

Chemioterapia – główne przyczyny niepowodzeń

Iwona Mitrus, Stanisław Szala

Chemioterapia nie zawsze niszczy wszystkie komórki nowotworowe. Te, które przeżywają, stają się przyczyną późniejszej wznowy. Powody, dla których leki zabijają tylko część komórek nowotworowych, są bardzo różne. Może to być niewłaściwa budowa naczyń krwionośnych i podniesione ciśnienie śródmiąższowe wewnątrz guza, które utrudniają transport leków do komórek. Może to być brak tlenu, który wpływa na działanie chemioterapeutyków. Ponadto, niektóre enzymy i niskie pH macierzy pozakomórkowej mogą inaktywować leki.

Dotarcie leku do komórki nie gwarantuje, że zadziała on prawidłowo. Niedobór proapoptotycznych lub nadmiar antyapoptotycznych białek utrudnia działanie leków, które indukują apoptozę. Lekooporność może być wywołana nadekspresją białek usuwających chemioterapeutyki z komórki lub naprawiających uszkodzenia DNA, powstające w czasie terapii. Zmiany w budowie mikrotubul wrzeciona kariokinetycznego utrudniają działanie związków antymitotycznych. Brak niektórych enzymów powoduje, że proleki nie są przekształcane w aktywną formę. Na oporność komórek nowotworowych wpływa także ich zmieniona adhezja do macierzy pozakomórkowej.

Poważnym problemem terapeutycznym jest obecność w guzie tzw. nowotworowych komórek macierzystych, które wykazują zwiększoną lekooporność. Zniszczenie tych komórek jest konieczne do całkowitego wyleczenia pacjenta.

Naszym zdaniem, w czasie projektowania nowych leków i strategii terapeutycznych należy uwzględnić wymienione powyżej przyczyny niepowodzeń.

Chemotherapy – main causes of failure

Chemotherapy does not always destroy all neoplastic cells. Those that survive lead subsequently to cancer recurrence. The reasons for which drugs may kill only a part of cancer cells vary. Vascular pathologies and elevated intratumoral pressure render it difficult for drugs to penetrate the inside of a tumor, whereas the lack of oxygen limits therapeutic effectiveness. Extracellular matrix enzymes and low pH also can inactivate chemotherapeutics.

Even when a drug reaches the cancer cell, this does not always lead to its elimination. Overexpression of antiapoptotic proteins or reduced levels of proapoptotic proteins may block the action of drugs which potentially induce this type of cell death. Other reasons for cellular resistance include overexpression of proteins responsible for eliminating the drug from cells and high levels of DNA damage repair caused by the drug. Mitotic spindle inhibitors fail to act if the microtubules are assembled incorrectly. Enzyme deficiency is responsible for the fact that pro-drugs fail to convert to their active form. Also, altered adhesion to extracellular matrix may promote cell survival.

Another reason for failure is the presence of cancer stem cells within a tumor. Such cells are resistant to chemotherapy. They are capable of repopulating the tumor and therefore they must be destroyed in the course of therapy.

In our opinion, gaining new knowledge about the possible causes of therapeutic failures in cancer is a prerequisite for planning novel drugs and treatment strategies.

Słowa kluczowe: właściwości guzów nowotworowych, bariery wpływające na wnikanie leków, lekooporność komórek nowotworowych, nowotworowe komórki macierzyste

Key words: tumor physiology, barriers to drug distribution, cancer drug resistance, cancer stem cells

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

Praca została sfinansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2 PO5A 161 29

Artykuł jest rozwinięciem pracy „Bariery utrudniające dostęp i działanie leków przeciwnowotworowych”, która ukazała się w 2007 r. w „Na pograniczu chemii i biologii”.

Wstęp

Ideałem terapii przeciwnowotworowej jest zniszczenie wszystkich komórek nowotworowych. Stosowane chemioterapeutyki często powodują jedynie zmniejszenie objętości guzów i zabijają tylko część komórek.

Ograniczona odpowiedź na lek może być związana z właściwościami guza, bądź też z lekoopornością

komórek. Pierwszym problemem jest słaby dostęp leku do niektórych komórek guza. Spadek aktywności leków może być spowodowany niewystarczającą ilością tlenu lub obniżonym pH wewnątrz guza [1-3]. Lekooporność komórek nowotworowych może być związana z pojawiającymi się w nich mutacjami bądź nadekspresją niektórych białek [4]. Dodatkowym problemem jest obecność w guzie nowotworowych komórek macierzystych, które są bardzo odporne na terapię, a po zakończeniu leczenia powodują ponowny wzrost guza [5-7].

W artykule omówiono wybrane problemy związane z dostępem i działaniem leków na komórki nowotworowe.

Właściwości guzów litych

Guzy nowotworowe są nie tylko zbiorowiskiem komórek nowotworowych [1, 8, 9]. W guzach znajdują się także naczynia krwionośne, limfatyczne, komórki układu odpornościowego, fibroblasty oraz macierz pozakomórkowa. Tworzą one razem swoiste mikrośrodowisko, które odgrywa ważną rolę w progresji nowotworowej, przerzutowaniu, ucieczce spod nadzoru immunologicznego. Mikrośrodowisko to ma wpływ na dostępność leków do komórek nowotworowych, a także na ich działanie w komórkach nowotworowych.

Unaczynienie guza nowotworowego

W czasie swojego wzrostu guz nowotworowy wytwarza własne naczynia krwionośne oraz limfatyczne [10, 11]. W przeciwieństwie do naczyń prawidłowych naczynia nowotworowe są nieszczelne, kręte, zawierają liczne przewężenia, ślepe zakończenia, itp. Ilość naczyń jest dużo mniejsza w centralnych rejonach guza niż na jego obrzeżach. Nieprawidłowa budowa naczyń powoduje spowolnienie przepływu i zaleganie krwi w naczyniach. Tlen w tkance może dyfundować na odległość do 100-200 μm [2]. Komórki nowotworowe, które znajdują się w większej odległości od naczynia, nie są zatem wystarczająco zaopatrzone w tlen. Słabiej utlenowane komórki w centralnej części guza często giną w wyniku martwicy [11-14].

