

Macierzyste komórki nowotworowe, a oporność nowotworów na terapię

Małgorzata Statkiewicz¹, Maciej Małecki^{1, 2}

Teoria macierzystych komórek nowotworowych (CSC), zakładająca występowanie w masie nowotworowej małej populacji komórek wykazujących zdolność do samoodnowy, pojawiła się już w latach 50. Początkowo donoszono o identyfikacji komórek CSC w nowotworach krwi, obecnie są dowody na ich występowanie w nowotworach mózgu, okrężnicy, wątroby, trzustki, jajnika i piersi. Prawdopodobnie to właśnie macierzyste komórki nowotworowe są odpowiedzialne za nieskuteczność konwencjonalnych metod leczenia i pojawianie się przerzutów nowotworowych. Stosowane obecnie strategie leczenia chorych, takie jak chemioterapia, radioterapia i immunoterapia, skierowane na zróżnicowane komórki nowotworowe, pozwalają na przeżycie komórek macierzystych. Zrozumienie molekularnych mechanizmów oporności CSC pozwoli na opracowanie skutecznych metod ich eliminacji i skuteczne leczenie chorych. W artykule zwrócono uwagę na obecny, publikowany, stan badań nad sposobami eliminacji CSC w nowotworach, włączając strategie skierowane na miejsca ich rezydowania – niszce naczyniowe oraz ich biomarkery powierzchniowe, białka transporterowe ABC i szlaki sygnałowe odpowiedzialne za samoodnowę komórek. Wydaje się, iż badanie macierzystych komórek nowotworowych jest istotnym krokiem w kierunku doskonalenia konwencjonalnych metod leczenia chorych na nowotwory.

Cancer stem cells and cancer resistance to therapy

Cancer stem cell hypothesis establishes that only a small population of cancer stem cells (CSC) within the mass of the tumor has the ability to initiate tumorigenesis, while other cancer cells have limited capacity to proliferation. The initial reports announced the identification of CSC in hematological malignancies. Currently, CSC have been found to be present in brain, pancreas, liver, colon, ovarian and breast tumors. Probably these are, cancer stem cells which are responsible for the inefficacy of conventional methods of the treatment and for metastatising. At present such antitumor strategies as chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy, which are targeted on differentiated cancer cells, allow tumor stem cells to survive. Understanding the molecular mechanisms of CSC resistance will enable us to develop forceful methods of CSC elimination and will also provide complete recovery from metaplastic diseases. The paper presents recent advances in CSC targeting therapies, which are focused on their surface biomarkers, on the ABC transporter family which is required for the maintenance of cancer stem cells pathways and also on the disruption of the CSC-specific vascular niches by antiangiogenic therapy. The cancer stem cell hypothesis has a profound impact on the treatment option. Identification of CSC allow for an improvement of the efficacy of conventional methods as well as for the development of new, alternative strategies.

Słowa kluczowe: macierzyste komórki nowotworowe, nowotworzenie, chemiooporność

Key words: cancer stem cells, cancerogenesis, chemoresistance

Wprowadzenie

Obecność macierzystych komórek nowotworowych w badaniach eksperymentalnych i klinicznych odzwierciedla postęp w naukach biomedycznych, który przyczynia się do poznania molekularnych podstaw procesu nowotworzenia, jak i, a może przede wszystkim bezpośrednio determinuje rozwój nowych metod leczenia chorych na

nowotwory. Najprawdopodobniej większość nowotworów wywodzi się z macierzystych komórek narządowych. Nie-wielka frakcja macierzystych komórek nowotworowych może warunkować oporność nowotworu na konwencjonalne leczenie onkologiczne. Badania molekularne macierzystych komórek nowotworowych wskazują, iż obserwowana *in vivo* oporność na chemioterapię może wynikać ze zmiany w macierzystych komórkach nowotworów wzorców transdukcji sygnałów odpowiedzialnych za aktywność metaboliczną komórek. Wydaje się, iż możliwe jest nie tylko charakteryzowanie zmian genetycznych w macierzystych komórkach nowotworowych, ale również planowanie swoistych, nowych metod leczenia chorych na nowotwory.

¹ Zakład Biologii Komórki
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

² Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Tab. I. Biomarkery komórek macierzystych

Biomarkery komórek macierzystych					
Embrionalne komórki macierzyste	Nerwowe komórki macierzyste	Sercowe komórki macierzyste	Hematopoetyczne komórki macierzyste	Mezenchymalne komórki macierzyste	Markery różnicowania embrionalnych komórek macierzystych
SSEA-3	CD133: Prominin-1	Sca-1	CD34	STRO-1	SSEA-1
SSEA-4	SSEA-1	Kit	c-kit	VCAM-1	A2B5
TRA-1-60	HNK-1: CD57		CD135: FLT-3R	Sca-1	CD56: NCAM
TRA-1-81	PSA-NCAM		CD48	BMPR-IA/ALK3	GD2
GCTM2			CD159	BMPR-IB/ALK6	GD3
GCT343			Sca-1	BMPR-II	
CD9			CD150 [SLAM]	CD73	
Thy1			CD244	c-kit	
TRA-2-54;				Thy-1	
TRA-2-49;				CD105/endoglin	

