

Rozprawa habilitacyjna • Thesis**Onkogeny jako modyfikatory procesów naczyniowych w nowotworach**

Janusz Rak

Progresja nowotworowa jest wynikiem akumulacji szeregu błędów genetycznych prowadzących do ekspresji onkogenów lub utraty genów supresorowych. Początkowo, głównie tym zmianom przypisywano wpływ na zaburzenia w procesach proliferacji i regulacji żywotności komórek nowotworowych. Istnieją jednak dowody na to, że wpływ onkogenów wykracza poza zmiany o charakterze wewnątrzkomórkowym i ma decydujące znaczenie w regulacji procesów naczyniowych towarzyszących nowotworzeniu. Najlepiej z nich opisane są procesy angiogenezy i koagulopatii nowotworowej (zespół Trousseau). Nasze badania wykazały, że wprowadzenie onkogenu K-ras do komórek nowotworowych powoduje zwiększenie produkcji śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), jednego z głównych stymulatorów wzrostu naczyniowego, oraz do obniżenia ekspresji białka o przeciwnym działaniu – trombospondyny 1 (TSP-1). Te i inne zmiany stymulują procesy angiogenne, które odgrywają centralną rolę w ekspansji, inwazji i przerzutowaniu nowotworów. Komórki, w których doszło do mutacji onkogenu ras nie tylko same nabywają cech angiogennych, ale również powodują powstawanie tzw. efektu pola angiogennego, poprzez obniżenie produkcji TSP-1 w sąsiadujących z nimi normalnych fibroblastach. Mutacyjne zmiany w obrębie genów, takich jak ras, receptor naskórkowego czynnika wzrostowego (EGFR) czy p53 prowadzą do zmian w ekspresji czynnika tkankowego (TF). Ten szczególnie czynnik krzepnięcia i receptor bierze udział w regulacji fenotypu angiogennego i jest znanym stymulatorem koagulopatii nowotworowej. Zmiany angiogenne i krzepliwe w nowotworach mają w znacznej mierze naturę genetyczną (a nie wyłącznie zależną od mikrośrodowiska), zatem mogą być modyfikowane pod wpływem nowej generacji leków przeciwnowotworowych skierowanych przeciwko specyficznym białkom onkogennym. Leki te można uważać za nowotworowo swoiste i pośrednio działające inhibitory angiogenezy i antykoagulanty.

Oncogenes as modifiers of vascular processes associated with cancer

Tumor progression is driven by a series of genetic alterations including gain-of-function mutations of oncogenes and loss-of-function events affecting tumor suppressor genes. These oncogenic events were hitherto mainly ascribed various roles in deregulation of cellular mitogenesis and survival. In this article we review the growing body of evidence that the impact of the aforementioned genetic lesions transcends boundaries of individual cancer cells and plays a central role in the interaction between the growing tumor and the host vascular system. Tumor angiogenesis and cancer coagulopathy (Trousseau syndrome) are amongst the most widely appreciated manifestations of such interactions. We have previously demonstrated that expression of mutant K-ras oncogene in a variety of cell types leads to overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent stimulator of vascular growth, along with downregulation of its antithetical inhibitor known as thrombospondin 1 (TSP-1), and several other changes. The resulting process of new blood vessel formation in tumors is critical for tumor expansion, invasion and metastasis. Cancer cells expressing mutant ras not only become proangiogenic themselves, but can also influence the expression of TSP-1 in their adjacent fibroblasts, a phenomenon we refer to as 'angiogenic field effect'. Oncogenic mutations of ras, epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 can also alter expression of tissue factor (TF) by cancer cells. This unique coagulation factor and signaling receptor can contribute to the regulation of the angiogenic phenotype, but also acts as a known trigger of cancer coagulopathy. Thus both, proangiogenic and procoagulant events in cancer, along with their consequences for tumor progression, morbidity and mortality are, at least in part, driven by events of genetic (rather than microenvironmental) nature, and could therefore be modulated by new generation oncogene-directed anticancer agents (targeted agents). We postulate that such drugs could, therefore, be regarded as cancer-specific and indirect acting antiangiogenics and anticoagulants.

Spis treści

1. Biologiczne podstawy progresji nowotworów	59
2. Oddziaływania nowotworów z układem naczyniowym	61
3. Transformujące zmiany genetyczne a układ naczyniowy nowotworów	64
4. Rola układu naczyniowego w patobiologii i leczeniu przeciwnowotworowym – fakty i kontrowersje	71
5. Uwagi końcowe	74
6. Podziękowania	74
7. Piśmiennictwo	75

Słowa kluczowe: progresja nowotworowa, onkogeny, geny supresorowe, angiogeneza, ras, p53, VEGF, trombospondyna, koagulopatia nowotworowa, zespół Trousseau, czynnik tkankowy

Keywords: tumor progression, oncogenes, tumor suppressor genes, angiogenesis, ras, p53, VEGF, thrombospondin, cancer coagulopathy, Trousseau syndrome, tissue factor

Rozprawa habilitacyjna przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu

1. Biologiczne podstawy progresji nowotworów

Jak wiele przewlekłych stanów chorobowych nowotwory złośliwe rozwijają się stopniowo, często w sposób bezobjawowy i podstępny, nierzadko w przeciągu wielu lat lub nawet dziesięcioleci.

Z tego punktu widzenia kliniczne manifestacje choroby nowotworowej występują stosunkowo późno (choć istnieją istotne różnice pomiędzy jednostkami nozologicznymi), ale i tu zmiany ilościowe (wzrost) i jakościowe (np. rozwój inwazyjności) są nieodłączną cechą tego procesu. Wreszcie, właściwości komórkowe i mechanizmy molekularne procesu nowotworowego zmieniają się znacząco w jego kolejnych etapach, których sekwencje określa się mianem progresji nowotworowej [1, 2].

Determinanty progresji nowotworowej

Istnieje wiele uznanych klasyfikacji manifestacji progresji nowotworowej. Są one podstawą znanych systemów oceny klinicznej i prognozowania, takich jak np. klasyfikacje TNM, Duke's i wiele innych [3]. Klasyfikacje te uwzględniają szereg cech procesu chorobowego, takich jak np. wielkość ogniska pierwotnego, stopień inwazji tkanek normalnych, stan węzłów chłonnych, obecność odległych przerzutów, zmiany uchwytne w badaniach laboratoryjnych (np. testy PSA w raku prostaty lub CA125 w raku jajnika) i szereg innych właściwości [4]. Jednak coraz częściej podejmuje się próby włączania w te systemy bardziej subtelnych cech komórkowych i molekularnych choroby oraz próbuje się zrozumieć, co zmiany te znaczą z punktu widzenia przyczyn i mechanizmów nowotworzenia. W tym względzie badania podstawowe nie tylko dostarczyły fascynującego materiału faktograficznego, ale również stały się ostatnio terenem interesujących syntez intelektualnych. Hanahan i Weinberg zaproponowali, że progresja nowotworowa doprowadza do uformowania się co najmniej sześciu wspólnych właściwości (*hallmarks of cancer*), które miałyby w sposób zasadniczy odróżnić komórki nowotworowe od ich normalnych odpowiedników tkankowych [5]. Cechy te to: (i) niezależność od egzogennych czynników wzrostowych, (ii) niepodatność (oporność) na fizjologiczne bodźce wywołujące programowaną śmierć komórkową (apoptozę), (iii) oporność na fizjologiczne czynniki przeciwwzrostowe, (iv) zdolność do inwazji tkanek, (v) zdolność do przerzutowania do odległych narządów, oraz (vi) zdolność do stymulacji reakcji naczyniowej (angiogenezy) [5]. Jak dochodzi do wyłonienia się tej ostatniej właściwości i jakie jest jej znaczenie w progresji nowotworowej, będzie głównym tematem tego opracowania.

Koncepcja ewolucji klonalnej nowotworów

Zrozumienie, co właściwie dzieje się w czasie kolejnych faz procesu progresji nowotworowej było przedmiotem licznych dociekań. Wśród nich szczególne znaczenie ma tzw. hipoteza ewolucji klonalnej, którą przed ponad trzy-

dziestu laty zaproponował Peter Nowell [2, 6]. U źródeł tej hipotezy leżą wcześniejsze obserwacje wskazujące na to, że początków nowotworzenia można dopatrywać się w zmianach na poziomie pojedynczej komórki prekursorowej. W niektórych białaczkach wszystkie komórki transformowane są nośnikami charakterystycznych zmian (markerów) na poziomie chromosomalnym [6]. W swoich badaniach nad chroniczną białaczką szpikową (*chronic myelogenous leukemia* – CML), Nowell zaobserwował niemal powszechne występowanie takiej anomalii (nazwanej chromosomem Philadelphia), choć wiadomo było, że w rozwiniętej chorobie istnieje wiele subpopulacji komórkowych charakteryzujących się ekspresją odrębnych markerów genetycznych i fenotypowych [6]. W oparciu o te obserwacje, Nowell zaproponował, że w trakcie progresji nowotworowej pojedyncza transformowana „komórka początkowa” może podlegać procesom podziałów i spontanicznej zmienności genetycznej, które prowadzą do, w zasadzie nieograniczonej, różnorodności (*diversity/heterogeneity*) populacji potomnych. Populacje te nieustannie konkurują ze sobą w warunkach zewnętrznej presji selekcyjnej, która wynika z ograniczonego dostępu do czynników wzrostowych, reakcji układu immunologicznego, terapii i innych okoliczności [6]. Wynikające stąd procesy selekcji pozytywnej i negatywnej prowadziłyby następnie (jak w przypadku ewolucji gatunków) do wyłonienia się klonów najlepiej przystosowanych, zwykle najbardziej agresywnych i często opornych na stosowane leczenie [6, 7].

Genetyczny model transformacji i progresji nowotworowej

Badania Nowell'a nad białaczkami nie tylko zwróciły uwagę na możliwość monitorowania progresji nowotworowej przy pomocy zmian genetycznych [6], ale również przyczyniły się do zainteresowania się rolą przyczynową tych ostatnich [2, 10, 11]. Występowanie chromosomu Philadelphia (Ph) w CML jest wynikiem translokacji $t(9;22)(q34;q11)$, która prowadzi do powstania nienormalnego genu hybrydowego (*bcr-abl*), o właściwościach transformujących komórki szpikowe. Dzieje się tak dlatego, że produkt genu *c-Abl* ma aktywność kinazy białkowej, która stymuluje szlaki sygnałowe zaangażowane w regulacji mitogenezy. Chroniczna aktywacja *c-ABL* w połączeniu z sekwencją *bcr* (*breakpoint cluster region*) prowadzi do utraty naturalnej regulacji wzrostu i jest podstawą nowotworzenia [8, 9]. Fascynującym wydarzeniem ostatniej dekady jest racjonalne wykorzystanie tych informacji dla zaprojektowania leku zdolnego do zahamowania aktywności białka BCR-ABL. Preparat ten o nazwie imatinib mesylate (Gleevec) zrewolucjonizował leczenie CML i okazał się skuteczny również w innych chorobach nowotworowych [8, 9].

O ile Gleevec stanowi efektowną ilustrację przemian, jakie się obecnie dokonują w leczeniu przyczynowym nowotworów, źródeł tego przełomu należy szukać znacznie wcześniej [10, 11]. Kulminacja tych wysiłków w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych [10, 11] doprowadziła

do zdefiniowania dwójakiego typu zmian genetycznych leżących u podstaw nowotworzenia [12]. Komórki nowotworowe mogą nabywać „nowe” cechy fenotypowe, wskutek ekspresji białek, których funkcja jest zmieniona poprzez mutacje odpowiadających im genów (np. *bcr-abl*), lub poprzez nienormalny poziom ekspresji (*gain-of-function mutations*). Często są to białka odgrywające rolę w regulacji procesów wzrostowych, które ulegają w ten sposób ilościowemu i/lub jakościowemu zaburzeniu. Zmienione w ten sposób geny komórkowe określono mianem onkogenów (*oncogenes*), a ich normalne odpowiedniki określa się jako proto-onkogeny (*proto-oncogenes*) [10]. Onkogeny mają cechy dominujące, ponieważ zmiana w obrębie tylko jednego z dwu alleli (*single hit*) jest wystarczająca dla powstania nienormalnego produktu białkowego o właściwościach transformujących [12]. Istnieje wiele mechanizmów, które mogą doprowadzić do nienormalnej ekspresji onkogenów w ludzkich komórkach nowotworach (np. mutacje punktowe, rearanżacje chromosomów, amplifikacje), a ich najbardziej znane przykłady to: *BCR-ABL*, *K-ras*, *EGFR*, *HER-2*, *MYC*, *MET* [10-13].

Drugim typem zmian genetycznych związanych z rozwojem nowotworów jest utrata ekspresji i/lub funkcji (*loss-of-function mutations*) tzw. genów supresorowych (*tumor suppressor genes*) [10, 12, 13]. Wiele spośród tych genów (np. *p53*, *Rb*, *p16/INK4a*, *PTEN*) koduje białka odpowiedzialne za kontrolę (zwykle negatywną) wzrostu komórkowego, odpowiedzi na stres metaboliczny lub naprawę uszkodzeń w strukturze DNA [12]. Ponieważ dla pełnej utraty funkcji musi zwykle dojść do zablokowania obydwu istniejących alleli (np. w wyniku mutacji, rearanżacji lub metylacji promotora), geny supresorowe działają w sposób recesywny, czyli zgodnie z tzw. hipotezą „dwu uderzeń” Knudson'a („*two hit*” hypothesis) [12]. Hipoteza ta zaproponowana została na podstawie klasycznych dziś badań nad dziedziczeniem genu związanego z dziecięcym nowotworem siatkówki oka – retinoblastoma (*Rb*). Postuluje ona, że powstawanie nowotworów wymaga dwu niezależnych „wydarzeń” genetycznych (*two hits*) dotyczących obu alleli genu *Rb*, np. w wyniku kombinacji wrodzonej mutacji tego genu z przypadkową inaktywacją pozostającej jego kopii w komórkach somatycznych nabłonka siatkówki. W podobny sposób mogą być inaktywowane również inne geny supresorowe, często w połączeniu z zespołami zwiększonej zapadalności na choroby nowotworowe np. gen *p53* w zespole Li-Fraumeni, gen *APC* w rodzinnej polipowatości jelita grubego (FAP), czy gen *PTEN* w zespole Cowden'a [12]. W miarę akumulacji danych dotyczących molekularnych mechanizmów działania onkogenów i genów supresorowych staje się jasne, że u podstaw transformacji i progresji nowotworowej leżą nie jedna, a liczne, współistniejące zmiany genetyczne i regulacyjne (minimum 3-7). Często też, cechy tych zmian nie mieszczą się w ramach wcześniejszych definicji (np. epigenetyczna regulacja ekspresji niektórych genów, rola mikro RNA w transformacji). W tym sensie genezy chorób nowotworowych coraz częściej upatruje się nie w pojedynczych genach, a raczej w powstawaniu nowych onkogennych szlaków i sieci w sygnalizacji komórkowej, które peł-

niej wyświetlić mogą tylko metody biologii systemowej (*systems biology*) [5, 12]. Sieci te są niejednokrotnie „karykaturą” normalnych reakcji komórkowych na bodźce wzrostowe lub szkodliwe (np. niedotlenienie), które w wyniku mutacji niektórych elementów są nadmiernie wzmacniane lub paradoksalnie modulowane w komórkach nowotworowych. Akumulacja genetycznych zmian onkogennych, i towarzysząca jej biologiczna i kliniczna progresja nowotworowa osiągają punkt kulminacyjny w formie procesu przerzutowania [14]. Ze względu na jego nieuchronność i znaczenie w patologii nowotworów proces ten będzie omówiony pokrótce poniżej.

