

Komórki mikrośrodowiska nowotworowego: cel terapii przeciwnowotworowej

Stanisław Szala

Infiltrujące guzy nowotworowe fibroblasty, komórki układu odpornościowego, komórki śródbłonkowe naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz macierz pozakomórkowa stanowią najbliższe otoczenie komórek nowotworowych, określane mianem: mikrośrodowiska nowotworowego.

Komórki mikrośrodowiska nowotworowego biorą udział w progresji nowotworowej: umożliwiają komórkom inwazyjny wzrost, kolonizację odległych narządów czy ucieczkę spod nadzoru immunologicznego.

Czy te swoiste dla nowotworów fibroblasty, makrofagi, komórki układu odpornościowego, komórki śródbłonkowe naczyń krwionośnych i limfatycznych mogą być punktami docelowymi nowych strategii terapeutycznych? Czy hamując lub niszcząc oddziaływania między nimi a komórkami nowotworowymi możemy kontrolować wzrost komórek nowotworowych? Jaka może być skuteczność takiej pośredniej metody terapeutycznej, której celem będą komórki prawidłowe a nie komórki nowotworowe? Czy współczesna terapia nie powinna być kombinacją strategii, których celami będą zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki prawidłowe swoiste dla nowotworów?

Artykuł jest próbą odpowiedzi na niektóre z tych pytań.

Cells forming tumor environment: a target for anticancer therapy?

The tumor mass is infiltrated by fibroblasts, immune system cells and endothelial cells lining blood and lymph vessels. All these cells together with the extracellular matrix form the intimate surroundings of cancer cells that have been termed as the tumor microenvironment.

The cells making up this microenvironment enable tumor progression, i.e. they facilitate invasive growth, the spread of cancer cells to distant organs and their escape from immune surveillance.

Could those tumor-specific fibroblasts, macrophages, immune system cells and endothelial cells be targets of novel anticancer therapeutic strategies? Would inhibiting or suppressing their interactions with neoplastic cells lead to better control of tumor growth? What efficacy is to be expected from such indirect approaches that target normal, rather than cancer cells? An important question is thus set: shouldn't prospective anticancer strategies shift towards combined approaches, that would target both cancer cells and tumor-specific normal cells?

This paper attempts to set answers to some of these queries.

Słowa kluczowe: mikrośrodowisko nowotworowe, progresja nowotworów, terapia nowotworów, leki działające na komórki mikrośrodowiska

Key words: tumor microenvironment, tumor progression, tumor therapy, drugs targeting tumor environment

Wstęp

Hanahan i Weinberg [1] wyróżniają sześć istotnych cech fenotypu nowotworowego:

- (1) wytwarzanie czynników wzrostu;
- (2) brak wrażliwości na egzogenne inhibitory wzrostu;
- (3) oporność na czynniki indukujące apoptozę;

- (4) nieograniczony potencjał replikacyjny;
- (5) zdolność do tworzenia naczyń krwionośnych i limfatycznych;
- (6) inwazyjny wzrost i zdolność tworzenia przerzutów.

Do cech tych można dodać jeszcze jedną: (7) zdolność komórek nowotworowych do ucieczki spod nadzoru immunologicznego i hamowania odpowiedzi odpornościowej oraz wywołania tolerancji odpornościowej [2-4]. Dzięki cechom (1-4) komórki nowotworowe stają się komórkami autonomicznymi, nie reagującymi na różne sygnały kontrolne organizmu. Natomiast dzięki cechom (5-7) komórki nowotworowe mogą tworzyć nowe relacje z niektórymi prawidłowymi komórkami. Tymi prawidłowo-

wymi komórkami, które wchodzą w relacje z komórkami nowotworowymi – komórkami tworzącymi swoiste mikrośrodowisko nowotworowe – są fibroblasty podścieliska, komórki odporności nieswoistej i swoistej, komórki śródbłonkowe oraz perycyty naczyń krwionośnych i limfatycznych. W skład tego mikrośrodowiska wchodzi także macierz pozakomórkowa. Mikrośrodowisko nowotworowe stanowi swego rodzaju niszę, umożliwiającą progresję nowotworową [5].

Jak zatem powstaje mikrośrodowisko nowotworowe? Jaką rolę odgrywają poszczególne jego elementy w progresji nowotworów? Czy hamowanie lub niszczenie sieci wzajemnych oddziaływań między komórkami nowotworowymi, a prawidłowymi komórkami środowiska nowotworowego może być wykorzystane w terapii nowotworów?

W artykule tym zostaną omówione istotne fenotypowe cechy komórek mikrośrodowiska nowotworowego oraz niektóre lepiej poznane związki i relacje, jakie komórki te tworzą z komórkami nowotworowymi. Zostaną także przedstawione terapeutyczne strategie, których celem mogą być prawidłowe komórki mikrośrodowiska nowotworowego.

Udział komórek odpowiedzi zapalnej w powstawaniu mikrośrodowiska nowotworowego

Szereg danych wskazuje na istotną rolę reakcji zapalnej w powstawaniu mikrośrodowiska nowotworowego [6-8]. U prawie 15% nowotworów, zwłaszcza pochodzenia nabłonkowego, pojawiająca się reakcja zapalna jest odpowiedzią na różnego rodzaju czynniki infekcyjne (m.in. bakterie, wirusy, pasożyty), czy też ciała obce, takie jak azbest. W nowotworach tych (m.in. w rakach pęcherza, żołądka, jelita grubego, szyjki macicy, wątroby) istnieje istotna zależność między przewlekłymi stanami zapalnymi, a predyspozycją do rozwoju nowotworu [6]. Z drugiej jednak strony, wiele też wskazuje, że to głównie komórki nowotworowe, dzięki wydzielanym przez siebie różnym cytokinom i chemokinom, rekrutują komórki odpowiedzi zapalnej (granulocyty, makrofagi, komórki tuczne) [7-8]. Infiltrujące guzy nowotworowe komórki reakcji zapalnej wydzielają szereg różnych mediatorów. Cytokiny i chemokiny wpływają dodatkowo na rekrutację komórek reakcji zapalnej. Enzymy proteolityczne biorą udział w przebudowie macierzy pozakomórkowej. Reaktywne formy tlenu (ROS) mogą tworzyć swoistą presję mutagenną na komórki nowotworowe. Cytokiny proangiogenne i czynniki wzrostowe stymulują powstawanie naczyń oraz wzrost komórek nowotworowych. Cytokiny immunosupresyjne mogą także modyfikować odpowiedź odpornościową.

Dominującą rolę w odpowiedzi zapalnej odgrywają makrofagi [9-12]. Mogą one stanowić nawet ponad 50% masy guza [13, 14]. Komórki prekursorowe makrofagów – monocyty – są rekrutowane z krwiobiegu i ze szpiku kostnego przy pomocy wydzielanych przez komórki nowotworowe cytokin (CSF-1 i VEGF) oraz chemokin (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) [7, 13].

Pod wpływem wydzielanych przez komórki nowotworowe cytokin IL-6 i CSF-1 monocyty ulegają zróżnicowaniu do makrofagów [7]. Komórki dendrytyczne odpowiedzi zapalnej powstają z zapalnych monocytów. W procesie tym biorą udział cytokiny IL-4 i GM-CSF [15].

Dzięki wydzielanym przez komórki nowotworowe cytokinom IL-10 i TGF- β makrofagi ulegają charakterystycznemu fenotypowemu przekształceniu (polaryzacji komórkowej M1 do M2) [9]. Z komórek żernych, prezentujących antygeny i produkujących cytokiny prozapalne (typowy fenotyp komórek M1), makrofagi stają się komórkami wydzielającymi cytokiny przeciwzapalne i immunosupresyjne (IL-10, TGF- β) (fenotyp komórek M2). Swoiste dla nowotworów makrofagi TAM (*Tumor Associated Macrophages*) są komórkami zróżnicowanymi pod względem fenotypowym i czynnościowym [11, 12].

W zależności od umiejscowienia (lokalizacji np. w sąsiedztwie naczyń lub komórek nowotworowych, czy też w rejonach niedotlenowanych) komórki TAM wytwarzają różnego rodzaju mediatory [12]. Niektóre z TAM produkują czynniki proangiogenne (VEGF, TNF- α , IL-8). Inne wydzielają różnego rodzaju czynniki wzrostowe (EGF, PDGF, HGF/SF, bFGF). Jeszcze inne produkują metaloproteiny MMP, urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA) i jego receptor (uPAR), katepsynę B, a więc białka biorące udział w proteolitycznych modyfikacjach macierzy pozakomórkowej i uwalnianiu związanych („sekwestrowanych”) przez macierz pozakomórkową czynników wzrostowych. Makrofagi TAM biorą także udział w migracji komórek nowotworowych. Pod wpływem chemotaktycznego czynnika EGF, wydzielanego przez komórki TAM znajdujące się na zewnętrznej stronie naczyń krwionośnych, komórki nowotworowe wędrują wzdłuż włókien kolagenowych w kierunku naczyń [11, 16]. Po przyłączeniu EGF do receptora EGFR komórki nowotworowe zaczynają produkować CSF-1, który z kolei stymuluje wydzielanie EGF przez makrofagi („pętla parakrynną”). Znajdujące się na zewnętrznej stronie naczyń makrofagi ułatwiają także proces intrawazacji: przemieszczania się komórek nowotworowych do światła naczyń [11].