Komórki macierzyste

Komórki macierzyste (*normal stem cells* – NSC) stanowią populację niezróżnicowanych i niewyspecjalizowanych komórek, które są zdolne do odnawiania się, a także do różnicowania się w komórki wyspecjalizowane, tworzące dojrzałe tkanki [1]. Wyróżnia się najczęściej embrionalne i nieembrionalne komórki macierzyste. Embrionalne komórki macierzyste pochodzą z pierwszego podziału zapłodnionego jaja i dają początek wszystkim typom komórek dorosłego organizmu. Podczas embriogenezy, powstałe z komórek embrionalnych komórki potomne tracą potencjał nieograniczonej ilości podziałów i zyskują swoiste właściwości. Zarodkowe komórki macierzyste są odpowiedzialne za reprodukcję, zaś komórki somatyczne, znajdujące się w tkankach, zapewniają ich odbudowę i regenerację [2, 3]. Często opisywane – molekularne biomarkery (Tab. I) służą do klasyfikacji i izolacji komórek macierzystych, a także monitorowania etapów ich różnicowania. Ze względu na zdolność różnicowania wyróżnia się następujące grupy komórek macierzystych [4]:

- totipotencjalne – mające zdolność do różnicowania się we wszystkie typy komórek, również komórki łożyska (zygota i blastomery);
- pluripotencjalne – komórki zarodkowe, zdolne do różnicowania się we wszystkie typy komórek organizmu, z wyjątkiem komórek łożyska;
- multipotencjalne – komórki ektodermy, endodermy i mezodermy, mogące różnicować się do różnych typów komórek;
- unipotencjalne – mające zdolność różnicowania się tylko do jednego typu komórek.

Komórki macierzyste dzielą się asymetrycznie, wnosząc dwie komórki potomne, z których jedna pozostaje w puli komórek macierzystych, zaś druga ulega dalszemu różnicowaniu lub wchodzi w stan apoptozy. Jeżeli liczba komórek macierzystych zmniejsza się, komórki zaczynają dzielić się w sposób symetryczny; wówczas obie komórki potomne zachowują cechy komórek rodzicielskich [5]. Stwierdzono, że szlaki sygnałowe Notch, Sonic hedgehog

(Shh) i Wnt, białka Oct-4, BMP, czynniki transkrypcyjne: Oct4, Rex1, Sox2, TDGF1 biorą udział w regulacji samoodnowy komórek macierzystych [6, 7]. W utrzymaniu pluripotencjalności ważne jest również mikrośrodowisko, w którym rezydują obok komórek macierzystych inne, zróżnicowane komórki [8-10].

Macierzyste komórki nowotworowe

Macierzyste komórki nowotworowe powstają w wyniku mutacji genetycznych zachodzących w komórkach macierzystych, dojrzałych, zróżnicowanych komórkach, a także komórkach już stransformowanych [11]. Pierwszy raz zidentyfikowano macierzyste komórki nowotworowe w przebiegu ostrej białaczki szpikowej w 1990 roku [12]. Zaobserwowano, że mała liczba komórek w masie nowotworowej jest fenotypowo podobna do komórek macierzystych i może inicjować rozwój nowotworu u myszy z obniżoną odpornością immunologiczną [13]. Od tej pory obecność nowotworowych komórek macierzystych stwierdzono np. w nowotworach jajnika, piersi, mózgu, prostaty, trzustki, wątroby [14-26]. Nie wszyscy naukowcy są przekonani o dominującej w nowotworzeniu roli macierzystych komórek nowotworowych, jednak ich istnienie potwierdzają przekonujące obserwacje eksperymentalne wskazujące, że np. tylko mała, swoista populacja komórek nowotworowych przeszczepianych do myszy z obniżoną opornością immunologiczną jest w stanie zainicjować proces nowotworzenia, a opisywane swoiste komórki charakteryzują się określoną ekspresją genów markerów powierzchniowych (Tab. I, II).

Oporność macierzystych komórek nowotworowych

W oparciu o badania poświęcone macierzystym komórkom nowotworowym stwierdzono, że tylko niewielka część populacji komórek guzów nowotworowych ma zdolność do samoodnowy i jest odpowiedzialna za rozwój nowotworu, utrzymanie jego masy, a także wznowę i tworzenie przerzutów. Jeżeli przyjmie się wnioskowanie

**Tab. II. Biomarkery macierzystych komórek nowotworowych.
Identyfikacja specyficznych biomarkerów CSC dla każdego typu nowotworu
jest krytyczna dla indywidualizacji potencjalnej terapii**

Nowotwór	Markery CSC	Piśmiennictwo
Rak mózgu	CD133+	36
Rak piersi	CD24+/CD44+/ESA+	37
Rak jajnika	CD133+/Side population /CD44+, CD117+	38, 39, 40
Rak płuca	Cd133+	41
Rak prostaty	CD44+/ α 2 β 1/CD133+	42
Rak trzustki	CD44+/CD24+/ESA/CD133+	43, 44
Rak wątroby	CD133+	45, 46
Rak okrężnicy	CD133+/CD44+/Lin-/ESA+	48, 49, 50

o istnieniu macierzystych komórek nowotworowych za słuszne, to skuteczna eliminacja komórek nowotworów wymaga stosowania metod terapii eliminujących komórki nowotworowe, ale przede wszystkim również populację komórek macierzystych. Obecnie, konwencjonalne strategie leczenia chorych na nowotwory, włączając chirurgię, chemioterapię, radioterapię i immunoterapię, niszczą szybko rosnące, zróżnicowane komórki nowotworowe, redukując masę nowotworową, ale najprawdopodobniej znacznie mniej efektywnie usuwają komórki macierzyste nowotworu, co może być przyczyną nawrotu choroby [27]. Powstaje dużo prac, wskazujących potencjalne mechanizmy oporności nowotworowych komórek macierzystych (CSC) na leczenie, oraz opisujących próby uwrażliwiania CSC na dostępne metody leczenia chorych na nowotwory.