Heterogenność i oddziaływanie subpopulacji komórek nowotworowych w procesie przerzutowania

Asynchroniczne nabywanie zmian genetycznych w komórkach nowotworowych, w naturalny sposób prowadzi do powstawania subpopulacji o zróżnicowanych (heterogennych) właściwościach fenotypowych. Prace prowadzone w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych udokumentowały ten fakt z nieznaną poprzednio precyzją, koncentrując się głównie na genezie procesu przerzutowania [14]. Fidler i współpracownicy zaproponowali model przerzutowania, który określany bywa mianem „mistrza dekatlonu” (*decathlon champion model*) [14]. Koncepcja ta zakłada, że proces przerzutowania ma naturę „kaskadową” (*metastatic cascade*) i składa się z szeregu niezależnych i trudnych do pokonania etapów, takich jak: (i) wnikanie do naczyń (intrawazacja), (ii) przetrwanie w krążeniu i osadzanie się w narządach docelowych (embolizacja i adhezja do śródbłonna), (iii) wydostawanie się komórek z przestrzeni wewnątrznaczyniowej (ekstrawazacja), (iv) wydzielanie czynników wzrostowych i proliferacja, (v) formowanie angiogennych ognisk wtórnych i inne [14]. Ponieważ na każdym z tych etapów prawdopodobieństwo „sukcesu” jest niezwykle małe (np. mniej niż 1% komórek nowotworowych przeżywa w krwiobiegu), trudno sobie wyobrazić żeby kiedykolwiek doszło do uformowania przerzutu w sposób całkowicie przypadkowy, tak jak trudno przez przypadek stać się zwycięzcą dekatlonu [14]. Komórki przerzutujące musiałyby posiadać wyjątkowe właściwości, które (jak umiejętności „mistrza dekatlonu”) dawałyby im deterministyczną zdolność do odniesienia „sukcesu” w toku rozsiewu nowotworowego [14]. Możliwość istnienia takich małych i wyspecjalizowanych subpopulacji została pokazana w eleganckich i klasycznych dziś doświadczeniach, w których cykliczne wstrzykiwanie komórek nowotworowych i późniejsza izolacja tych, które przemieściły się do różnych narządów, doprowadziło do wzbogacenia populacji w klony zdolne do przerzutowania [14]. Jakkolwiek istnieją obecnie dowody molekularne na istnienie wyspecjalizowanego komórkowego fenotypu przerzutowego [14-20], jego cechy nie wydają się być ani tak definitywne i konstytutywne, ani tak całkowicie deterministyczne [21, 22] jak to przewiduje model „dekatlonu”.

Wyzwaniem dla modelu „mistrza dekatlonu” było szereg innych koncepcji, z których teoria dominacji klo-

nalnej (*clonal dominance*) [7] i teoria oddziaływań międzykomórkowych [23] zasługują na szczególną uwagę. W pierwszym przypadku Kerbel, Waghorne, Korczak, Theorescu i ich współpracownicy zaobserwowali, że niektóre zaawansowane nowotwory pierwotne (mysi rak sutka SP1, czy ludzki czerniak złośliwy) przypominają pod względem cech biologicznych wywodzące się z nich przerzuty [7]. Komórki przerzutujące musiałyby stanowić większość, a nie mniejszość (jak zakładał „model dekatlonu”) w ogólnej populacji nowotworowej. Znakowanie genetyczne subpopulacji komórek nowotworowych (np. za pomocą przypadkowej integracji sekwencji retrowirusowych) doprowadziło do ustalenia, że w czasie wzrostu guza pierwotnego komórki przerzutujące wykazują cechy dominujące, które umożliwiają progresywne zwiększanie się ich proporcji w masie nowotworu (zjawisko znane pod nazwą: *selective growth advantage/clonal dominance*) [7]. Sytuacja ta w sposób oczywisty zwiększałaby prawdopodobieństwo i efektywność rozsiewu, oraz byłaby zgodna z założeniem, że fenotyp przerzutowy nie jest wynikiem wąskiej specjalizacji komórkowej, a raczej konsekwencją akumulacji błędów genetycznych w toku nowotworowej progresji. Warto zauważyć, że w myśl tej koncepcji konkurencja międzyklonalna jest istotnym mechanizmem prowadzącym do przerzutowania [7]. Pogląd ten kwestionuje teoria oddziaływań, w myśl której między populacjami nowotworowymi zachodzą nie tyle procesy kompetycyjne (których istnienie trudno byłoby pogodzić z ciągłą ekspansją heterogenności komórkowej), a raczej komplementarne oddziaływania kooperacyjne. W wyniku tych ostatnich, różne populacje komórek nowotworowych mogą wspomagać wzajemną zdolność do rozsiewu [23]. Mogłoby to prowadzić do synergistycznych efektów lub wręcz do podziału „ról” między komórkami nowotworowymi w trakcie pokonywania „kaskadowego” procesu przerzutowania [23-26]. Wprawdzie można przypuszczać, że oddziaływania komórkowe zwiększają prawdopodobieństwo rozsiewu [23], ale nie wiadomo czy geny za nie odpowiedzialne są częścią wyraźnego profilu molekularnego, jaki przypisywany jest obecnie komórkom przerzutującym [14-20].

Komórki pnia nowotworu (*cancer stem cells*)

Szczególną manifestacją heterogenności nowotworowej jest postulowana obecność niewielkiej subpopulacji komórek stransformowanych, które miałyby być obdarzone właściwościami nieograniczonego samoodnawiania (*self renewal*) i wzrostu klonalnego. Komórki te określa się mianem komórek pnia nowotworu (*cancer stem cells, CSC*), ponieważ ich właściwości nieco przypominają zachowanie normalnych komórek prekursorowych obecnych w szpiku i innych odnawiających się tkankach (*stem cells*) [25-27]. Nowotworowe komórki pnia mają się wywodzić z tych ostatnich, a w związku z tym odznaczać się takimi cechami jak ekspresja specyficznych markerów (*Sca1, CD133, ABCG2, Hoechst uptake*), niska aktywność mitogenna, oporność na leki przeciwnowotworowe, a przede

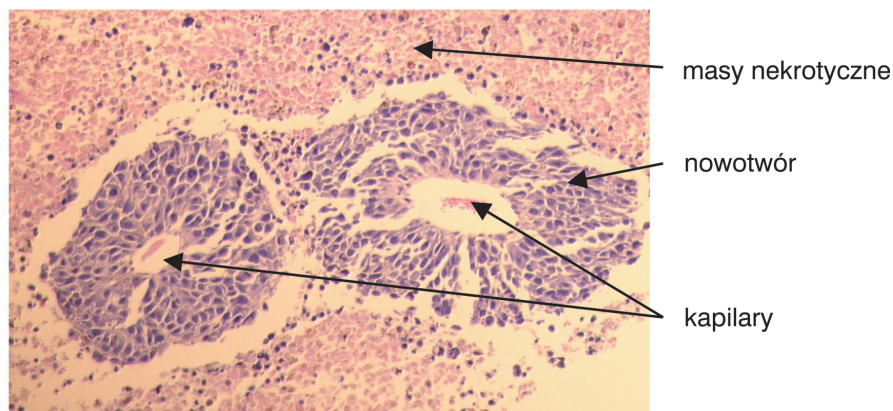
wszystkim zdolność do inicjowania lub repopulacji guzów nowotworowych, nawet przez pojedyncze CSCs [27-30]. Uważa się, że powstawanie populacji nowotworowych komórek pnia wynika ze szczególnej podatności normalnych komórek pnia na transformujący wpływ mutacji onkogennych [27]. Mutacje te są również wykrywalne w „potomnych” komórkach nowotworowych (wywodzących się z CSC), które choć odznaczają się większą aktywnością mitogenną i tym, że dominują one masy nowotworowe, mogą nie stanowić prawdziwego źródła rozrostu, przerzutowania i rozwoju lekooporności obserwowanych w toku progresji choroby [28]. Jest zastanawiające, że niekiedy komórki podścieliska (np. śródbłonek) izolowane z niektórych typów nowotworów szpiku również wydają się zawierać zmutowane onkogeny, co można interpretować jako dalsze potwierdzenie nienormalnego różnicowania się CSC [31].

Choć koncepcja CSC jest fascynująca, jej pełne zaakceptowanie w obecnie proponowanej formie prowadziłoby do szeregu paradoksów. Wśród nich, deterministycznie i jakościowo ujmowana zdolność pojedynczych CSCs do indukowania wzrostu nowotworowego, trudna byłoby do pogodzenia z szeregiem obserwacji. Na przykład, wzrost *tumor take* znajduje się pod silnym wpływem takich czynników jak: lokalizacja tkankowa (ektopowa lub ortotopowa), obecności innych komórek nowotworowych, normalnych lub martwych/napromienionych (tzw. efekt Revesz'a), obfitości macierzy międzykomórkowej (np. w postaci preparatu Matrigel), a szczególnie zdolności angiogennych (lub ich brak) zarówno ze strony samych komórek nowotworowych jak i tkanek gospodarza [23, 32-34]. Można więc zaproponować, że właściwości opisane jako istnienie „CSC” nie koniecznie wynikają z cech autonomicznych komórek o określonym fenotypie, a raczej mogą reprezentować efekt złożonych oddziaływań w obrębie angiogennych wielokomórkowych jednostek „guzotwórczych” lub „przerzutowych” (*angiogenic multicellular cancer stem units*), być może zawierających CSCs, ale z nimi nie tożsamy [32].

2. Oddziaływania nowotworów z układem naczyniowym

Zależność pomiędzy rozrostem złośliwym a stanem mikrokrążenia

Oddziaływania genetyczne stransformowanych populacji komórek nowotworowych z ich otoczeniem nigdzie nie są tak znamienne jak w przypadku układu naczyniowego. Obecność naczyń krwionośnych jest nieodłącznym elementem wzrostu nowotworowego, a komórki nowotworowe, tak jak tkanki normalne (choć w zmienionym stopniu i formie), są z wielu powodów całkowicie zależne od dostępu do mikrokrążenia [35]. Dostęp do czynników wzrostowych, anabolitów i tlenu jest niezbędny dla podtrzymania ich żywotności i zdolności do wzrostu, do czego również niezbędne jest odprowadzanie przez układ krążenia tkankowych produktów przemiany materii [35]. Z tych względów, lokalne zaburzenia w gęstości, czy funkcji na-

Mysi czarniak 16F1 - zjawisko *perivascular cuffing*

Ryc. 1. Zjawisko *vascular cuffing* w masie przeszczepu ludzkiego guza jelita grubego u myszy. Komórki nowotworowe zachowują żywotność jedynie w bezpośredniej bliskości kapilarnych naczyń krwionośnych. Klement i Rak – dane nieopublikowane

czyń krwionośnych wewnątrz mas nowotworowych, manifestują się często tworzeniem charakterystycznych pierścieni/mankietów okołonaczyniowych (tzw. *perivascular cuffing*). Zjawisko to polega na stopniowym, koncentrycznym zaniku funkcji w kolejnych warstwach komórek nowotworowych otaczających izolowane kapilary [35, 36]. Komórki najbliższe światłu takiego naczynia zachowują pełną żywotność i zdolność do proliferacji, podczas gdy następne ich warstwy wykazują zahamowanie cyklu komórkowego [36]. Gdy odległość dyfuzyjna przekracza 100-180 μm (7-10 warstw komórkowych), otoczka komórek nowotworowych (niezależnie od ich pierwotnej złośliwości i nagromadzenia genetycznych zmian) zaczyna objawiać cechy apoptotyczne. Na zewnątrz tych struktur znajdują się jedynie masy martwicze [35]. Jest to bodaj najbardziej sugestywny dowód na absolutną zależność komórek nowotworowych od układu naczyniowego [35, 37, 38] (Ryc. 1).

Zależność pomiędzy procesami wzrostu i przerzutowania nowotworów, a układem naczyniowym jest wielowymiarowa i nie ogranicza się do perfuzji tkanek. Istnieją zatem dowody na niezależne od krążenia krwi oddziaływanie komórek śródbłonna naczyniowego na sąsiadujące z nimi komórki nowotworowe [39]. Oddziaływania te mogą mieć charakter parakryny [39-41], enzymatyczny [42] albo związany z formowaniem się macierzy międzykomórkowej (ECM) [43]. Ich rola może polegać na stymulacji mitogenezy, migracji czy inwazyjności komórek nowotworowych pod wpływem śródbłonkowych czynników wzrostowych [41-43] albo przeciwnie, na hamowaniu tych procesów, często w sposób zależny od stanu genetycznej złośliwości nowotworu [39].

Mechanizmy angiogenezy i limfangiogenezy

Uważa się, że każdy przyrost masy nowotworowej musi być skoordynowany z odpowiadającą mu ekspansją nowotworowego łożyska naczyniowego [35, 44]. Również procesy inwazji tkankowej [42], a w jeszcze większym

stopniu przerzutowania [14, 16], zależą w sposób oczywisty i bezpośredni od obecności gęstej sieci naczyń krwionośnych i limfatycznych, np. jako dróg „ucieczki” komórek z ogniska pierwotnego [35, 45-47]. Z tych względów celowe wydaje się choćby skrótowe omówienie głównych mechanizmów, które doprowadzają do powstania „prywatnej” sieci naczyniowej w nowotworach.

Komórki nowotworowe, jak również w pewnym stopniu otaczające je komórki tkanki łącznej gospodarza (stroma), komórki zapalne i płytki krwi są nośnikami czynników stymulujących lub hamujących wzrost naczyniowy (*angiogenesis stimulators and inhibitors*). Choć wczesne etapy nowotworzenia, czy powstawania tzw. „drzemiących” mikroprzerzutów (*dormant metastases*), mogą odbywać się w sposób niewymagający zmian naczyniowych, uważa się, że zapoczątkowanie makroskopowej ekspansji guzów niemal zawsze zależy od wzrostu nowych naczyń. Aby mogło to nastąpić, muszą powstać warunki stymulujące wzrost śródbłonna naczyniowego, która to zmiana określana bywa jako „przełącznik angiogeny” (*angiogenic switch*) [35]. W sensie czysto operacyjnym zmiana ta polega na takim globalnym zaburzeniu w ekspresji czynników hamujących i stymulujących system naczyniowy (czyli powstaniu stanu określanego jako – *angiogenic imbalance*), ażeby przewagę uzyskały czynniki stymulujące angiogenezę. Wymaga to bezwzględnego wzrostu ich ekspresji i/lub obniżenia poziomu naturalnych inhibitorów angiogenezy [48, 49]. Wśród licznych opisanych przykładów takich inhibitorów najczęściej wymieniane są: trombospondyny 1 i 2 (TSP-1, TSP-2), czynnik płytkowy 4 (PF4), czynnik komórek pigmentowych (PEDF), endostatyna i wiele innych [35, 50, 51]. Równie licznie opisane są stymulatory angiogenezy, do których zalicza się niektóre peptydowe czynniki wzrostowe (VEGF, bFGF, HGF, PDGF-BB), niektóre fosfolipidy (np. fosforan sfingozyny), niektóre białka wielkocząsteczkowe (np. fibryna/włóknik) i szereg innych mediatorów, których poziom w nowotworach może ulegać znacznemu podwyższeniu [35].

Chociaż właściwości angiogenne mogą stanowić tylko jedną z wielu funkcji biologicznych przypisywanych

niektórym z wymienionych wyżej czynników, inne media-tory mają charakter względnie śródbłonkowo-swoisty i/lub są niezbędne dla wywołania określonej reakcji naczynio-wej. W tej grupie na uwagę zasługują trzy klasy czynników, a mianowicie: (i) czynniki z rodziny śródbłonkowego czyn-nika wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), (ii) angiopoetyny (*angiopoietins*) i (iii) efryny (*ephrins*) [52, 53]. Istnieje obecnie co najmniej sześć opisanych czyn-ników naczyniowych z rodziny VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, -E, PLGF), z których VEGF-A występuje w conajm-niej pięciu postaciach molekularnych (tzw. *splice variants*: 121, 145, 165, 189, 205) i zajmuje wyjątkową rolę w rozwo-ju układu naczyniowego oraz w procesach fizjologicznej i patologicznej angiogenezy [54, 55]. Procesy angiogenne zwykle wymagają oddziaływania pomiędzy VEGF-A, któ-ry określany jest często po prostu jako VEGF (lub VPF, od *vascular permeability factor*), z jego głównym recepto-rem na komórkach śródbłonka VEGFR-2/KDR/Flk-1 [55]. Prowadzi to do ekspresji angiopoetyny 2 (Ang-2), która blokuje oddziaływanie pomiędzy angiopoetyną 1 (Ang-1) a jej śródbłonkowym receptorem Tie-2/tek [56]. Ponieważ Ang-1 ma działanie stabilizujące naczy-nia krwionośne oraz stymuluje oddziaływania między śródbłonkiem i komórkami przydanki (perycytami, otaczającymi kanały śródbłonkowe), działanie kaskady VEGF/Ang-2 powoduje destabilizację ściany kapilarnej, utratę kontaktu między śródbłonkiem i perycytami, i zapoczątkowanie gwałtownego rozwoju naczyń [56]. Przy niedoborze lub wahaniach poziomu VEGF reakcje te mogą jednak doprowadzić również do regresji naczynio-wej, głównie wywołanej działaniem Ang-2 [56]. Zatem, oddziaływania pomiędzy VEGF, Ang-1 i Ang-2 w sposób dynamiczny regulują aktywność, żywotność i funkcje an-giogenne komórek śródbłonkowych [56]. Z kolei, dzia-łanie niektórych efryn (np. *ephrin B2*) na ich śródbłonko-we receptory (Eph B4), powoduje nie tyle wzrost naczy-niowy, ile jego jakościową determinację w kierunku powstawania kapilarnego fenotypu tętniczego lub żylnego [52, 57]. Znaczenie tych ostatnich oddziaływań dla an-giogenezy nowotworów pozostaje jak dotąd niejasne.

