- wpływa na wzrost genetycznej niestabilności komórek nowotworowych [12].

6. UCIECZKA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH SPOD NADZORU IMMUNOLOGICZNEGO

Wiele danych świadczy o tym, że ukierunkowane delecje (tzw. nokauty genowe) genów kodujących różne elementy odpowiedzi immunologicznej mają istotny wpływ na powstawanie niektórych typów nowotworów u doświadczalnych zwierząt [93,108]. U zwierząt, u których doprowadzono do delecji obu alleli genu *RAG-2* (*RAG-2^{-/-}*), kodującego enzym biorący udział w rekombinacji segmentów genowych receptorów limfocytów wiążących antygen, brak jest komórek T, B i NK. U zwierząt tych, nowotwory zarówno spontaniczne, jak i indukowane niektórymi związkami chemicznymi, pojawiały się statystycznie częściej niż u zwierząt kontrolnych. Podobne efekty obserwowano u zwierząt, u których usuwano geny *STAT1*, perforyny (białka tworzącego pory w błonach komórkowych, związanego z cytoplazmatycznymi ziarnami cytotoxicznymi limfocytów cytotoksycznych), *TRAIL* (TNF-related apoptosis ligand, białko mające zdolność indukowania apoptozy), *IFNGR1* (receptor 1 czynnika IFN- γ) [108]. Dane te wskazują, że układ odpornościowy gospodarza ma wpływ na powstanie i wzrost nowotworów.

Układ odpornościowy można zatem traktować jako pozakomórkowy system chroniący wyższe organizmy przed powstawaniem nowotworów [93]. Do wewnątrzkomórkowych systemów ochronnych można zaliczyć te, które biorą udział w naprawie uszkodzeń DNA, wywołują apoptozę w komórkach zmienionych nowotworowo, lub indukują w tych komórkach proces starzenia (senescence).

Skomplikowane relacje między komórkami nowotworowymi a komórkami układu odpornościowego dotyczą w istocie dwóch przeciwstawnych procesów:

- 1) eliminacji komórek nowotworowych przez komórki odpornościowe oraz
- 2) powstawania stanu immunosupresji, umożliwiającej komórkom nowotworowym ucieczkę spod kontroli immunologicznej gospodarza [24,56].

Między fazą eliminacji a fazą „ucieczki” można wyróżnić fazę pośrednią. W fazie tej obserwuje się stan równowagi



Tabela 3. Dwie strategie ucieczki spod nadzoru immunologicznego stosowane przez komórki nowotworowe (wg [13,84,94,102,103])

Unikanie rozpoznania i eliminacji przez komórki limfocytów T
<ul style="list-style-type: none"> · zahamowana ekspresja w komórkach nowotworowych cząsteczek MHC klasy I; · mutacje w białkach TAP1 biorących udział w transporcie produktów enzymatycznej „obróbki” antygenów (↓ ekspresja antygenów na powierzchni komórek nowotworowych); · mutacje w białkach LMP2 i LMP7 immunoproteasomów biorących udział w „obróbce” antygenów (↓ ekspresja antygenów na powierzchni komórek nowotworowych); · „złuszczenie” z powierzchni komórek nowotworowych antygenów; · zmniejszona ekspresja cząsteczek kostymulujących należących do rodziny B7 mających wpływ na odpowiedź limfocytów T; · zwiększona oporność komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną przez limfocyty T (np. ↑ Bcl-2, ↓ Fas, ↓ ICAM-1)
Uszkodzenie, hamowanie aktywności niektórych elementów odpowiedzi odpornościowej przez komórki nowotworowe oraz inne komórki
<ul style="list-style-type: none"> · wydzielanie przez komórki nowotworowe czynników immunosupresyjnych (TGF-β, IL-10, PGE2 i VEGF) hamujących dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz aktywność limfocytów T; · rekrutacja komórek MDSC wydzielających czynniki immunosupresyjne: NOS2 i Arginazę1; · rekrutacja przez komórki nowotworowe, przy pomocy cytokiny CCL22, regulatorowych limfocytów T_{reg} (o fenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3), hamujących dojrzewanie komórek dendrytycznych i stymulujących je do wydzielania enzymu indoleamino 2, 3, dioksygenazy (IDO) katabolizującego tryptofan; produkty degradacji tryptofanu (kinureniny) są toksyczne dla limfocytów T; · zahamowanie ekspresji niektórych białek wchodzących w skład receptorów TCR (np. CD3 zeta, kinaz tyrozynowych p56^{lck} i p59^{fyn}); wpływ na ekspresję tych białek może mieć utrata argininy spowodowana aktywnością Arginazy1 znajdującej się w komórkach MDSC; · wydzielanie przez komórki nowotworowe ligandów FasL i TRAIL indukujących w komórkach T śmierć apoptotyczną; · wytwarzanie przez komórki nowotworowe ligandów PD-L1, PD-L2, B7-H4 indukujących śmierć apoptotyczną limfocytów T (tzw. negatywna kostymulacja)