Ciśnienie śródmiąższowe

Wewnątrz guza znajdują się również naczynia limfatyczne [11]. Są one jednak niesprawne pod względem funkcjonalnym: nie są w stanie odprowadzać nadmiaru płynu, przenikającego do masy guza z naczyń krwionośnych. Nagromadzenie płynu wewnątrz guza jest przyczyną wzrostu ciśnienia śródmiąższowego [2]. Na ogół większe guzy charakteryzują się wyższym ciśnieniem śródmiąższowym niż mniejsze guzy. W obrębie guza ciśnienie jest równomierne w całej objętości – jedynie na peryferiach guza jest ono niższe [1-3].

pH wewnątrz guza nowotworowego

Jedną z własności guzów litych, odróżniającą je od tkanek prawidłowych, są zmiany pH [8]. W prawidłowych komórkach pH jest lekko zasadowe ($\geq 7,2$), nieco niższe niż w macierzy pozakomórkowej (około 7,4). W niektórych komórkach nowotworowych pH jest natomiast wyższe niż macierzy pozakomórkowej. Przyczyną tej różnicy są zaburzenia w działaniu pompy jonowej [15]. Komórki nowotworowe usuwają jony H^+ w większym stopniu niż komórki prawidłowe, co powoduje wzrost pH wewnątrz komórki oraz jego spadek w macierzy pozakomórkowej. W innych obszarach guza nowotworowego pompa jono-wa działa prawidłowo. W tych rejonach pH jest takie, jak w zdrowej tkance [11, 12].

Rozregulowanie mechanizmu odpowiedzialnego za stabilizację pH jest jednym z ważnych etapów w progresji nowotworów [1, 12]. Przypuszcza się, że obniżone pH w guzie może wpływać na inwazyjność komórek nowotworowych. Prawdopodobnie jest to związane ze zwiększoną aktywnością proteaz degradujących białka macierzy (np. kolagenazy, katepsyny A, D, L) [12].

Czynniki utrudniające transport leku do komórek nowotworowych

Oczywiście, aby lek zadziałał, musi dotrzeć do określonego miejsca w organizmie – w tym wypadku do komórek nowotworowych [1, 3]. Zazwyczaj leki są podawane do krwiobiegu i wraz z krwią transportowane do guzów. Stężenie leku jest znacznie wyższe w pobliżu naczynia krwionośnego, natomiast spada w komórkach coraz bardziej oddalonych od światła naczynia. Jak wspomniano, w guzach nowotworowych znajdują się obszary słabo unaczynione – najczęściej położone w centralnej części guza. Tak więc już w pierwszym etapie – transporcie leku – pojawia się trudność z dostarczeniem go do całej masy guza.

Ściana naczynia krwionośnego

Aby dotrzeć do komórek nowotworowych lek musi wydostać się z naczynia krwionośnego [16]. Małe cząsteczki (np. tlen, składniki odżywcze, niektóre chemioterapeutyki) dyfundują poprzez komórki śródbłonkowe. Również cząsteczki większe, rozpuszczalne w lipidach, mogą przenikać przez komórki śródbłonkowe. W przypadku większych cząsteczek (np. niektóre polimery, przeciwiała), nierozpuszczalnych w lipidach, istnieją dwie drogi transportu: przez pory (okienka) istniejące pomiędzy komórkami śródbłonka lub poprzez transport pęcherzykowy (*vesicular transport*), za pomocą którego komórki przenoszą związki w sposób aktywny ze światła naczynia do sąsiadującej tkanki lub komórek guza nowotworowego.

Naczynia w guzie nowotworowym są zwykle 4-10 razy bardziej przepuszczalne niż prawidłowe [16]. Za przepuszczalność tę odpowiadają zarówno pory pomię-

dzy komórkami śródbłonna, jak i zwiększony transport pęcherzykowy.

Macierz pozakomórkowa

W tkankach prawidłowych, w przestrzeni pozakomórkowej odbywa się ruch płynu tkankowego [1, 3]. Płyn przemieszcza się z obszarów o ciśnieniu wyższym (zwykle położonym blisko naczyń krwionośnych) do obszarów o ciśnieniu niższym, a następnie do naczyń limfatycznych. Ruch ten umożliwia m.in. transport różnych cząsteczek w procesie konwekcji. Rozkład ciśnienia śródmiąższowego w guzie jest jednorodny, a naczynia limfatyczne, które powinny odprowadzać nadmiar płynu, są niesprawne. Z tego powodu konwekcja w guzie jest bardzo ograniczona. Natomiast w części peryferyjnej różnica ciśnień może powodować ucieczkę płynu tkankowego i rozpuszczonego w nim leku poza guz nowotworowy.

Ponieważ konwekcja jest ograniczona, głównym mechanizmem umożliwiającym przemieszczanie się leków w obrębie guza jest dyfuzja [1, 3]. Dyfuzja leku w guzie zależy od wielu czynników, m.in. wielkości cząsteczki (cząsteczki małe poruszają się znacznie szybciej), jej kształtu, rozpuszczalności w wodzie. Ponadto wewnątrz guza nowotworowego leki mogą być wiązane przez białka macierzy pozakomórkowej [1, 8].

Nawet wysokie stężenie leku we krwi nie gwarantuje, że lek dotrze do większości komórek nowotworowych [17].

Inne ograniczenia – niedotlenowanie komórek nowotworowych i obniżone pH macierzy pozakomórkowej

Niektóre z leków (np. bleomycyna, etopozyd, karboplatyna) działają znacznie słabiej lub nawet nie są aktywne w przypadku braku tlenu [3, 18]. Niedobór tlenu może hamować podziały komórkowe (wiele leków działa jedynie w określonej fazie cyklu podziałowego), niedotlenienie jest również czynnikiem umożliwiającym selekcję komórek nowotworowych w guzie – w jej wyniku przeżywają jedynie komórki, które uruchamiają beztlenową glikolizę [19].

Niektóre leki (np. doksorubicyna, mitoksantron) są słabymi zasadami [15]. Kwaśne pH macierzy pozakomórkowej w guzie powoduje protonowanie tych związków. Ładunek elektryczny cząsteczek utrudnia przenikanie związków przez błonę do wnętrza komórki. Zjawisko to, nazywane pułapką jonową (*ion-trapping*), jest jedną z przyczyn spadku aktywności wspomnianych leków.