Choć reakcja naczyniowa, która towarzyszy nowo-tworom określana jest zwykle zbiorczym mianem angioge-nezy (*angiogenesis*), to procesu tego nie należy uważać za jednorodny. Przeciwnie, na formowanie naczyń krwionośnych składają się liczne, bardzo zróżnicowane i nie do końca poznane mechanizmy komórkowe [52]. Najlepiej opisanym zjawiskiem jest tzw. „pączkowanie” (*sprouting angiogenesis*), które polega na formowaniu się kolumn („pączków”) komórek śródbłonkowych (*endothelial spro-uts*), których wydłużanie odbywa się w kierunku źródła stymulacji (np. guzka nowotworowego), i ostatecznie pro-wadzi do powstawania zamkniętych pętli i sieci kapilar-nych [52]. Zachodzi to w szeregu etapów, poczynając od opisanego powyżej rozluźnienia się kontaktów śródbłon-ka z wspierającą go warstwą kapilarnych perycytów, degra-dacji błony podstawnej (*basement membrane* – BM) i po-większenia się średnicy naczynia, czyli uformowania się tzw. „naczynia matki” (*mother vessel*) [52, 58]. Z tej struk-tury wysuwają się następnie tzw. komórki końcówkowe

(*tip cells*), których wypustki (filopodia) mają zdolność do rozpoznawania gradientu czynników angiogennych (np. VEGF) i za którymi posuwają się szeregi komórek pącz-ków naczyniowych. Wydłużanie się tych formacji komór-kowych zależy od skoordynowanych procesów migracji i mitogenezy [59]. „Naczynia matki” mogą również dzielić się na mniejsze odnogi w sposób bardziej bezpośredni, np. w wyniku nacisku tkanek pozanaczyniowych (*intusus-ception*) lub poprzez powstawanie wewnątrznaczyniowy-ch, śródbłonkowych przegród (*splitting angiogenesis*) [52]. Tworzenie się nowotworowego mikrokrążenia może rów-nież zachodzić z udziałem krążących prekursorowych ko-mórek śródbłonka (*endothelial progenitor cells* – EPCs), wywodzących się głównie ze szpiku kostnego. Komórki te mogą wbudowywać się w powstające struktury naczy-niowe w procesie określanym jako vaskulogeneza (*vascu-logenesis*) [52, 60, 61].

Obok procesów, w których aktywną rolę odgrywają komórki śródbłonka lub ich prekursory, naczynia/kanały krwionośne mogą również powstawać z bardziej aktyw-nym udziałem komórek nowotworowych, a mianowicie poprzez koopcje istniejących naczyń danego narządu (*va-scular cooption*), lub w procesie tzw. „naczyniowej mimi-kry” (*vasculogenic mimicry*) [62-64]. W pierwszym przy-padku, opisanym głównie w kontekście zmienionej no-wotworowo tkanki glejowej (glioblastoma), właściwa angiogeneza może być poprzedzona okresem wzrostu „cylindrów” komórek nowotworowych wzdłuż/wokół ist-niejących naczyń mózgowych [62]. Radykalnie odmienny jest proces „naczyniowej mimikry”, w przebiegu które-go komórki czerniaka i niektórych innych nowotworów mogą nabywać cech fenotypowych i morfologicznych śród-błonka, oraz tworzyć kanały krwionośne połączone z wła-ściwym krwiobiegiem [63].

W ciągu ostatnich kilku lat okazało się, że wbrew hi-storycznym opisom, nowotwory posiadają bogatą (choć nie w pełni funkcjonalną) sieć naczyń chłonnych, których wzrost stymulowany jest przez oddziaływanie pomiędzy czynnikami VEGF-C lub VEGF-D, a ich wspólnym re-ceptorem VEGFR-3/Flt-4, który jest obecny na komór-kach śródbłonka limfatycznego [45, 47]. Uważa się, że choć unaczynienie to (jak również ekspresja VEGF-C/D) jest ważnym elementem w przerzutowaniu do węzłów chłonnych [45], krążenie limfatyczne w masach nowotwo-rowych jest w zasadzie niewydolne. Stąd też pochodzi znaczny wzrost ciśnienia płynu śródtkankowego w wielu typach guzów złośliwych [47].

Wpływ nowotworzenia na układ krzepnięcia

Analiza oddziaływań nowotworów z układem naczynio-wym nie byłaby kompletna bez krótkiego choćby opisu zaburzeń powstających w systemie krzepnięcia krwi i fibry-nolizy u pacjentów onkologicznych [65, 66]. Zmiany takie są dość powszechne i wynikają z wielu powodów, takich jak: (i) „nieszczelność” nowopowstałych i pozostających w stanie ciągłej „przebudowy” (*remodeling*) naczyń kapi-larnych zaopatrujących masy nowotworowe, (ii) obecność

komórek nowotworowych w ścianach (np. w wyniku wyżej wspomnianej inwazji, koopcji czy mimikry naczyniowej) lub świetle naczyń (np. w wypadku komórek przerzutowych), (iii) jatrogenne wpływy dożylnego podawania leków przeciwnowotworowych u ciężko chorych pacjentów, (iv) unieruchomienie chorych w warunkach szpitalnych i staza naczyniowa, jak również kombinacja tych i innych czynników [65]. W tym świetle, nietrudno sobie wyobrazić, że sama strukturalna nieciągłość naczyń nowotworowych powoduje, że przeciwkrzepliwa bariera śródbłonkowa może przestać spełniać swoje funkcje [66]. Ponadto, pod wpływem wydzielania VEGF przez masy nowotworowe, komórki śródbłonka mogą nabywać właściwości prokoagulacyjne, np. w wyniku ekspresji czynnika tkankowego (*tissue factor* – TF) na ich powierzchni. Czynnikiem ten występuje również na powierzchni komórek nowotworowych, które, jak wcześniej wspomniano, często pozostają w kontakcie z białkami surowicy krwi [67, 68]. Tak dochodzi do oddziaływania pomiędzy TF a jego naturalnym ligandem, obecnym w krążącej krwi, czynnikiem krzepnięcia VII (FVII), to zaś prowokuje aktywację tego zymogenu do FVIIa [68]. Katalityczne właściwości FVIIa powodują aktywację innych czynników krzepnięcia, a mianowicie konwersję FX do FXa, z następową produkcją małej ilości trombiny (FIIa) [69]. FIIa odgrywa centralną rolę w procesie krzepnięcia, która przejawia się w aktywacji płytek krwi i białek koagulacyjnych, np. FVIII i FV, eksplozji aktywności samej trombiny oraz w katalitycznej zamianie fibrynogenu w nierozpuszczalne złogi fibrynowe. Konsekwencją tych reakcji jest powstanie śród- i okołonaczyniowych skrzepów, zarówno wewnątrz i poza obrębem mas nowotworowych [67, 69].

W związku z ekspresją TF przez komórki nowotworowe, śródbłonek i komórki odczynu zapalnego w towarzystwie innych licznych zmian, aktywacja układu krzepnięcia u pacjentów onkologicznych ma niejednokrotnie charakter chroniczny i uogólniony [65, 67, 68]. Objawia się to między innymi w szeregu zmian laboratoryjnych. Należą do nich: krążące kompleksy trombiny z antytrombiną (TAT), obecność fragmentów protrombiny (PT1+2), zaburzenia w liczbie płytek krwi, krążące dimery D fibrynogenu, i inne anomalie. Ponadto, pacjenci z nowotworami narażeni są na zwiększoną zapadalność na zakrzepice żył głębokich (DVT), zespół rozsianego krzepnięcia śródnaczyniowego (DIC) o różnym stopniu nasilenia, krwawienia, oraz inne, niejednokrotnie groźne powikłania (koagulopatie). Określa się je często jako zespół Trousseau lub koagulopatia nowotworowa (*cancer coagulopathy*) od nazwiska autora pierwszego opisu tych zmian w 1865 roku [65, 67, 68].

Należy zauważyć, że wielu elementom układu krzepnięcia przypisuje się nie tylko istotną rolę w „uszczelnianiu” naczyń krwionośnych (czyli tzw. hemostazie), ale również w stymulowaniu (lub modulowaniu) angiogenezy, wzrostu nowotworowego i przerzutowania [65, 67, 68, 70]. Dotyczy to w szczególności TF, trombiny, fibryny, płytek i wielu innych elementów, które mogą oddziaływać z elementami sygnalizacji komórkowej [68, 70-72]. Ponadto, elementy układu hemostazy uważa się za regu-

latory procesów angiogennych na poziomie ogólnoustrojowym/systemowym, co może mieć wpływ na losy utajonych mikroprzerzutów w początkowych stadiach rozsiewu nowotworowego. Dzieje się tak dlatego, że w ognisku pierwotnym może dochodzić do produkcji i wydzielania do krwiobiegu zmodyfikowanych enzymatycznie białek układu hemostazy, które nabywają w ten sposób właściwości czynników antyangiogennych [35, 68, 70-72]. Czynniki te mogą hamować przynajmniej przejściowo wzrost naczyń i nowotworowy w guzkach przerzutowych znajdujących się w odległych narządach [35]. Wśród krążących czynników antyangiogennych o takich właściwościach wymienienia się najczęściej: angiostatynę (fragment plasminogenu), fragment antytrombiny (aaAT), płytkowy czynnik 4 (PF4) i kininostatynę, prawdopodobnie istnieje jednak wiele innych [35, 68, 70-72].

Jak ilustrują powyższe przykłady, pomimo że, opisy zjawisk naczyniowych w nowotworach stają się coraz bardziej precyzyjne, towarzyszące im związki przyczynowe są znacznie słabiej poznane. Ten ważny aspekt będzie tematem następnego rozdziału.

3. Transformujące zmiany genetyczne a układ naczyniowy nowotworów

Przedmiotem naszych szczególnych zainteresowań badawczych w ciągu ostatnich lat było poznanie wzajemnych zależności pomiędzy trzema, niejako równoległymi zachodzącymi (ale badanymi oddzielnie) procesami: (i) progresji klinicznej i genetycznej nowotworów, (ii) angiogenezy i przemian w układzie naczyniowym, (iii) aktywacji układu krzepnięcia w czasie wzrostu inwazyjnego i przerzutowania [37, 39, 40, 73-90]. W tym względzie szczególne znaczenie wydaje się mieć pytanie o rolę genów transformujących w indukowaniu zmian naczyniowych towarzyszących procesom nowotworzenia.

Geneza fenotypu angiogennego w rozwoju nowotworów

Co stanowi przyczynę zmiany w ekspresji czynników pro- i antyangiogennych w przebiegu choroby nowotworowej? Odpowiedź na to pozornie proste pytanie uległa w ciągu ostatnich 10-20 lat diametralnej rewizji. Do roku 1989 uważano, że przyczyna tych zmian ma naturę mikrośrodowiskową. Procesy zapalne, czynniki wzrostowe czy niedotlenienie (*hypoxia*) wzrastających mas nowotworowych miały powodować niejako „reaktywną” zmianę w ekspresji genów kodujących czynniki angiogenne, nie tylko w komórkach nowotworowych, ale również w otaczających je komórkach zrębu [91-95]. Wyjaśnienie takie stało się szczególnie atrakcyjne, kiedy okazało się, że VEGF-A, jeden z najbardziej znaczących stymulatorów angiogenezy, jest silnie indukowany w warunkach niedotlenienia. Odbywa się to z udziałem czynnika transkrypcyjnego znanego jako „czynnik 1 wywołany niedotlenieniem” (*hypoxia inducible factor 1 – HIF-1*), dla którego sekwencja promotorowa *VEGF* zawiera dobrze zdefiniowany rozpoznawczy element (zwany HRE) [95, 96]. Podobnie wy-

obrażano sobie również regulacje innych czynników angiogennych.

Fenotyp angiogeny a geny supresorowe

W roku 1989 grupa Noel Bouck z Uniwersytetu Northwestern, w Chicago opublikowała pierwsze doniesienie, które fundamentalnie zmieniło powyższy punkt widzenia [97]. W tej i wielu innych, późniejszych nieco pracach wykazano, że w różnych rodzajach komórek stansformowanych utrata genów supresorowych (a więc zmiany genetyczne, a nie mikrośrodowisko) powoduje powstanie permanentnego fenotypu proangiogenego, który charakteryzuje się obniżeniem ekspresji endogennego inhibitora angiogenezy TSP-1 [49, 97-100]. Jedną z bardziej eleganckich demonstracji tego zjawiska była oparta na analizie fibroblastów izolowanych od pacjentów z zespołem Li-Fraumeni (LFS). W rodzinach tych pacjentów jedna z kopii genu supresorowego *p53* jest w stanie ciągłej inaktywacji [12]. Spontaniczna utrata pozostałego allelu (*loss of heterozygosity* – LOH) *p53* w komórkach somatycznych powoduje, że członkowie rodzin obarczonych LFS zapadają na mnogie nowotwory tkanek miękkich, kości, mózgu, piersi i białaczki [12]. Proces ten został niejako odtworzony w hodowlach fibroblastów pochodzących od osobników z LFS, w tym sensie, że w pewnej części tych komórek również obserwowano spontaniczną utratę *p53 in vitro* [99]. Zauważono przy tym, że utrata *p53* jest ściśle sprzężona z dramatycznym obniżeniem się poziomu ekspresji TSP-1 i nabyciem właściwości angiogennych przez te komórki [99]. Jakkolwiek fascynujące i przełomowe, wyniki te nastrożyły pewnych trudności interpretacyjnych w przypadku niektórych nowotworów ludzkich. Tak na przykład, w przypadku raka jelita grubego (CRC), LOH w obrębie genu *p53* występuje często, ale głównie w późnych fazach progresji choroby, prawdopodobnie wiele lat po indukcji fenotypu angiogenego [101]. Ponieważ w przebiegu CRC intensywne unaczynienie pojawia się w fazie gruczolaka (adenoma), można przypuszczać, że „przełącznik angiogeny” jest tu sprzężony z inną zmianą genetyczną, np. towarzyszącą gruczolakom ekspresją zmutowanego onkogenu *ras* [80]. Zaproponowaliśmy więc, że to ten gen, a nie utrata *p53* może być motorem reakcji angiogennej w CRC, oraz że onkogeny jako takie, mogą odgrywać rolę naczyniowych „przełączników” [80].

Onkogeny jako induktory właściwości angiogennych komórek nowotworowych

W roku 1995 bezpośrednia rola onkogenów w indukcji fenotypu angiogenego została po raz pierwszy udowodniona doświadczalnie [73]. W toku badań, które zapoczątkowaliśmy wiele lat wcześniej, zaobserwowaliśmy, że produkcja proangiogennych czynników, takich jak VEGF, jak również manifestacja właściwości angiogennych wobec komórek śródbłonna, są w przypadku licznych linii komórek nowotworowych zachowane w warunkach dostatecznego natlenienia (np. *in vitro*), i z reguły konstytu-

tywne, a więc jest niezależne od stanu niedotlenienia [80]. Ponadto, zauważyliśmy że wprowadzenie onkogenu *ras* do immortalizowanych, ale niezdolnych do nowotworzenia i wzbudzania angiogenezy komórek nabłonka jelitowego (IEC-18), powoduje radykalną zmianę ich właściwości [73, 102, 103]. Komórki takie nie tylko ulegały wcześniej opisanym, charakterystycznym zmianom morfologicznym, ale również stawały się tumorogenne *in vivo*, która to właściwość byłaby nie do pomyślenia bez jakiegś formy indukcji wzrostu naczyniowego [73]. Istotnie, medium inkubowane z komórkami IEC-18/*ras* nabywało zdolności do stymulowania mitogenezy i podtrzymywania żywotności komórek śródbłonna (HUVEC). Właściwości te zanikały w obecności przeciwciał blokujących VEGF [73]. Co więcej, produkcja mRNA, białka i aktywności biologicznej VEGF w szeregu linii komórkowych, pozostawała w ściślejszej zależności od konstytutywnej lub indukowalnej ekspresji onkogenu *ras* [73]. Obserwacje te po raz pierwszy udokumentowały zależność produkcji tego czynnika od transformacji onkogennej.

Interesujące okazało się również i to, że nasze rezultaty niejako wyjaśniały uprzednio obserwowany związek pomiędzy częstotliwością mutacji genu *ras* w CRC, a histologiczną formą wzrostu nowotworowego. Skłonność guzów do wzrostu w formie trójwymiarowej (polipowatej/egzofitycznej) była związana ze szczególnie wysoką częstotliwością mutacji genu *ras*, podczas gdy w nowotworach rosnących w sposób powierzchniowy mutacje te zachodziły znacznie (2-3 krotnie) rzadziej [104]. Tendencje te można by interpretować jako przejaw zwiększonego zapotrzebowania na wzrost nowych naczyń krwionośnych w guzach polipowatych, a to z powodu towarzyszącej im zwiększonej odległości pomiędzy masami nowotworowymi i naczyniami ściany jelitowej. Ekspresja zmutowanego genu *ras*, a przez to zwiększone wydzielanie VEGF, umożliwiłyby bardziej intensywny wzrost naczyniowy i być może również przyczyniłyby się do trójwymiarowego wzrostu guza [80].