Wywodzące się z linii monocytarno-makrofagowej komórki dendrytyczne są komórkami niedojrzałymi i nie są w stanie prezentować antygenów komórkom T [3, 4]. Dojrzewanie komórek dendrytycznych hamują cytokiny immunosupresyjne: VEGF, IL-10, TGF- β , wydzielane przez komórki nowotworowe. Działanie VEGF prawdopodobnie polega na wiązaniu tego czynnika przez receptory VEGFR1, znajdujące się na powierzchni niedojrzałych komórek dendrytycznych [17].

Najnowsze dane wskazują, że komórki dendrytyczne i makrofagi wydzielają także IL-23 [18]. Cytokina ta stymuluje odpowiedź prozapalną, ma wpływ na wzrost aktywności MMP-9 i proces angiogenezy. Z drugiej jednak strony hamuje infiltrację nowotworów przez limfocyty CD8⁺.

Stan zapalny dotyczy również zmian naczyniowych: zwiększonej przepuszczalności istniejących naczyń oraz

powstawania nowych (makrofagi i fibroblasty wydzielają m.in. VEGF) [7]. Stan zapalny w nowotworach nie wygasa: od wczesnych do późnych etapów progresji nowotworowej komórki nowotworowe, jak i komórki mikrośrodowiska, rekrutują cały szereg komórek odpowiedzi nieswoistej.

W rozwoju stanu zapalnego pewną rolę odgrywiają limfocyty B i produkowane przez nie przeciwciała [19, 20]. Genetyczna eliminacja komórek T i B u doświadczalnych zwierząt znosi rekrutację komórek odpowiedzi nieswoistej i, tym samym, przebudowę tkanek oraz angiogenezę. Natomiast transfer komórek B przywraca tę rekrutację. Ponieważ komórki B nie infiltrują guzów nowotworowych niewykluczone, że za powstanie stanu zapalnego mogą być odpowiedzialne przeciwciała produkowane przez te komórki. Powyższe dane wskazują, jak złożone mogą być relacje między komórkami odpowiedzi nieswoistej i swoistej w utrzymywaniu się stanu zapalnego w nowotworach [20].

W nowotworach nie tylko makrofagi i komórki dendrytyczne ulegają charakterystycznym fenotypowym modyfikacjom („przeprogramowaniu”) [6]. Fenotypowym przekształceniom ulegają także fibroblasty podścieliska [21] i komórki śródbłonkowe, tworzące naczynia nowotworowe [22].

Aktywowane przez makrofagi i komórki tuczne swoiste dla nowotworów fibroblasty CAF (*Carcinoma Associated Fibroblasts*) różnią się od typowych fibroblastów. Mające charakterystyczny marker α -aktynę komórki CAF zwane są także miofibroblastami [21, 23]. Komórki CAF wytwarzają niektóre strukturalne białka macierzy pozakomórkowej (głównie: kolageny typ I, III, V i fibronektynę), białka błony podstawnej (kolagen IV i lamininę) oraz metaloproteinazy (MMP-1, -7, -9). Enzymy te biorą udział w proteolitycznych modyfikacjach i przebudowie macierzy pozakomórkowej. Komórki CAF produkują także szereg czynników wzrostowych (m.in. EGF, IGF-1, TGF- α). Niektóre z czynników wydzielanych przez fibroblasty, np. czynnik HGF/SF, mają istotny wpływ na migrację komórek nowotworowych [24]. Dzięki wydzielanej chemokinie SDF-1 (CXCL12) fibroblasty nowotworowe rekrutują ze szpiku kostnego prekursorowe komórki śródbłonkowe EPC (*Endothelial Progenitor Cells*) z receptorem CXCR4. Komórki EPC biorą udział w powstawaniu unaczynienia nowotworów [25].

W środowisku komórek nowotworowych swoistym modyfikacjom fenotypowym ulegają również komórki śródbłonkowe naczyń krwionośnych [22]. Modyfikacje te polegają na pojawianiu się na powierzchni komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych zwiększonych ilości niektórych białek, np. receptora VEGFR2, endogliny, białka ROBO4, DELTA4, czy białek należących do rodziny TEM (*Tumor Endothelial Markers*). Komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych są niestabilne pod względem genetycznym i wykazują wyraźną aneuploidię [26]. Przyczyny tej aneuploidii nie są jednak znane. Pod względem morfologicznym komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych znacznie różnią się od komórek prawidłowych [27]. W przeciwieństwie do komórek

naczyń prawidłowych, których powierzchnia jest gładka, komórki naczyń nowotworowych mają powierzchnię szorstką. Niewykluczone, że powierzchnia ta może mieć wpływ na szybkość przepływu krwi w naczyniach nowotworowych.

Udział komórek mikrośrodowiska nowotworowego w progresji nowotworowej

Nowotworowe naczynia krwionośne

Powstawanie naczyń uważane jest obecnie jako warunek *sine qua non* progresji nowotworowej: nowotwory nie mogą się bowiem rozwijać bez własnej sieci naczyń krwionośnych [28]. Główną rolę w tworzeniu unaczynienia odgrywa proangiogeny czynnik VEGF-A, który jest wydzielany nie tylko przez komórki nowotworowe, ale także przez swoiste dla nowotworów makrofagi i fibroblasty [29].

Oprócz głównego szlaku sygnałowego: VEGF-A i receptora VEGFR2, w powstawaniu naczyń nowotworowych biorą także udział: angiopoetyna 1 i 2 oraz ich receptor TIE2, a także cztery rodziny ligandów: neuropiliny/semaforyny, efryny, Robo/slit, netryny/Unc5 oraz ich receptory [30]. Te cztery rodziny ligandów i ich receptorów biorą głównie udział we wzroście aksonów, osiowych wypustek komórek nerwowych [31]. Rola tych ligandów, jak i ich receptorów – poza efrynami – w powstawaniu naczyń nowotworowych nie jest jednak dobrze poznana.

Naczynia nowotworowe mogą powstawać głównie w wyniku angiogenezy (z naczyń już istniejących), waskulogenezy (z prekursorów komórek śródbłonkowych) i naczyniowej mimikry (formowania ścian naczyń z komórek nowotworowych) [32, 33]. Do swego wzrostu niektóre nowotwory mogą wykorzystywać już istniejące naczynia prawidłowe (np. kooptowanie naczyń prawidłowych przez komórki nowotworowe glejaków) [34].

Naczynia nowotworowe różnią się od naczyń prawidłowych [35, 36]. Naczynia nowotworowe to naczynia niedojrzałe, o chaotycznym przebiegu, nieszczelne, z licznymi ślepyimi zakończeniami i nieprawidłowymi połączeniami (anastomozami). W naczyniach nowotworowych przepływ krwi jest spowolniony. Zwiększona przepuszczalność naczyń ma wpływ na wzrost ciśnienia śródmiąższowego w guzach nowotworowych. Rozkład naczyń w guzach jest nierównomierny: na peryferiach guzów nowotworowych jest więcej naczyń niż wewnątrz guzów. Naczynia wewnątrz guzów różnią się od tych, które są na peryferiach. Te ostatnie, pod względem funkcjonalnym bardziej przypominają naczynia prawidłowe.

W naczyniach nowotworowych błona podstawna luźno przylega do komórek śródbłonkowych i perycytów. Błona ta składa się z kilku warstw, co może świadczyć o ciągłej przebudowie naczyń [37]. Błona podstawna naczyń nowotworowych ma inny skład w porównaniu z błonami naczyń prawidłowych. Pod względem fenotypowym również perycyty naczyń nowotworowych różnią się od perycytów naczyń prawidłowych.

Konsekwencją zwiększonej przepuszczalności naczyń nowotworowych i nadekspresji czynnika tkankowego (TF) w komórkach śródbłonkowych naczyń jest pojawianie się skrzepów, zarówno wewnątrznaczyniowych, jak i pozanaczyniowych (tzw. zespół Trousseau lub koagulopatia nowotworowa) [38, 39]. Przypuszcza się, że różne elementy układu krzepnięcia mogą odgrywać rolę w uszczelnianiu naczyń krwionośnych, powstawaniu macierzy zastępczej, modulowaniu angiogenezy [39-41].

Naczynia w guzach nowotworowych ulegają ciągłej przebudowie: powstają i ulegają regresji [34]. Wokół będących w ciągłej przebudowie naczyń komórki nowotworowe tworzą szereg koncentrycznych warstw [28]. W komórkach nowotworowych coraz bardziej oddalonych od światła naczynia pogarsza się utlenowanie. Komórki, znajdujące się w warstwach oddalonych powyżej 100-150 μm od światła naczynia, giną w wyniku martwicy spowodowanej brakiem tlenu [42].

W guzach nowotworowych istnieje także sieć naczyń limfatycznych, która jest jednym z elementów odczynu zapalnego [43]. W powstaniu sieci naczyń limfatycznych (z naczyń już istniejących) biorą udział czynniki VEGF-C i VEGF-D, wydzielane głównie przez komórki nowotworowe oraz receptory VEGFR3, znajdujące się na powierzchni śródbłonkowych komórek limfatycznych. Powstająca wewnątrz guzów nowotworowych sieć naczyń limfatycznych jest jednak niesprawna. Naczynia ulegają kompresji. Niektóre z nich mogą być wypełnione komórkami nowotworowymi. Brak sprawnego drenażu limfatycznego ma także wpływ na wzrost ciśnienia śródmiąższowego wewnątrz guzów nowotworowych.