Przyczyną słabej odpowiedzi organizmu na chemioterapeutyki może być niewłaściwy wybór leków we wstępnej fazie badań – eksperymentach *in vitro* [3]. Podczas badań *in vitro* komórki zwykle rosną w pożywce hodowlanej o optymalnym (lekko zasadowym) pH, a lek ma swobodny dostęp do wszystkich komórek. Komórki *in vitro* rosną zwykle przy ciśnieniu parcjalnym tlenu do 4 kPa, podczas gdy w organizmie ciśnienie tlenu jest bardzo różne – np. 2 kPa w przypadku komórek nerki, a 15 kPa

dla komórek pęcherzyków płucnych. We wnętrzu guza ciśnienie tlenu spada nawet do 0,025 kPa [20]. Warunki *in vitro* są nieporównywalne do warunków w organizmie. To, że lek działa w określony sposób na komórki znajdujące się w hodowli *in vitro* nie oznacza, że będzie identycznie działał na komórki guza nowotworowego, które znajdują się w całkiem innym środowisku [3]. Badania *in vitro* można natomiast prowadzić np. w hodowlach trójwymiarowych lub sferoidach komórkowych. Komórki znajdujące się wewnątrz tak prowadzonej hodowli są narażone na niedotlenienie, dociera do nich mniejsza ilość składników odżywczych oraz leków. Takie komórkowe modele lepiej odzwierciedlają warunki panujące wewnątrz guza nowotworowego, choć oczywiście nie uwzględniają wszystkich właściwości komórek nowotworowych, np. nie ma w nich oddziaływań między komórkami nowotworowymi a macierzą pozakomórkową [3].

Lekooporność komórek nowotworowych

Przyczyną niewystarczającej odpowiedzi organizmu na leki przeciwnowotworowe może być lekooporność komórek nowotworowych [21]. Może ona być związana z aktywnym usuwaniem leków z komórki, zwiększeniem poziomu naprawy DNA, defektami w szlaku apoptotycznym lub innymi zmianami w komórkach nowotworowych.

Komórki nowotworowe mogą wykazywać oporność na stosowane chemioterapeutyki przed rozpoczęciem terapii (tzw. oporność wrodzona), mogą też wykształcić w sobie mechanizmy obronne dopiero po ekspozycji na dany lek (tzw. oporność nabyta) [21]. Średnio jedna na 10^6 - 10^7 komórek jest oporna na określony chemioterapeutyk. Ponieważ wykrywanie guzów nowotworowych jest możliwe, gdy zawierają co najmniej 10^9 komórek, to oznacza, że jest w nich już 10^2 - 10^3 komórek opornych na lek [21].

Usuwanie leków z komórek

Jeden z głównych mechanizmów oporności nabytej polega na usuwaniu leków z komórki przez swoiste białka transportowe [17, 22]. W procesie tym największe znaczenie ma rodzina białek ABC (*ATP-binding cassette*). Znanych jest co najmniej 49 tych białek [23, 24]. Są to białka zlokalizowane w błonie komórkowej. Ich aktywność zależy od ATP. Pełnią one ochronną rolę: funkcjonują jako pompy usuwające z komórek różne związki. Ich nadekspresja powoduje jednak oczywiste problemy w czasie terapii: białka te bowiem usuwają z komórki również leki [17, 21]. Narządy bardziej narażone na działanie toksyn (np. nerki, płuca, trzustka) mają wyższy poziom białek ABC niż inne. Nowotwory wywodzące się z tych narządów często wykazują nadekspresję białek ochronnych [23, 24].

Najbardziej znanym białkiem z tej rodziny jest białko P (inne nazwy to: P-glikoproteina, P-gp, ABCB1, MDR1 – *multidrug resistance protein 1*). Jego zwiększona ekspresja powoduje oporność m.in. na antracykliny, alka-

loidy *vinca*, taksany, cisplatynę [23, 24]. Z kolei białko ABCG2 usuwa Gleevec i mitoksantron, nie usuwa natomiast cisplatyny, ani taksoli [24].

Podobnie działającym białkiem jest MRP1 (*multi-drug resistance associated protein*) [23]. Jego nadekspresja pojawia się w białaczkach i niedrobnokomórkowym raku płuc. Zwiększona ilość tego białka jest przyczyną oporności na antracykliny, alkaloidy *vinca*, metotreksat. MRP1 nie ma wpływu na działanie taksanów.

Białko BCRP (*breast cancer resistant protein*, znane też jako ABCG2, ABCP, MXR) występuje w około 40% nowotworów. Zostało ono wykryte w nowotworach piersi, jednak znacznie wyższy poziom pojawia się np. w rakach okrężnicy i żołądka. Białko to usuwa z komórki m.in. mitoksantron [23].

Zwiększona naprawa uszkodzeń DNA

Większość stosowanych leków, a także promieniowanie jonizujące, w nieodwracalny sposób uszkadza DNA i indukuje śmierć apoptotyczną komórki [21, 25]. Działanie leków alkilujących polega na modyfikacji zasad azotowych DNA podstawnikiem alkilowym (metylowym lub etylowym) oraz zahamowaniu procesów replikacji i transkrypcji. Leki mogą także tworzyć dodatkowe wiązania między zasadami azotowymi nici DNA, lub też powodować uszkodzenia DNA pośrednio – np. oddziaływać na aktywność topoizomeraz lub brać udział w powstawaniu wolnych rodników.

Komórki nowotworowe z jednej strony są w stanie tolerować znacznie większą ilość uszkodzeń DNA niż prawidłowe, a z drugiej – często wykazują nadekspresję białek naprawczych [21]. Do białek tych należą m.in. XPE-BF (*xeroderma pigmentosum group E binding factor*), ERCC1 (*excision repair cross-complementing protein*) – biorące udział w NER (*nucleotide excision repair*) – systemie naprawy usuwającej większość adduktów DNA. Komórki z nadekspresją białek naprawczych wykazywały oporność na cisplatynę – lek tworzący addukty z DNA [4, 17, 21].