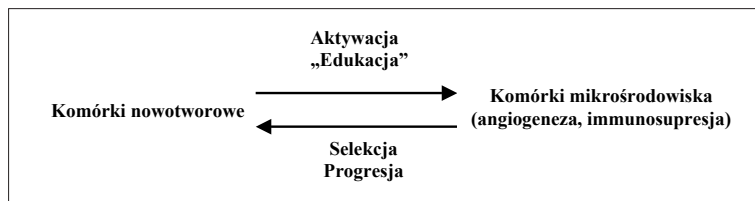
między komórkami eliminowanymi przez układ odpornościowy a komórkami, w których pojawia się stan swoistej oporności na działanie układu odpornościowego. Wszystkie trzy stany (fazy) określa się mianem immunoedycji (immunoediting) [24]. W fazie pierwszej, w procesie eliminacji, biorą udział komórki odpowiedzi nieswoistej, a także komórki odpowiedzi swoistej. W odpowiedzi nieswoistej biorą udział takie komórki efektorowe jak NK, NKT, γδT. Komórki te są aktywowane przez cytokiny prozapalne uwalniane przez komórki nowotworowe, makrofagi i inne komórki mikrośrodowiska nowotworowego. Wydzielane przez te komórki cytokiny rekrutują coraz więcej komórek odpornościowych, które wytwarzają inne cytokiny prozapalne (IL-12 i IFN-γ).

Perforyny, FasL (cytokina należąca do nadrodziny TNF) i TRAIL, to główne elementy odpowiedzi immunologicznej, które biorą udział w eliminacji komórek nowotworowych przez komórki NK [56]. Podczas tego procesu z nekrotycznych komórek są uwalniane antygeny unikalne dla komórek nowotworowych (tumor-specific antigens – TSA), a także antygeny obecne zarówno w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych (tumor associated antigens – TAA), które mogą uruchamiać odpowiedź swoistą. W wyniku tzw. „dialogu” (cross-talk) między komórkami NK i DC, komórki NK indukują „dojrzewanie” komórek DC i mobilizują ich migrację do węzłów chłonnych, gdzie zachodzi prezentacja antygenów nowotworowych dziewiczym komórkom T i ich klonalna ekspansja [56]. Limfocyty rozpoznające antygeny nowotworowe są

następnie rekrutowane przez nowotwory. W trakcie eliminacji komórek nowotworowych cytotoksyczne limfocyty wydzielają IFN-γ [23]. Cytokina IFN-γ uruchamia wiele dodatkowych mechanizmów (indukuje apoptozę komórek nowotworowych, wzmacnia przeciwnowotworową aktywność makrofagów).

Następnym etapem „immunoedycji” jest tzw. faza równowagi [24,93]. W fazie tej, w wyniku progresji nowotworowej, powstają warianty genetyczne odporne na działanie układu odpornościowego. Powstające warianty komórkowe są coraz to mniej immunogenne, innymi słowy: są coraz to słabiej rozpoznawane i eliminowane, zarówno przez komórki odpowiedzi nieswoistej jak i swoistej. Ten stan równowagi między komórkami opornymi a komórkami rozpoznawanymi i eliminowanymi przez układ odpornościowy może być najdłuższą fazą „immunoedycyjną” (większość tzw. „śpiących” nowotworów może się znajdować w tej fazie). W fazie równowagi limfocyty i IFN-γ odgrywają istotną selekcyjną rolę.

Ostatnim etapem jest faza ucieczki: w nowotworach znajdują się prawie wyłącznie komórki nowotworowe, które „uciekają” spod nadzoru immunologicznego. W swojej ucieczce spod kontroli układu odpornościowego komórki nowotworowe wykorzystują dwie strategie [13,84,94,102,103]. Pierwsza z nich polega na „unikaniu” rozpoznania i eliminacji przez komórki T. Druga strategia polega na uszkodzeniu lub zahamowaniu aktywności niektórych elementów odpowiedzi immunologicznej przez komórki nowotworowe



Ryc. 3. Komórki nowotworowe mają wpływ na fenotyp komórek mikrośrodowiska, a te z kolei wpływają na progresję komórek nowotworowych

lub inne komórki. W tabeli 3 przedstawiono przykłady obu strategii stosowanych przez komórki nowotworowe.