Radioterapia

Wskazuje się, iż oporność nowotworowych komórek macierzystych na radioterapię może wynikać z szybkiej aktywacji w tych komórkach mechanizmów naprawiających uszkodzone DNA. Powoduje to, że bardziej niż pozostałe komórki nowotworowe, CSC są odporne na zmiany genetyczne [28]. Wydaje się, że bardzo duży wpływ na oporność macierzystych komórek nowotworowych mają kinazy Chk1 i Chk2, które powodują zatrzymanie cyklu komórkowego do momentu naprawy DNA. Wykazano, iż ich inhibicja zmniejsza *in vitro* i *in vivo* oporność CSC na promieniowanie jonizujące [28, 29]. Hambardzumyan i wsp. zaobserwowali, że w przeciwieństwie do szybko proliferujących komórek nowotworowych, CSC (*medulloblastoma*) aktywują szlaki PI3K/Akt i zależnie od białka p53 zostają zatrzymane w cyklu komórkowym i ponownie do niego włączone po 72 godzinach. Wydaje się, że inhibicja szlaku sygnałowego kinazy Akt powoduje uwrażliwienie komórek CSC na radioterapię i ich eliminację na drodze apoptozy [30]. Strata aktywności supresorowych fosfataz cyklu komórkowego, białka PTEN, funkcjonujących w szlakach kinazy Akt, zapobiega wstrzymaniu cyklu po naświetlaniu, przez ograniczenie wpływu Chk1 do cy-

toplazmy [31]. Zmuszanie CSC do pozostania w cyklu komórkowym wydaje się metodą umożliwiającą ich eliminację podczas radioterapii.

Ostatnio stwierdzono, że kilka szlaków, zaangażowanych w samoodnowę i różnicowanie prawidłowych komórek macierzystych, takich jak: WNT/katenina, SHH, Notch, zapewnia nowotworowym komórkom macierzystym oporność na radioterapię. Przypuszcza się, że nieprawidłowa transdukcja sygnału szlaku Wnt/katenina indukuje transformację prawidłowych komórek macierzystych w CSC [32]. Wzmocniona zostaje tolerancja komórek na uszkodzenie DNA, zwiększa się niestabilność genetyczna, co ułatwia przeżywanie komórek nowotworowych po naświetlaniu [29]. Fan i wsp. zbadali wpływ szlaku Notch, odpowiedzialnego za promowanie proliferacji i hamowanie różnicowania naturalnych komórek macierzystych, na oporność CSC (*medulloblastoma*). Badacze odkryli, że blokowanie szlaku redukuje frakcję CD133+ CSC prawie 5-krotnie, a szybkość apoptozy tych komórek jest około 10-krotnie wyższa niż innych komórek w masie nowotworowej. Takie wyniki pozwalają przypuszczać, że blokowanie szlaku Notch może być jedną z pierwszych terapii skierowanych przeciwko nowotworowym komórkom macierzystym [33]. Wang i wsp. odkryli natomiast, że stosowanie inhibitora ścieżki sygnałowej Shh – cyklopaminy wzmacnia wrażliwość CSC na naświetlanie [34]. Cyklopamina blokuje szlaki sygnałowe białka Shh przez wiązanie się do białka Smo, sygnalizacyjnej podjednostki receptora Shh. Powoduje to blokowanie onkogennego efektu Smo w fibroblastach, hamowanie wzrostu komórek pozbawionych funkcjonalnego Ptch, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0-G1 i indukcję apoptozy [35-38].

Chemioterapia

Działanie większości cytotoksycznych środków leczniczych polega na niszczeniu struktury DNA, zakłócaniu przebiegu mitozy; dochodzi do śmierci szybko proliferujących komórek nowotworowych. Istnieje coraz więcej dowodów świadczących o tym, że za nieskuteczność che-

mioteraapii odpowiada mała populacja komórek macierzystych (CSC). Zawdzięczają one swoją oporność np. większej aktywności białek transporterowych (transmembranowych transporterów ABC), wyższemu poziomowi ekspresji białek antyapoptotycznych, szybszej naprawie DNA [39, 40]. Wydaje się, iż skuteczność terapii chorych na nowotwory może być wiązana z identyfikacją biologicznych markerów nowotworowych komórek macierzystych (Tab. I, II). Zainteresowania naukowców wiążą się z rozpoznawaniem biomarkerów, których geny są ekspresjonowane specyficznie w CSC, a zarazem są nieobecne w prawidłowych komórkach macierzystych. Wykorzystując aktywowane, monoklonalne przeciwciała skierowane przeciw molekule adhezyjnej CD44 obserwowano wyraźną redukcję subpopulacji CSC w pozbawionych odporności myszach z przeszczepioną ludzką ostrą białaczką szpikową [41]. Xu i wsp. otrzymali monoklonalne przeciwciała mAb188, które selektywnie wiąże się z węglowodanowym epitopem, wyrażanym na CSC raka okrężnicy. Opierając się na tym odkryciu zakłada się, że użycie mAb188 jako nośnika chemoterapeutycznych leków dla CSC i innych komórek nowotworowych zwiększy skuteczność terapeutyczną tych leków [41]. W strategii skierowanej przeciwko CSC glejaka, wykazano, że białko BMP może indukować różnicowanie komórek CD133+ w znacznie łagodniejsze komórki podobne do astrocytów. Transplantacja komórek nowotworowych CD133+, wstępnie wyhodowanych z BMP lub wszczepianie ich łącznie z BMP redukuje wzrost nowotworu i zwiększa przeżycie zwierząt. To może oznaczać, że wymuszone różnicowanie komórek CD133+ mózgu, przez indukowaną nadekspresję BMP, może służyć jako efektywny środek uwrażliwiający populację komórek nowotworowych na konwencjonalną chemioterapię i redukować szybkość nawrotu nowotworu [42].