Niedobór białek biorących udział w procesie MMR (*mismatch repair* – mechanizm naprawy DNA, odpowiedzialny za poprawność parowanych zasad w nowo syntezowanej nici) zaobserwowano w nowotworach jelita grubego, piersi, jajnika [22]. Niski poziom tych białek nie tylko sprzyja nagromadzeniu uszkodzeń DNA i nowotworzeniu, ale wiąże się też z opornością na leki uszkadzające DNA. Mechanizm tej oporności nie jest do końca poznany. Być może białka te w przypadku wielu uszkodzeń DNA nie naprawiają ich, a kierują komórkę na drogę apoptozy. Komórki charakteryzujące się niskim poziomem tych białek są odporne na apoptozę.

Defekty w szlaku apoptotycznym komórek nowotworowych

Zmniejszona wrażliwość na apoptozę jest jedną z podstawowych cech odróżniających komórki nowotworowe od prawidłowych [26]. Jak już wspomniano, większość sto-

sowanych leków indukuje w komórkach nowotworowych śmierć apoptotyczną. Rozregulowanie szlaku apoptozy w komórkach nowotworowych może być czynnikiem wywołującym lekooporność tych komórek [4, 27].

Jednym z białek, którego mutacje prowadzą do zaburzeń szlaku apoptozy, jest P53 [25]. Białko P53 – klasyczny czynnik transkrypcyjny – pełni wiele różnych funkcji, m.in. bierze udział w reakcji komórki na uszkodzenia DNA. Jest odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu komórkowego do chwili, gdy uszkodzenie zostanie naprawione, bądź też kieruje komórkę na drogę apoptozy. Reguluje ono również ekspresję szeregu białek biorących udział w szlaku apoptotycznym. Nadekspresja białek antyapoptotycznych (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, IAP i in.) lub zbyt niski poziom białek proapoptotycznych (Bax, Bak, kaspaza-8, APAF1 i in.) sprzyja oporności na apoptozę. Mutacje genu *P53* zostały wykryte w około 70% guzów [25].

Stwierdzono także wyraźną zależność pomiędzy mutacjami genu *P53* a opornością komórek nowotworowych na różne chemioterapeutyki – np. 5-FU (5-fluorouracyl), cis-platynę, doksorubicynę [22, 25, 28].

Zmniejszoną ilość prokaspazy 8 i 10 – białek biorących udział w szlaku receptorów śmierci – stwierdzono w niektórych przypadkach drobnokomórkowego raka płuc i nerwiaków zarodkowych. Komórki te były niewrażliwe na działanie 5-aza-2'-deoksycytozyny [27].

W komórce funkcjonuje wiele różnych, uzupełniających się nawzajem mechanizmów apoptozy. Dlatego zbyt niski poziom białek biorących udział w określonym szlaku nie oznacza, że w komórce nie może zachodzić apoptoza, raczej zmniejsza się wrażliwość komórkowa na dany lek [25].

Zmieniony metabolizm leków

Część spośród stosowanych leków dopiero w komórce przekształca się w aktywną formę [22]. W procesie tym konieczne są określone enzymy, a ich brak powoduje oporność komórkową na dany lek. Przykładowo, 5-FU ulega przekształceniu w 5-FC (5-fluorocytozynę), która hamuje m.in. proces syntezy DNA. Przekształcenie 5-FU do 5-FC jest dość skomplikowanym procesem, wymaga udziału m.in. fosforylasy tymidyny, fosforylasy urydynowej, oraz transferazy fosforybozylowej. Jeśli jednego z tych enzymów brakuje, komórka staje się oporna na lek.

Oporność komórki na 5-FU może być spowodowana zbyt wysoką ilością dehydrogenazy dihydropiryminyowej. Enzym ten rozkłada 5-FC [22].

Irinotekan (CPT-11) jest lekiem stosowanym w chemioterapii nowotworów jelita grubego [22]. Jest to prolek, który w komórkach nowotworowych musi zostać przekształcony w postać aktywną – inhibitor topoizomerazy I. W procesie tym bierze udział karboksylesteraza. Zbyt niski poziom tego enzymu w komórkach nowotworowych powoduje ich oporność na irinotekan.

Glutation tworzy trwałe koniugaty z cisplatyną i karboplatiną [22]. Koniugaty te są następnie usuwane z komórki przez białka transportowe ABC. Zbyt wysoki

poziom glutationu powoduje więc oporność komórek nowotworowych na cisplatynę i karboplatynę.

Oporność komórek nowotworowych na leki uszkodzające mikrotubule i stabilizujące kompleks topoizomeraz z DNA

Taksany i alkaloidy należą do leków antymitotycznych. Wpływają one na polimeryzację tubuliny wrzeciona kariokinetycznego w czasie podziału, powodując tzw. katastrofę mitotyczną [29]. Zmiany w szybkości polimeryzacji i depolimeryzacji mikrotubul, a także mutacje β -tubuliny mogą sprawić, że komórki stają się niewrażliwe na ten typ leków [4, 22].

Białko BRCA1 bierze udział w naprawie uszkodzeń DNA [30]. U osób ze zmutowanym genem, kodującym to białko, stwierdzono zwiększoną zapadalność na nowotwory piersi i jajnika. Przypuszcza się, że białko BRCA1 bierze udział w wykrywaniu uszkodzeń mikrotubul i kieruje komórki na drogę apoptozy. Stwierdzono wyraźną zależność pomiędzy mutacjami BRCA1 a opornością komórek na leki uszkodzające mikrotubule (przede wszystkim taksany). Sprawdzenie, czy pacjentka z rakiem piersi lub jajnika jest nosicielką mutacji w genie *BRCA1* powinno mieć wpływ na dobór chemioterapii. W przypadku stwierdzenia takiej mutacji należy zrezygnować ze stosowania taksanów [30, 31].

Mechanizm działania niektórych leków polega na stabilizacji kompleksu topoizomeraza/DNA. Topoizomeraza I, rozplatając łańcuch DNA, wprowadza do niego jednoniciowe nacięcia, a następnie bierze udział w ich ligacji. Zablockowanie działania topoizomerazy uniemożliwia naprawienie uszkodzenia DNA. Niski poziom topoizomerazy I może być przyczyną oporności np. na irinotekan, ponieważ w komórce brakuje białka, które jest celem działania tego leku [4, 22].