Nieprawidłowa pod względem funkcjonalnym sieć nowotworowych naczyń krwionośnych odgrywa jednak istotną rolę w progresji nowotworów. Z jednej strony sieć zapewnia utlenowanie najbliższym komórkom nowotworowym, a kontaktując się z naczyniami prawidłowymi, tworzy szlaki dla migrujących komórek nowotworowych [32, 33]. Z drugiej jednak strony, powstające w warstwach oddalonych od naczyń niedotlenowanie stwarza będzie komórkom nowotworowym wysoce selektywne warunki: przeżyć będą bowiem tylko te komórki, które będą posiadały zdolność do glikolizy beztlenowej i zdolność migracji [44].

Glikoliza beztlenowa to proces, w wyniku którego glukoza jest metabolizowana do pirogronianu, a następnie do kwasu mlekowego [45]. W procesie tym z jednej cząsteczki glukozy powstają dwie cząsteczki ATP (dla porównania: w warunkach normoksji, w cyklu Krebsa, z jednej cząsteczki glukozy powstaje aż 36 cząsteczek ATP). Cztery krytyczne etapy glikolizy są kontrolowane przez czynnik transkrypcyjny HIF-1. Ekspresja białek biorących udział w trzech etapach glikolizy: transporcie glukozy do komórek, konwersji glukozy do pirogronianu i pirogronianu do kwasu mlekowego – znacznie wzrasta, natomiast w czwartym etapie: konwersji pirogronianu do acetyloCoA – wyraźnie maleje.

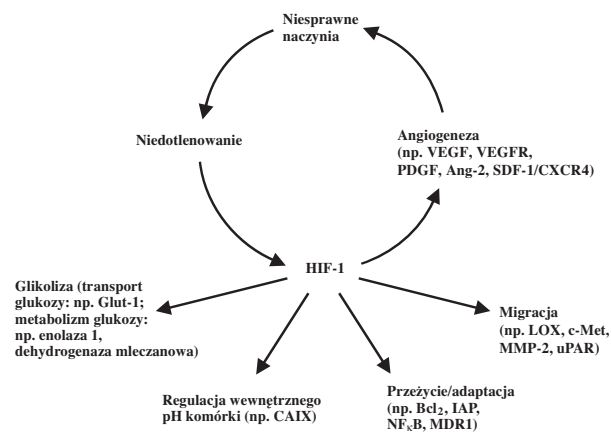
Wpływ na beztlenową glikolizę ma także aktywność niektórych onkogenów (AKT, MYC, RAS) oraz inaktywacja pewnych genów supresorowych (np. VHL). Jedną

z konsekwencji glikolizy beztlenowej jest obniżenie pH wewnątrz komórek [44]. Spadek pH jest także widoczny w otoczeniu komórek nowotworowych [36].

Czynnik transkrypcyjny HIF-1 jest indukowany niedoborem tlenu [44]. Białkiem sensorycznym, reagującym na poziom tlenu w środowisku, jest podjednostka HIF-1 α . W warunkach normoksji, podjednostka HIF-1 α ulega hydroksylacji. Następnie, po przyłączeniu białka VHL (białka von Hippel-Lindau) i ubikwitynacji, podjednostka HIF-1 α ulega degradacji (w warunkach normoksji brak jest więc czynnika HIF-1). W warunkach beztlenowych podjednostka HIF-1 α jest stabilna i po połączeniu z podjednostką HIF-1 β tworzy aktywną, heterodimerską formę czynnika transkrypcyjnego. W komórkach nowotworowych, w których występuje zmutowany gen VHL, obserwuje się stabilizację podjednostki HIF-1 α i konstytutywną aktywność czynnika HIF-1.

Czynnik transkrypcyjny HIF-1 indukuje ekspresję blisko 70 różnych genów [46] (Ryc. 1). Są wśród nich m. in. geny kodujące białka glikolizy beztlenowej, np. białka biorące udział w transporcie glukozy (GLUT-1, -3, -4) czy metabolizmie glukozy (np. enolaza 1, dyhydrogenaza mleczanowa A), geny kodujące białka biorące udział w regulacji wewnętrznego pH komórki (np. anhidraza węglanowa IX (CAIX)), geny kodujące białka uczestniczące w powstawaniu naczyń (m. in. VEGF, VEGFR, PDGF, Ang-2, chemokina SDF-1 i jej receptor CXCR4). Są wśród nich także geny kodujące białka adaptacyjne, umożliwiające przeżycie (np. Bcl₂, IAP, NF κ B, MDR1). Indukowanymi przez niedotlenowanie są także geny kodujące białka odgrywające rolę w migracji komórek nowotworowych, m.in. geny kodujące oksydazę lizylową (LOX), Met, MMP-2, uPAR [44].

W warunkach niedotlenowania adaptacja komórek nowotworowych do niekorzystnych warunków będzie polegała zatem na wykorzystaniu beztlenowej glikolizy do syntezy ATP i stymulacji unaczynienia, które będzie miało na celu poprawę utlenowania komórek. Zależność między unaczynieniem guzów nowotworowych, a powstającym niedotlenowaniem w guzach nowotworowych będzie



Ryc. 1. Niektóre z genów indukowanych przez HIF-1. Na Rycinie przedstawiono grupy genów odgrywających rolę w progresji nowotworowej, a także „błędne koło”, które powstaje między niedotlenowaniem a unaczynieniem

miała jednak charakter „błędnego koła”: konsekwencją niedojrzałych, nie dostarczających wystarczającej ilości tlenu komórkom nowotworowym naczyń nowotworowych będzie niedotlenowanie, a niedotlenowanie będzie stymulowało powstawanie naczyń [47] (Ryc. 1).

Inwazyjny wzrost komórek nowotworowych

W warunkach niedotlenowania, w komórkach nowotworowych, ma miejsce ekspresja genów (Met, LOX), które kodują białka biorące udział w inwazyjnym wzroście komórek nowotworowych. Inwazyjny wzrost komórek nowotworowych to proces, który przypomina swobodne przemieszczanie się komórek macierzystych i progenitorowych podczas rozwoju embrionalnego i regeneracji organów [48]. Oprócz czynnika HIF-1, w uzyskaniu zdolności inwazyjnego wzrostu przez komórki nowotworowe, biorą także udział takie czynniki, jak: TGF- β , IGF, EGF. Konwersja wywodzących się z nabłonków osiadłych komórek nowotworowych do komórek posiadających zdolność ameboidalnego ruchu, charakterystycznej cechy komórek mezenchymalnych, nazywana jest przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT) (*Epithelial-Mesenchymal Transitions*) [49]. Zahamowanie ekspresji E-kadheryny (pod wpływem czynników transkrypcyjnych: Twist, Snail, SIP1) i jednocześnie aktywacja N-kadheryny (zwane także przejściem kadherynowym) uważane jest za istotę tego procesu [50]. E-kadheryny biorą udział w oddziaływaniach komórka – komórka, natomiast N-kadheryny w relacjach komórka – macierz pozakomórkowa. N-kadheryny mają wpływ na budowę cytoszkieletu aktynowego, kształt oraz adhezyjne właściwości komórek [51]. Ameboidalny ruch komórek nowotworowych polega na nawiązywaniu i zrywaniu kontaktów z podłożem (powstawaniu przejściowych struktur lokomotorycznych) [52, 53].

Zmiany w cytoszkielecie, spowodowane przejściem kadherynowym, mają charakter odwracalny. Ruchliwe komórki (z fenotypem komórek mezenchymalnych) mogą stawać się z powrotem komórkami wykazującymi wszelkie cechy komórek osiadłych (jest to tzw. przejście mezenchymalno-nabłonkowe: MET) [54]. Przejście to będzie polegało na odzyskaniu przez komórki osiadłe zdolności do proliferacji i wrażliwości na sygnały proapoptyczne, pochodzące z macierzy pozakomórkowej.

Parakrynną aktywacja receptora Met przez swoisty czynnik HGF/SF, wydzielany głównie przez komórki CAF, jest także ważnym procesem prowadzącym do powstania w komórkach zdolności do inwazyjnego wzrostu [48]. Sam receptor Met (bez udziału ligandu HGF/SF) może tworzyć oligomeryczne struktury z różnymi receptorami (m.in. z receptorem kwasu hialuronowego CD44, integryną $\alpha_6\beta_4$, receptorami Fas, pleksyną B, receptorami EGF i Ron). Oligomeryczne struktury powodują powstanie swoistych kontekstów, które mają wpływ na przebieg różnych reakcji. Wiążąc się np. z receptorem CD44 i integryną $\alpha_6\beta_4$, receptor Met bierze udział w reakcjach adhezji i modyfikacji cytoszkieletu. Kompleksując z receptorem

Fas, może wpływać na apoptozę i przeżycie komórek. Dimeryzując z receptorem EGF Met, stymuluje wzrost komórek nowotworowych. Met stymuluje także ekspresję genów kodujących inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) i cyklooksygenazę-2 (COX-2). Okazuje się, że oba białka biorą udział w powstawaniu tzw. zespołu Trousseau (koagulopatii nowotworowej) [55].