Jakkolwiek obserwacje te wskazywały na znaczący (jeśli nie dominujący) udział onkogenu *ras* (oraz prawdopodobnie innych onkogenów) w regulacji fenotypu angiogenego stansformowanych komórek jelitowych [102], natrafiliśmy na dwa istotne problemy interpretacyjne. Po pierwsze, użyty w naszych badaniach gen *H-ras* jest nieczęsto obiektem transformujących mutacji w ludzkich nowotworach jelita (kontekst odpowiadający pochodzeniu komórek IEC-18). W guzach tych aktywacji ulega najczęściej funkcjonalnie i strukturalnie podobny, ale nie identyczny gen *K-ras* [11]. Po drugie, ekspresja wielu kopii genu *ras* w stansfekowanych komórkach IEC-18/*ras* nie w pełni odpowiada mechanizmowi aktywacji tych genów w ludzkich nowotworach (CRC i innych), gdzie źródłem progresji są zwykle heterozygotyczne mutacje punktowe *K-ras*, najczęściej w obrębie krytycznych kodonów 12, 13 lub 61 [11]. Ażeby rozwiązać te trudności, rozpoczęliśmy współpracę z grupą prof. Takehiko Sasazuki, w której dr Senji Sirasawa właśnie pracował nad rolą *K-ras* w determinacji właściwości komórek DLD-1 i HCT116, pochodzących z zaawansowanego CRC. Linie te charakteryzują się

istnieniem pojedynczych, spontanicznych mutacji genu *K-ras* [105]. W przełomowych badaniach udało się wykazać naszym japońskim współpracownikom, że genetyczna inaktywacja (technika *homologous recombination*) zmutowanego (ale nie naturalnego) allelu *K-ras*, w każdej z testowanych linii komórkowych CRC, prowadzi to utraty lub znacznego zredukowania ich cech nowotworowych (np. zdolności do formowania kolonii w półpłynnym agarze lub do wzrostu w postaci guzów u myszy). Działo się tak, pomimo że inaktywacja zmutowanego genu *K-ras* w tak powstałych wariantach komórkowych (np. Dks-8, Hkh-2), nie naruszyła przecież całej gamy błędów genetycznych, które komórki macierzyste (DLD-1 i HCT116) nabyły w trakcie ich naturalnej progresji [105]. Należy tu wspomnieć, że niektóre z takich pozostawionych błędów dotyczą ekspresji genów o silnych właściwościach transformujących takich jak: *APC*, *MSH2*, *p53* (linii DLD-1) i inne [105]. Wyniki te były niezwykle ważne (i w owym czasie kontrowersyjne), ponieważ prowadziły do wniosku, że mutacje onkogenne nabyte na początku procesu nowotworowego, nie są zastępowane przez późniejsze błędy genetyczne, a przeciwnie, zachowują swoją krytyczną rolę w „podtrzymywaniu procesu nowotworzenia” (*tumor maintenance*) [105-107]. Zadaliliśmy więc pytanie, czy utrata zdolności do wzrostu nowotworowego towarzysząca inaktywacji zmutowanego allelu *K-ras* może, choć po części, wynikać z utraty fenotypu angiogenne zależnego od tego onkogeny? Okazało się, że istotnie, obecność onkogeny *K-ras* jest niezbędna do manifestacji właściwości angiogenne przez komórki DLD-1 i HCT116, co przejawia się w tym, że wydzielanie VEGF [73] oraz ekspresja TF [89] (Ryc. 2) są znacznie obniżone w wariantach komórkowych, gdzie *K-ras* został inaktywowany (Dks-8 i Hkh-2). Wyniki te wskazują, że onkogeny *ras* odgrywa zasadniczą rolę w regulacji angiogenezy nowotworowej w wielu typach komórek [80]. Podobne wnioski zostały opublikowane niemal jednocześnie przez grupę Dietera Marme [108] i potwierdzone w późniejszych pracach z innych laboratoriów. Z czasem badania te doprowadziły do identyfikacji ponad 20 różnych onkogenów zdolnych do stymulacji procesów angiogenne [80] (Tab. I).

Działanie onkogenów na fenotyp angiogeny nie jest ograniczone do regulacji ekspresji VEGF. Badania wielu grup ustaliły, że również ekspresja TSP-1 jest zmieniona (obniżona) w komórkach stransformowanych onkogenami *ras*, *src*, *HER-2* czy *myc* [49, 79, 80, 87, 109, 110]. Onkogeny mogą mieć wpływ na liczne efekторы angiogenezy (często jednocześnie), włączając w to: PEDF [87], TIMP [111], bFGF [112], Ang-1 [87], IL-8 [113] i szereg innych [64]. W niektórych przypadkach mechanizmy zaangażowane w te zmiany zostały częściowo poznane. Na przykład regulacja VEGF przez zmutowany *ras* jest zależna od aktywacji MAPK w fibroblastach, podczas gdy komórki epitelialne wykorzystują do tego celu głównie szlak zależny od kinazy fosfoinozytolu (PI3K) [79]. Inne prace wskazują na udział HIF-1, Rho, rodników tlenowych (ROI), PKCz lub Raf w tych procesach [64]. Podobnie mechanizmy supresji TSP-1 w komórkach stransformowanych działaniem onkogenne *ras* były ostatnio analizowane

Tab. I. Onkogeny o działaniu angiogenym
(Rak i wsp. 2003)

H-ras	ODC
K-ras	V-P3k
V-src	PTTG1
C-myb	E2A-Pbx1
N-myc	V-Abl
C-myc	Bcr-Abl
HER-2/neu	V-sis
EGFR	PML-RARa
Bcl-2	RhoC
PyMT	HHV8
C-fos	NOX1
trkB	EIF-4E
	MDM2
	HPV16

w szczegółach, wskazując na udział szlaku złożonego z takich elementów jak: PI3K, Rho, ROCK oraz *myc* [110]. Nasze własne badania wskazują jednak, że w procesie tym bierze również udział represor transkrypcyjny Id1 (Kałas i Rak 2005 – niepublikowane wyniki), a w niektórych przypadkach receptor dla nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) (Kałas i Rak 2005 – niepublikowane wyniki) oraz nieznanne mediatory wrażliwe na leki z grupy tetracyklin [114]. Ta ostatnia obserwacja jest interesująca, gdyż wskazuje na niewykorzystany potencjał niektórych powszechnie używanych leków jako inhibitorów angiogenezy nowotworowej [83].

Leki antyonkogenne jako inhibitory angiogenezy

Jedną z istotnych implikacji wynikających z ustalenia roli białek onkogenne w regulacji angiogenezy nowotworów jest możliwość użycia leków skierowanych przeciwko tym białkom (tzw. *targeted agents*) jako nowotworowo-swoiste, pośrednie inhibitory angiogenezy [73]. Prace prowadzone od wczesnych lat dziewięćdziesiątych wykazały, że w odróżnieniu od klasycznych leków cytotoksycznych, działanie leków antyonkogenne jest niejednokrotnie bardziej dramatyczne *in vivo* niż *in vitro*, co może świadczyć o ich wpływie na nowotwór za pośrednictwem czynników gospodarza, np. poprzez zaburzenia w tworzeniu naczyń [80]. Pierwsze dowody, że zastosowanie inhibitorów Ras może mieć działanie antyangiogenne zostały uzyskane w toku naszych badań nad tzw. inhibitorami farnesyltransferazy (FTIs) [73]. Preparaty te uznawane były za inhibitory Ras, ponieważ białko to wymaga posttranslacyjnej modyfikacji w celu zapewnienia mu lokalizacji w błonie komórkowej, gdzie może być aktywne [115]. Modyfikacja ta była początkowo utożsamiana z przyłączeniem reszty metabolitu cholesterolu, znanego pod nazwą pirofosforanu farnesylowego (FPP), do struktury zwanej *CAAX box*, zlokalizowanej w obrębie karboksylowego końca łańcucha białkowego Ras [115]. Uważano

wówczas, że hamowanie tej reakcji przez FTI powinno, w sposób całkowicie swoisty zahamować transformację wywołaną ekspresją tego onkogenu [115]. Istotnie, traktowanie komórek IEC-18/ras preparatem L-739,749 (FTI syntetyzowany przez Merck Inc.) spowodowało znaczne obniżenie produkcji VEGF przez te komórki [73]. Tego typu efekty okazały się być wspólne dla wielu preparatów z grupy FTI oraz podobnie działających leków przeciwolesterolowych z grupy statyn [115, 116]. Okazało się jednak, że preparaty te hamują farnesylicację nie tylko Ras, ale również wielu innych białek komórkowych o różnych funkcjach. Co więcej, FTI nie wywoływały zamierzonego efektu w komórkach, w których *K-ras*, a nie *H-ras* stanowił podstawę onkogenezy [115]. Ta ostatnia okoliczność wynika z faktu, że modyfikacja *K-ras* może być oparta na działaniu innego enzymu (GGT-azy), który nie jest wrażliwy na FTIs [115]. Jest więc zrozumiałe, że choć badania nad tymi preparatami trwają, i choć mają one udokumentowane właściwości antyangiogenne, nie udało się ustalić korelacji między ich aktywnością przeciwnowotworową a ekspresją onkogenów Ras, co ostatecznie utrudniło określenie właściwych wskazań terapeutycznych [115].

Znacznie bardziej klarowne działanie antyangiogenne odnotowano w przypadku leków skierowanych przeciwko innemu onkogenom, np. EGFR (C225, Iressa, Tarceva), HER-2 (Herceptin), czy BCR-ABL (Gleevec) [64]. Dla przykładu, nasze badania nad inhibitorami białek HER-2 i EGFR [64] wykazały, że przeciwciała zdolne do blokowania tych onkogennych receptorów (np. C225 i 4D5 – prekursor leku Herceptin), istotnie hamują wydzielanie VEGF przez komórki wielu linii nowotworowych [76]. Podobnie Gleevec i niektóre inne preparaty z tej grupy zostały scharakteryzowane pod tym względem [64, 118-120]. Obecnie uważa się, że właściwości przeciwnowotworowe tych leków *in vivo*, są w znaczącej części wynikiem ich działania przeciwiangiogenne [64]. Warto zauważyć, że wiele związków i leków przeznaczonych do leczenia stanów pozornie nie związanych z procesem nowotworowym, może hamować właściwości angiogenne stransformowanych komórek. U podstaw tych ubocznych działań może być blokowanie szlaków sygnalizacji komórkowej, które wykorzystywane są przez onkogeny (i inne mechanizmy regulatorowe komórki) do sterowania produkcją VEGF, TSP-1 i innych mediatorów angiogenezy [64, 83]. Do grupy tej można zaliczyć inhibitory MAPK, raf/kinaz (np. sorafinib/BAY-43-9006), antyoksydanty, inhibitory syntazy tlenu azotu, leki antyhormonalne, leki przeciwwzapalne (np. inhibitory COX-2) i wiele innych [64, 83].

Fenotyp angiogeny jako wynik oddziaływania pomiędzy środowiskiem wewnętrznym i zewnętrznym komórki nowotworowej

Silny wpływ onkogenów i defektywnych genów supresorowych na fenotyp angiogeny często wynika z faktu, że zmiany te naśladują i/lub nienaturalnie wzmacniają nor-

malne wpływy środowiskowe [64]. Na przykład, utrata genu supresorowego związanego z chorobą von Hippel-Lindau (VHL) – rodzinny zespół związany z powstawaniem raka nerki, naczynek i innych anomalii – prowadzi do nadprodukcji VEGF. Jest tak dlatego, że białko VHL jest w istocie zależną od tlenu ligazą ubikwitynową (*ubiquitine ligase*), której funkcja polega na nieustannej destrukcji podjednostki alfa czynnika HIF-1. Stąd też, w warunkach normalnych HIF-1 alfa (oraz HIF-1) posiada bardzo krótki okres półtrwania, który jest znacznie przedłużony w warunkach beztlenowych, kiedy to akcja VHL jest zablokowana. Ponieważ czynnik HIF-1 jest silnym stymulatorem VEGF, komórki z defektem VHL (niezdolne do degradacji HIF-1a) znajdują się w stanie niejako „urojonego” niedotlenienia, produkując nadmiar HIF-1 i VEGF [96, 121, 122]. W przypadku onkogenu *ras*, grupa kierowana przez Amato Giaccia wykazała, że nie tylko, jak wcześniej wspomniano, pod wpływem tego onkogenu dochodzi do konstytutywnego wzmocnienia produkcji VEGF, ale również komórki takie stają się nadwrażliwe na warunki hypoksyczne. Powoduje to karykaturalne spotęgowanie wydzielania VEGF przez te komórki hodowane w warunkach beztlenowych [123]. Nasze badania wykazały również, że stransformowane komórki IEC-18/ras (ale nie ich rodzicielskie komórki IEC-18) produkują zwiększoną ilość VEGF, kiedy dochodzi do ścisłych fizycznych oddziaływań (kontaktów) międzykomórkowych (np. w hodowli o wysokiej gęstości) [79]. Podobne wyniki uzyskaliśmy z liniami komórek IEC-18 poddawanymi spontanicznej transformacji, np. poprzez długotrwałe utrzymywanie ich w warunkach wywołujących anoikis (śmierć komórkową w zawiesinie). Tak uzyskane podlinie niewrażliwe na anoikis (AR1.10, AR2.10) również stawały się zdolne do nadprodukcji VEGF, zwłaszcza w hodowlach o podwyższonej gęstości lub jako trójwymiarowe formacje, tzw. sferoidy [78, 79]. Obserwacje te wydają się wskazywać na oddziaływania komórkowe jako źródło istotnych modyfikacji fenotypu angiogenne i prowadzi do postulowanego przez nas modelu, w którym nie tyle pojedyncze komórki stransformowane, ile ich wielokomórkowe ugrupowania (*multicellular angiogenic units* – omówione poniżej) byłyby źródłem sygnałów zdolnych do prowokowania wzrostu naczyń krwionośnych *in vivo* [80].

Koncepcja pola angiogenne w nowotworach

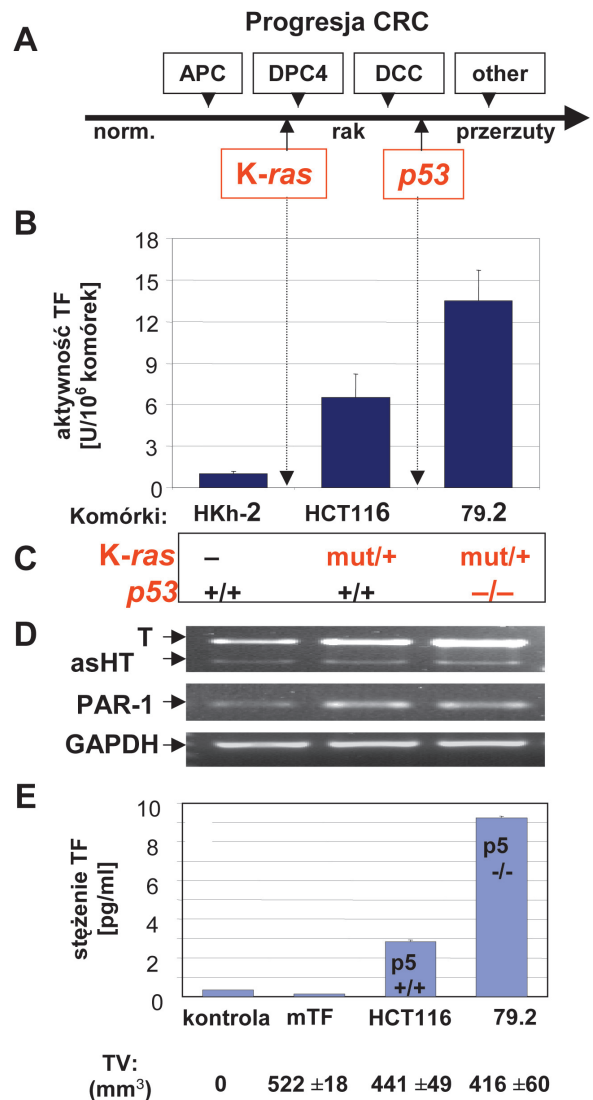
Onkogenne zmiany genetyczne w nowotworach uważane są za wynik stosunkowo rzadkich i przypadkowych mutacji zachodzących w pojedynczych komórkach [6, 101]. Przy tym założeniu, genetyczna indukcja angiogenezy byłaby jednak procesem raczej nieefektywnym. Byłoby tak na przykład, dlatego że obniżenie poziomu TSP-1 w pojedynczej komórce, w której doszło do mutacji *ras*, nie mogłoby spowodować wystarczającego spadku lokalnego stężenia tego inhibitora, ażeby doprowadzić do zniesienia jego efektu na sąsiadujące naczynia krwionośne. Należy pamiętać, że TSP-1 byłaby przecież ciągle produkowana

przez otaczające komórki, w których nie doszło do onkogennych mutacji [87]. Do przełamania tej bariery potrzebna byłaby akumulacja większej liczby komórek transformowanych (o obniżonej produkcji TSP-1) [80], czyli powstanie jednorodnej wielokomórkowej „jednostki angiogennej” – *homogeneous angiogenic unit*. Wymagałoby to, np. zlokalizowanego namnożenia się takich komórek w określonym miejscu tkanki nowotworowej. Alternatywnie, musiałaby zajść jakaś inna (nie koniecznie genetyczna) zmiana w ekspresji TSP-1 w otoczeniu komórki ze zmutowanym onkogenem *ras* [64], w wyniku której komórki zrębu obniżyłyby produkcję tego inhibitora do poziomu umożliwiającego reakcję naczyniową. Można to interpretować jako powstanie innego typu „jednostki angiogennej”, tym razem złożonej z mieszaniny komórek stransformowanych genem *ras* i ich niestransformowanych „sąsiadów” (*heterogenous angiogenic unit*). Nasze ostatnie badania, w których główną rolę odgrywał Dr Wojciech Kałas z IITD, doprowadziły do potwierdzenia tej ostatniej możliwości. Wykazaliśmy więc, że szereg linii komórkowych, w których doszło do ekspresji aktywowanego onkogenu *ras*, nabywa zdolności do wydzielania czynników o niskiej masie cząsteczkowej (>3 kDa), które mogą dyfundować do otoczenia i wywoływać obniżenie poziomu ekspresji TSP-1 w niestransformowanych komórkach fibroblastycznych [90]. Właściwość tę nazwaliśmy zależnym od *ras* „efektem pola angiogennej” (*angiogenic field effect*). Nawet stosunkowo nieliczne komórki nowotworowe, w których doszło do aktywacji onkogenów *ras* (lub innych), mogłyby modyfikować angiogenne właściwości swojego otoczenia i powodować rozlane zmiany mikrośrodowiskowe stymulujące wzrost naczyń [90].