Rola adhezji komórkowej w oporności komórkowej

Ważną rolę we wzroście i przeżyciu komórek odgrywiają białka powierzchniowe i receptory błonowe [32, 33]. Selektyny i kadheryny (zwłaszcza E-kadheryna) odpowiadają za oddziaływanie pomiędzy komórkami. Integryny i N-kadheryna natomiast biorą udział w oddziaływaniach między komórkami a macierzą pozakomórkową. W przypadku braku oddziaływań integryny z macierzą pozakomórkową w komórkach indukowana jest apoptoza. Zjawisko to jest nazywane *anoikis* [34].

Macierz pozakomórkowa w nowotworach różni się od tej w prawidłowych tkankach – zmienia się jej struktura fizykochemiczna i skład białek. Jej objętość, w stosunku do objętości komórek, jest większa niż w tkankach prawidłowych [35, 36]. Zmiany w strukturze macierzy pozakomórkowej stymulują ekspresję i zmiany konformacyjne receptorów błonowych [36]. Zmienia się adhezja komórek nowotworowych, co z kolei może pociągać za

sobą wzrost inwazyjności i oporności komórek nowotworowych na leki [37].

CAM-DR, czyli oporność komórkowa związana z adhezją (*cell adhesion-mediated drug resistance*) jest zjawiskiem złożonym i może być spowodowana kilkoma czynnikami [33, 37]. Przykładowo, nadekspresja integryny $\alpha_4\beta_1$ w komórkach szpiczaka wywołuje ich oporność na dokсорubicynę. Przypuszczalnie jest to związane z tym, że zwiększona adhezja podnosi ekspresję białek antyapoptotycznych [33].

W niektórych typach komórek nowotworowych z nadekspresją integryny zmniejsza się aktywność topoizomerazy II, co prowadzi do oporności na mitoksantron i etopozyd (związki te stabilizują kompleks topoizomerazy z DNA) [37].

Zwiększona adhezja, związana z nadekspresją integryny β_1 , może z kolei blokować komórki w fazie G_1 . Konsekwencją jest oporność na leki działające tylko w czasie podziału [33, 37].

Nowotworowe komórki macierzyste

Komórki nowotworowe charakteryzują się zróżnicowanym fenotypem, innymi słowy: heterogennością. Większość z nich jest wrażliwa na leki lub promieniowanie. Mogą przejść ograniczoną liczbę podziałów. Stwierdzono, że tylko nieliczne (0,1-1% populacji [38]) komórki nowotworowe w warunkach *in vitro* tworzą kolonie (ulegają wielokrotnym podziałom), a po wszczepianiu myszom SCID – guzy. Nazwano je nowotworowymi komórkami macierzystymi (*cancer stem cells – CSC*) [39, 40]. Niektórzy autorzy używają nazwy komórki inicjujące guzy (*tumour-initiating cells*) lub podobne do macierzystych (*stem-like*) [41]. Komórki CSC zidentyfikowano w różnych typach nowotworów: białaczkach, rakach piersi, płuc, prostaty, mózgu i in. [42]. Hipoteza nowotworowych komórek macierzystych ma ogromne znaczenie dla zrozumienia biologii guzów, a także projektowania nowych leków i strategii terapeutycznych.

Pochodzenie nowotworowych komórek macierzystych

W dorosłym organizmie występują specyficzne dla danego narządu komórki macierzyste (*somatic stem cells*) [40, 43]. Podstawowymi cechami charakteryzującymi ten typ komórek jest ich zdolność do nieograniczonej ilości podziałów, różnicowania się oraz samoodnawialność. Obecność komórek macierzystych zapewnia możliwość odnowy poszczególnych narządów, są one zatem niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Komórki macierzyste mają zdolność do niesymetrycznych podziałów [40, 43]. W wyniku takiego podziału jedna z komórek zachowuje cechy komórki macierzystej, a druga staje się komórką ukierunkowaną (progenitorową). Komórka ukierunkowana może ulegać dalszym podziałom i różnicowaniu, dając początek różnym typom komórek danego narządu; ma ona jednak ograniczoną

zdolność do podziału (nie może dzielić się w nieskończoność).

Komórki macierzyste żyją bardzo długo, więc mogą się w nich kumulować mutacje. Mutacje w genach supresorowych, naprawczych, onkogenach i in. mogą zapoczątkować proces nowotworzenia [42]. Inną drogą, prowadzącą do powstania nowotworowych komórek macierzystych, jest selekcja klonalna – w wyniku nagromadzenia różnych mutacji część zróżnicowanych komórek nowotworowych nabiera zdolności do nieskończonej liczby podziałów i dalszego różnicowania, czyli cech charakteryzujących komórki macierzyste. Komórka taka, dzieląc się, tworzy klony komórek potomnych i bierze udział w nowotworzeniu [40].

Lekooporność nowotworowych komórek macierzystych

Komórki macierzyste – zarówno prawidłowe, jak i nowotworowe – wykazują zwiększoną oporność na apoptozę, mają podwyższony poziom białek naprawczych oraz białek typu ABC, usuwających toksyny. Cechy te zapobiegają śmierci oraz powstawaniu mutacji w prawidłowych komórkach macierzystych. Jednak te same mechanizmy sprawiają, że nowotworowe komórki macierzyste są odporne na chemioterapię. Podwyższony poziom białek naprawczych powoduje, że CSC są mało wrażliwe na radioterapię, która najczęściej wprowadza uszkodzenia do DNA [44].

Dużym problemem jest fakt, że przez większość czasu nowotworowe komórki macierzyste nie ulegają podziałom. Jak wiadomo, wiele chemioterapeutyków działa głównie na komórki dzielące się [39, 42].

Uważa się, że w czasie terapii giną głównie zróżnicowane komórki nowotworowe, natomiast macierzyste przeżywają, powodując remisję guzów [5].