Białkiem, które ma wpływ na kształtowanie się swoistej macierzy pozakomórkowej, jest oksydaza lizylova (LOX) [56]. Enzym ten bierze udział w powstaniu poprzecznych wiązań między kolagenami macierzy pozakomórkowej, a elastyną. Tak zmodyfikowane białka macierzy pozakomórkowej stanowią swego rodzaju „drogę szybkiego ruchu” dla przemieszczających się komórek nowotworowych.

Udział komórek otoczenia nowotworowego w powstawaniu przerzutów

Komórki nowotworowe, które uzyskały zdolność inwazyjnego wzrostu, są komórkami predysponowanymi do tworzenia przerzutów (nabycie zdolności do inwazyjnego wzrostu określane jest jako jeden z pierwszych etapów przerzutowania). Kaskada przerzutowania stanowi końcową fazę progresji nowotworowej [57-59]. W powstawaniu przerzutów, zwłaszcza kolonizacji odległych narządów, istotną rolę odgrywają komórki środowiska nowotworowego i produkowane przez nie białka.

Niektóre dane doświadczalne wskazują na występowanie dość szczególnej fazy, poprzedzającej właściwe powstawanie przerzutów. Faza ta polega na tworzeniu swoistej niszy dla przyszłych przerzutów (faza premetastatyczna). Hirakawa i wsp. [60] stwierdzili, że w węzłach chłonnych znajdujących się najbliżej guzów pierwotnych, jeszcze przed pojawieniem się w nich komórek nowotworowych, jest indukowana limfangiogeneza. Limfangiogeneza ta nie jest indukowana przez VEGF-C czy VEGF-D, lecz przez czynnik VEGF-A, produkowany i wydzielany przez komórki nowotworowe. Sieć naczyń limfatycznych, znajdująca się wewnątrz węzłów limfatycznych, stanowi pierwsze miejsce ich kolonizacji przez komórki nowotworowe.

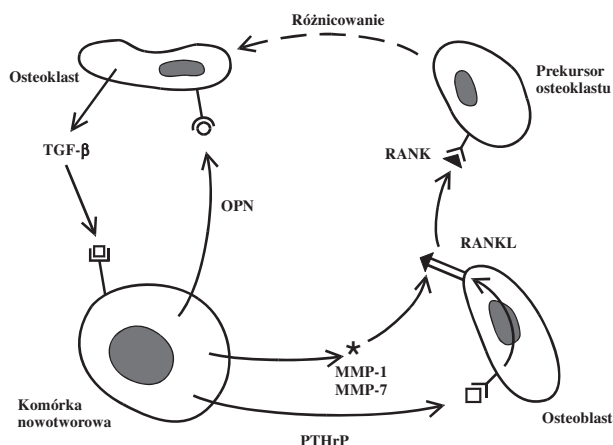
Również w procesie powstawania przerzutów z udziałem naczyń krwionośnych daje się zaobserwować obecność niszy premetastatycznej [61]. Pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe (w tym konkretnym wypadku: komórki raka płuc Lewis (LLC) lub czerniaka B16) fibroblasty znajdujące się w płucach zaczynają produkować i wydelać fibronektynę. Złogi fibronektyny są celem migracji, uwalnianych ze szpiku, hemopoetycznych komórek prekursorowych, posiadających fenotyp VEGFR1⁺VLA4⁺Id3⁺. Dzięki receptorowi VLA-4 (integrynie $\alpha_4\beta_1$) komórki hemopoetyczne mogą przyczepiać się do cząsteczek fibronektyny. Komórki te wydzielają także metaloproteinazę MMP-9, która uwalnia z błony podstawnej VEGF-A.

Komórki VEGFR1⁺, dzięki wydzielanej przez siebie chemokinie SDF-1 (CXCL12), mogą mobilizować

do powstającej niszy komórki nowotworowe, posiadające receptor CXCR4. Natomiast uwolniony VEGF-A może rekrutować prekursorowe komórki śródbłonkowe VEGFR2⁺. Dzięki temu w niszy premetastatycznej zostaje zainicjowana angiogeneza i tworzenie sieci naczyń krwionośnych, ułatwiających wzrost komórek nowotworowych.

W powstaniu przerzutów nisza premetastatyczna odgrywa zatem zasadniczą rolę [62]. Jej utworzenie w określonym narządzie, w tym przypadku w płucach, pod wpływem sygnałów wydzielanych zarówno przez komórki nowotworowe, jak i komórki prawidłowe może, w pewnym stopniu, wyjaśnić predestynację komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów w ściśle określonych narządach.

Przy powstawaniu przerzutów, w niektórych narządach, dochodzi niekiedy do równie złożonych relacji między komórkami nowotworowymi, a niektórymi komórkami prawidłowymi. Szczególne relacje zachodzą między osteoklastami, a komórkami nowotworowymi w powstawaniu przerzutów do kości [58]. Homeostaza w tkance kostnej jest wynikiem subtelnej równowagi między osteoblastami a osteoklastami. Tworzące przerzuty komórki nowotworowe naruszają tę równowagę (Ryc. 2). Uwalniany przez osteoklasty z macierzy pozakomórkowej TGF- β jest czynnikiem, stymulującym wydzielanie przez komórki nowotworowe szeregu różnych czynników, w tym także peptydu, pochodnego hormonu przytarczycznego (PTHrP) (*Parathyroid Related Peptide*). W komórkach osteoblastów peptyd ten indukuje ekspresję szeregu cytokin, m.in. M-CSF, IL-6, IL-8, IL-11 oraz czynnika RANKL (liganda receptora aktywującego NF κ B). Komórki nowotworowe wydzielają także inhibitor czynnika RANKL: osteoprotegerynę (OPN), która hamuje szereg reakcji osteoklastów zachodzących podczas przerzutowania. Metaloproteiny (MMP-1, MMP-7), wydzielane głównie przez komórki nowotworowe, trawią RANKL do bardziej aktywnej formy RANK. Czynniki RANK stymulują różnicowanie prekursorów osteoklastów do osteoklastów, które zaczynają wydelać szereg czynników wzrostowych komórek nowotworowych. Mówiąc w wielkim skrócie: komórki nowotworowe



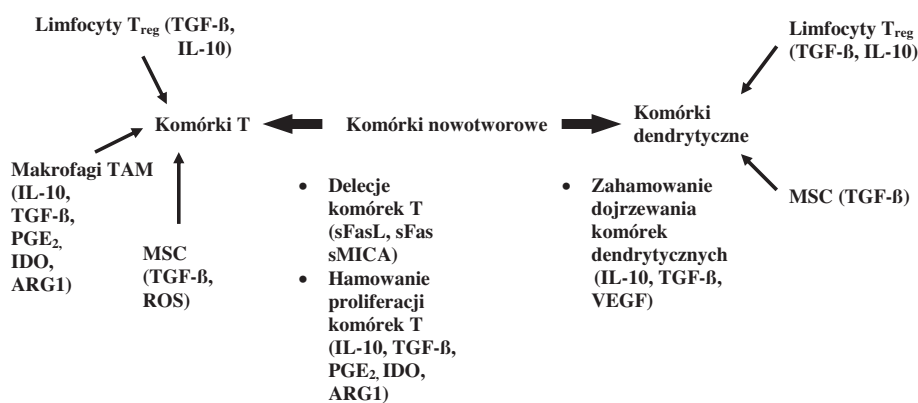
Ryc. 2. Relacje między komórką nowotworową a komórkami prawidłowymi w procesie powstawania przerzutów do kości (według Gupty i Massagué [58], zmienione)

wydzielają czynniki aktywujące osteoblasty, a te z kolei aktywują osteoklasty, które produkują szereg czynników stymulujących wzrost komórek nowotworowych („błędne koło”).

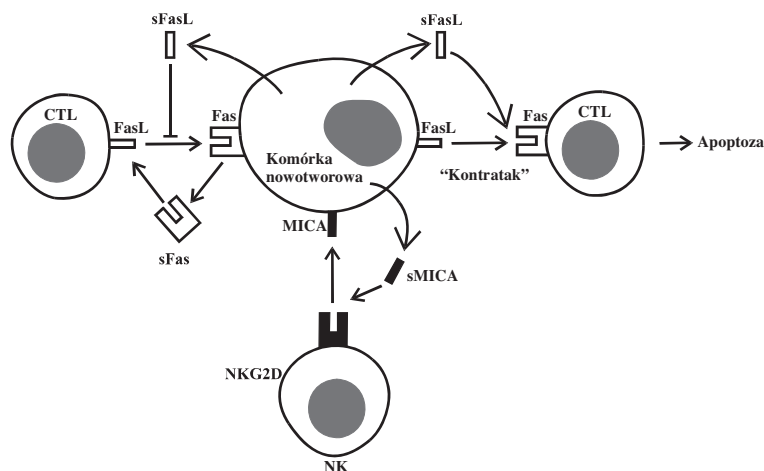
Podane powyżej przykłady ilustrują dość złożone relacje między komórkami nowotworowymi a prawidłowymi, które mają miejsce podczas inwazyjnego wzrostu i powstawania przerzutów. Jasne, że powstawanie przerzutów w różnych narządach i tkankach jest wynikiem wielu unikalnych relacji, swoistych dla danego miejsca [58].