Końcowym etapem swoistej immunoselekcji jest nowotwór: swego rodzaju „fałszywy” organ limfoidalny, w którym niedojrzałe komórki dendrytyczne, komórki TAM, MDSC, regulatorowe limfocyty T oraz różne czynniki immunosupresyjne uniemożliwiają powstanie skutecznej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym [35,109].

W ucieczce komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego znaczną rolę odgrywają komórki mikrośrodowiska. Komórki te wydzielają czynniki immunosupresyjne: VEGF, TGF β , IL-10, PGE2 działające na komórki limfocytów T i komórki dendrytyczne. Immunosupresyjna aktywność komórek mikrośrodowiska może mieć raczej znaczenie w początkowych etapach nowotworzenia, kiedy komórki nowotworowe nie dysponują odpowiednim zestawem trików i sposobów unikania czy też niszczenia elementów odpowiedzi immunologicznej. Komórki mikrośrodowiska mogą stanowić wówczas swoistą pierwszą linię obrony komórek nowotworowych przed atakiem układu immunologicznego. Pojawiające się w trakcie progresji nowe warianty genetyczne komórek nowotworowych dysponują coraz to lepszymi zestawami mechanizmów obronnych. Mechanizmy te znacznie przewyższają skutecznością te, które są stosowane przez komórki mikrośrodowiska. Komórki mikrośrodowiska mogą być jednak „wątpliwymi sojusznikami” komórek nowotworowych. Fenotyp immunosupresyjny komórek mikrośrodowiska można bowiem zmodyfikować na fenotyp immunostymulacyjny i wykorzystać te komórki do niszczenia komórek nowotworowych [16,77].

7. MIKROŚRODOWISKO NOWOTWOROWE. NISZA PREMETASTATYCZNA

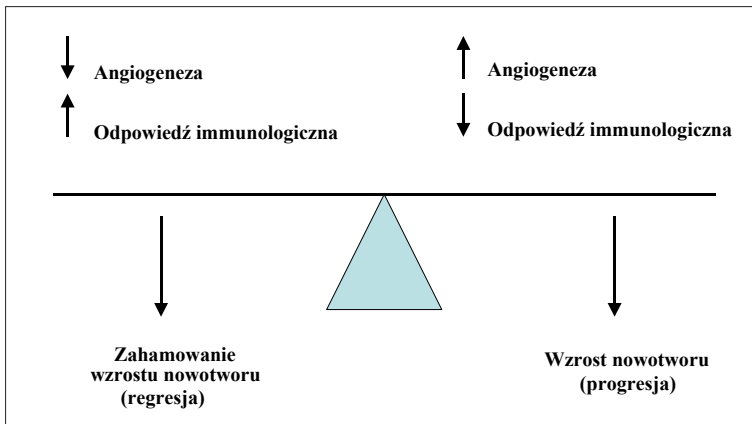
Przez mikrośrodowisko nowotworowe najczęściej rozumie się komórki reakcji zapalnej, które tworzą z komórkami nowotworowymi ścisłe, funkcjonalne więzi [59,104]. Pojęcie niszy, a więc ogółu wszystkich warunków środowiskowych, w których żyją i rozwijają się komórki nowotworowe, zostało przyjęte do wyjaśnienia wielu cech prawidłowych komórek macierzystych oraz komórek CSC [61]. Nisza reguluje wiele ważnych funkcji prawidłowych komórek macierzystych, zwłaszcza ich samoodnawialność i różnicowanie [37,61]. Dzięki komórkom niszy prawidłowe komórki macierzyste mogą być przez dłuższy okres w fazie spoczynkowej G₀ (nisza reguluje stan równowagi między czynnikami indukującymi proliferację komórkową a czynnikami hamującymi ich proliferację). Natomiast nisza swoistych komórek CSC jest niszą, która traci kontrolę nad proliferacją komórek nowotworowych. Umożliwia samodzielne przemieszczanie się komórek nowotworowych

i ułatwia ich intrawazację do naczyń krwionośnych i limfatycznych w procesie przerzutowania. Jej właściwości są więc całkowicie odmienne od właściwości niszy prawidłowych komórek macierzystych.