Mikrośrodowisko komórek macierzystych

Funkcje normalnych komórek macierzystych (prolifercja i różnicowanie) są regulowane przez ich otoczenie (tzw. mikrośrodowisko lub niszę) [42, 45, 46]. W skład niszy wchodzi macierz pozakomórkowa oraz sąsiadujące komórki – śródbłónki naczyń krwionośnych, perycyty, komórki układu odpornościowego i in. Mikrośrodowisko zapewnia komórkom macierzystym możliwość „zakotwiczenia się”, stały dopływ tlenu i składników odżywczych, a także sygnałów wzrostu (EGF, PDGF) [47].

Uważa się, że niewłaściwe działanie niszy jest czynnikiem sprzyjającym nadmiernym podziałom i różnicowaniu komórek macierzystych. Przypuszczalnie chodzi o nadmiar sygnałów wzrostu, a nie o niedobór czynników „wyciszenia” [45]. Z czasem nowotworowe komórki macierzyste stają się niezależne od dopływu czynników stymulujących proliferację, a ponadto same zaczynają produkować czynniki (*extrinsic factors*), które powodują zmiany w niszy (np. angiogenezę) [38].

Badania dotyczące komórek macierzystych oraz ich mikrośrodowiska są bardzo skomplikowane. Modelem

doświadczalnym najczęściej są myszy laboratoryjne, często myszy bezgraniczne. Zwierzęta te mają upośledzoną odporność, dzięki czemu nie odrzucają ksenoprzeszczepów – np. ludzkich komórek nowotworowych, są więc często stosowane do badań ludzkich nowotworów. Model ten ma jednak wiele wad [38]. Na proliferację i przeżycie komórek nowotworowych duży wpływ ma mikrośrodowisko – komórki potrzebują bowiem sygnałów od innych komórek i macierzy pozakomórkowej. Budowa receptorów, chemokin, itp. jest inna u myszy i ludzi, dlatego ludzkie komórki podane myszom zmuszone są rozwijać się w niezbyt korzystnych dla siebie warunkach. Uzyskane na takim modelu wyniki mogą odbiegać od tego, co dzieje się w guzie.

Strategie terapeutyczne

Znoszenie barier związanych z transportem leku, brakiem tlenu i obniżonym pH macierzy pozakomórkowej

Problem z ograniczonym transportem leków do komórek nowotworowych można do pewnego stopnia ominąć, podając lek w sposób ciągły w niewielkich dawkach. Wówczas giną komórki położone najbliżej naczyń krwionośnych, odsłaniając kolejne warstwy komórek nowotworowych [3].

Niedotlenowanie komórek nowotworowych jest jedną z przyczyn słabej odpowiedzi komórek nowotworowych na stosowane leki. Można zatem przypuszczać, że zwiększenie ilości tlenu w guzie może poprawić wyniki zarówno chemio-, jak i radioterapii (do jej właściwego działania niezbędne są rodniki tlenowe) [18]. Zwiększenie utlenienia można osiągnąć np. poprzez podanie erytropoetyny – białka zwiększającego produkcję erytrocytów przez szpik kostny. Jak do tej pory, zwiększanie utleniania w guzie nie weszło do praktyki klinicznej [2].

Jednym ze sposobów, który umożliwia lepszą dystrybucję leku, jest tzw. normalizacja naczyń krwionośnych [48]. Po podaniu niektórych leków antyangiogennych (np. przeciwciał anti-VEGF lub talidomidu) przez pewien czas naczynia krwionośne w guzie stają się zbliżone do prawidłowych – zwiększa się ich drożność i zmniejsza przepuszczalność. Zwiększony przepływ krwi ułatwia dostęp leków do guza, zmniejsza się również ciśnienie śródmiąższowe. Powstaje tzw. okienko normalizacyjne, podczas którego zwiększa się skuteczność radioterapii i chemioterapii. Niestety, metoda ta ma również swoje wady – przede wszystkim normalizacja powoduje, że do komórek guza może docierać większa ilość tlenu i składników odżywczych, co pobudza komórki nowotworowe do intensywnych podziałów [2].

Próbowano także modyfikować pH w macierzy pozakomórkowej [2, 15]. Wzrost pH, można uzyskać poprzez podanie np. roztworu węgla sodu (związku zasadowego) [2]. Próbuje się również stosować inhibitory pomp jonowych [2, 15]. Aby zmniejszyć ciśnienie śródmiąższowe, usiłuje się stosować enzymy niszczące

macierz pozakomórkową (np. hialuronidazę, kolagenazę) [2, 3]. Ich działanie polega na zmniejszeniu gęstości macierzy pozakomórkowej, wskutek czego poprawia się transport leków w obrębie guza. Niestety, enzymy te trzeba podawać wprost do guza, co może ograniczać ich zastosowanie. Niektóre z właściwości guzów (np. niedotlenienie, kwaśne pH macierzy pozakomórkowej) próbuje się wykorzystać w celowanej terapii nowotworów. Leki, które działają tylko w warunkach niedotlenienia (np. Tirapazamina, AQ4N) lub obniżonego pH, powinny niszczyć komórki nowotworowe, nie uszkadzając przy tym prawidłowych [3].

Omijanie barier związanych z lekoopornością komórek

Szereg metod zmniejszających oporność komórkową opiera się na zahamowaniu powstawania lub działania białek wywołujących oporność. Jedną z takich metod jest stosowanie antysensownych oligonukleotydów, w końcowym efekcie blokujących powstawanie niektórych białek [28]. Próbowano także hamować ekspresję w komórce różnych białek, np. antyapoptycznych lub transportowych typu MDR1 [28, 49]. Do badań klinicznych zostały zaakceptowane oligonukleotydy hamujące ekspresję np. Bcl-2 [28, 50].

Próbowano wywoływać apoptozę w komórkach nowotworowych, wprowadzając do nich peptydy proapoptyczne. Aby zwiększyć swoistość transportu do komórek nowotworowych, do peptydów wprowadzano dodatkowo krótki motyw, rozpoznawany przez określone receptory (np. motyw RGD rozpoznawany przez integriny $\alpha_v\beta_3$). Badania te są na razie w fazie wstępnej [28, 33, 50].