Tolerancja odpornościowa

Jedną z charakterystycznych cech komórek nowotworowych jest zdolność hamowania odpowiedzi odpornościowej i wywołania tolerancji: stanu, w którym układ odpornościowy nie reaguje na nowotworowe antygeny [2-4]. Komórki nowotworowe hamują odpowiedź odpornościową przy pomocy różnych mechanizmów (Ryc. 3). Jednym z lepiej poznanych jest hamowanie proliferacji efektorowych komórek T. Komórki nowotworowe wydzielają szereg czynników immunosupresyjnych (m.in. IL-10, TGF- β , prostaglandynę PGE₂), które hamują proliferację



Ryc. 3. Powstawanie tolerancji odpornościowej. W jej powstaniu biorą udział komórki nowotworowe, makrofagi TAM, limfocyty T_{reg} oraz komórki MSC (nieblastyczne komórki supresorowe). Głównymi cytokinami immunosupresyjnymi są IL-10, TGF- β oraz PGE₂



Ryc. 4. Udział sFas, sFasL i sMICA w ucieczce komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego (według Kima i wsp. [4], zmienione)

komórek T. Wpływ na proliferację komórek T ma także wzmożona aktywność dwóch enzymów nowotworowych: arginazy 1 (ARG1) i 2,3-dioksygenazy indoleaminy (IDO). Enzymy te metabolizują odpowiednio: argininę do ornityny i mocznika, oraz tryptofan do N-formylo-kynureiny. Intensywny katabolizm argininy i tryptofanu powoduje gwałtowny spadek poziomu obu aminokwasów w środowisku i, w efekcie, zahamowanie proliferacji i anergię komórek T. Negatywny wpływ na proliferację komórek T mają także makrofagi TAM, wydzielające IL-10, TGF- β i PGE₂ oraz ich enzymy ARG1 i IDO, a także mieloblastyczne komórki supresorowe (MSC), wydzielające TGF- β i ROS.

Drugim ważnym procesem, mającym wpływ na odpowiedź immunologiczną, jest zahamowanie dojrzewania komórek dendrytycznych [3, 4]. Dojrzewanie komórek dendrytycznych hamują cytokiny VEGF, IL-10, TGF- β , wydzielane przez komórki nowotworowe oraz TGF- β , produkowany przez komórki MSC.

W powstaniu tolerancji odpornościowej biorą także udział swoiste limfocyty regulatorowe T_{reg} (CD4⁺CD25⁺; FOXP⁺) [4, 63]. Limfocyty te, dzięki wydzielanym cytokinom TGF- β i IL-10, nie tylko hamują proliferację limfocytów CD8⁺, ale mają również wpływ na dojrzewanie komórek dendrytycznych. Powstające w węzłach chłonnych limfocyty T_{reg} są rekrutowane przez komórki nowotworowe i makrofagi wydzielające chemokinę CCL22 [64].

Znaczny wpływ na hamowanie odpowiedzi immunologicznej mają także tzw. rozpuszczalne ligandy sFasL i receptory sFas, które są uwalniane („złuszczone”) z powierzchni komórek nowotworowych przy pomocy niektórych proteaz [4] (Ryc. 4). Dzięki temu procesowi komórki nowotworowe mogą być nie rozpoznawane przez komórki limfocytów T i komórki NK. Rozpuszczalne receptory sFas wiążą ligandy FasL, znajdujące się na powierzchni komórek CTL i zapobiegają w ten sposób indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych. Natomiast rozpuszczalne ligandy sFasL, łącząc się z receptorami Fas, znajdującymi się na komórkach CTL, indukują w nich apoptozę (ten swego rodzaju „kontratak”

atak” komórek nowotworowych ma wpływ na liczebność komórek CTL). Także „złuszczone” z powierzchni komórek nowotworowych ligandy MICA (tzw. rozpuszczalny ligand sMICA) blokują receptory NKG2D, znajdujące się na powierzchni komórek NK. W ten sposób komórki nowotworowe stają się „oporne” na cytotoksyczne działania limfocytów CTL i komórek NK [2] (Ryc. 4).

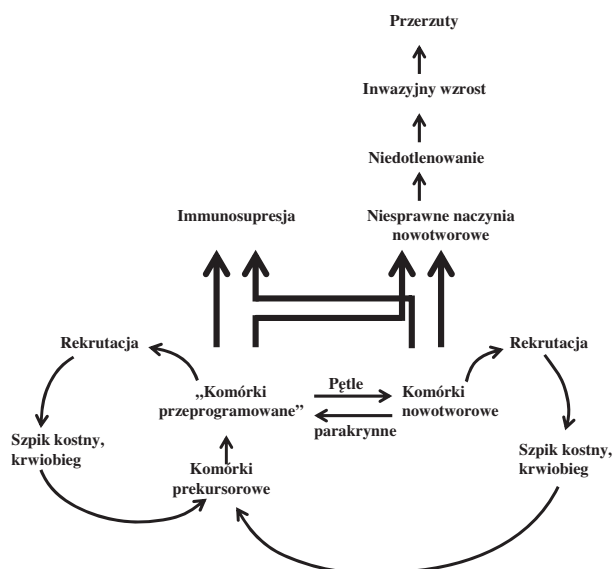
Mikrośrodowisko nowotworowe i progresja nowotworowa

Jak zatem wygląda udział komórek mikrośrodowiska nowotworowego i ich produktów w progresji nowotworowej? Wiele danych wskazuje, że przy pomocy odpowiednich cytokin i chemokin, komórki nowotworowe rekrutują ze szpiku, krwiobiegu, węzłów chłonnych, szereg różnych komórek, w tym także komórki odczynu zapalnego. Pod wpływem komórek nowotworowych, komórki te ulegają następnie swoistemu „przeprogramowaniu”. Stają się swoistymi, uczulonymi przez komórki nowotworowe: makrofagami, fibroblastami, komórkami dendrytycznymi, komórkami śródbłonkowymi naczyń krwionośnych i limfatycznych (Ryc. 5).

Swoiste dla nowotworów komórki mikrośrodowiska mają wspólne cechy: pod względem fenotypowym są komórkami niedojrzalymi (nie są komórkami terminalnie zróżnicowanymi). Komórki takie tworzą często wzajemne parakrynnne relacje z komórkami nowotworowymi („dialog komórkowy”). W wyniku tych relacji komórki mikrośrodowiska pełnią nowe, „wymuszone” przez komórki nowotworowe funkcje. Szereg tych funkcji jest wykorzystywanych przez komórki nowotworowe w procesie progresji.

Komórki mikrośrodowiska guzów pierwotnych stanowią zatem swego rodzaju niszę. Nisza ta umożliwia komórkom nowotworowym przeprowadzenie dwóch wielkich procesów: uciezki komórek nowotworowych spod nadzoru układu odpornościowego oraz powstania naczyń krwionośnych i limfatycznych.

Jedną z charakterystycznych cech niesprawnego, upośledzonego pod względem funkcjonalnym, unaczy-



Ryc. 5. Zależność między komórkami nowotworowymi a prawidłowymi w procesie progresji nowotworowej. Komórki nowotworowe rekrutują komórki prekursorowe, które ulegają swoistemu „przeprogramowaniu”. Przeprogramowane komórki środowiska nowotworowego biorą udział w tolerancji immunologicznej oraz w powstawaniu naczyń. Powstające w guzach nowotworowych niedotlenowanie indukuje inwazyjny wzrost komórek nowotworowych

nienia będzie pojawiające się w różnych regionach guzów nowotworowych niedotlenowanie. W wysoce selektywnych warunkach niedotlenowania przetrwają populacje komórek nowotworowych, posiadające zdolność beztlenowej glikolizy, inwazyjnego wzrostu i tworzenia przerzutów. Komórki te, dzięki swej oporności na efektorowe funkcje układu odpornościowego oraz immunosupresyjne właściwości, będą tolerowane przez układ odpornościowy.

Kolonizacja odległych narządów podczas przerzutowania wiązać się będzie z powstaniem nowego rodzaju niszy (tzw. niszy premetastatycznej). Tworzyć ją będą komórki mikrośrodowiska nowotworowego i wydzielane przez nie cytokiny, chemokiny, enzymy proteolityczne itd.

Komórki mikrośrodowiska nowotworowego jako cele terapeutyczne

Podstawowym zadaniem terapii przeciwnowotworowej jest konstrukcja leków rozpoznających i niszczących określone cele molekularne [65, 66]. Celami tymi są głównie białka odgrywające kluczową rolę w regulacji ważnych procesów życiowych komórek nowotworowych. Niektóre leki: antysensy, rybozomy i siRNA degradują produkty transkrypcji i hamują w ten sposób ekspresję genu kodującego określone białko (ściślej: zapobiegają powstaniu białka). Inne mogą neutralizować lub hamować aktywność istniejącego białka. Do tej ostatniej grupy leków można zaliczyć m.in.: przeciwciała, immunotoksyny (białka fuzyjne składające się z fragmentów przeciwciała i toksyn), swoiste inhibitory enzymów, antagonistów ligandów, pułapkowe receptory czynników wzrostowych i cytokin.

Stosunkowo skutecznymi lekami przeciwnowotworowymi okazały się swoiste przeciwciała i niskocząsteczkowe inhibitory kinaz tyrozynowych [67]. Klasycznymi przykładami leków rozpoznających i niszczących bezpośrednio komórki nowotworowe są np.: cetuximab, trastuzumab i glivec. Dwa pierwsze leki to monoklonalne przeciwciała. Cetuximab rozpoznaje i blokuje aktywność receptora EGFR, a trastuzumab receptora HER-2. Glivec natomiast jest niskocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej białka BCR-ABL i receptora c-Kit (w istocie glivec jest antagonistą ATP, wiązanego przez centra aktywne tych kinaz). Oprócz neutralizowania właściwego celu terapeutycznego przeciwciała uruchamiają dodatkowe mechanizmy cytotoksyczne, takie jak choćby cytotoksyczność, zależną od komplementu [67]. Obecnie w badaniach znajdują się nowe generacje inhibitorów kinaz tyrozynowych. Są to leki, które działają na komórki odporne na leki pierwszej generacji [68].