Nisza premetastatyczna, nisza ułatwiająca zasiedlenie przerzutujących komórek nowotworowych, jest strukturą w której powstawaniu istotną rolę odgrywają komórki nowotworowe [49,50,101]. To dzięki sygnałom wywołanym przez komórki nowotworowe guzów pierwotnych (VEGF, PIGF, TGF- β , chemokinie S100, amyloidowi SAA3) fibroblasty znajdujące się w odległych narządach (np. płucach) stymulowane są do wytwarzania fibronektyny. Złogi fibronektyny staną się miejscem zakotwiczenia mobilizowanych ze szpiku hematopoetycznych progenitorowych komórek HPC. Komórki te wydzielają wiele tzw. premetastatycznych czynników: TNF- α , MMP9, i TGF- β [82]. Zaktywowane fibroblasty (prawdopodobnie pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych, MSC) wydzielają oksydazę lizylową, modyfikującą strukturę macierzy pozakomórkowej. Dodatkowo z płytek krwi uwalniany jest czynnik SDF1 (CXCL12), który jest czynnikiem chemotaktycznym komórek mających receptory CXCR4: hematopoetycznych komórek progenitorowych (HPC) i komórek nowotworowych. W powstaniu z niszy premetastatycznej mikroprzerzutów biorą udział takie czynniki jak TNF- α , TGF- β , MMP9, P i E-selektyny, CD44, VEGF i PIGF. Ostatnim etapem w procesie przerzutowania jest powstanie makroprzerzutów. Na tym etapie zachodzi rekrutacja progenitorowych komórek śródbłonkowych EPC i ekspresja w komórkach nowotworowych fenotypu angiogenego. Nisza pierwotna i powstająca z niszy premetastatycznej nisza wtórna umożliwiają komórkom nowotworowym przeżycie, proliferację i osłonę przed atakiem układu odpornościowego.

8. RELACJE MIĘDZY KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI A KOMÓRKAMI MIKROŚRODOWISKA

Między komórkami nowotworowymi a komórkami mikrośrodowiska zachodzą ścisłe relacje (ryc. 3). Komórki nowotworowe biorą udział w aktywacji spoczynkowych komórek śródbłonkowych (np. EC) oraz w tzw. „edukacji” (np. komórki TAM i CAF). „Edukacja” ta polega na wykształceniu w komórkach TAM i CAF ściśle określonych funkcji związanych głównie z powstawaniem naczyń i hamowaniem odpowiedzi odpornościowej. Komórki mikrośrodowiska umożliwiają dalszą progresję komórek nowotworowych tworząc środowisko selekcyjne najlepiej przystosowane komórki nowotworowe. Z jednej strony, dzięki swym proangiogenym właściwościom komórki mikrośrodowiska nowotworowego biorą udział w tworzeniu niezbędnych do progresji komórek nowotworowych naczyń krwionośnych i limfatycznych. Z drugiej, komórki mikrośrodowiska osłabiają działanie układu odpornościowego



Ryc. 4. Na wzrost nowotworu ma wpływ stymulacja angiogenezy i zahamowanie odpowiedzi immunologicznej. Na zahamowanie wzrostu nowotworu (regresję) ma natomiast wpływ zablokowanie angiogenezy i indukcja odpowiedzi immunologicznej

i chronią komórki nowotworowe przed wyeliminowaniem przez komórki odpornościowe.

Obie te funkcje: proangiogenne i immunosupresyjne wydają się ściśle powiązane ze sobą, łączy je ze sobą choćby czynnik VEGF [25]. VEGF jest głównym czynnikiem proangiogennym wydzielanym przez komórki nowotworowe i komórki mikrośrodowiska. Jednocześnie jest dominującym czynnikiem immunosupresyjnym hamującym dojrzewanie komórek dendrytycznych i upośledzającym w ten sposób działanie układu odpornościowego. Niewykluczone, że podobnie zróżnicowaną rolę proangiogenną i immunosupresyjną odgrywają plejotropowo działające TGF- β [9] i TNF- α [5]. Natomiast IL-12 jest cytokiną antyangiogenną i immunomodulacyjną [20].

Komórki mikrośrodowiska amplifikują i wzmacniają sygnały proangiogenne wysyłane przez komórki nowotworowe. W powstających naczyniach krwionośnych spowolniony przepływ krwi powoduje powstawanie niedotlenienia. Paradoksalnie, niedotlenienie to ma wiele korzystnych dla komórek konsekwencji: sprzyja metabolicznemu przeprogramowaniu komórek nowotworowych [58]. Ograniczając funkcje mitochondriów zmniejsza zużycie tlenu. Dzięki niestabilności genetycznej spowodowanej niedotlenieniem w nowotworach mogą się pojawiać nowe warianty genetyczne. Niewykluczone, że niestabilność ta może w znacznym stopniu wpłynąć na szybkość progresji komórek nowotworowych. Niedotlenienie indukuje także proces przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT) [81]. Dzięki temu procesowi komórki nowotworowe zyskują zdolność do samodzielnego przemieszczania. Niektóre dane wskazują, że na przemieszczanie to mogą mieć wpływ także niektóre komórki mikrośrodowiska: makrofagi TAM i fibroblasty CAF [17,48]. Powstałe w wyniku EMT komórki nowotworowe wykazują wiele cech fenotypowych charakterystycznych dla nowotworowych komórek macierzystych: zdolność do samoodnawiania, oporność na apoptozę, oporność na sygnały starzenia (senescence) [81,100].