Obniżenie ekspresji TSP-1 w komórkach stromalnych może być również wywołane w sposób niezależny od parakrynych efektów nowotworu. W tym względzie, nasze badania wykazały, że inkubowanie mysich fibroblastów w obecności płytek krwi (PLT), sfingozyny (Sph) lub lipopolisacharydu (LPS) może również powodować obniżenie produkcji TSP-1 [124]. Jak wcześniej wspomniano, mediatory stanów zapalnych i elementy układu krzepnięcia są często obecne w mikrośrodowisku nowotworowym i mogłyby brać udział w tworzeniu wielokomórkowych jednostek angiogennej [125]. Wypada tu zauważyć, że również aktywacja płytek krwi i układu krzepnięcia jest do pewnego stopnia funkcją genetycznej transformacji komórek nowotworowych (Ryc. 2 i tekst poniżej).

Genetyczne podłoże zespołu Trousseau

Opisane powyżej objawy koagulopatii nowotworowej, zwanej również zespołem Trousseau (*Trousseau syndrome*), były tradycyjnie przypisywane nieswoistym zaburzeniom naczyniowym wywołanym przez wzrost nowotworowy [68]. Podobnie traktowane były molekularne objawy koagulopatii, w postaci progresywnego zwiększania się ekspresji czynnika tkankowego TF na komórkach nowotworowych (np. w CRC, raku trzustki, płuca i białaczkach), złożeń włókniaka w tkankach guzów litych i w sze-



Ryc. 2. Ekspresja czynnika tkankowego (TF) i receptora trombiny (PAR1) jako funkcja genetycznej progresji nowotworów. W komórkach jelita grubego HCT116 poziom i aktywność TF, oraz ekspresja PAR-1 zwiększają się wraz z nabyciem mutacji onkogenu *K-ras* i utratą genu supresorowego *p53* (A-D). Ilość prokoagulacyjnych exosomów zawierających TF, które uwalniane są do krążenia myszy obciążonych nowotworami jest zależna od ekspresji *p53* przez komórki rakowe (E). Adaptacja danych z pracy opublikowanej przez Yu (Rak) i wsp. *Blood* 2005

regu innych zmian [68, 125-127]. Ponieważ zmiany te przebiegają w sposób niejako równoległy do klinicznej, a zwłaszcza genetycznej progresji nowotworów (np. w CRC), wysunęliśmy przypuszczenie, że regulacja TF i koagulopatii jako takiej, może być głębiej i bardziej bezpośrednio powiązana z ekspresją onkogenów i genów supresorowych [81]. Niedawno uzyskaliśmy pierwsze dowody doświadczalne na potwierdzenie tej hipotezy. Zablockowanie onkogennej aktywności EGFR w komórkach raka naskórka A431, np. przy pomocy przeciwciała C225 (obecnie znanego jako preparat Erbitux), spowodowało obniżenie transkrypcji TF [88]. Wynik ten sprowokował nas do porównania wcześniej opisanych komórek CRC zawierających zmutowany *K-ras* (linie: DLD-1 i HCT116), z ich izogenicznymi wariantami, w których onkogen ten

został inaktywowany genetycznie (linie: Dks-8, Hkh-2). Doświadczenia te (Ryc. 2) wykazały, że i tu ekspresja TF jest funkcją transformacji onkogennej (w tym wypadku ekspresji *K-ras*) [89].

Jak już zostało wspomniane, komórki Hkh-2, które wywodzą się z linii HCT116, ale są negatywne pod względem zmutowanego genu *K-ras* i wykazują niską ekspresję TF, mają również znacznie zredukowaną zdolność do wzrostu w postaci guzów nowotworowych u myszy SCID [73, 89]. Objawia się to wielomiesięcznym okresem latencji po inokulacji nawet stosunkowo wysokiej liczby tych komórek ($2-10 \times 10^6$) [89]. Zauważyliśmy, że w wielu przypadkach wzrost guza w końcu jednak następuje, a kinetyka jego wzrostu stopniowo osiąga tempo obserwowane w przypadku guzów wywodzących się z komórek HCT116 [89]. Linie komórkowe izolowane z tych „późnych” guzów oznaczyliśmy jako Hkh-2-TUM i poddaliśmy serii analiz. Zaskakujące było to, że w odróżnieniu od komórek Hkh-2, linie Hkh-2-TUM odznaczały się wysoką ekspresją TF, oraz zawierały zmutowany *K-ras* [89]. Okazało się, że w warunkach *in vivo*, w tych niestabilnych genetycznie komórkach nastąpiła nowa mutacja w obrębie jedyne go normalnego (wt) allelu genu *K-ras*, który pozostał nietknięty w czasie wcześniejszej eksperymentalnej rekombinacji [89]. Mutacja ta spowodowała rewersję komórek Hkh-2-TUM do fenotypu złośliwego, oraz reekspresję TF [89]. Wyniki te sugerują istnienie ściślej korelacji między obecnością zmutowanego *K-ras* i zdolnością do agresywnego wzrostu *in vivo* a wysoką ekspresją TF [89].

Regulacja TF w sposób zależny od onkogenu *K-ras*, oraz implikacje jakie miałyby to dla nowotworowej koagulopatii były nowymi i niezwykle interesującymi obserwacjami, które jednak intuicyjnie nie były trudne do zaakceptowania. Mniej oczywista była kwestia, czy – poza ewentualnym udziałem w koagulopatii – wzrost poziomu TF należy traktować jako epifenomen transformacji nowotworowej, czy też białko to odgrywa jakąś istotną rolę w procesie wzrostu guzów w CRC. Ażeby uzyskać odpowiedź na to pytanie, zastosowaliśmy metody określane zwykle jako *RNA silencing* (siRNA) dla uzyskania wariantów komórek HCT116 o głęboko obniżonej ekspresji TF, choć nadal pozytywnych pod względem zmutowanego *K-ras* [89]. W warunkach hodowli *in vitro* nie wywołało to żadnej zauważalnej zmiany w zachowaniu tych komórek. Natomiast *in vivo* okazało się, że komórki o obniżonej ekspresji TF miały znacznie upośledzoną zdolność do wzrostu jako guzy nowotworowe u myszy, nie były zdolne do efektywnego indukowania angiogenezy i (w odróżnieniu od komórek kontrolnych – HCT116) nie wykazywały charakterystycznego obniżenia poziomu TSP-1 i TSP-2 [89]. Można przypuszczać, że ta różnica we wpływie TF na zachowanie się komórek HCT116 *in vitro* i *in vivo*, związana jest z obecnością krążącego lub tkankowego ligandu (np. FVIIa). Czynniki te mogłyby aktywować zdolność TF do regulacji ekspresji genów istotnych dla procesów angiogennych (np. TSP-1/2) i wzrostu, ale tylko *in vivo* [89]. TF ma w tym kontekście nie tylko właściwości czynnika koagulacyjnego, ale również udział w mechanizmie efek-

torowym, za pomocą którego onkogenny *K-ras* kontroluje zdolność komórek CRC do wzrostu nowotworowego i oddziaływania z układem krzepnięcia i w indukcji angiogenezy [89].

Choć wyniki powyższe są pierwszym opisanym przykładem udziału TF jako mediatora efektów komórkowych onkogenów, nie jest to jednak całkowicie zaskakujące, zwłaszcza jeśli wziąć pod uwagę biochemiczne właściwości tego białka. Jak już wspomniano, TF jest monomerycznym białkiem błony komórkowej, o masie cząsteczkowej 47 kDa, i receptorem dla FVIIa. Jako taki, TF wydaje się stanowić krytyczny punkt w wymianie informacji pomiędzy systemem proteaz krążących w surowicy krwi i wnętrzem komórkowym [69, 128-132], włączając w to komórki nowotworowe o podwyższonej ekspresji TF [89]. W trakcie kontaktu z białkami krwi powstają na powierzchni komórek nowotworowych kompleksy TF/VIIa, co może prowadzić do fosforylacji reszt serynowych obecnych w obrębie krótkiego, karboksylowego końca TF skierowanego do wnętrza komórki [130]. Powoduje to przekazywanie sygnałów za pośrednictwem szlaku zależnego od fosfolipazy C i wapnia [130]. Ponadto, okołokomórkowa generacja aktywnych proteaz (Xa, thrombin/IIa) może spowodować zależne od TF/VIIa aktywowanie receptorów z klasy PAR (*protease activated receptors*), np. PAR-1 [132, 133]. Białka te, po związaniu własnego proteolitycznie zmodyfikowanego końca aminowego (np. przez enzymatyczne działanie FIIa, FXa lub TF/VIIa), aktywują sąsiadujące z nimi białka G, a tym samym szereg pochodnych szlaków sygnałowych. Wśród tych ostatnich znajdują się ważne modyfikatory fenotypu angiogenne, takie jak kaskady Rho/ROCK czy MEK/MAPK [133]. W tym świetle interesujące jest, że *K-ras* wydaje się nie tylko podnosić ekspresję TF, ale również ekspresję PAR-1 w komórkach CRC (Ryc. 2-D), a przez to wpływać na conajmniej dwa ważne ogniwa tego szlaku sygnalizacyjnego.

Kontynuując tę samą linię rozumowania, zadaliśmy sobie pytanie, czy dalsza progresja genetyczna komórek CRC, np. poprzez utratę ekspresji genu supresorowego *p53*, miałyby również wpływ na poziom TF na powierzchni komórki. Do ustalenia, czy tak jest w istocie, wykorzystaliśmy wariant komórek HCT116, w którym Bert Vogelstein i jego współpracownicy z Johns Hopkins University, genetycznie inaktywowali oba allele tego genu [134]. Zgodnie z naszymi przewidywaniami, komórki te (zwane linią 379.2) miały znacznie podwyższony poziom ekspresji i prokoagulacyjnej aktywności TF, nawet w porównaniu z linią HCT116 (Ryc. 2) [89]. Warto zauważyć, że komórki 379.2 reprezentują zaawansowane stadium progresji CRC (fazę głębokiej inwazji i rozsiewu) [101], mając zachowaną ekspresję zmutowanego onkogenu *K-ras*, przy całkowitej utracie supresora *p53*. Podwyższony poziom TF byłby tu wynikiem kombinacji tych dwu jak i innych współistniejących defektów genetycznych [89]. Istotnie, badania epidemiologiczne sugerują, że wzrost ekspresji TF oraz natężone objawy koagulopatii i angiogenezy towarzyszą nie tylko w fazie wzrostu CRC odpowiadającej aktywacji *K-ras* (gruczolak), ale również potęgują się w czasie dalszej progresji choroby, osiągając apogeum na

etapie przerzutowania [126, 127]. Należy przy tym wspomnieć, że ponad 90% pacjentów z rozсіяną chorobą nowotworową wykazuje zaburzenia w układzie krzepnięcia, co może mieć związek z często znacznie podwyższoną ekspresją TF [65].

Nasze badania wydają się sugerować, że skoro ekspresja TF jest pod kontrolą czynników genetycznych nowotworu, to również najbardziej uznana funkcja tego receptora, to jest indukcja koagulopatii, może mieć w nowotworach naturę genetyczną [81]. Powstaje jednak trudność pogodzenia tego poglądu z faktem, że koagulopatia nowotworowa jest zjawiskiem systemowym, podczas gdy TF indukowany przez efekty onkogenne byłby obecny lokalnie, tzn. na powierzchni komórek nowotworowych. Co więcej, objawy wędrującego zapalenia żył, lub zakrzepicy żył głębokich (VTE) kończyn występują w miejscach nie-raz bardzo odległych od pierwotnej zmiany nowotworowej [135]. Można naturalnie sugerować, że komórki nowotworowe mają kontakt z krążącymi białkami surowicy przenikającymi przez nieszczelne ściany naczyń krwionośnych, a potem ulegającymi systemowej dystrybucji. Podobnie, wtargnięcie komórek nowotworowych do krwiobiegu (w fazie tworzenia przerzutów) może prowokować ogólne zmiany krzepliwości, które tylko manifestują się w miejscach gdzie dochodzi do krążeniowej stazy (np. w żyłach kończyn dolnych) [68, 135]. Istnieje jednak alternatywne, czy też komplementarne, wyjaśnienie związku między ekspresją TF, a ogólnymi przejawami koagulopatii. Okazuje się, że TF może być uwalniany, np. z komórek odczynu zapalnego i krążyć we krwi w aktywnej rozpuszczalnej formie jako tzw. „alternatywny wariant” molekularny (asHTF) [136], albo jako standardowy wariant (TF) związany z błoną komórkowych egzosomów [137]. Nasze niedawno wykonane badania wykazały, że również komórki nowotworowe uwalniają znaczne ilości TF (głównie w formie egzosomów) i to w sposób odzwierciedlający stan ich progresji genetycznej [89, 138]. Analiza medium z hodowli komórek Hkh-2, HCT116 i 379.2, które odzwierciedlają trzy krytyczne fazy genetycznej progresji CRC (związane z mutacją *K-ras* i utratą *p53*), wykazuje stopniowo zwiększającą się ilość TF, w sekwencji: Hkh-2 < HCT116 < 379.2 [89]. Warto jest podkreślić, że ultrawirowanie tego materiału wykluczyło obecność istotnych ilości molekularnego TF (np. asHTF) i wykazało, że TF jest związany głównie z frakcją egzosomów [89]. Podobna zależność między obecnością rozpuszczalnego TF, a stanem genetycznym komórek CRC udało się ustalić w toku testowania surowicy myszy będących nosicielami guzów indukowanych komórkami HCT116 (*p53*+/+), lub 379.2 (*p53*-/-) [89]. Materiał pobrany od tych ostatnich miał znacznie wyższą zawartość ludzkiego TF (HCT116 < 379.2), przy czym guzy nowotworowe były niemal identycznej wielkości. Wykazuje to, że regulacja krążącego TF znajduje się pod kontrolą zmian onkogennych, podobnych do tych, które wpływają na komórkową pulę tego czynnika [89] (Ryc. 2-E).

Ekspresja TF, jego wydzielanie do krwiobiegu, stymulacja angiogenezy i koagulopatii nowotworowej zespołu Trousseau oraz inne zjawiska naczyniowe wydają

się być, w gruncie rzeczy, nie odpowiedzią (jak dotąd przypuszczano) na warunki mikrośrodowiska, a raczej wynikiem mutacji onkogenów i genów supresorowych [81, 88, 89]. W ciągu ostatniego roku pojawiły się conajmniej dwa doniesienia, które potwierdzają i rozszerzają ważność naszej hipotezy. Brat i współpracownicy wykazali, że utrata ekspresji genu supresorowego *PTEN*, zwłaszcza w warunkach hipoksji, powoduje pojawienie się wysokiego poziomu TF na powierzchni komórek nowotworów mózgu [139]. Inne, elegancko zaprojektowane badania przeprowadzone przez grupę Boccaccio wskazują, że wprowadzenie onkogeny *c-MET* do myszy i towarzyszące temu powstawanie mnogich ognisk nowotworowych, powoduje systemową koagulopatię i objawy DIC. Dzieje się tak głównie z powodu onkogennych zmian w ekspresji PAI-1 i COX-2 [140].