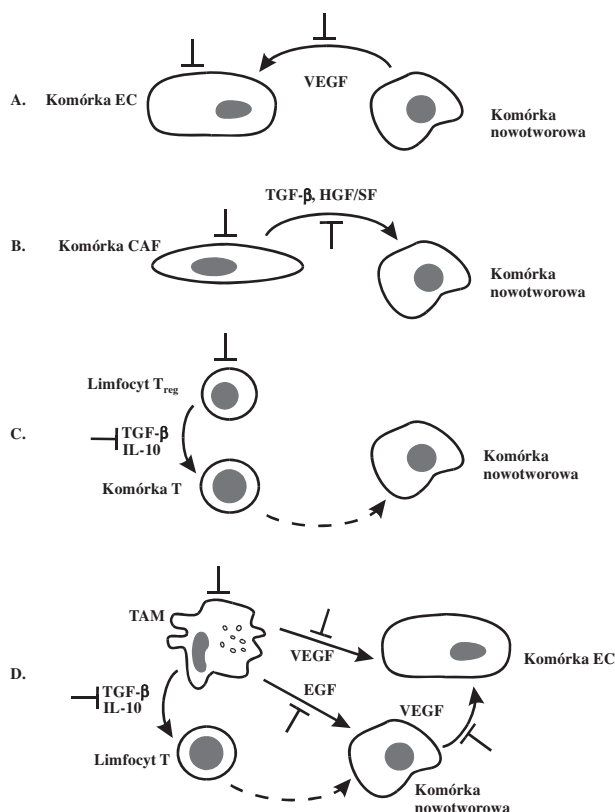
Lekami działającymi pośrednio na komórki nowotworowe są natomiast te leki, które działają na prawidłowe komórki mikrośrodowiska nowotworowego. Ponieważ niektóre funkcje życiowe komórek nowotworowych są uzależnione od komórek prawidłowych, swoistych dla nowotworów, niszcząc te ostatnie można doprowadzić do zniszczenia także komórek nowotworowych. Podręcznikowym wręcz przykładem jest tu zależność komórek nowotworowych od własnego systemu naczyniowego: uszkadzając i niszcząc nowotworowy system naczyniowy doprowadza się do śmierci komórek nowotworowych (tzw. „efekt głodzenia komórek nowotworowych”) [28].

W dalszej części artykułu zostaną omówione te strategie terapeutyczne, których celem są różne komórki środowiska nowotworowego (Ryc. 6). Najwięcej prac dotyczy rozwiązań, których celem są komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych oraz komórki układu odpornościowego. Próby wykorzystania w terapii jako celów terapeutycznych makrofagów TAM i fibroblastów CAF są, jak na razie, w fazie doświadczalnych badań przedklinicznych.

Komórki śródbłonkowe naczyń nowotworowych

Jednym z lepiej zbadanych leków antyangiogennych, działających na komórki śródbłonkowe, biorące udział w powstawaniu naczyń nowotworowych, jest przeciwciało anty-VEGF (tzw. avastin, bevacizumab). Lek ten hamuje aktywność kluczowego czynnika proangiogennego VEGF-A. W kombinacji z irinotekaniem, fluorouracylem i leukoworyną, w znamienny sposób wydłuża czas przeżycia pacjentów z przerzutami raka okrężnicy [69].

W zależności od „kontekstu” (a więc rodzaju nowotworu, sposobu podawania, wielkości dawek itd.) avastin wywołuje w niektórych nowotworach tzw. „normalizację” naczyń, stan, w którym naczynia nowotworowe zaczynają przypominać naczynia prawidłowe [70]. Dzięki „normalizowanym” naczyniom poprawia się utlenowanie komórek nowotworowych i polepsza dostęp leków do komórek



Ryc. 6. Komórki środowiska nowotworowego oraz niektóre cytokiny jako cele terapii przeciwnowotworowej

- A – przedstawia relacje między komórkami nowotworowymi a komórkami śródbłonna; czynniki terapeutyczne działają zarówno na komórki śródbłonkowe, jak i na VEGF wydzielany przez komórki nowotworowe
- B – przedstawia relacje między komórkami nowotworowymi a komórkami CAF; czynniki terapeutyczne działają zarówno na komórki CAF, jak i na TGF- β i HGF/SF, wydzielane przez komórki CAF
- C – przedstawia relacje między komórkami T_{reg}, limfocytami T a komórkami nowotworowymi; zahamowanie wydzielania TGF- β , IL-10 oraz zmniejszenie liczby T_{reg} ma wpływ na efekt terapeutyczny (zniesienia tolerancji)
- D – przedstawia relacje między komórkami TAM, komórkami śródbłonna (EC), limfocytami T a komórkami nowotworowymi; czynniki terapeutyczne mogą działać na TGF- β , IL-10, VEGF i EGF, a także bezpośrednio na same komórki TAM

nowotworowych. Avastin zmniejsza także ilość krążących w krwiobiegu prekursorów komórek śródbłonkowych.

Badania kliniczne III fazy z udziałem avastinu, a także innych czynników anti-VEGF wskazują zarówno na walory, jak i ograniczenia leków antyangiogennych [71]. Monoterapia z udziałem avastinu nie jest skuteczna. Natomiast kombinacja avastinu z chemioterapią wydłuża czas przeżycia pacjentów z przerzutującymi rakami okrężnicy, a także pierwotnymi rakami piersi i płuc. Ta sama kombinacja avastinu i chemioterapii nie ma jednak wpływu na przeżycie pacjentów z przerzutującymi rakami piersi. Zastąpienie avastinu niskocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej (vatalanibem), w kombinacji z chemioterapią, nie ma wpływu na przeżycie pacjentów z przerzutującymi rakami okrężnicy. Monoterapia z udziałem drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz, działających na enzymy występujące zarówno w komórkach nowotworowych, jak i śródbłonkowych

(np. sutinitibu – inhibitora VEGFR2, PDGFR- β , FLT3, c-Kit i sorafenibu – inhibitora kinazy Raf, VEGFR2, PDGFR- α , PDGFR- β , FLT3 i c-Kit), okazuje się skuteczną i wydłuża życie pacjentów. Jest to pierwszy i dobrze udokumentowany przypadek skutecznej monoterapii przeciwnowotworowej z udziałem czynników antyangiogennych. Terapia z udziałem czynników anti-VEGF ma jednak niepożądane skutki uboczne (m.in. perforacje pęcherza, fenestracja naczyń w nerkach) [71].

Brak obiektywnych wskaźników efektywności leczenia (biomarkerów) utrudnia właściwą ocenę postępów wszelkich terapii cytostatycznych, w tym także terapii antyangiogennej [71]. W ocenie postępów terapii antyangiogennej korzysta się zatem z tzw. markerów zastępczych (*surrogate markers*). Postępy terapii próbuje się ocenić, oznaczając np. ilość krążących w krwiobiegu komórek śródbłonkowych, stopień utlenowania guzów, mierząc ciśnienie śródmiąższowe w guzach, jak i niektóre parametry przepływu krwi w naczyniach przy pomocy PET, CET, MRI.

W trakcie terapii antyangiogennej w guzach nowotworowych pojawia się oporność na leki antyangiogenne [72]. Jedną z przyczyn tej oporności jest duża liczba różnych czynników proangiogennych, które z powodzeniem mogą kompensować brak któregoś z nich. Źródłem oporności jest także dublowanie różnych dróg i szlaków sygnałowych, biorących udział w powstawaniu naczyń. Ponadto, w wyniku stosowania terapii antyangiogennej w guzach nowotworowych pojawia się niedotlenowanie, które w przeżywających komórkach nowotworowych może indukować inwazyjny wzrost i zdolność do przerzutowania [73].

Odrębnym wariantem terapii antyangiogennej jest immunoterapia: próba uzyskania odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko naczyniom nowotworowym, a ściślej mówiąc: przeciwko swoistym białkom, znajdującym się na powierzchni komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych, np. receptorom VEGFR2 [74].

Odpowiedź immunologiczną przeciwko VEGFR2 można uzyskać, immunizując zwierzęta obcogatunkowym białkiem VEGFR2 [75] lub przy pomocy szczepionki DNA, która zawiera gen kodujący autologiczne białko VEGFR2 [76]. Szczepionkę DNA można wprowadzać zwierzętom za pośrednictwem odpowiednio atenuowanych bakterii *Salmonella typhimurium*. W pierwszym wypadku uzyskuje się odpowiedź odpornościową w postaci autoprzeciwciał, skierowanych przeciwko VEGFR2 [75]. W drugim – uzyskuje się odpowiedź w postaci swoistych limfocytów T, rozpoznających VEGFR2 [76]. W obu wypadkach powstająca odpowiedź immunologiczna pozwalała na zahamowanie wzrostu naczyń i, tym samym, guzów nowotworowych. Powstająca pamięć immunologiczna umożliwia także stosunkowo długie zahamowanie wzrostu guzów nowotworowych (zapobiegała wznowie). Kombinacja tak zaprojektowanej immunoterapii z chemioterapią, przynajmniej na modelach zwierzęcych nowotworów, okazała się terapią dość skuteczną [77].