Prace doświadczalne wskazują, iż oporność nowotworów na chemioterapię warunkuje również ekspresja kwasu hialuronowego (HA). Bourguignon i wsp. badali interakcje pomiędzy HA, CD44 (receptorem HA) i czynnikiem transkrypcyjnym embrionalnych komórek macierzystych – Nanog w komórkach raka piersi (MCF-7) i raka jänika (SK-OV-3ipl). W obu typach komórek HA wspomaga oddziaływanie białka Nanog z markerem CD44 oraz ekspresję pluripotencjalnych komórkowych regulatorów (Rex1 i Sox2). Oprócz tego Nanog także formuluje w jądrze kompleks z białkiem STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription protein 3*), co prowadzi do ekspresji transmembranowego transportera MDR1. Zaobserwowano również, że kompleks HA-CD44 indukuje wiązanie cytoszkieletowego białka ankiryiny do MDR1, powodując wypompowywanie antynowotworowych leków, takich jak doxorubicyna i paklitaxel poza komórkę. Nadekspresja białka Nanog przez komórki nowotworowe aktywuje białko STAT-3 oraz wysoką ekspresję transportera MDR1, co powoduje wysoką chemooporność komórek. Opisane doniesienia podkreślają rolę szlaku sygnalizacyjnego Nanog-Stat-3, kompleksu HA/CD44 oraz ankiryiny w chemooporności CSC w raku piersi i jänika [43].

Jak już wspomniano, obecność w macierzystych komórkach nowotworowych aktywnych transmembranowych transporterów ABC, takich jak MDR1, ABCG2 i BCRP, umożliwia CSC wypompowywanie stosowanych w chemioterapii leków poza komórkę [27]. Możliwość usuwania cytostatyków przyczynia się do ich zwiększonej chemooporności, którą może wzmacniać zachodząca w niektórych typach nowotworów ekspresja genów kodujących metaboliczne mediatory, takie jak np. dehydrogenaza aldehydowa 1 (ADHD1). Obserwowano, że aktywność enzymatyczna ADHD1 w macierzystych komórkach raka jelita grubego jest wyższa niż w pozostałych komórkach. Wydaje się, że jest to główną przyczyną oporności na leczenie cyklofosfamidem. Inhibicja aktywności enzymu *in vitro* i redukcja ekspresji *in vivo* uwrażliwia komórki rakowe na cyklofosfamid [44]. Macierzyste komórki nowotworowe białaczek mają również zwiększoną zdolność do wypompowywania leków np. daunorubicyny i mitoxantronu poza komórkę. Podobne właściwości wykazują CSC neuroblastoma w stosunku do mitoxantronu, czego rezultatem jest zwiększona przeżywalność tych komórek. Ostatnio doniesiono, że subpopulacja komórek raka trzustki, funkcjonalnie przypominających komórki macierzyste, posiada silną oporność na gemcytabinę *in vitro* i *in vivo*, a także, że CSC glejaka odgrywają znaczącą rolę w oporności na temozolamid, karboplatynę, etopozyd, paklitaxel. Beier i wsp. badali wpływ temozolamidu na populację nowotworowych komórek macierzystych CD133+ i CD133-. Temozolamid indukował, zależny od dawki i czasu działania, spadek subpopulacji CSC. Inkubacja z subletalnym stężeniem temozolamidu przez 2 dni całkowicie usuwała CSC z hodowli *in vitro* oraz znacznie zmniejszała nowotworzenie *in vivo*. Badacze wykazali, że w linii komórek CSC, w których zachodzi ekspresja metylotransferazy guaniny (MGMT), enzymu odpowiedzialnego za demetylację guaniny, efekt działania temozolamidu jest widoczny przy 10-krotnie wyższej dawce w porównaniu do MGMT-negatywnych CSC. Stężenie temozolamidu stosowane u pacjentów wystarczało tylko do całkowitej eliminacji MGMT negatywnych CSC *in vitro*. Przeprowadzone badania sugerują, że optymalizacja stężenia temozolamidu w chemioterapii może znacznie poprawić eliminację CSC [45, 46]. Wskazuje się również, iż np. CSC raka okrężnicy są odporne na śmierć komórkową, indukowaną leczeniem flurouracylem lub interleukiną-4. Stymulacja receptora IL-4 w komórkach CSC wiąże się z chemoopornością i może być używana do zmiany wrażliwości CSC na cytostatyki. Francipane i wsp. udowodnili, że zablokowanie IL-4 przez neutralizujące przeciwciała, mutację bądź inhibitor (IL4-DM), uwrażliwia komórki nowotworowe, w tym również CSC, na chemioterapię [39].

Yilmaz i wsp. [47] badali rolę genu supresorowego *PTEN*, regulatora szlaku sygnałowego kinazy fosfatydylinozitolowej PI[3]K, hamującego proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych. Autorzy pracy odkryli, że delecja *PTEN* w dorosłych hematopoetycznych komórkach mysich prowadzi do rozwijania się białaczkowych komórek macierzystych i zmniejszenia ilości zdrowych

hematopoetycznych komórek. Wykazano, iż leczenie zwierząt rapamycyną hamuje rozwój CSC i utrzymuje populację prawidłowych komórek macierzystych.