Znane są też chemioutuczulacze – np. verapamil, cyklosporyna A, blokujące usuwanie leków przez P-glikoproteinę, czy też lek o symbolu VX-710, skierowany przeciwko MRP1. Ich skuteczność jest jednak niezbyt duża, przypuszczalnie dlatego, że inhibitory działają tylko na pewien typ białek transportujących, lek natomiast może być usuwany przez różne białka [39]. Ponadto niektóre z wymienionych leków okazały się neurotoksyczne [24]. W fazie badań klinicznych znajdują się leki przeciwko P-glikoproteinie (LY335979 oraz XR9576) oraz przeciwko białku ABCG2 (GF12918) [24].

Próbuje się stosować przeciwciała skierowane przeciwko integrynom (Vitaxin -1^{TM} i -2^{TM} to przeciwciała przeciwko receptorom integrynowym $\alpha_v\beta_3$) [33]. Zadaniem tych przeciwciał jest zmniejszenie oporności związanej z adhezją.

Niszczenie komórek macierzystych w nowotworach

Zniszczenie komórek macierzystych jest obecnie uważane za najważniejsze – ale i najtrudniejsze – zadanie terapii. Zwykle uważa się, że w pierwszej fazie terapii należy zniszczyć jak najwięcej wrażliwych na leki komórek nowotworowych, a dopiero gdy ich liczba ulegnie redukcji,

należy skierować terapię przeciwko opornym komórkom macierzystym.

Komórki macierzyste większość czasu są w fazie G_0 , dlatego leki działające podczas podziału są nieskuteczne. W niszczeniu komórek macierzystych próbuje się stosować leki niezależne od cyklu komórkowego [40]. Innym rozwiązaniem może być „zmuszanie” komórek macierzystych do różnicowania (*diffrentiation therapy*). Takie działanie ma np. witamina A i jej analogi (retinoidy). Próbowano stosować je jako leki wspomagające terapię. Wyniki ich stosowania są jednak ograniczone [40].

Dużym problemem jest lekooporność nowotworowych komórek macierzystych, dlatego próbowano stosować czynniki działające podobnie jak w przypadku zwykłych komórek nowotworowych – np. inhibitory białek ABC. Nie przyniosło to jednak widocznych efektów terapeutycznych [39].

Próbowano także wykorzystać przeciwciała blokujące interleukinę-4 (IL-4). Interleukina ta bierze udział w powstawaniu lekooporności macierzystych komórek nowotworowych, zatem przeciwciała takie powinno uwrażliwić te komórki na chemioterapię (jak na razie, badania te są w fazie laboratoryjnej) [44].

W regulacji wzrostu i migracji macierzystych komórek swój udział ma ścieżka sygnałowa Hedgehog (Hh) [51]. Ścieżka sygnałowa Hh jest regulowana przez takie białka jak PTC (*Patched*, białko o 12 transmembranowych domenach) i SMO (*Smoothened*, receptor wiążący białko G). Przyłączenie białka Hedgehog powoduje zahamowanie aktywności białka SMO (SMO jest represorem szeregu czynników transkrypcyjnych, biorących udział w regulacji proliferacji i różnicowaniu). Nadekspresję białek biorących udział w tym szlaku wykryto w różnych rodzajach nowotworów. Stwierdzono, że cyklopamina A (alkaloid, antagonist SMO) blokuje tę ścieżkę sygnałową i indukuje apoptozę w wielu różnych liniach nowotworowych *in vitro* oraz hamuje wzrost guzów u myszy.

Inną ważną ścieżką sygnałową, która odgrywa rolę w proliferacji komórek nowotworowych, jest ścieżka sygnałowa zwana Wnt- β -kateniny [52]. Ścieżka ta jest uruchamiana przez wiązanie liganda Wnt z receptorem FZD (*Frizzled*). Proces ten uruchamia β -kateniny, które tworzą aktywne kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi, aktywnymi m.in. protoonkogen *MYC*. Blokiwanie aktywności liganda Wnt, np. przez białka SFRP (*Secreted Frizzled-Related Protein*), lub białka Wnt (*Wnt inhibitory factor 1*) hamuje szereg sygnałów poprzez uruchomienie procesu degradacji β -katenin z udziałem proteasomów. W terapii przeciwnowotworowej usiłuje się wykorzystać m.in. przeciwciała anty-Wnt, przeciwciała przeciwko receptorom Frizzled, a także zrekombinowane białka SFRP.

Ścieżką sygnałową, która odgrywa również ważną rolę w proliferacji komórek macierzystych jak ścieżka Hh i Wnt- β -kateniny, jest ścieżka sygnałowa zwana Notch [52]. Przyłączenie przez receptory Notch odpowiednich ligandów powoduje uruchomienie transkrypcji szeregu genów, biorących udział w proliferacji komór-

rek macierzystych. W aktywacji genu Notch ważną rolę odgrywa γ -sekretaza. Zahamowanie aktywności tego białka powoduje zahamowanie aktywności genów Notch. Stąd podejmowane są próby syntezy i wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej różnych inhibitorów γ -sekretazy.

Jedną ze strategii niszczenia nowotworowych komórek macierzystych jest immunoterapia [53]. W badaniach klinicznych wykorzystano dwa, swoiste dla komórek CSC, antygeny: surwiwinę (białko antyapoptotyczne) oraz telomerazę (enzym odpowiedzialny za odbudowę telomerów, zapewniający komórkom zdolność do nieskończonej liczby podziałów). W warunkach *ex vivo* „skarmiano” komórki dendrytyczne fragmentami wspomnianych białek. Tak przygotowane komórki dendrytyczne podawano następnie pacjentom. W przypadku stosowania do immunizacji telomerazy efekt terapeutyczny był słaby, dużo lepsze wyniki uzyskano stosując surwiwinę.