Naczyniowe konsekwencje stosowania leków blokujących białka onkogenne

Interesującą możliwością, która można wyprowadzić z powyższych obserwacji jest założenie, że skoro koagulopatia jest zależna od zmian onkogennych, to jej geneza i mechanizmy mogą w pewnym sensie być nowotworowo-swoiste (w odróżnieniu od innych form koagulopatii, np. w miażdżycy, posocznicy, zaburzeniach w ekspresji czynników krzepnięcia itp.) [89]. Co więcej, choć wydzielanie TF do krwi pacjentów onkologicznych nie jest szczególnie precyzyjnym wskaźnikiem natężenia koagulopatii modyfikowanej przez wiele czynników, może jednak służyć jako wskaźnik efektywności działania leków anty-onkogennych, które powinny redukować liczbę krążących egzosomów nowotworowych zawierających TF [88]. Podane, jak i inne aktywności leków skierowanych przeciw onkogenom mogłyby je kwalifikować jako nowotworowo-swoiste, pośrednio działające antykoagulanty [88]. Przykładem takiego działania tych leków są nasze doświadczenia z inhibitorami EGFR, które powodują zmniejszenie się ilości egzosomalnego TF w krążeniu myszy obciążonych ludzkim rakiem A431 ([88] oraz Yu, May & Rak – nieopublikowane obserwacje). Innym przykładem w tej samej kategorii jest przeciwkrzepliwe działanie niektórych retinoidów, takich jak np. *all-trans retinoic acid* – ATRA, który stosowany jest w ostrej białaczce promielocytarnej (APL). Lek ten blokuje funkcje onkogenne białka PML-RARa i powoduje jednocześnie zmniejszenie ekspresji TF w komórkach APL [141]. Oprócz powszechnie znanych efektów antyproliferacyjnych i proapoptotycznych, blokowanie funkcji onkogenów może również zaburzać oddziaływanie nowotworów z układem naczyniowym na wielu poziomach, np. poprzez efekty antyangiogenne czy przeciwkrzepliwe [64]. Jakkolwiek dalsza weryfikacja tej hipotezy jest przedmiotem zainteresowania i intensywnych badań obecnie prowadzonych w moim laboratorium, problematykę tą należy umieścić w szerszej perspektywie badań nad lekami o działaniu przeciwnaczyniowym, które zostaną po-krótce omówione poniżej.

4. Rola układu naczyniowego w patobiologii i leczeniu przeciwnowotworowym – fakty i kontrowersje

Koncepcje „przeciwnaczyniowych” terapii w leczeniu przeciwnowotworowym

Obecność naczyń krwionośnych w zmianach nowotworowych była dostrzeżona przez nielicznych badaczy i nie stała się skonsolidowaną koncepcją naukową, aż do roku 1971 [142]. Wówczas Folkman po raz pierwszy zaproponował, że ponieważ wzrost nowotworowy wydaje się być „zależny od angiogenezy” (*tumor growth is angiogenesis-dependent*), więc proces ten może stanowić cel bezpośredniej interwencji terapeutycznej w leczeniu przeciwnowotworowym [44]. Hipoteza ta, choć początkowo przyjęta ze sceptycyzmem, zapoczątkowała trzy dekady poszukiwań leków zdolnych do destrukcji nowotworowego łożyska naczyniowego, głównie w myśl dwojakiego rodzaju koncepcji. Leki antyangiogenne (*anti-angiogenics*) miały w sposób swoisty zahamować sam proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych w nowotworach, podczas gdy leki przeciwnaczyniowe (*antivascular therapeutics*) miałyby zniszczyć już uformowane naczynia, wykorzystując ich szczególne właściwości [35]. W miarę rozwoju tych koncepcji zaproponowano, że leki antyangiogenne (wówczas raczej hipotetycznie) miałyby posiadać szereg właściwości, które byłyby zasadniczo odmienne i terapeutycznie korzystne w porównaniu z klasycznymi (cytotoksycznymi) metodami leczenia nowotworów [64], a mianowicie: (i) leki antyangiogenne miałyby działać niezależnie od typu i lokalizacji nowotworu, zakładając podobieństwo we właściwościach komórek śródbłonna w różnych narządach; (ii) po podaniu systemowym, penetracja tych leków do komórek docelowych (*endothelium*) byłaby niezaburzona przez procesy dyfuzji tkankowej, które zwykle upośledzają działanie innych leków przeciwnowotworowych; (iii) efekt terapeutyczny byłby wysoce swoisty, ponieważ procesy angiogenezy są niezwykle rzadkie w dorosłym organizmie; (iv) efekt ten byłby spotęgowany faktem, że każda komórka śródbłonna daje oparcie wielu komórkom nowotworowym, a więc eliminacja nawet części tych pierwszych powinna mieć efekt katastrofalny dla żywotności tych ostatnich; (v) Kerbel zasugerował, że ponieważ komórki śródbłonna nie odznaczają się zmiennością genetyczną, nie powinny one nabywać lekooporności (*therapy resistant to resistance* [143]). Poza tymi teoretycznymi zaletami leczenia antyangiogennego, wykazano, że istotnie, naczynia krwionośne w nowotworach mają szczególne właściwości strukturalne i funkcjonalne. Naczynia te odznaczają się krętym przebiegiem (*tortuosity*), nierównym światłem, nienormalnym układem rozgałęzień (np. obecnością trójdzielnych rozgałęzień – *trifurcatio*), niepełnym pokryciem warstwą perycytów, wysokim indeksem mitotyczny komórek śródbłonna, stazą oraz wieloma innymi właściwościami o potencjalnej użyteczności dla zaplanowania specyficznego ataku terapeutycznego [35]. Co więcej, liczne różnice molekularne zostały również zidentyfikowane w obrębie śródbłonna naczyń nowotworowych.

Wysiłki te najpełniej charakteryzuje praca StCroix i współpracowników, którzy przy użyciu techniki SAGE (*sequential analysis of gene expression*) wykazali istnienie szeregu molekularnych osobliwości, charakterystycznych wyłącznie dla naczyń nowotworowych (*tumor endothelial markers – TEMs*) [144].

Pod wpływem tych prac, koncepcja antyangiogenezy, jako nowej metody leczenia nowotworów, uległa stopniowej akceptacji, a nawet popularyzacji w końcu lat 90-tych. Odzwierciedleniem tego może być fakt, że na początku roku 2004 ponad 20 różnych preparatów antyangiogennych znajdowało się na liście prób klinicznych sponsorowanych przez Narodowe Instytuty Zdrowia w USA (NIH; <http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table>). Dziesiątki, jeśli nie setki innych preparatów były jednocześnie testowane przez przemysł farmaceutyczny i w badaniach przedklinicznych [35, 85, 145]. Generalnie rzecz biorąc, preparaty te dzieli się na działające „bezpośrednio”, jeśli paraliżują one mechanizmy efektorowe komórek śródbłonna i „pośrednio”, jeśli ich celem jest neutralizacja czynnika angiogenego i blokada jego produkcji [145]. Użyteczność tego podziału nie jest jednak jasna, gdyż mechanizmy działania wielu tych leków nie są do końca poznane, często zawierają wiele komponentów lub też zależą od podawanej dawki [85]. Na przykład, jak wykazały pionierskie badania grupy Folkmana [146], potwierdzone później przez inne laboratoria [147, 148], niektóre leki cytotoksyczne (*cyclophosphamide – CTX*, *vinblastine – Vbl* i inne) podawane w znacznie zmniejszonych dawkach i w sposób ciągły (czyli jako tzw. terapia metronomiczna – *metronomic chemotherapy*), mogą wywierać efekty swoście przeciwsródbłonkowe [146, 147]. Leki te mogą jednak również wpływać na fenotyp angiogeny komórek nowotworowych [35]. Podobnie, niektóre inhibitory sygnałów komórkowych (np. FTIs) mogą obniżać ekspresję czynników angiogennych przez komórki nowotworowe (efekt pośredni), a jednocześnie hamować funkcje samego śródbłonna (efekt bezpośredni) [117].

Pomimo tych różnic, obecna klasyfikacja NIH grupuje leki antyangiogenne (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table>) według ich domniemanej biochemicznej aktywności, a mianowicie: (i) leki, które hamują degradację błon podstawowych śródbłonna (np. *suramin*); (ii) bezpośrednie inhibitory śródbłonna (2-metoksy estradiol, *thalidomid*, fosforan *combretastatyny A4* i inne); (iii) inhibitory czynników proangiogennych (np. *neovastat*, *bevacizumab* i inne); (iv) inhibitory angiogennych integryn (np. *EMD 121974*); (v) leki o wybiórczym mechanizmie działania (np. *Celecoxib*, *IL-12*). Lista ta powinna być uzupełniona o takie grupy jak: (v) preparaty endogennych czynników antyangiogennych (*endostatin*, *angiostatin*, *tumstatin*, *kininostatin* i inne); (vi) inhibitory receptorów kinazowych obecnych na komórkach śródbłonna, włączając w to tzw. *multikinase inhibitors* lub *dirty inhibitors* np. *SU6668*; (vii) inhibitory metaloproteaz (*merimastat*, *batimastat*, *pentosan polyphosphate*); (viii) pochodne *fumagiliny* (*TNP470*) i szereg innych preparatów. Choć wiele z tych preparatów jest obecnie ba-

danych poza obrębem NIH, ich użyteczność kliniczna nie została jeszcze ostatecznie ustalona [85]. Trzeba tu zaznaczyć, że pomimo niesłabnącego zainteresowania lekami antyangiogennymi, oczekiwania w stosunku do ich skuteczności klinicznej uległy ostatnio poważnemu zweryfikowaniu. Przykładem tego są wyniki uzyskane przy użyciu inhibitorów VEGF/VEGFR.

Leki antagonizujące VEGF jako przykład sukcesów i porażek terapii antyangiogennej

Historycznym momentem w rozwoju terapii antyangiogennych jest data 26 lutego 2004 roku, kiedy to preparat znany obecnie jako bevacuzimab (Avastin®, Genentech) został zatwierdzony w USA (przez Food and Drug Administration – FDA) jako lek pierwszego rzutu w terapii skojarzonej zaawansowanego raka jelita grubego [149]. Decyzja ta była wynikiem pomyślnego zakończenia szeregu kontrolowanych badań klinicznych, w których ostatniej fazie (III fazie) wykazano, że lek ten podawany w dawce 5 mg/kg, i w połączeniu z chemioterapią (ILF), przedłuża życie pacjentów z bardzo źle rokującym, przerzutowym CRC średnio o niemal 5 miesięcy, a niejednokrotnie o wiele dłużej [149]. Jest to pierwszy przypadek racjonalnie zaprojektowanego leku antyangiogennej w onkologii.

Bevacuzimab jest humanizowanym przeciwciałem, które blokuje działanie VEGF na komórki śródbłonna. W związku z tym, sukces tego preparatu można by interpretować jako uznanie VEGF za główny i obiecujący cel terapeutyczny oraz dowód, że ten czynnik angiogeny jest niezbędny dla rozwoju nowotworów [149-151]. Pogląd ten jest często wyrażany w kontekście badań przedklinicznych, w których różne inhibitory lub genetyczna inaktywacja genu *VEGF* niejednokrotnie powodowały dramatyczny blok w tworzeniu się naczyń krwionośnych. Tak na przykład, angiogeneza embrionalna jest całkowicie sparaliżowana nawet po usunięciu tylko jednego allele *VEGF*, a poważnie zaburzona brakiem niektórych izoform tego białka [149, 152-154]. Podobnie, angiogeneza nowotworowa była opisywana jako proces całkowicie zależny od produkcji VEGF przez komórki nowotworowe [150, 151]. Pomimo tych fascynujących obserwacji sytuacja nie wydaje się wcale tak oczywista. Tak na przykład, niedawne zaawansowane badanie kliniczne wykazało nieskuteczność preparatu bevacuzimab w leczeniu przerzutowych nowotworów piersi, nawet w wysokich dawkach, i w połączeniu z chemioterapią [149]. Również nasze własne badania przedkliniczne nad komórkami nowotworowymi o genotypie *VEGF*^{-/-} wykazały, że komórki te (zawierające onkogeny *ras* lub *HER-2*) zachowują zdolność do tworzenia gęsto unaczynionych guzów u myszy, pomimo braku ekspresji VEGF [87]. Co więcej, wzrostu tych eksperymentalnych guzów nie udało się zahamować w obecności bardzo aktywnych inhibitorów blokujących działanie stromalnego VEGF [87]. Przeciwciała DC101, które skutecznie blokuje VEGFR-2 [87], ani podobnie działające przeciwciała skierowane przeciwko VEGFR-1

(Rak – niepublikowane wyniki) nie były zdolne zablokować wzrostu i angiogenezy tych nowotworów. Te i inne obserwacje sugerują, że jakkolwiek niektóre typy nowotworów mogą poddawać się działaniu preparatu bevacuzimab, inne guzy wykazują brak takiej odpowiedzi, wydają się wzrastać w sposób niezależny od VEGF i manifestują cechy równoznaczne z *de facto* opornością na ten i inne leki antyangiogenne [74].

Mechanizmy oporności na leki antyangiogenne

W roku 1996 zaproponowaliśmy, że problem oporności na leki antyangiogenne (uznawany wówczas za nieistniejący) jest jednak wart rozważenia [74]. Rozumowanie nasze oparte było na dwu elementach. Po pierwsze, choć komórki śródbłonna, powinny być stabilne genetycznie i nie nabywać mutacji w kierunku lekooporności, można sobie wyobrazić wiele procesów epigenetycznych, które mogłyby zmniejszyć skalę uszkodzeń wywołanych przez leki antyangiogenne. Po drugie, choć bezpośrednim celem tego leczenia są naczynia krwionośne, ostatecznie antyangiogeneza skierowana jest jednak przeciwko komórkom nowotworowym, których zmienność mutacyjna i adaptacyjna może skompensować, przynajmniej częściowo, skutki interwencji terapeutycznej. Szereg niżej wspomnianych mechanizmów może doprowadzić do rozwoju oporności na inhibitory angiogenezy.

(i) Złożoność i zmienność fenotypu angiogennej w nowotworach złośliwych

Wcześniej wspomniana niewrażliwość ludzkiego raka piersi na bevacuzimab sugeruje, że w tej chorobie VEGF odgrywa stosunkowo niewielką rolę. Jest to zrozumiałe w świetle prac wykazujących, że ten czynnik angiogeny odgrywa dominującą rolę jedynie we wczesnych fazach złośliwej choroby piersi, po czym mogą go stopniowo „zastępować” inne stymulatory, których ilość i różnorodność ulega ciągłym i postępującym zmianom [155-156]. Blokowanie jednego z tych czynników (np. VEGF) stawałoby się coraz mniej skuteczne w miarę progresji choroby [74].

(ii) Koncepcja podaży i popytu w regulacji unaczynienia nowotworów

Zmiana ilości i kompozycji (podaży) czynników angiogennych i antyangiogennych w toku progresji nowotworowej jest, jak to zostało wcześniej wspomniane, funkcją zmian genetycznych w postaci ekspresji onkogenów i utraty genów supresorowych [80]. Okazuje się, że niektóre z tych genów, np. *ras* [39] lub *p53* [86, 157] mogą również wpływać na zapotrzebowanie (popyt) komórek nowotworowych na bezpośredni dostęp do naczyń krwionośnych [37, 158]. Wykazaliśmy na przykład, że komórki CRC, w których gen *p53* został całkowicie inaktywowany (linia 379.2), wykazują zwiększoną zdolność do wzrostu w regionach nowotworu oddalonych od naczyń krwionośnych [86]. W porównaniu z guzami złożonymi z komórek HCT116 (*p53*^{+/+}), guzy nowotworowe indukowane u myszy komórkami 379.2 (*p53*^{-/-}) wykazują też znacznie

zmniejszoną (choć nie zniesioną) wrażliwość na terapię antyangiogeną, złożoną z intensywnego dawkowania inhibitora VEGFR-2 (DC101) i metronomicznego podawania leku Vinblastin [86]. Co więcej, leczenie to zastosowane w przypadku guzów indukowanych mieszaniną komórek HCT116 i 379.2, prowadziło do dominacji tych ostatnich (pozbawionych *p53*) w ogólnej masie nowotworu [86]. Wyniki te można interpretować jako dowód *in vivo*, że obecność funkcjonalnego genu *p53* jest warunkiem fizjologicznego zahamowania wzrostu guza w warunkach upośledzonego ukrwienia. Utrata jego ekspresji natomiast, np. w późnych stadiach progresji CRC, może prowadzić do zwiększonej tolerancji komórkowej na niedotlenienie. Stan ten może wynikać z niefunkcjonalnej struktury naczyniowej guza lub być skutkiem terapii antyangiogennej [80, 86]. W „ekonomii naczyniowej” nowotworu, pod wpływem błędów genetycznych może pojawić się zwiększona ilość (podaż) czynników angiogennych i obfitość (defektywnych) struktur naczyniowych (*vascular supply*), czemu towarzyszyć może jednak zmniejszony popyt naczyniowy (*vascular demand*) samych komórek. Należy zauważyć, że jakkolwiek ten ostatni fenotyp dyktowany jest przez stan komórek nowotworowych, może on leżeć u podstaw oporności na leki antyangiogenne nominalnie skierowane przeciwko komórkom gospodarza [37, 86, 158].