Rozwiązaniem, które pozwala ominąć niektóre ograniczenia terapii antyangiogennej, jest tzw. terapia antynaczyniowa [78, 79]. Celem tej terapii są naczynia nowotworowe. Niektóre leki antynaczyniowe są tak zaprojektowane, że mają zarówno zdolność rozpoznawania markerów swoistych dla naczyń nowotworowych, jak i zdolność ich niszczenia [80]. Przykładem może być białko fuzyjne, które składa się z czynnika VEGF (liganda, wysoce swoistego dla naczyń nowotworowych, receptora VEGFR2) oraz skoniugowanej z ligandem białkowej toksyny [81-84]. Po internalizacji do wnętrza docelowej komórki skoniugowanego z toksyną liganda i po uwolnieniu z pęcherzyków endosomowych białka fuzyjnego, w komórkach docelowych jest indukowana apoptoza. Niszczenie komórek śródbłonkowych pociąga za sobą poważne uszkodzenia naczyń, powstanie skrzepów i martwicę komórek nowotworowych, leżących w najbliższym sąsiedztwie uszkodzonych naczyń [78, 79].

Leki antynaczyniowe mają szereg unikalnych właściwości [85, 86]. W przeciwieństwie do cytostatycznych leków antyangiogennych, leki antynaczyniowe są lekami cytotoksycznymi. Kilka dawek pozwala zniszczyć większość naczyń nowotworowych i wywołać martwicę u większości komórek nowotworowych (leki antyangiogenne, które zapobiegają powstawaniu naczyń, podaje się w sposób ciągły). W przeciwieństwie do leków antyangiogennych, których celem są raczej małe guzy, leki antynaczyniowe można stosować do niszczenia dużych guzów z dobrze uformowaną siecią naczyń krwionośnych.

Leki antynaczyniowe nie niszczą jednak wszystkich komórek nowotworowych. Na obrzeżach guzów nowotworowych pozostaje warstwa żywych komórek [79]. Prawdopodobnie komórki te są odżywiane przez „oporne” na działanie leków antynaczyniowych naczynia prawidłowe, dochodzące do guzów nowotworowych. Pewien wpływ na grubość tej warstwy wydają się mieć także komórki prekursorowe śródbłonnków naczyń, rekrutowane działaniem czynników antynaczyniowych. Zniszczenie komórek prekursorowych przy pomocy dodatkowych leków wyraźnie wpływa na efekty terapeutyczne [87]. Powodzenie terapii antynaczyniowej zależy zatem w dużym stopniu od znalezienia dodatkowych czynników, skutecznie niszczących lub też ograniczających przeżywalność komórek nowotworowych [88].

Komórki CAF

Komórki CAF wydzielają cytokiny TGF- β i VEGF, charakterystyczny czynnik wzrostowy HGF/SF, oraz chemokinę SDF-1. TGF- β i HGF/SF to dwa główne czynniki biorące udział w powstawaniu EMT i w inwazyjnym wzroście komórek nowotworowych. TGF- β może być celem działania swoistych przeciwciał, niskocząsteczkowych inhibitorów oraz antysensów [89]. Rozpuszczalne receptory („receptory pułapkowe”) dla TGF- β i HGF/SF okazały się skuteczne w hamowaniu powstawania przerzutów nowotworów zwierząt doświadczalnych [90-92]. Zwłaszcza kombinacja pułpkowego receptora HGF z radioterapią okazała się kombinacją szczególnie efektywną [91].

Fibroblasty CAF są także celem swoistego leku: sibtuzumabu [21]. Jest to przeciwciało, rozpoznające swoistą proteazę (FAP), znajdującą się na powierzchni komórek CAF.

Komórki układu odpornościowego

Oslabienie lub też zniesienie tolerancji odpornościowej może okazać się dość skutecznym rozwiązaniem terapeutycznym [3, 4, 93-95]. W procesie apoptozy komórek nowotworowych, indukowanej przez liczne chemioterapeutyki, ginące komórki nowotworowe uwalniają szereg antygenów. Antygeny te są pochłaniane przez komórki dendrytyczne i mogą być prezentowane w kontekście cząsteczek MHC I limfocytom CD8⁺ (jest to tzw. prezentacja krzyżowa). Proces prezentacji krzyżowej w nowotworach jest jednak mocno ograniczony. Prezentacja krzyżowa może być jednak wywołana reakcją prozapalną. Reakcję taką można sprowokować przy pomocy czynników kostymulatorowych: lipopolisacharydów, dsRNA, oligonukleotydów, zawierających niemetylowane sekwencje CpG. Czynniki te są rozpoznawane przez swoiste receptory TLR (receptory należące do receptorów Toll – podobnych). Cząsteczki oligonukleotydów zawierające niemetylowane sekwencje CpG, po przyłączeniu do swoistego receptora TLR9, aktywują komórki dendrytyczne i stymulują odpowiedź immunologiczną [96].

Na osłabienie tolerancji odpornościowej ma także wpływ inaktywacja regulatorowych limfocytów T_{reg} (inaktywacja limfocytów T_{reg} znosi ich supresyjne działanie na limfocyty CD8⁺) [3]. Zmniejszenie liczby limfocytów T_{reg} w guzach nowotworowych można uzyskać przy pomocy swoistych przeciwciał lub leku o symbolu DAB(389)IL-2 (ONTAK). Lek ten jest dwudomenowym białkiem, składającym się z domeny rozpoznającej limfocyt T_{reg} (w tym wypadku jest to IL-2, dla której receptor znajduje się na powierzchni tych limfocytów) oraz domeny efektorowej: toksyny dyfterytu [97]. Związane z receptorem IL-2R białko fuzyjne ulega internalizacji i po uwolnieniu z pęcherzyków endosomalnych indukuje w komórkach limfocytów śmierć apoptotyczną. Aby uniknąć ogólnoustrojowej immunosupresji, leki takie podaje się wprost do guzów nowotworowych.

Lekami, które mogą także osłabić tolerancję odpornościową, są niskocząsteczkowe inhibitory arginazy (np. N-hydroksy-nor-L-arginina), oraz 2,3-dioksygenazy indoleaminy (np. 1-metylotryptofan). Inhibitory COX-2 (enzymu biorącego udział m.in. w syntezie prostaglandyny PGE₂), mimo wstępnych zachęcających danych, wykazują jednak efekty uboczne [98]. Z tych też względów zaniechano badań klinicznych z ich udziałem [17].

Komórki TAM

W procesie nowotworzenia komórki TAM pełnią niezwykle zróżnicowaną rolę. W zależności od usytuowania („kontekstu”) mogą być komórkami biorącymi udział w powstawaniu tolerancji immunologicznej, w angiogenezie, proliferacji komórek nowotworowych i w ich in-

wazyjnym wzroście. Komórki TAM, w zależności od kontekstu środowiskowego, mogą posiadać różne fenotypy i wydzielać różne cytokiny, czynniki wzrostowe i enzymy proteolityczne. Zmniejszenie liczebności komórek TAM może mieć zatem duże znaczenie terapeutyczne.

Celem terapeutycznym mogą być zatem swoiste białka, produkowane przez różne populacje komórek TAM, jak i same komórki TAM [15, 99]. Celami terapeutycznymi mogą stać się produkowane i wydzielane przez komórki TAM cytokiny: VEGF, TGF- β , HGF/SF, oraz komórkowe enzymy:IDO, ARG1, jak i niektóre czynniki transkrypcyjne, np. NF κ B, HIF-1. Komórki TAM mogą być również wykorzystywane jako nośniki leków, zwłaszcza leków aktywowanych niedotlenowaniem [100]. Opakowane w liposomach leki są wprowadzane do komórek TAM drogą fagocytozy. Dzięki komórkom TAM leki takie mogą być transportowane do rejonów niedotlenowanych, do których tradycyjne leki z trudem docierają.

Podsumowanie końcowe

Celami współczesnej terapii przeciwnowotworowej stają się zarówno komórki nowotworowe, jak i swoiste dla nowotworów prawidłowe komórki środowiska okołonowotworowego. Niestety, stosowanie leków działających bezpośrednio na komórki nowotworowe, rozpoznających zdefiniowane cele molekularne, ma swoje ograniczenia. Dotyczą one głównie powstającej lekooporności komórek nowotworowych. Dodatkowe ograniczenia mogą być także spowodowane występowaniem barier, utrudniających dostępność leków do komórek nowotworowych. Barierami tymi mogą być: zwiększone ciśnienie śródmiąższowe, panujące wewnątrz guzów nowotworowych, jak i spowolniony przepływ krwi w naczyniach nowotworowych. Ponadto, niestabilność genetyczna komórek nowotworowych sprawia, że w nowopowstających populacjach komórek niektóre cele terapeutyczne mogą zanikać. Powoduje to oczywistą konieczność poszukiwania nowych celów terapeutycznych, jak i stosowania nowych generacji leków, działających na komórki odporne na leki poprzedniej generacji.