Wielu autorów wskazuje na ściśle związki między komórkami nowotworowymi typu CSC a powstającą niszą [31,61]. W wielu pracach stwierdza się także wyraźną zależność wzrostu komórek nowotworowych od angiogenezy. Zahamowanie angiogenezy [14,39,86] lub niszczenie naczyń krwionośnych [43] pociąga za sobą zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych, a nawet często ich

śmierć. Ten „efekt głodzenia komórek nowotworowych” jest podstawą terapii antyangiogennej i antynaczyniowej. Skojarzenie terapii antyangiogennej z chemioterapią wydaje się oczywistym rozwiązaniem terapeutycznym [46,53,55]. Tak zaprojektowana terapia (swego rodzaju „uczulanie” przez inhibitory angiogenezy komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków) wydaje się skuteczna w przynajmniej częściowej eliminacji opornych na działanie chemioterapeutyków macierzystych komórek nowotworowych [29,30].

Najnowsze dane wskazują jednak na wiele niedogodności stosowania leków antyangiogennych. Niedogodnością jest stosunkowo wysoka toksyczność [99] oraz nieoczekiwana oporność [7]. Oporność ta może być związana choćby z występowaniem w nowotworach wielu różnych powielających się sygnałów proangiogennych (nie tylko VEGF indukuje angiogenezę, ale także inne czynniki, np. PlGF, BV8 itd.) [27,90,91].

Ze spostrzeżenia, że fenotyp proangiogennej komórek nowotworowych i mikrośrodowiska jest ściśle powiązany z fenotypem immunosupresyjnym tych komórek nasuwa się kilka konsekwencji (ryc. 4):

- leki antyangiogenne powinny indukować powstawanie odpowiedzi immunologicznej;
- polaryzacja fenotypu proangiogennej i immunosupresyjnej komórek mikrośrodowiska w kierunku fenotypu antyangiogennej indukującej odpowiedź immunologiczną powinna dawać oczekiwany efekt terapeutyczny.

Dane Manning i wsp. [65] i Li i wsp. [60] wskazują na pierwszą możliwość: hamowanie aktywności receptora VEGFR2 aktywuje limfocyty T i pociąga za sobą zahamowanie wzrostu nowotworów; hamowanie aktywności czynnika VEGF wpływa na wzrost liczby efektorowych limfocytów T, a także na wzrost liczby tych limfocytów w stosunku do limfocytów regulatorowych T_{reg}, a więc limfocytów hamujących odpowiedź immunologiczną.

Na możliwość drugą wskazują doświadczenia Guiducci i wsp. [38]. Zmiana fenotypu M2 makrofagów za pomocą oligonukleotydów CpG i przeciwciała skierowanego przeciwko receptorom interleukiny 10 (IL-10R) na fenotyp M1 (fenotyp stymulujący odpowiedź immunologiczną) powoduje zahamowanie wzrostu doświadczalnych nowotworów.

Na interesującą możliwość terapeutyczną wskazują również doświadczenia, w których wykazano immunostymulującą aktywność niektórych leków (np. antracyklin) [78]. Inne badania wykazały, że np. cyklofosfamid w określonych dawkach hamuje aktywność limfocytów T_{reg} [107].

Leki mogą indukować w komórkach nowotworowych także śmierć nekrotyczną (martwiczą). Uwalniane z martwych komórek prozapalne cytokiny mogą indukować przeciwnowotworową odpowiedź odpornościową [3]. HMGB1, kwas moczowy, białka szoku cieplnego, kalretikulina stymulują dojrzewanie komórek dendrytycznych, prezentację antygenów komórkowych oraz ekspansję komórek $CD8^+$. Dodatkowo, uszkodzenia DNA mają wpływ na wzrost białka MICA, które uruchamia zależną od NKG2D cytotoxiczność komórek NK i limfocytów T [33].

Można zatem zaprojektować dwa scenariusze terapeutyczne z użyciem leków antyangiogennych. Pierwszy będzie oparty na założeniu, że niszczenie niszy za pomocą leków antyangiogennych będzie pociągającą za sobą śmierć komórek CSC (pośrednie eliminowanie opornych na leki komórek nowotworowych). W scenariuszu tym najczęściej będą występować kombinacje leków antyangiogennych (ew. antynaczyniowych) z chemioterapeutykami lub innymi lekami w miarę selektywnie eliminującymi komórki CSC.