Zwiększenie tolerancji na niedokrwienie może również towarzyszyć wielu innym zmianom genetycznym, włączając w to ekspresję onkogenów takich jak: *ras*, *src*, *EGFR* czy *HER-2* [37]. Prowadzi to do wniosku, że wyżej opisane leki hamujące funkcje białek transformujących (*targeted agents*), mogłyby również posiadać zdolność, choć częściowego, przywracania komórkom nowotworowym popytu naczyniowego. Jak sugerowaliśmy wcześniej, leki te mogłyby działać w sposób wysoce synergistyczny w połączeniu z inhibitorami angiogenezy [37]. Kombinacje takie znajdują się obecnie w zaawansowanej fazie badań klinicznych.

(iii) Heterogenność naczyniowa w nowotworach

Pod względem strukturalnym, molekularnym i wrażliwości na leki, naczynia krwionośne w nowotworach nie są strukturami homogennymi. Mogą więc istnieć różnice pomiędzy naczyniami w odrębnych łożyskach naczyniowych narządów, pomiędzy różnymi ogniskami tego samego nowotworu lub między podobnymi typami nowotworów u różnych osobników [64]. Niejednokrotnie, różnice mogą występować pomiędzy populacjami komórek śródbłonkowych i naczyń wewnątrz tego samego guza i ujawniać się przy zastosowaniu terapii antyangiogennej. W ten sposób, niektóre bardziej wrażliwe na lek naczynia mogą ulegać całkowitemu zanikowi, podczas gdy inne zmieniają się pod względem morfologicznym [159], ulegają rearanżacji pericytów [87, 159] lub pozostają względnie niezmienione, czyli wykazują cechy zbliżone do lekooporności [159]. Laboratorium kierowane przez Brendę Coomber wykazało ostatnio, że traktowanie nowotworów preparatem Delta-tek, który jest inhibitorem Ang-1/2, prowadzi do selektywnego eliminowania z nowotworów naczyń po-

siadających ekspresję receptora dla angiopoetyn (Tie-2/tek). Naczynia negatywne pod względem Tie-2/tek pozostawały w tym przypadku nietknięte (Coomber – personalna obserwacja). Nie tylko komórki nowotworowe, ale również towarzyszące im struktury naczyniowe mogą ulegać negatywnej selekcji w obecności pewnych leków, co w przypadku inhibitorów angiogenezy może spowodować stopniowe zmniejszanie się ich efektu terapeutycznego.

(iv) Śródbłonkowe mechanizmy antyapoptotyczne

Niektóre czynniki angiogenne, które występują w znacznym nadmiarze w środowisku nowotworu, mogą zapobiegać śmierci apoptotycznej śródbłonka traktowanego lekami antyangiogennymi. Działanie takie może więc powodować stan operacyjnie identyczny z opornością na te leki [160]. Na przykład, obecność nadmiaru VEGF wywołuje oporność komórek śródbłonka na TSP-1 lub traktowanie metronomicznymi dawkami leków cytostatycznych, głównie poprzez indukcję podwyższonej ekspresji takich białek blokujących apoptozę jak survivin czy bcl 2 [161-163].

(v) Genetyczne zmiany w komórkach śródbłonka nowotworów układu krwiotwórczego

Choć intuicyjnie może to być trudne do zaakceptowania, białaczki i chłoniaki (nowotwory krwi i szpiku) są również podatne na leczenie antyangiogenne [4, 164]. Dzieje się tak dlatego, że niektóre komórki białaczkowe mogą być bezpośrednio stymulowane do wzrostu przez czynniki angiogenne, np. VEGF [4]. Głównie jednak, wyprovadza się to z obserwacji, że szpikowy system naczyń krwionośnych u pacjentów białaczkowych jest miejscem aktywnego wzrostu komórek śródbłonka, które mogą być źródłem parakrynych czynników wzrostowych stymulujących proces nowotworowy [35, 39, 165]. Okazuje się jednak, że w ostrej sprzeczności z hipotezą „stabilności genetycznej naczyń krwionośnych w nowotworach” [143], komórki śródbłonka obecne w szpiku białaczkowym mogą wykazywać cechy aneuploidii [166], zawierać zmutowane onkogeny [31] lub zawierać markery genetyczne charakterystyczne dla komórek nowotworowych [167]. Można przypuszczać, że zmiany te powstają w wyniku przekazu materiału genetycznego między komórkami nowotworowymi a śródbłonkiem [168], różnicowania się części białaczkowych komórek pnia w kierunku śródbłonka [31] lub innych bliżej niepoznanych mechanizmów. Niezależnie od przyczyny, cechy niestabilności genetycznej w komórkach śródbłonka naczyń towarzyszących nowotworom niewątpliwie mogą stać się podstawą nabywania oporności na leki, w tym antyangiogenne.

(vi) Destrukcja czy „normalizacja” naczyń nowotworowych

Niedawno Rakesh Jain z Harvard University w Bostonie wysunął niezwykle oryginalną hipotezę, że nie destrukcja, ale przeciwnie, „normalizacja” naczyń nowotworowych poddanych działaniu leków antyangiogennych, mogłaby mieć znaczenie terapeutyczne, zwłaszcza w terapii skojarzonej [169]. Jest to możliwe, ponieważ całkowite

zniszczenie siatki naczyńowej wpłynęłoby negatywnie na dostęp leków cytostaticznych do wnętrza zmian nowotworowych, a towarzysząca temu hipoksja utrudniłaby radioterapię [169]. Wbrew temu, obserwacje empiryczne wskazują, że leki antyangiogenne działają w sposób synergistyczny z innymi metodami terapii przeciwnowotworowej [170]. Ponadto, w toku badań nad klinicznym zastosowaniem leku bevacizumab w leczeniu CRC, pojawił się z pozoru niewytłumaczalny paradoks [171]. Zamiast spodziewanej współzależności między dawką leku i efektem terapeutycznym, okazało się, że w połączeniu z chemioterapią, niższe (5 mg/kg), a nie wyższe dawki (10 mg/kg) bevacizumab były bardziej skuteczne [171]. Ten zaskakujący wynik jest bardziej zgodny z koncepcją „normalizacji” naczyńowej warunkującej synergistyczny efekt leków cytostaticznych i antyangiogennych, niż ze zwyczajną destrukcją naczyń nowotworowych. Przypuszcza się, że niepełny efekt antyangiogeny może doprowadzić do poprawy (a nie pogorszenia) krążenia krwi w zmianach nowotworowych. Działałoby się tak skutek ograniczenia gwałtownego i przez to defektywnego procesu tworzenia nowych naczyń. Można więc przyjąć, że pewien stopień osłabienia odpowiedzi (oporność) na leki antyangiogenne może być zjawiskiem korzystnym, ale tylko w warunkach terapii skojarzonej.

(vii) Inne mechanizmy oporności naczyń nowotworowych na leczenie antyangiogenne

Poza wymienionymi powyżej, cały szereg innych mechanizmów biologicznych może prowadzić do sprzecznego z koncepcją *therapy resistant to resistance* zachowania nowotworowych naczyń krwionośnych [74]. Na przykład, istnieją doniesienia, że unaczynienie niektórych raków płuca odbywa się bez udziału aktywnej angiogenezy, tzn. głównie w formie koopcji istniejących naczyń krwionośnych [172]. Niejasne są również konsekwencje alternatywnych mechanizmów powstawania naczyń (waskulogenezy, waskulogennej mimikry czy intususceptcji) dla skuteczności terapeutycznej istniejących leków antyangiogennych. Ponadto właściwości farmakologiczne, farmakokinetyczne, biodegradacyjne i biodystrybucyjne poszczególnych preparatów mogą również wpływać na zmniejszenie ich efektywności. Jak wykazują badania nad genami Id1, genetyczny profil organizmu gospodarza może mieć decydujący wpływ na indukcję angiogenezy nowotworowej [61]. Należy także uwzględnić możliwość wpływu farmakogenetycznych czynników modyfikujących odpowiedź na leki antyangiogenne. Te i wiele innych okoliczności powoduje, że odpowiedź nowotworów na te leki może być trudniejsza do przewidzenia niż pierwotnie przypuszczano. Koncepcja uniwersalnej skuteczności tych, skądinąd niezwykle cennych i z reguły nietoksycznych leków, musi być zastąpiona rozwinięciem szczegółowych wskazań i przeciwwskazań dotyczących ich stosowania.

5. Uwagi końcowe

Trudno przecenić postęp, jaki się dokonał w ciągu ostatnich 20 lat w dziedzinie zrozumienia podstaw procesu

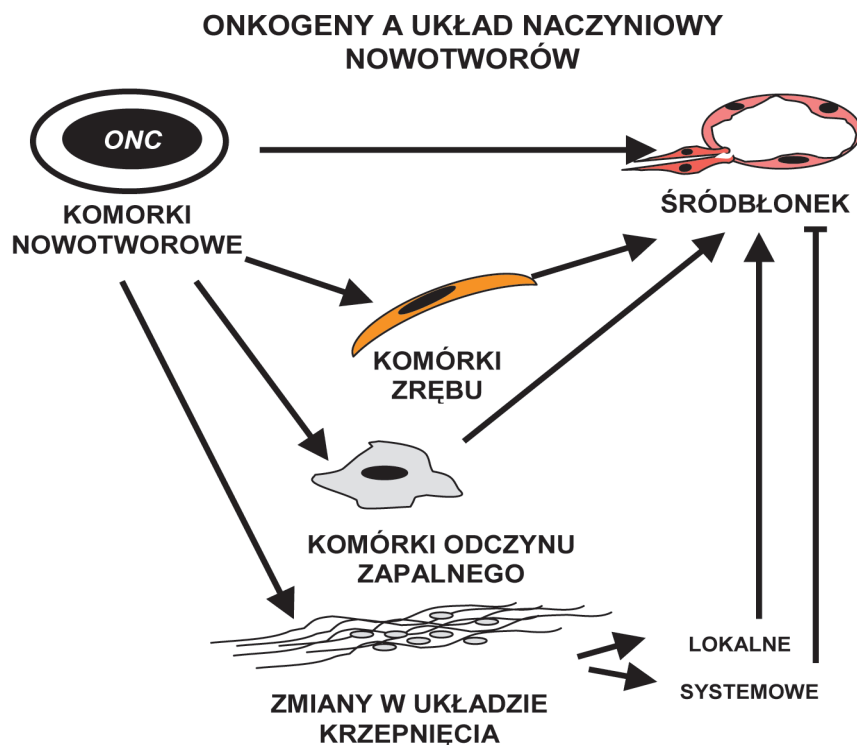
nowotworzenia. Powstało przy tym wiele nurtów badawczych, które z czasem odgradziły się od siebie murem odrębnych aparatów pojęciowych, paradygmatów, metodologii, a przede wszystkim definicji, czym jest choroba nowotworowa. Tak było w przypadku fascynujących odkryć, które doprowadziły do zdefiniowania funkcji genów supresorowych i onkogenów [10, 11, 101]. Produkty tych genów stały się celem pierwszych prób przyczynowego (a nie tylko objawowego) leczenia nowotworów, jak na przykład przez stosowanie leków takich jak Gleevec, Iressa i inne preparaty z grupy *targeted agents*. Choć sukcesy te prawdopodobnie nie byłyby możliwe bez zredukowania pojęcia nowotworu do atrybutów komórki nowotworowej, ceną takiego koniecznego uproszczenia było pominięcie heterogenności tych komórek, ich oddziaływania z tkankami normalnymi, układem immunologicznym, krążenia i innymi elementami chorobowego *continuum*.

Z drugiej strony, rozwijające się głównie od 1971 roku [44] prace nad mechanizmami i terapeutycznym znaczeniem procesów angiogenezy, koagulopatii czy innych efektów naczyniowych towarzyszących nowotworzeniu, nie poświęcały wiele uwagi cechom genetycznym komórek nowotworowych. Takie koleje miała historia badań nad VEGF, która prowadzi od jego odkrycia w 1983 roku, wówczas pod nazwą czynnika przepuszczalności naczyń (*vascular permeability factor* – VPF) [173], oraz do wprowadzenia 21 lat później preparatu bevacizumab do leczenia przynajmniej niektórych nowotworów [149]. Znaczenie czynników takich jak TF, białka związane z procesami krzepnięcia, regulacja pericytów i inne mechanizmy naczyniowe są przedmiotem aktywnej i szczegółowej eksploatacji, która również nieczęsto odwołuje się do przyczynowej roli onkogenów w tych procesach [64].

Tematem tego opracowania było poszukiwanie wspólnego mianownika pomiędzy procesami genetycznej progresji nowotworów, a ich wpływem na szeroko pojęty układ naczyniowy. Istotnie, wiele krytycznych zmian w ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie naczyń krwionośnych (VEGF) lub koagulopatie (TF) w nowotworach, okazuje się być pod bezpośrednią kontrolą mutacji onkogennych, w stopniu tak znacznym, że niektóre zmiany naczyniowe należałoby uznać za podstawowy atrybut procesu nowotworzenia [5] (Ryc. 3). Należy mieć nadzieję, że takie bardziej zintegrowane i systemowe podejście do patobiologii procesów nowotworowych, z uznaniem ich złożoności oraz indywidualnych molekularnych odrębności, będzie źródłem dalszego postępu w rozwoju nowych, bardziej skutecznych (kompleksowych) form leczenia chorób nowotworowych.

6. Podziękowania

Lata pracy nad patobiologią i leczeniem nowotworów były dla mnie pasjonującą przygodą, która nie byłaby możliwa bez oparcia w mojej rodzinie. Szczególne podziękowania należą się mojej żonie Danusi i córce Ani, które były moją spokojną przystanią i okazały mi tak wiele zrozumienia, wsparcia, cierpliwości i pomocy. Winien jestem również ogromna wdzięczność mojej mamie Stanisławie Ży-



Ryc. 3. Wielowarstwowość oddziaływań pomiędzy transformowanymi onkogenicznie komórkami nowotworowymi (*onc*) i elementami układu naczyniowego gospodarza.
Adaptacja z pracy: Rak & Kerbel, *Oncogenes and Tumor Angiogenesis*, w: J. Rak (red.) *Oncogene Directed Therapies*, Totowa: Humana Press 2003; 171-218

romskiej-Rak i siostrze Krystynie Poznańskiej za zachętę i oparcie w okresie kiedy krystalizowała się moja droga zawodowa.

Wdzięczność winien jestem moim mentorom i przyjaciółom, których podziwiam, od których nauczyłem się wszystkiego, co wiem. Profesorowie Czesław Radzikowski, Leon Strządała, Adam Opolski, Fred Miller, Robert Kerbel, Judah Folkman, Brad St.Croix, Andras Nagy, Brenda Coomber, Jeffrey Weitz, Giannoula i Petr Klement – byli dla mnie przewodnikami i źródłem inspiracji. W nie mniejszym stopniu koleżeńskie wsparcie Haliny Kusnierczyk, Igi Steuden, Jennifer Tran, Halki Klement, Wojciecha Kałasa, Lindy May, Alicji Viloria-Petit, a szczególnie Joanne Yu było dla mnie prawdziwie niezastąpione.

Profesorowi Strządale pragnę podziękować za nieprzerwaną, pomimo upływu lat i fascynującą dla mnie wymianę myśli oraz za otwartą, nieraz twardą, ale prawdziwie akademicką dyskusję o nauce i życiu. Rozpoczęcie tego procesu habilitacyjnego było w dużej mierze wynikiem naszych rozmów.

Władzom Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, a w szczególności Profesorowi Andrzejowi Górskiemu winienem jestem podziękowania za pamięć, życzliwe przyjęcie i umożliwienie wejścia na drogę przewodu habilitacyjnego.