Immunoterapia

CD200 jest transmembranową glikoproteiną, odgrywającą istotną rolę w reakcjach immunoregulacji, odpowiedzi organizmu na komórki nowotworowe. Wiązanie CD200 do receptora CD200R wpływa na szlaki sygnałowe kinaz MAP, hamuje degranulację komórek tucznych, powoduje spadek ekspresji interleukiny 13 (IL-13), czynnika wzrostu nowotworu (TNF α), interferonu α (INF α) i interleukiny 17 (IL-17). Immunoglobulina CD200 reguluje również produkcję cytokin Th1 i interleukiny 10 (IL-10) oraz indukuje komórki T. Ostatnio stwierdzono, że glikoproteina CD200 jest markerem komórek CSC w nowotworach prostaty, mózgu, okrężnicy, czerniaku oraz raku piersi [48]. Kawasaki i wsp. przypisują jej funkcję nadawania komórkom CSC zdolności do ucieczki przed systemem odpornościowym organizmu. Ekspresja CD200 w komórkach CSC przypuszczalnie wywołuje obniżenie odpowiedzi obronnej, regulowanej przez cytokiny Th1 oraz powoduje wzrost proliferacji i/lub indukcję komórek T. Sugeruje się, że modyfikacja aktywności CD200 może skutecznie zwiększać efektywność immunoterapii [49].

Odkryte ostatnio komórki pCSC, uważane za wczesne stadium nowotworowych komórek macierzystych, mogą być wykorzystywane do produkcji szczepionek przeciwnowotworowych. Zaobserwowano, że pre-immunizacja myszy komórkami pCSC zapobiega odbudowywaniu się nowotworu, po wszczepieniu komórek rakowych, nawet przez 8 miesięcy. Autor pracy sugeruje również, że odpowiedź immunologiczna, wywołana nadekspresją białka Piwil2, może powstrzymać rozwój nowotworu. Koncepcję immunoprewencji potwierdza również fakt, że biologiczny czynnik modyfikujący (BRM), nazwany KaovaccineTM, może zapobiegać rozwojowi raka płuc u SP-C/p53-273H transgenicznej myszy ze zmutowanym ludzkim białkiem p53 (p53-173H), pod kontrolą promotora białka C (SP-C), spontanicznie wywołującego raka płuc. Podawanie transgenicznym myszom KaovaccineTM przez 12 miesięcy efektywnie zapobiega rozwojowi nowotworu [5, 50]. Trzeba jednak stwierdzić, iż u zwierząt wiele prób eksperymentalnej immunoterapii, skierowanych przeciwko antygenom komórek nowotworowych, zakończyło się niepowodzeniem. Wnioskuje się, iż najprawdopodobniej jest to spowodowane tym, że żaden antygen stale i mocno nie jest wyrażany w komórkach CSC we wszystkich typach nowotworów. Wydaje się, że komórkowe szczepionki pCSC i CSC mogą być bardziej skuteczne w leczeniu nowotworów człowieka. Stwierdzono, że w komórkach pCSC zachodzi ekspresja genów Oct-4, TDFG-1 i REX1, zidentyfikowanych również w zarodkowych komórkach macierzystych [51]. Produkty tych genów odkryto w wielu typach nowotworów i niektóre z nich, takie jak SOX2, wykazują silną immunogenność u pacjentów [52].

Angiogeneza

Jednym ze sposobów identyfikacji czynników regulujących funkcjonowanie komórek CSC jest porównanie ich z naturalnymi komórkami macierzystymi i odnajdywanie podobieństw między tymi dwoma populacjami komórek. Interesującą cechą, charakteryzującą komórki macierzyste, jest ich koncentracja w regionach silnie ukrwionych, w tak zwanych „niszach naczyniowych”, pełniących ważną rolę w zapewnieniu schronienia komórkom np. przed czynnikami stymulującymi apoptozę [53, 54]. Kluczowym składnikiem nisz komórek macierzystych są komórki śródbłonna, odpowiedzialne za utrzymanie odpowiedniej równowagi między samo- odnawianiem i różnicowaniem się komórek. Stwierdzono, że np. CSC w nowotworach mózgu, podobnie jak prawidłowe komórki macierzyste, rezydują w pobliżu naczyń włosowatych [55]. Ponadto, komórki CSC, hodowane z ludzkimi komórkami śródbłonna, szybko i selektywnie z nimi asocjują, podczas gdy większość komórek w masie nowotworowej nie wykazuje takiej właściwości. Wykazano także, że komórki śródbłonna wzmacniają zdolności samoodnowy CSC *in vitro*. Celebrase i wsp. [56] zbadali efekt interakcji CSC z komórkami śródbłonna na wzrost nowotworu *in vivo*. Przeszczepili komórki *medulloblastoma* z komórkami śródbłonna oraz same CSC do myszy mających obniżoną odporność. W obu przypadkach transplantowane komórki inicjowały nowotworzenie, jednakże komórki *medulloblastoma*, transplantowane z komórkami śródbłonna, rosły szybciej i tworzyły większe guzy. Co więcej, ustalono, iż w obecności komórek śródbłonna masa nowotworowa zawiera 25-razy więcej nowotworowych komórek macierzystych. Uzyskane wyniki stanowią dowód, że komórki śródbłonna mogą wzmacniać samoodnowę CSC *in vitro* i promują wzrost raka mózgu *in vivo*. Celebrase i wsp. [56] zbadali również, czy eliminacja komórek śródbłonna może zapobiegać rozwojowi nowotworu mózgu. Stwierdzono, że CSC *medulloblastoma* często wykazują nadekspresję czynnika ERBB2, co prowadzi do podwyższonej produkcji naczyniowo-śródbłonnego czynnika wzrostu (VEGF), krytycznego regulatora żywotności i proliferacji komórek śródbłonna. CSC, wykazujące nadekspresję czynnika ERBB2, indukowały wzrost nowotworu szybciej niż komórki kontrolne. Wykazano, iż u myszy traktowanych inhibitorami ERBB2 lub VEGF zmniejszeniu ulegała liczba naczyń krwionośnych i CSC; obserwowano ograniczenie wzrostu nowotworu. Podobne wyniki uzyskano dla komórek *glioblastoma* [55]. Na podstawie wielu podstawowych badań stwierdzono, że niedotlenienie powoduje zwiększenie produkcji VEGF w nowotworach. Wykazano, iż np. bevacizumab (Avastin), będący neutralizującym przeciwciałem anti-VEGF, specyficznie hamuje angiogenezę CSC. Stwierdzono, że połączenie bevacizumabu z inhibitorem topoizomazy, irinotekaniem, zwiększa skuteczność terapeutyczną u chorych z nawrotami *glioblastoma* [57]. Celebrase i wsp. [56] podkreślają rolę mikrośrodowiska naczyniowego we wzroście raka mózgu. Stwierdzenie, iż ko-transplantacja komórek nowotworowych z komórkami śródbłonna, pro-