Drugi scenariusz terapeutyczny przewiduje modyfikowanie fenotypu komórek nowotworowych i komórek niszy z proangiogennego i immunosupresyjnego na fenotyp antyangiogenny i immunostymulujący. W tym drugim scenariuszu odgrywać rolę będą leki antyangiogenne i immunostymulujące. Takie kombinacje leków antyangiogennych z immunoterapią powinny również eliminować w pośredni sposób komórki CSC.

Jak widać, wspólnym zamierzeniem autorów obu scenariuszy jest dążenie do coraz to lepszego i coraz to bardziej skutecznego kontrolowania wzrostu komórek nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

[1] Adams R.H., Alitalo K.: Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 464–478

[2] Allavena P., Sica A., Solinas G., Porta C., Mantovani A.: The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2008; 66: 1–9

[3] Apetoh L., Tesniere A., Ghiringhelli F., Kroemer G., Zitvogel L.: Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res.*, 2008; 68: 4026–4030

[4] Avraamides C.J., Garmy-Susini B., Varner J.A.: Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 604–617

[5] Balkwill F.: Tumor necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 361–371

[6] Bergers G., Benjamin L.E.: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 401–410

[7] Bergers G., Hanahan D.: Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 592–603

[8] Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L.: Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004; 432: 332–337

[9] Brier B., Moses H.L.: Tumour microenvironment: TGF β : molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 506–520

9. PODZIĘKOWANIA

Swoim Współpracownikom serdecznie dziękuję za dyskusje, wsparcie i cierpliwość. Z oczywistych względów w pracy tej pozwoliłem sobie zacytować tylko kilkadziesiąt wybranych prac. Przepraszam niecytowanych Autorów, że ich pominąłem.

10. NOTATKA DODANA W TRAKCIE KOREKTY

Kilka nowych informacji, które nie znalazły się w tej pracy, zasługują na szczególną uwagę.

- W komórkach mikrośrodowiska (fibroblastach i miofibroblastach) pojawiają się mutacje genu *P53*, które powodują zmniejszenie wrażliwości tych komórek na niektóre chemioterapeutyki (Dudley A. C. i wsp.: Attenuated p53 activation in tumor-associated stromal cells accompanies decreased sensitivity to etoposide and vincristine. *Brit. J. Cancer*, 2008; 99: 118–125).
- Sygnatura transkrypcyjna genów komórek zrębu (mikrośrodowiska) ma wpływ na przebieg choroby nowotworowej (Finak G. i wsp.: Stroma gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* 2008; 14: 518–527).
- W przeciwieństwie do komórek śródbłonkowych prawidłowych naczyń, komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych są odporne na niektóre leki (Xiong J. B. i wsp.: Human hepatocellular carcinoma tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability and drug resistance compared with normal endothelial cells. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15: 4838–4846).
- Wprawdzie terapia antyangiogenna hamuje wzrost guzów pierwotnych, niemniej przyspiesza jednak zarówno inwazyjność komórek nowotworowych, jak i pojawianie się przerzutów u doświadczalnych zwierząt (Paez-Ribes M. i wsp.: Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 2009; 15: 220–231. Ebos J. M. L. i wsp.: Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009; 15: 232–239).