Dr med. Janusz Rak

Henderson Research Centre, McMaster University
711 Concession Street, Hamilton, Ontario, L8V 1C3,
Canada
jrak@thrombosis.hhscr.org

Piśmiennictwo

1. Foulds L. Tumor progression. *Cancer Res* 1954; 17: 337-339.
2. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986; 46: 2203-2207.
3. Kulke MH, Turner JR, Skarin AT. *Cancer of the gastrointestinal tract. Atlas of Diagnostic Oncology*, Dana-Farber Cancer Institute. Edited by Skarin AT. London, Mosby, Elsevier Science Ltd., 2003, pp. 113-162.
4. Moehler TM, Hillengass J, Goldschmidt H, Ho AD. Antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1221-1234.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
6. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
7. Kerbel RS. Growth dominance of the metastatic cancer cell: cellular and molecular aspects. *Adv Cancer Res* 1990; 55: 87-132.
8. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ i wsp. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1031-1037.
9. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H i wsp. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344: 1038-1042.
10. Bishop JM. Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 1995; 9: 1309-1315.
11. Malumbres M, Barbacid M. Timeline: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 459-465.
12. Done S, Squire JA. Genetic basis of cancer progression. W: *Oncogene-Directed Therapies*. Rak J (red.). Totowa: Humana Press; 2003, 3-18.
13. Rak J. Preface. *Oncogene-Directed Therapies*. Rak J (red.). Totowa: Humana Press; 2003, 5-8.
14. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-458.
15. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379.
16. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-336.

17. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000; 406: 532-535.
18. Kang Y, Siegel PM, Shu W i wsp. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003; 3: 537-549.
19. Minn AJ, Kang Y, Serganova I i wsp. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 2005; 115: 44-55.
20. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM i wsp. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005; 436: 518-524.
21. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 563-572.
22. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277-279.
23. Miller FR, Heppner GH. Cellular interactions in metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 21-34.
24. Aslakson CJ, Rak JW, Miller BE i wsp. Differential influence of organ site on three subpopulations of a single mouse mammary tumor at two distinct steps in metastasis. *Int J Cancer* 1991; 47: 466-472.
25. Rak J. Possible role of tumour stem – end cell interaction in metastasis. *Med Hypoth* 1989; 29: 17-19.
26. Heppner GH. Tumor cell societies. *J Natl Canc Inst* 1989; 81: 648-649.
27. Buick RN, Pollak MN. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. *Cancer Res* 1984; 44: 4909-4918.
28. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 275-284.
29. Weissman IL. The road ended up at stem cells. *Immunol Rev* 2002; 185: 159-174.
30. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID i wsp. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
31. Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL i wsp. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000; 355: 1688-1691.
32. Rak J. Is cancer stem cell a cell, or a multicellular unit capable of inducing angiogenesis? *Med Hypoth* 2005; in press.
33. Bayko L, Rak J, Man Si i wsp. The dormant in vivo phenotype of early stage primary human melanoma: termination by overexpression of vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 1998; 2: 203-217.
34. Lyden D, Young AZ, Zagzag D i wsp. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 1999; 401: 670-677.
35. Folkman J, Kalluri R. Tumor Angiogenesis. *Cancer Medicine*. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr. RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E (red.), III, and . Hamilton, London: BC Decker Inc.; 2003, 161-194.
36. Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 1968; 22: 258-273.
37. Rak JW, Yu JL, Kerbel RS, Coomber BL. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 1931-1934.
38. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 19; 94: 883-893.
39. Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells. The „angiogenesis progression” hypothesis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2438-2450.
40. Rak JW, Hegmann EJ, Lu C, Kerbel RS. Progressive loss of sensitivity to endothelium-derived growth inhibitors expressed by human melanoma cells during disease progression. *J Cell Physiol* 1994; 159: 245-255.
41. Hamada J, Cavanaugh PG, Miki K i wsp. A paracrine migration-stimulating factor for metastatic tumor cells secreted by mouse hepatic sinusoidal endothelial cells: identification as complement component C3b. *Cancer Res* 1993; 53: 4418-4423.
42. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N i wsp. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nature Med* 1997; 3: 1222-1227.
43. Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res* 1983; 43: 2159-2166.
44. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
45. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002; 1: 219-227.
46. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
47. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E i wsp. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002; 296: 1883-1886.
48. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
49. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-174.
50. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *Acta Path Microbiol Scand* 2004; 112: 496-507.
51. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 357-369.
52. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
53. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW i wsp. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
54. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M i wsp. Review: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
55. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
56. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
57. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93: 741-753.
58. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF i wsp. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000; 80: 99-115.
59. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M i wsp. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003; 161: 1163-1177.
60. Asahara T, Murohara T, Sullivan A i wsp. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
61. Lyden D, Hattori K, Dias S i wsp. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194-1201.
62. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D i wsp. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-1998.
63. Hendrix MJ, Sefror EA, Hess AR i wsp. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 411-421.
64. Rak J, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis. W: *Oncogene-Directed Therapies*. Rak J (red). Totowa: Humana Press; 2003, 171-218.
65. Falanga A. Thrombophilia in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 104-110.
66. Dvorak FH. *Abnormalities of Hemostasis in Malignant Disease. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Coleman RB, Hirsh J, Marder VJ, and Salzman JB (red.). Philadelphia: Lippincott Company; 1994, 1238-1254.
67. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL i wsp. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2: 209-215.
68. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 31-44.
69. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 66-74.
70. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 5-20.
71. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-1524.
72. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001; 3: 371-384.
73. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L i wsp. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55: 4575-4580.
74. Rak J, Kerbel RS. Treating cancer by inhibiting angiogenesis: New hopes and potential pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 231-236.
75. Rak J, Kerbel RS. bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? *Nat Med* 1997; 3: 1083-1084.
76. Vilorio-Petit AM, Rak J, Hung M-C i wsp. Neutralizing antibodies against EGF and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate VEGF production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997; 151: 1523-1530.
77. Okada F, Rak J, St.Croix B i wsp. Impact of oncogenes on tumor angiogenesis: mutant K-ras upregulation of VEGF/VPF is necessary but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998; 95: 3609-3614.
78. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C i wsp. Collateral expression of proangiogenic and tumorigenic properties in intestinal epithelial cell variants selected for resistance to anoikis. *Neoplasia* 1999; 1: 23-30.
79. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C i wsp. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor

- up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 2000; 60: 490-498.
80. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 24-33.
 81. Rak J, Klement G. Impact of oncogenes and tumor suppressor genes on deregulation of hemostasis and angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 93-96.
 82. Lopez-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M i wsp. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner [In Process Citation]. *Oncogene* 2000; 19: 4611-4620.
 83. Kerbel RS, Vilorio-Petit A, Klement G, Rak J. 'Accidental' anti-angiogenic drugs. anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic agents as examples. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1248-1257.
 84. Rak J, Kerbel RS. Ras regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Methods Enzymol* 2001; 333: 267-283.
 85. Rak J, Kerbel RS. Prospects and progress in the development of anti-angiogenic agents. Rosenberg SA. Principles and Practice of Biologic Therapy of Cancer - Updates 3[3], 1-13. 2002. New York, Lippincott, Williams & Wilkins. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
 86. Yu JL, Rak JW, Coomber BL i wsp. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002, 295:1526-1528.
 87. Vilorio-Petit A, Miquelot L, Yu JL, Gertsenstein M, Sheehan C, May L, Henkin J, Lobe C, Nagy A, Kerbel RS, Rak J. Contrasting effects of VEGF gene disruption in embryonic stem cell-derived versus oncogene-induced tumors. *EMBO J* 2003; 22: 4091-4102.
 88. Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 21-30.
 89. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-1741.
 90. Kalas W, Yu JL, Milsom C, Rosenfeld J, Benezra R, Bornstein P, Rak J. Oncogenes and angiogenesis. Downregulation of thrombospondin 1 in normal fibroblasts exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Res* 2005; 65: 8878-86.
 91. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? *J Natl Canc Inst* 1990; 82: 4-6.
 92. Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 1977; 269: 804-806.
 93. Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ i wsp. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979; 62: 1459-1472.
 94. Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1990; 87: 3092-3096.
 95. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
 96. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 71-103.
 97. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck N. Regulation of the activity of a new inhibitor by angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-355.
 98. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F i wsp. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6624-6628.
 99. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.
 100. Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997; 14: 1495-1502.
 101. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
 102. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G i wsp. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 263-277.
 103. Rak J, St.Croix B, Kerbel RS. Consequences of angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 1995; 6: 3-18.
 104. Hasegawa H, Ueda M, Watanabe M i wsp. K-ras gene mutations in early colorectal cancer . . . flat elevated vs polyp-forming cancer . . . *Oncogene* 1995, 10:1413-1416.
 105. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 1993; 260: 85-88.
 106. Shirasawa S, Sasazuki T. The impact of oncogenes on tumor maintenance. W: *Oncogene-Directed Therapies*. Rak J (red.). Totowa: Humana Press; 2003, 229-244.
 107. Chin L, Tam A, Pomerantz Ji wsp. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 1999, 400:468-472.
 108. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K i wsp. Both v-Ha-ras and v-raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 25915-25919.
 109. Zabrenetzky V, Harris CC, Steeg PS, Roberts DD. Expression of the extracellular matrix molecule thrombospondin inversely correlates with malignant progression in melanoma, lung and breast carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1994; 59: 191-195.
 110. Watnick RS, Cheng Y-N, Rangarajan A i wsp. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2003; 3: 219-231.
 111. Chambers AF, Tuck AB. Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev Oncog* 1993; 4: 95-114.
 112. Iberg N, Rogelj S, Fanning P, Klagsbrun M. Purification of 18- and 22-kDa forms of basic fibroblast growth factor from rat cells transformed by the ras oncogene. *J Biol Chem* 1989; 264: 19951-19955.
 113. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; 6: 447-458.
 114. Kalas W, Gilpin S, Yu JL, May L, Krchnakova H, Bornstein P, Rak J. Restoration of thrombospondin 1 expression in tumor cells harbouring mutant ras oncogene by treatment with low doses of doxycycline. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 110-115.
 115. Sebt SM, Adjei AA. Farnesyltransferase inhibitors. *Semin Oncol* 2004; 31: 28-39.
 116. Feleszko W, Balkowicz EZ, Sieberth E i wsp. Lovastatin and tumor necrosis factor-alpha exhibit potentiated antitumor effects against Ha-ras-transformed murine tumor via inhibition of tumor-induced angiogenesis. *Int J Cancer* 1999; 81: 560-567.
 117. Gu WZ, Tahir SK, Wang YC i wsp. Effect of novel Caax peptidomimetic farnesyltransferase inhibitor on angiogenesis in vitro and in vivo. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1394-1401.
 118. Ebos JM, Tran J, Master Z i wsp. Imatinib mesylate (STI-571) reduces Bcr-Abl-mediated vascular endothelial growth factor secretion in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cancer Res* 2002; 1: 89-95.
 119. Konecny GE, Arboleda J, Slamon D, Pegram M. Inhibition of the HER-2 oncogene: A translational research model for the development of future targeted therapies. W: *Oncogene-Directed Therapies*. Rak J (red.). Totowa: Humana Press, 2003, pp. 331-352.
 120. Ciardiello F, Caputo R, Bianco Ri wsp. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1459-1465.
 121. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002, 2: 38-47.
 122. Pugh CW, Ratcliffe PJ. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 83-89.
 123. Mazure NM, Chen EY, Yeh P i wsp. Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 1996; 56: 3436-3440.
 124. Kalas W, Klement P, Rak J. Downregulation of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 1 in fibroblasts exposed to platelets and their related phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 549-554.
 125. Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A i wsp. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000; 88: 295-301.
 126. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C i wsp. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 69: 247-254.
 127. Shigemori C, Wada H, Matsumoto Ki wsp. Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost* 1998; 80:894-898.
 128. Zhang Y, Deng Y, Luther T i wsp. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 1320-1327.
 129. Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S i wsp. Tissue factor--a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 334-345.
 130. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015-1022.

131. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S i wsp. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004; 10: 502-509.
132. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1495-1503.
133. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407: 258-264.
134. Bunz F, Hwang PM, Torrance C i wsp. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104: 263-269.
135. Lee AY, Levine MN. Venous thrombembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation* 2003; 107: 117-121.
136. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J i wsp. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003; 9: 458-462.
137. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B i wsp. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2311-2315.
138. Yu JL, Rak JW. Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2065-2067.
139. Rong Y, Post DE, Pieper RO i wsp. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res* 2005; 65: 1406-1413.
140. Boccaccio C, Sabatino G, Medico E i wsp. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005; 434: 396-400.
141. Kaplan R, DeLa Cadena RA. Mechanism of the coagulopathy associated with acute promyelocytic leukemia -clinical conference-. *Am J Hematol* 1998; 59: 234-237.
142. Steiner R. Angiogenesis – historical perspective. W: *Angiogenesis: Key Principles, Science-Technology-Medicine*. Steiner R, Weis PB (red.). Basel-B1-3: Birkhauser Verlag; 1992.
143. Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997; 390: 335-336.
144. St Croix B, Rago C, Velculescu Vi wsp. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000; 289: 1197-1202.
145. Kerbel RS, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 727-739.
146. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM i wsp. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 1878-1886.
147. Klement G, Baruchel S, Rak J i wsp. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity [In Process Citation]. *J Clin Invest* 2000; 105: R15-R24.
148. Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D i wsp. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood* 1999; 94:4143-4155.
149. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 391-400.
150. Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O i wsp. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res* 1999; 59: 1592-1598.
151. Inoue M, Hager JH, Ferrara N i wsp. VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell* 2002; 1: 193-202.
152. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H i wsp. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.
153. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G i wsp. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439.
154. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D i wsp. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 1999; 5: 495-502.
155. Relf M, LeJeune S, Scott PA i wsp. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 963-969.
156. Filleul S, Volpert OV, Degeorges A i wsp. In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev* 2001; 15: 1373-1382.
157. Graeber TG, Osmanian C, Jacks Ti wsp. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.
158. Rak J, Yu JL. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular „supply” and vascular „demand”. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 93-104.
159. Inai T, Mancuso M, Hashizume H i wsp. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol* 2004; 165:35-52.
160. Kerbel RS, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, Coomber BL, Rak J. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 79-86.
161. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. Induction of endothelial cell resistance to chemotherapy by VEGF mediated up-regulation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 (in press).
162. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999; 154: 375-381.
163. O'Connor DS, Schechner JS, Adida C i wsp. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398.
164. Giles FJ. The emerging role of angiogenesis inhibitors in hematologic malignancies. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16: 23-29.
165. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U i wsp. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-820.
166. Hida K, Hida Y, Amin DN i wsp. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 2004; 64: 8249-8255.
167. Streubel B, Chott A, Huber D i wsp. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 351: 250-259.
168. Bergsmeth A, Szeles A, Henriksson Mi wsp. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 6407-6411.
169. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nature Med* 2001; 7: 987-989.
170. Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. *Cancer Res* 1992; 52: 6702-6704.
171. Hurwitz H. Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4 Suppl 2: S62-S68.
172. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E i wsp. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1417-1423.
173. Senger DR, Galli S, Dvorak AM i wsp. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983, 219:983-985.

Publikacje z badań własnych związane z tematem artykułu i przedstawione jako rozprawa habilitacyjna

1. Kalas W, Yu JL, Milsom C, Rosenfeld J, Benezra R, Bornstein P & **Rak J** (corresponding author). Oncogenes and angiogenesis. Downregulation of thrombospondin 1 in normal fibroblasts exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Research* 2005; 65: 8878-86.
2. Kalas W, Klement P & **Rak J** (corresponding author). Downregulation of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 1in fibroblasts exposed to platelets and their related phospholipids. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 334: 549-554.
3. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber B, Mackman N & **Rak J** (corresponding author). Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: Implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-1741 with cover (Prepublished online as Blood First Edition Paper, October 19, 2004; DOI 10.1182/blood-2004-05-2042).
4. Yu JL & **Rak J** (corresponding author). Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004; 11: 2065-7.
5. Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI & **Rak J** (corresponding author): Oncogenes as putative regulators of tissue factor expression in cancer: Implications for angiogenesis and anti-cancer therapy. Invited review, *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 2004; 30: 21-30
6. Kalas W, Gilpin S, Yu JL, May L, Krchnakova H, Bornstein P & **Rak J** (corresponding author). Restoration of thrombospondin 1

expression in tumor cells harbouring mutant ras oncogene by treatment with low doses of doxycycline. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 310: 109-114.

7. Vilorio-Petit A, Miguero L, Gertsenstein M, Yu JL, Sheehan C, May L, Lobe C, Nagy A, Kerbel RS & **Rak J** (corresponding author). Contrasting effects of VEGF gene disruption in embryonic stem cell-derived teratomas versus adult fibrosarcoma cells. *EMBO J* 2003; 22, 16: 4091-4102 .

Otrzymano i przyjęto do druku: 2 listopada 2005 r.