Bardziej obiecujące wydają się leki działające na „niszczenie”, w której znajdują się nowotworowe komórki macierzyste [47]. Prawidłowe działanie „niszczy” wymaga ciągłego dopływu tlenu i składników odżywczych. Zniszczenie naczyń krwionośnych w guzie może więc powodować śmierć macierzystych komórek nowotworowych. Naczynia w guzach różnią się od naczyń prawidłowych. Komórki śródbłonkowe dzielą się znacznie szybciej niż w prawidłowych naczyniach, wykazują też zwiększoną ekspresję niektórych receptorów. Różnice te sprawiają, że możliwe jest projektowanie leków niszczących naczynia nowotworowe i nie uszkadzających naczyń prawidłowych. Do leków takich należy np. kombretastatyna (niszczy jedynie komórki w fazie podziału) lub bewacizumab (działa na komórki z nadekspresją receptora VEGF) [47].

Uwagi końcowe

Komórki nowotworowe cechuje niestabilność genetyczna (cecha komórek nowotworowych, prowadząca do nagromadzenia mutacji i aberracji chromosomowych). Bez względu na to, w jaki sposób będziemy tłumaczyć heterogenność komórek w guzie (selekcja klonalna lub zdolność komórek macierzystych do różnicowania) jest faktem, że komórki wykazują różne rodzaje oporności na leki i radioterapię.

Stopniowe nabywanie oporności jest często porównywane do procesu ewolucji – w guzach powstają różne komórki nowotworowe, a przeżywają tylko te, które są odporne na stosowaną terapię [46, 54]. Aby zniszczyć nowotwór, należy zabić wszystkie komórki ulegające proliferacji (czyli zmniejszyć masę guza) oraz komórki macierzyste, które będą powodować remisję guza nowotworowego [40].

Zastosowanie jednego leku w terapii jest często mało skuteczne. Dużo lepsze efekty przynosi terapia kombinowana, w której wykorzystuje się różne strategie terapeutyczne (np. chemioterapia skojarzona z radioterapią). Można też stosować chemioterapeutyki atakujące

komórki nowotworowe oraz komórki mikrośrodowiska nowotworowego [9].

Dr Iwona Mitrus

Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
e-mail: mitrus@io.gliwice.pl

Piśmiennictwo

1. Kuszyk BS, Corl FM, Franano FN i wsp. Tumor transport physiology: implications for imaging and imaging-guided therapy. *Am J Roentgenol* 2001; 177: 747-53.
2. Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 61-70.
3. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 583-92.
4. Martinez-Lacaci I, Garcia Morales P, Soto JL i wsp. Tumour cells resistance in cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 2007; 9: 13-20.
5. Blagosklonny MV. Why therapeutic response may not prolong the life of a cancer patient: selection for oncogenic resistance. *Cell Cycle* 2005; 4: 1693-8.
6. Huff CA, Matsui W, Smith BD i wsp. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006; 15: 431-4.
7. Janik P. Stemowe komórki nowotworowe. *Nowotwory J Oncol* 2008; 58: 221-4.
8. Di Paolo A, Bocci G. Drug distribution in tumors: mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification. *Curr Oncol Rep* 2007; 9: 109-14.
9. Szala S. Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej. *Nowotwory J Oncol* 2007; 57: 633-45.
10. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours – what is it not for? *J Pathol* 2003; 201: 173-80.
11. Vaupel P. Abnormal microvasculature and defective microcirculatory function of solid tumors. W: Siemann DW (red.). *Vascular-targeted Therapies in Oncology*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2006, 9-29.
12. Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *Br J Radiol* 2003; 76 Special Issue: S11-S22.
13. Ribatti D, Nico B, Crivellato E i wsp. The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Lett* 2007; 248: 18-23.
14. Si ZC, Liu J. What “helps” tumors evade vascular targeting treatment? *Chin Med J* 2008; 121: 844-9.
15. De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 2005; 1: 779-86.
16. Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 419-32.
17. Stein WD, Bates SE, Fojo T. Intractable cancers: the many faces of multidrug resistance and the many targets it presents for therapeutic attack. *Curr Drug Targets* 2004; 5: 333-46.
18. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 5: 4-9.
19. Melillo G, Semenza GL. Meeting report: exploiting the tumor microenvironment for therapeutics. *Cancer Res* 2006; 66: 4558-60.
20. Ebbesen P, Pettersen EO, Denekamp J i wsp. Hypoxia, normoxia and hyperoxia – terminology for medical in vitro cell biology. *Acta Oncol* 2000; 39: 247-8.
21. Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 2005; 14 Suppl 1: 35-48.
22. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005; 205: 275-92.
23. Perez-Tomas R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1859-76.
24. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 105-27.
25. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 231-7.

26. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
27. Zhivotovsky B, Orrenius S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 125-34.
28. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-88.
29. Stepień A, Izdebska M, Grzanka A. Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Hig Med Dośw* 2007; 61: 420-8.
30. James CR, Quinn JE, Mullan PB i wsp. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncologist* 2007; 12: 142-50.
31. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T i wsp. Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108: 289-96.
32. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 163-80.
33. Bewick MA, Lafrenie RM. Adhesion dependent signalling in the tumour microenvironment: the future of drug targeting. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2833-48.
34. Gilmore AP, Anoikis. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1473-7.
35. Huang S, Ingber DE. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* 2005; 8: 175-6.
36. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 463-71.
37. Shain KH, Dalton WS. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther* 2001; 1: 69-78.
38. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 755-68.
39. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 275-84.
40. Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006; 17: 1620-4.
41. Neuzil J, Stantic M, Zobalova R i wsp. Tumour-initiating cells vs cancer "stem" cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 855-9.
42. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 2008; 49: 193-9.
43. Lobo NA, Shimono Y, Qian D i wsp. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675-99.
44. Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2839-45.
45. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 2006; 66: 4553-7.
46. Shipitsin M, Polyak K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab Invest* 2008; 88: 459-63.
47. Baguley BC. Tumor stem cell niches: a new functional framework for the action of anticancer drugs. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2006; 1: 121-7.
48. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58-62.
49. Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of *MDR1* (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1515-9.
50. Meng XW, Lee SH, Kaufmann SH. Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 668-76.
51. Eaton S. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 437-45.
52. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 387-98.
53. Parmiani G, Russo V, Marrari A i wsp. Universal and stemness-related tumor antigens: potential use in cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5675-9.
54. Kitano H. Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 227-35.

Otrzymano: 21 stycznia 2009 r.

Przyjęto do druku: 15 lutego 2009 r.