- [18] Cueni L.N., Detmar M.: Lymphatic vascular system and lymphangiogenesis. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 505–516
- [19] Dang C.V., Kim J., Gao P., Yustein J.: The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 51–56
- [20] Del Vecchio M., Bajetta E., Canova S., Lotze M.T., Wesa A., Parmiani G., Anichini A.: Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 4677–4685
- [21] Denko N.C.: Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 705–713
- [22] Dewhirst M.W., Cao Y., Moeller B.: Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 425–437
- [23] Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D.: Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 836–848
- [24] Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D.: The three es of cancer immunoeediting. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004; 22: 329–360
- [25] Ellis L.M., Hicklin D.J.: VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumor activity. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 579–591
- [26] Ferrara N., Kerbel R.S.: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 2005; 438: 967–974
- [27] Fischer C., Mazzone M., Jonckx B., Carmeliet P.: FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 942–956
- [28] Fischer K., Hoffmann P., Voelkl S., Meidenbauer N., Ammer J., Edinger M., Gottfried E., Schwarz S., Rothe G., Hoves S., Renner K., Timischl B., Mackensen A., Kunz-Schughart L., Andreesen R., Krause S.W., Kreutz M.: Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 2007; 109: 3812–3819
- [29] Folkins C., Kerbel R.S.: Tumor angiogenesis and the cancer stem cell model. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 249–258
- [30] Folkins C., Man S., Xu P., Shaked Y., Hicklin D.J., Kerbel R.S.: Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res.*, 2007; 67: 3560–3564
- [31] Folkman J.: History of angiogenesis. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 1–14
- [32] Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1182–1186
- [33] Fonseca C., Dranoff G.: Capitalizing on the immunogenicity of dying tumor cells. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 1603–1608
- [34] Gao D., Nolan D.J., Mellick A.S., Bambino K., McDonnell K., Mittal V.: Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, 2008; 319: 195–198
- [35] Garg A.D., Nowis D., Golab J., Vandenabeele P., Krysko D.V., Agostinis P.: Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; (w druku)
- [36] Gavert N., Ben-Ze'ev A.: Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol. Med.*, 2008; 14: 199–209
- [37] Gilbertson R.J., Rich J.N.: Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat. Rev. Cancer*, 2007; 7: 733–736
- [38] Guiducci C., Vicari A.P., Sangaletti S., Trinchieri G.: Redirecting *in vivo* elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.*, 2005; 65: 3437–3446
- [39] Hanahan D.: Perspectives on the future of angiogenesis research. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red. W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 575–583
- [40] Hanahan D., Weinberg R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000; 100: 57–70
- [41] Hill R.P., Marie-Egyptienne D.T., Hedley D.W.: Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin. Radiat. Oncol.*, 2009; 19: 106–111
- [42] Hofmeister V., Schrama D., Becker J.C.: Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2008; 57: 1–17
- [43] Horsman M.R., Siemann D.W.: Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11520–11539
- [44] Hughes C.C.: Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2008; 15: 204–209
- [45] Iruela-Arispe M.L.: Endothelial cell activation. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 135–143
- [46] Jain R.K.: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 2005; 307: 58–62
- [47] Jinushi M., Dranoff G.: Triggering tumor immunity through angiogenesis targeting. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 3762–3764
- [48] Kalluri R., Zeisberg M.: Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2006; 6: 392–401
- [49] Kaplan R.N., Rafii S., Lyden D.: Preparing the „soil”: the premetastatic niche. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11089–11093
- [50] 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., Lyden D.: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005; 438: 820–827
- [51] Karamysheva A.F.: Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc.)*, 2008; 73: 751–762
- [52] Keith B., Simon M.C.: Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 2007; 129: 465–472
- [53] Kerbel R.S.: Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science*, 2006; 312: 1171–1175
- [54] Kerbel R.S.: Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 19: 2039–2049
- [55] Kerbel R.S., Kamen B.A.: The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 423–438
- [56] Kim R., Emi M., Tanabe K.: Cancer immunoeediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 2007; 121: 1–14
- [57] Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Harris A.L., Sivridis E.: Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.*, 2006; 66: 632–637
- [58] Kroemer G., Pouyssegur J.: Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 2008; 13: 472–482
- [59] Le Bitoux M.A., Stamenkovic I.: Tumor-host interactions: the role of inflammation. *Histochem. Cell Biol.*, 2008; 130: 1079–1090
- [60] Li B., Lalani A.S., Harding T.C., Luan B., Koprivnikar K., Huan Tu G., Prell R., Van Roey M.J., Simmons A.D., Jooss K.: Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 6808–6816
- [61] Li L., Neaves W.B.: Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res.*, 2006; 66: 4553–4557
- [62] Lin E.Y., Pollard J.W.: Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.*, 2007; 67: 5064–5066
- [63] Lunt S.J., Chaudary N., Hill R.P.: The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin. Exp. Metastasis*, 2009; 26: 19–34
- [64] Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyakkannu A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R.A.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008; 133: 704–715
- [65] Manning E.A., Ullman J.G., Leatherman J.M., Asquith J.M., Hansen T.R., Armstrong T.D., Hicklin D.J., Jaffee E.M., Emens L.A.: A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 3951–3959
- [66] Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F.: Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008; 454: 436–444
- [67] McDonald D.M., Choyke P.L.: Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.*, 2003; 9: 713–725
- [68] Mishra P.J., Mishra P.J., Glod J.W., Banerjee D.: Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res.*, 2009; 69: 1255–1258
- [69] Mocellin S., Nitti D.: Therapeutics targeting tumor immune escape: towards the development of new generation anticancer vaccines. *Med. Res. Rev.*, 2008; 28: 413–444
- [70] Morel A.P., Lièvre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S., Pusieux A.: Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 2008; 3: 1–7
- [71] Muerkoster S.S., Werbing V., Koch D., Sipos B., Ammerpohl O., Kalthoff, Tsao M.S., Fölsch U.R., Schäfer H.: Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma-epigenetic downregulation of caspases. *Int. J. Cancer*, 2008; 123: 1751–1760