wadząca do szybszego formowania nowotworów, zwiększa prawdopodobieństwo tego, że to właśnie naczyniowe niszce mogą przyczynić się do indukcji i utrzymania nowotworu [56]. Bao i wsp. [58] wykazali, że komórki CSC *glioma* silnie ekspresują VEGF, który indukuje migrację komórek śródbłonna i formowanie się nowych naczyń krwionośnych [58]. Terapia antyangiogenna jest znaną strategią leczenia chorych na nowotwory. Mimo iż wiele prac wskazuje, że hamowanie powstawania nowych naczyń krwionośnych wpływa bezpośrednio na wzrost nowotworów [59], to jednak mechanizm terapii antyangiogennej – w świetle badań poświęconych CSC – wydaje się nie być jednoznacznie wyjaśniony [60, 61]. Praca Celebrase i wsp. [56] sugeruje, że mechanizm, przez który działają leki antyangiogenne, polega na zakłócaniu angiogenezy, niezbędnej do samoodnowy CSC. Celebrase i wsp. [56] obserwowali także, iż czynniki angiogenne mają uderzający wpływ nie tylko na samoodnowę CSC, ale również na proliferację, apoptozę większości komórek nowotworowych. Sugeruje to, że zastosowanie terapii antyangiogennej może nie być wystarczające do uzyskania szybkiej regresji guzów. Zasadne wydaje się stosowanie kombinacji terapii przeciw CSC z konwencjonalnymi metodami terapii onkologicznych, skierowanych na masę komórek nowotworowych [62]. Folkins i wsp. [63] udowodnili, że zarówno pojedyncza terapia antyangiogenna, jak i chemioterapia przy zastosowaniu wysokich dawek cyklofosfamidu, nie powodują redukcji frakcji CSC *glioma*, natomiast jednoczesne zastosowanie obu terapii selektywnie eliminuje CSC nowotworu. Jest możliwe, że terapia antyangiogenna niszczy strukturę naczyń krwionośnych w *glioma*, uniemożliwiając komunikację między CSC i ich niszami. Prawdopodobnie wywołuje to redukcję lub utratę charakterystycznych dla CSC cech komórek macierzystych, w tym utratę oporności na leki cytotoksyczne, co powoduje wzrost szybkości proliferacji i redukcję zdolności naprawy DNA. Takie zmiany mogą uwrażliwiać CSC na cyklofosfamid, co umożliwia eliminację CSC [64].

Oddziaływanie pomiędzy CSC a układem naczyń może mieć również znaczący wpływ na skuteczność radioterapii. Niedotlenienie indukuje czynnik transkrypcyjny (HIF-1 α), który aktywuje białko TP53, przyspiesza metabolizm ATP i proliferację, przez co uwrażliwia komórki na promieniowanie jonizujące, ale również pozwala na przetrwanie komórkom śródbłonkowym [29]. Dodatkowo regulatorami radiooporności, zależnymi od niedotlenienia, są: β -katenina, Tcf-4, Notch, Oct-4, Sox2 i Nanog. Nie zdołano jeszcze scharakteryzować wpływu poszczególnych czynników na wrażliwość komórek na radioterapię, ale odkryto, że napromieniowane CSC są częściowo unaczynione, co wskazuje, iż komórki śródbłonna, które przetrwały napromieniowanie, mogą przyczynić się do angiogenezy i wzrostu nowotworu po zastosowaniu radioterapii. Te wszystkie obserwacje potwierdzają hipotezę, że radiooporność nowotworów, wywołana przez czynnik HIF, może być związana z niedotlenieniem nisz, w których rezydują CSC. Ostatnie badania kliniczne wskazują, iż wzmocnienie odpowiedzi antynowotworowej uzyskuje

się np. po połączeniu terapii antyangiogennej z radioterapią [64-66].

Terapia genowa i nanotechnologia

Pojawienie się nowych środków leczniczych i metod leczenia chorych na nowotwory wynika z badań podstawowych, poświęconych zrozumieniu genetycznych podstaw procesu nowotworzenia. Wykorzystanie preparatów genowych i metod transferu genów do niszczenia macierzystych komórek nowotworowych ma aktualnie status eksperymentalny. Wykazano np. skuteczność stosowania wektora wirusowego Ad/TRAIL-F/RGD w uwrażliwianiu komórek nowotworowych raka płuc i przełyku na radioterapię. Wykazano, iż zastosowany preparat genowy skutecznie zwiększał eliminację radioopornych nowotworowych komórek macierzystych raka przełyku [67].

Yin i wsp. [68] z kolei badali wpływ czynnika różnicowania komórek wątroby (HNF-4 α) na macierzyste komórki nowotworowe. Badacze stwierdzili, że zwiększona ekspresja HNF-4 α przyczynia się do spadku liczby komórek z ekspresją markerów CD90+ i CD133+ [68].