Równie poważne ograniczenia mają leki działające na cele pośrednie, a więc na prawidłowe komórki tworzące mikrośrodowisko nowotworowe. Leki te mogą działać na same komórki mikrośrodowiska, jak i na czynniki wzrostowe, cytokiny, chemokiny, biorące udział we wzajemnych relacjach między komórkami prawidłowymi, a nowotworowymi (zob. Ryc. 6). Również komórki mikrośrodowiska nowotworowego mogą indukować swoistą oporność. Podobnie jak leki działające bezpośrednio na komórki nowotworowe, także leki działające na komórki prawidłowe mogą z trudem docierać do swoich celów terapeutycznych. Mimo oczywistych ograniczeń obu rodzajów leków celem badań prowadzonych w wielu zespołach, oprócz konstruowania coraz to nowszych leków, jest także poszukiwanie takich kombinacji leków, które nie będą zwykłą sumą działań ich elementów składowych, ale będą dawały rzeczywisty efekt synergiczny.

Postępy współczesnej terapii, w znacznym stopniu, będą zależały również od znalezienia takich kombinacji [101, 102].

Podziękowania

Autor wyraża głęboką wdzięczność prof. Cz. Radzikowskiemu za cenne uwagi krytyczne oraz swoim najbliższym współpracownikom za pomoc w redagowaniu tej pracy.

Prof. dr hab. Stanisław Szala
Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Wyrbrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
e-mail: sszala@io.gliwice.pl

Piśmiennictwo

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-48.
- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 263-247.
- Kim R, Emi M, Tanabe K i wsp. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2006; 66: 5527-36.
- Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2005; 7: 513-20.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; 7: 211-7.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M. i wsp. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-55.
- Pollard JW. Tumor – educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nature Rev Cancer* 2004; 4: 71-78.
- Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124: 263-6.
- Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66: 605-12.
- Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; 104: 2224-34.
- Hofmeister V, Vetter C, Schrama D i wsp. Tumor stroma-associated antigens for anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 481-94.
- Shortman K, Naik SH. Steady – state and inflammatory dendritic – cell development. *Nature Rev Immunol* 2007; 7: 19-30.
- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB i wsp. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 2005; 65: 5278-83.
- Muller AJ, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 613-25.
- Langowski JL, Zhang X, Wu L i wsp. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-5.
- de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 2005; 7: 411-23.
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 24-37.
- Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 392-401.

22. Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 436-46.
23. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004; 432: 332-37.
24. Pennacchietti S, Michieli P, Galuzzo M i wsp. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the *met* protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3: 347-61.
25. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC i wsp. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121: 335-48.
26. Hida K, Klagsbrun M. A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res* 2005; 65: 2507-10.
27. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature Med* 2003; 9: 713-25.
28. Folkman J, Kalluri R. Tumor angiogenesis. W: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR i wsp. (red.) *Cancer Medicine*. Hamilton, London, BC Decker Inc.; 2003, 161-94.
29. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Rev* 2004; 25: 581-11.
30. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-74.
31. Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005; 436: 193-200.
32. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003; 9: 653-60.
33. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Med* 2003; 9: 685-93.
34. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999; 18: 5356-62.
35. Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. The vascular network of tumours – what is it not for? *J Pathol* 2003; 201: 173-80.
36. Vaupel P. Abnormal microvasculature and defective microcirculatory function in solid tumors. W: Siemann DW. (red.) *Vascular-target therapies in oncology*. Chichester, John Wiley and Sons Ltd, 2006, 9-29.
37. McDonald DM, Baluk P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 5381-85.
38. Rak J. Onkogeny jako modyfikatory procesów naczyniowych w nowotworach. *Nowotwory* 2006; 56: 57-79.
39. Rak J, Yu JL, Luyendyk J, Mackman N. Oncogenes, Trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. *Cancer Res* 2006; 66: 10643-6.
40. Reijkerk A, Voest EE, Gebbink MF. No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1695-705.
41. Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Tissue factor signal transduction in angiogenesis. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1009-13.
42. Folkman J. Looking for a good endothelial address. *Cancer Cell* 2002; 1: 113-5.
43. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005; 438: 946-53.
44. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; 441: 437-43.
45. Kim J-w, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006; 66: 8927-8930.
46. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S i wsp. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* 2006; 237: 10-21.
47. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA i wsp. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncol* 2005; 7: 134-53.
48. Bocciaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a *MET*-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 637-645.
49. Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277-79.
50. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441: 444-50.
51. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Rev Cancer* 2004; 4: 118-32.
52. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor – host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379.
53. Geho DH, Bandle TC, Clair T i wsp. Physiological mechanism of tumor – cell invasion and migration. *Physiology* 2005; 20: 194-200.
54. Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 4549-52.
55. Bocciaccio C, Sabatino G, Medico E i wsp. The *MET* oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005; 434: 396-400.
56. Erler JT, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res* 2006; 66: 10238-41.
57. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Med* 2006; 12: 895-904.
58. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127: 679-95.
59. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 449-58.
60. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R i wsp. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med* 2005; 201: 1089-99.
61. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S i wsp. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-27.
62. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the “soil”: the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006; 66: 11089-93.
63. Yu P, Fu Y-X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* 2006; 86: 231-45.
64. Curiel TJ, Coukos G, Zou L. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Med* 2004; 10: 942-9.
65. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004; 432: 294-7.
66. Benson JD, Chen YNP, Cornell-Kennon SA i wsp. Validating cancer drug targets. *Nature* 2006; 441: 451-56.
67. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 714-727.
68. Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 2006; 312: 1175-8.
69. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W i wsp. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N England J Med* 2004; 350: 2335-42.
70. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58-62.
71. Jain RK, Duda DG, Clark JW i wsp. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clin Pract Oncol* 2006; 3: 24-40.
72. Jubb AM, Oates AJ, Holden i wsp. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 626-35.
73. Steeg P. Angiogenesis inhibitors: motivators of metastasis? *Nature Med* 2003; 9: 822-3.
74. Reisfeld RA, Niethammer AG, Luo Y i wsp. DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of anti-angiogenesis. *Immunol Rev* 2004; 199: 181-90.
75. Liu J, Wei Y, Yang L i wsp. Immunotherapy of tumors with vaccine based on quail homologous vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 2003; 102: 1815-23.
76. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC i wsp. A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nature Med* 2002; 8: 1369-75.
77. Loeffler M, Kruger JA, Reisfeld RA. Immunostimulatory effects of low-dose cyclophosphamide are controlled by inducible nitric oxide synthase. *Cancer Res* 2005; 65: 5027-30.
78. Thorpe FE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 415-27.
79. Tozer GM, Kanthou Ch, Baguley BC. Disrupting tumor blood vessels. *Nature Cancer Rev* 2005; 5: 423-36.
80. Szala S. Two-domain vascular disruptive agents in cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* 2004; 4: 501-9.
81. Arora N, Masood R, Zheng T i wsp. Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Res* 1999; 59: 183-88.
82. Veenedaal LM, Jin H, Ran S i wsp. *In vitro* and *in vivo* studies of a VEGF₁₂₁/rGelolin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7866-71.
83. Liu Y, Cheung LH, Thorpe P i wsp. Mechanistic studies of a novel, human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)₁₂₁ and the serine protease granzyme B: direct apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 949-59.
84. Smagr A, Boyko M, Biront N i wsp. New chimeric protein ABRaA-VEGF₁₂₁ is selectively cytotoxic towards cells overexpressing VEGFR2 (KDR) receptor and inhibits growth of primary tumors (w przygotowaniu do druku).
85. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG i wsp. Differentiation and definition of vascular- targeted therapies. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 416-20.

86. Siemann DW. Tumor vasculature: a target for anticancer therapies. W: Siemann DW. (red.) *Vascular-target therapies in oncology*. Chichester, John Wiley and Sons Ltd, 2006, 1-8.
87. Shaked Y, Ciarrocchi A, Franco M i wsp. Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. *Science* 2006; 313: 1785-7.
88. Horsman MR, Siemann DW. Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies. *Cancer Res* 2006; 66:11520-39.
89. Bieri B, Moses HL. TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 506-520.
90. Yang Y, Dukhanina O, Tang B i wsp. Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest* 2002; 109: 1607-15.
91. Michieli P, Mazzone M, Basilico C i wsp. Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 2004; 6: 61-73.
92. Corso S, Comoglio PM, Giordano S. Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med* 2005; 11: 284-92.
93. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1136-51.
94. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy – a practical partnership. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 397-405.
95. van der Most RG, Currie A, Robinson BW i wsp. Cranking the immunologic engine with chemotherapy: using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity. *Cancer Res* 2006; 66: 601-4.
96. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Rev* 2006; 5: 471-84.
97. Foss FM. DAB(389)IL-2 (ONTAK): a novel fusion toxin therapy for lymphoma. *Clin Lymphoma* 2000; 1: 110-16.
98. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H i wsp. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005; 352:1092-102.
99. Colombo MP, Mantovani A. Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion. *Cancer Res* 2005; 65: 9113-6.
100. Griffiths L, Binley K, Iqbal S i wsp. The macrophage – a novel system to deliver gene therapy to pathological hypoxia. *Gene Ther* 2000; 7: 255-62.
101. Huber PE, Bischof M, Jenne J i wsp. Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. *Cancer Res* 2005; 65: 3643-55.
102. Gasparini G, Longo R, Fanelli i wsp. Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. *J Clin Oncology* 2005; 23: 1295-311.

Otrzymano i przyjęto do druku: 18 kwietnia 2007 r.