- [72] Murdoch C., Giannoudis A., Lewis C.E.: Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 2004; 104: 2224–2234
- [73] Murdoch C., Muthana M., Coffelt S.B., Lewis C.: The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 618–631
- [74] Nagaraj S., Gabrilovich D.I.: Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 2561–2563
- [75] Neufeld G., Kessler O.: The semaphorins: versatile regulators of tumor progression and tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 632–645
- [76] Nolan D.J., Ciarrocchi A., Mellick A.S., Jaggi J.S., Bambino K., Gupta S., Heikamp E., McDevitt M.R., Scheinberg D.A., Benezra R., Mittal V.: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007; 21: 1546–1558
- [77] Noonan D.M., De Lerma Barbaro A., Vannini N., Mortata L., Albini A.: Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev.*, 2008; 27: 31–40
- [78] Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J.L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Métivier D., Larochette N., Van Endert P., Ciccosanti F., Piacentini M., Zitvogel L., Kroemer G.: Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.*, 2007; 13: 54–61
- [79] Orimo A., Weinberg R.A.: Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*, 2006; 5: 1597–1601
- [80] Pahlter J.C., Tazzyman S., Erez N., Chen Y.Y., Murdoch C., Nozawa H., Lewis C.E., Hanahan D.: Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia*, 2008; 10: 329–340
- [81] Polyak K., Weinberg R.A.: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 265–273
- [82] Psaila B., Lyden D.: The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 285–293
- [83] Purhonen S., Palm J., Rossi D., Kaskenpää N., Rajantie I., Ylä-Herttuala S., Alitalo K., Weissman I.L., Salven P.: Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 6620–6625
- [84] Rabinovich G.A., Gabrilovich D., Sotomayor E.M.: Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007; 25: 267–296
- [85] Ribatti D., Vacca A.: Overview of angiogenesis during tumor growth. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 161–168
- [86] Sarmiento R., Longo R., Gasparini G.: Challenges of antiangiogenic therapy of tumors. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 461–475
- [87] Saunders W.B., Bohnsack B.L., Fiske J.B., Anthis N.J., Bayless K.J., Hirschi K.K., Davis G.E.: Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J. Cell Biol.*, 2006; 175: 179–191
- [88] Seandel M., Hooper A.T., Rafii S.: Contribution of endothelial progenitor cells to the angiogenic process. W: *Angiogenesis. An Integrative Approach From Science to Medicine*, red.: W.D. Figg, J. Folkman. Springer, New York 2008, 239–248
- [89] Shchors K., Evan G.: Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res.*, 2007; 67: 7059–7061
- [90] Shojaei F., Ferrara N.: Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 5501–5504
- [91] Shojaei F., Wu X., Zhong C., Yu L., Liang X.H., Yao J., Blanchard D., Bais C., Peale F.V., Van Bruggen N., Ho C., Ross J., Tan M., Carano R.A., Meng Y.G., Ferrara N.: Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumor angiogenesis. *Nature*, 2007; 450: 825–831
- [92] Shojaei F., Zhong C., Wu X., Yu L., Ferrara N.: Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth. *Trends Cell Biol.*, 2008; 18: 372–378
- [93] Smyth M.J., Dunn G.P., Schreiber R.D.: Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.*, 2006; 90: 1–50
- [94] Stewart T.J., Abrams S.I.: How tumours escape mass destruction. *Oncogene*, 2008; 27: 5894–5903
- [95] Sulpice E., Plouët J., Bergé M., Allanic D., Tobelem G., Merkulova-Rainon T.: Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood*, 2008; 111: 2036–2045
- [96] Swietach P., Vaughan-Jones R.D., Harris A.L.: Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.*, 2007; 26: 299–310
- [97] Szala S.: Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej. *Nowotwory*, 2007; 6: 633–645
- [98] Vaupel P.: Abnormal microvasculature and defective microcirculatory function in solid tumors. W: *Vascular-targeted Therapies in Oncology*. red.: D.W. Siemann. John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2006, 9–29
- [99] Verheul H.M., Pinedo H.M.: Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat. Rev. Cancer*, 2007; 7: 475–485
- [100] Weinberg R.A.: Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 1021–1023
- [101] Wels J., Kaplan R.N., Rafii S., Lyden D.: Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.*, 2008; 22: 559–574
- [102] Whiteside T.L.: Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.*, 2006; 16: 3–15
- [103] Whiteside T.L.: The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 2008; 27: 5904–5912
- [104] Witz I.P.: Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv. Cancer Res.*, 2008; 100: 203–229
- [105] Wouters B.G., Koritzinsky M.: Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 851–864
- [106] Zeisberg E.M., Potenta S., Xie L., Zeisberg M., Kalluri R.: Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.*, 2007; 67: 10123–10128
- [107] Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G.: Immunological aspects of anticancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008; 8: 59–73
- [108] Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G.: Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 715–727
- [109] Zou W.: Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 263–274

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.