Zastosowanie nanotechnologii w leczeniu zapoczątkowało rozwój nanomedycyny, która pozwala na opracowanie nowych terapii leczniczych, a także zwiększa efektywność stosowanych obecnie terapeutycznych strategii, ułatwia specyficzne wprowadzanie leku do organizmu oraz umożliwia jego ukierunkowany transport, maksymalizując efekt terapeutyczny i ograniczając niespecyficzne efekty uboczne. Nanomateriały mogą być używane do opłaszczania leków, zapobiegając ich niepożądanym interakcjom w organizmie. Lek zostaje uwolniony w formie aktywnej dopiero w miejscu docelowym. Taki system transportu wykorzystano do pokonania oporności wywołanej obecnością wewnątrzblonowych transporterów ABC w komórkach nowotworowych. W przypadku dyfuzji leku do komórki zostaje on rozpoznany przez transportery ABC. Jego opłaszczenie lub koniugacja z nanomolekułą powoduje, że lek wnika do komórki w pęcherzyku endocytarnym, a tym samym nie zostaje od razu rozpoznany przez pompy ABC [69]. Wykazano, np. że doxorubicyna połączona z hydroksypropylometakrylamidem (HPMA) efektywnie wnika na drodze endocytozy do komórek [70, 71]. Kabanov i wsp. [72, 73] zastosowali polimer Pluronic jako nośnik leków antynowotworowych. Zaobserwowali oni, że polimer opłaszczał doxorubicynę i zachowywał swoją aktywność, przeciwstawiając się różnym mechanizmom oporności i uwrażliwiając odporne komórki, szczególnie na antracykliny [72-74]. Tokes i wsp. [75] już w 1982 roku wykazali, że doxorubicyna połączona kowalencyjnie z polimerowymi mikrosferami była aktywna pomimo braku wewnątrz komórki wolnego leku [76]. Tym samym udowodnili oni, że wprowadzając lek do komórki i wykorzystując interakcję polimeru z błoną komórkową, można pokonać mechanizmy oporności komórkowej, a także modyfikować właściwości farmakologiczne leku [69, 76]. Oczywiście nie wszystkie komórki nowotworowe ekspresują transportery ABC są komórkami macierzystymi, podobnie jak nie wszyst-

kie transportery są wyrażane przez macierzyste komórki nowotworowe. Stwierdzono, że wiele nowotworowych komórek macierzystych ekspresuje transporter ABCG2 rzadziej niż ABCB1 p-gp/MDR1, co może wyjaśniać, dlaczego wiele inhibitorów transporterów ABC nie ma pozytywnego, klinicznego wpływu na CSC i na efektywne leczenie chorych na nowotwory [77]. Inhibitor, który skutecznie blokuje transportery ABC większości komórek nowotworowych, może być nieefektywny w przypadku populacji komórek macierzystych [69]. Uzyskane wyniki wskazują, iż stosowanie nanopolimerów jest jedną z możliwości pokonywania oporności nowotworowych komórek macierzystych, spowodowanej wysoką ekspresją genów transporterów ABC.

Podsumowanie

Obecność macierzystych komórek nowotworowych w badaniach rewiduje spojrzenie naukowców na biologiczne podstawy procesu nowotworzenia, zaś lekarzom – klinicyzom pozwala zrozumieć nierzadko obserwowany brak efektywności leczenia chorych na nowotwory, a co najważniejsze, planować leczenie inaczej, skuteczniej. Istnieją dość liczne dowody na istnienie nowotworowych komórek macierzystych w wielu typach nowotworów. Dotychczas stosowane terapie antynowotworowe są skierowane na dojrzałe komórki nowotworowe. Wydaje się, że macierzyste komórki nowotworowe są niewrażliwe na konwencjonalne metody leczenia, są odporne na radioterapię, chemioterapię, mogą przetrwać leczenie, zainicjować nawrót choroby nowotworowej. Wydaje się, iż konieczne jest prowadzenie dalszych badań podstawowych, poświęconych poznaniu molekularnych podstaw procesu nowotworzenia, jak i podejmowanie prób wykorzystania zdefiniowanych już obserwacji eksperymentalnych i klinicznych do wdrażania nowych rozwiązań w terapii chorych na nowotwory.

Doc. dr hab. n. med. Maciej Małecki
Zakład Immunologii
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Piśmiennictwo

- Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7274-82.
- Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006; 17: 1620-4.
- Witoń M. *Laboratorium Medyczne* 2007; 7-8: 51-2.
- Gil J, Stembalska A, Pesz K, Szaśniadek M. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 2008; 49: 193-9.
- Gao J-X. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 67-96.
- Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; 411: 349-54.
- Koestenbauer S, Zech NH, Juch H i wsp. Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 169-80.
- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG i wsp. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 759-806.
- Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311: 1880-5.
- Zhang J, Niu C, Ye L i wsp. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836-41.
- Ponnusamy MP, Batra SK. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. *J Ovarian Res* 2008; 1: 1-9.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J i wsp. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-8.
- Pan CX, Zhu W, Cheng L. Implications of cancer stem cells in the treatment of cancer. *Future Oncol* 2006; 2: 723-31.
- Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF i wsp. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
- Seaberg RM, van der KD. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* 2003; 26: 125-31.
- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001-20.
- Brown MD, Gilmore PE, Hart CA i wsp. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations. *Prostate* 2007; 67: 1384-96.
- Collins AT, Berry PA, Hyde C i wsp. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-51.
- Eramo A, Lotti F, Sette G i wsp. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008; 15: 504-14.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler i wsp. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 313-23.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID i wsp. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H i wsp. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-4.
- Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT i wsp. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 11154-9.
- Yin S, Li J, Hu C i wsp. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 120: 1444-50.
- Zhang S, Balch C, Chan MW i wsp. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 4311-20.
- Klonisch T, Wiehce E, Hombach-Klonisch S i wsp. Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. *Trends Mol Med* 2008; 14: 450-60.
- Rich JN. Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Cancer Res* 2007; 67: 8980-4.
- Eyler CE, Rich JN. Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2839-45.
- Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK i wsp. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev* 2008; 22: 436-48.
- Puc J, Keniry M, Li HS i wsp. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell* 2005; 7: 193-204.
- Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiehce E i wsp. Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. *Arch Immunol Ther Exp* 2008; 56: 165-80.
- Fan X, Matsui W, Khaki L i wsp. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 2006; 66: 7445-52.
- Wang J, Guo LP, Chen LZ i wsp. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67: 3716-24.
- Gailani MR, Stähle-Bäckdahl M, Leffell DJ i wsp. The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 1996; 14: 78-81.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK i wsp. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 2000; 406: 1005-9.

37. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR i wsp. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002; 297: 1559-61.
38. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG i wsp. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; 422: 313-7.
39. Francipane MG, Alea MP, Lombardo i wsp. Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4022-5.
40. Massard C, Teutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006; 17: 1620-4.
41. Jin L, Hope KJ, Zhai Q i wsp. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Natural Medicine* 2006; 12: 1167-1174.
42. Lee J, Son MJ, Woolard K i wsp. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 2008; 13: 69-80.
43. Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W i wsp. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 17635-51.
44. Dylla SJ, Bevilgia L, Park IK i wsp. Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogenic Tumors Following Chemotherapy. *PLoS ONE*. 2008; 18; 3: e2428
45. Beier D, Röhl S, Pillai DR i wsp. Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Cancer Res* 2008; 68: 5706-15.
46. Liu G, Yuan X, Zeng Z i wsp. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 2;5:67.
47. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK i wsp. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006; 441: 475-82.
48. Kawasaki BT, Farrar WL. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 778-82
49. Halama N, Zoernig I, Jäger D. Immunotherapy for cancer—modern immunologic strategies in oncology. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 2105-8.
50. Duan W, Ding H, Subler MA i wsp. Lung-specific expression of human mutant p53-273H is associated with a high frequency of lung adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* 2002; 21: 7831-8.
51. Chen L, Shen R, Ye Y i wsp. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS ONE*. 2007; 3: 1-16.
52. Spisek R, Kukreja A, Chen LC i wsp. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 2007; 204: 831-40.
53. Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C i wsp. *Nat Neurosci* 2006; 9: 331-9.
54. Shen Q, Goderie SK, Jin L i wsp. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004; 304: 1338-40.
55. Yang ZJ, Wechsler-Reya RJ. Hit 'Em Where They Live: Targeting the Cancer Stem Cell Niche. *Cancer Cell* 2007; 11: 3-5.
56. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M i wsp. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007; 11: 69-82.
57. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE i wsp. Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1253-9.
58. Bao Wu Q, Sathornsumetee S i wsp. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2006; 66: 7843-8.
59. Malecki M, Jastrzębski Z, Przybyszewska M i wsp. Antiangiogenic gene therapy: application of soluble FLT-1 receptor. *Adv Clin Exp Med* 2004; 13: 227-33
60. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Natural Medicine* 2001; 7: 987-9.
61. Lin MI, Sessa WC. Antiangiogenic therapy: creating a unique „window” of opportunity. *Cancer Cell* 2004; 6: 529-31.
62. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 423-35.
63. Folkins C, Man S, Xu P i wsp. Anticancer Therapies Combining Antiangiogenic and Tumor Cell Cytotoxic Effects Reduce the Tumor Stem-Like Cell Fraction in Glioma Xenograft Tumors. *Cancer Res* 2007; 67: 3560-4.
64. Lee CG, Heijn M, di Tomaso E i wsp. Antivascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 2000; 60: 5565-70.
65. Hess C, Vuong V, Hegyi I i wsp. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer* 2001; 85: 2010-16.
66. Li J, Huang S, Armstrong EA i wsp. Angiogenesis and radiation response modulation after vascular endothelial growth factor receptor-2 [VEGFR2] blockade. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 1477-85.
67. Zhang X, Komaki R, Wang L i wsp. Treatment of Radioresistant Stem-Like Esophageal Cancer Cell by an Apoptotic Gene-Armed, Telomerase-Specific Oncolytic Adenovirus. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2813-23.
68. Yin C, Lin Y, Zhang X i wsp. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4alpha gene. *Hepatology* 2008; 48: 1528-1539
69. Andreas G. Schätzlein. Delivering cancer stem cell therapies – A role for nanomedicines? *Eur J Cancer* 2006; 42: 1309-15.
70. Minko T, Kopeckova P, Pozharov V i wsp. HPMA copolymer bound adriamycin overcomes MDR1 gene encoded resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *J Control Release* 1998; 54: 223-33.
71. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 347-60.
72. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic block copolymers. *J Control Release* 2003; 91: 75-83.
73. Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 759-79.
74. Venne A, Li S, Mandeville R i wsp. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res* 1996; 56: 3626-9.
75. Tokes ZA, Rogers KE, Rembaum A. Synthesis of adriamycin coupled polyglutaraldehyde microspheres and evaluation of their cytostatic activity. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79: 2026-30.
76. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 2000; 85: 217-29.
77. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 275-84.

Orzymano: 10 lutego 2009 r.

Przyjęto do druku: 5 marca 2009 r.