

Artykuł przeglądowy – nauki podstawowe

Przeszczepialne nowotwory jako model doświadczalny do badania procesu przerzutowania i efektywności leczenia przeciwprzerutowego

Joanna Wietrzyk, Adam Opolski, Czesław Radzikowski

Przeszczepianie mysich doświadczalnych nowotworów, a także komórek ludzkich linii nowotworowych, pochodzących z hodowli in vitro, myszom o osłabionej odporności immunologicznej, stanowi dostępny, ale i ograniczony model doświadczalny, stosowany w badaniach nad procesem nowotworowym, w tym nad mechanizmem wzrostu progresywnego i przerzutowania. W pracy przedstawiono przegląd piśmiennictwa oraz własne wyniki, dotyczące wpływu drogi przeszczepienia doświadczalnego nowotworu (lokalizacji guza pierwotnego) na dynamikę jego wzrostu, lokalizację przerzutów, a także na efektywność leczenia przeciwnowotworowego i przeciwprzerutowego. Przedyskutowano zalety i ograniczenia modeli uzyskiwania naturalnych i eksperymentalnych przerzutów, a także modelu ortotopowego przeszczepiania komórek nowotworowych.

Transplantable tumors as a study model of the biology of cancer progression and the effectiveness of antimetastatic therapy

Transplantable mouse tumors and human tumor cells grown in immunodeficient mice are widely used as experimental models in the studies on biology of cancer, including mechanisms of cancer progression and metastasis. The role of tumor cells implantation route and subsequent site of primary tumor growth on dissemination and distribution of metastases is described and discussed. The varying efficacy of antineoplastic treatment, depending on the primary tumor growth and its subsequent dissemination, is emphasized. Various models of natural and experimental metastases are described, including models of orthotopic growth of transplanted tumors.

Słowa kluczowe: przeszczepialne nowotwory, implantacja ortotopowa, angiogeneza nowotworowa, terapia antyangiogenna, terapia przeciwnowotworowa, ksenoprzeszczepy, myszy bezgranicze

Key words: transplantable tumors, orthotopic implantation, tumor angiogenesis, antiangiogenic treatment, antitumor therapy, xenotrasplantations, athymic mice

Pomimo znacznego postępu w dziedzinie onkologii, dotyczącego precyzji metod diagnostycznych i rokowniczych oraz miejscowego i systemowego leczenia, problemem pozostają przerzuty nowotworowe, trudno dostępne diagnostycznie, często niewrażliwe na leczenie. W okresie diagnostycznej dostępności guza pierwotnego, nowotwór zwykle jest rozsiany [1]. Z obserwacji klinicznych wynika, że w trakcie leczenia przerzuty dostępne diagnostycznie, zależnie od ich lokalizacji, mogą ulegać regresji lub też przeciwnie, progresji. Zaobserwowano np. u kobiet z rakiem piersi, wyższą wrażliwość na leczenie przerzutów zlokalizowanych w skórze i węzłach chłonnych w porównaniu z przerzutami do kości i płuc [2].

Wykorzystując nowe techniki badań na poziomie komórkowym i molekularnym, poznano znaczenie oddziały-

wań międzykomórkowych, rolę czynników wzrostowych, cząsteczek adhezyjnych, enzymów proteolitycznych, a także udział różnych komponentów układu odpornościowego w rozwoju procesu nowotworowego i w mechanizmie przerzutowania. Badania te potwierdzają złożoność procesu przerzutowania oraz wskazują na potrzebę poszukiwania modelu doświadczalnego *in vivo*, w którym możliwe byłoby analizowanie odtworzonych etapów tego procesu.

Jednym z najważniejszych czynników warunkujących progresywny wzrost nowotworu jest heterogenność populacji komórek nowotworowych, będąca konsekwencją niestabilności w ekspresji genów warunkujących ich zmienny fenotyp. Mimo wpływu różnych czynników środowiskowych, zdolnych do niszczenia wrażliwych komórek nowotworowych, czy ekspozycji na leki o różnym mechanizmie działania, część komórek nowotworowych może przetrwać presję czynników selekcyjnych. Przeżyć mogą komórki zdolne do opuszczenia guza pierwot-

nego i zapoczątkowania kaskady wydarzeń prowadzących do wzrostu w formie przerzutu [3]. W guzach rozwijających się w różnych narządach u myszy, selekcyjonowane są subpopulacje komórek, m.in. przez ich zdolność do proliferacji w określonym środowisku. W obrębie tej populacji komórki mogą charakteryzować się zmienną zdolnością do tworzenia przerzutów, w tym o określonej, wybiórczej lokalizacji [4] oraz zróżnicowanym fenotypem, związanym z przerzutowaniem [3, 5, 6].

„Uwolnione” z guza pierwotnego komórki nowotworowe, dzięki zmieniającym się oddziaływaniom adhezyjnym mogą migrować w kierunku nowo wytworzonych naczyń krwionośnych. Dzięki działaniu enzymów proteolitycznych, zachodzą zmiany w strukturze macierzy pozakomórkowej, ułatwiające m.in. przemieszczanie się komórek i powstanie nowych naczyń, charakteryzujących się zwiększoną przepuszczalnością. Ułatwia to intrawazację, czyli przedostanie się komórek nowotworowych do światła naczynia. Przemieszczające się z prądem krwi czy limfy, przeżywające komórki nowotworowe, mogą opuścić światło naczynia (ekstrawazacja), inicjując w sprzyjających warunkach wtórny wzrost nowotworowy w formie przerzutu. Środowisko narządu docelowego może sprzyjać ujawnieniu potencjału proliferacyjnego i tworzeniu przerzutu [1, 3].

Trwają poszukiwania udoskonalonych modeli doświadczalnych, które pozwoliłyby na dokładne śledzenie poszczególnych faz procesu nowotworowego i przerzutowania oraz na badanie efektywności leczenia przeciwrzutowego [7]. Jednym z podejść badawczych jest uzyski-

Innym stosowanym podejściem badawczym jest przeprowadzanie doświadczeń na zwierzętach o obniżonej reaktywności układu odpornościowego, u których rosną także immunogenne nowotwory syngeniczne i allogeniczne [10]. Wykorzystuje się także techniki przeszczepiania ortotopowego, tzn. wszczepianie komórek nowotworowych do naturalnego dla nich środowiska tkankowego, czy też narządowego [11].

W niniejszej pracy podano przegląd modeli doświadczalnych stosowanych w badaniu mechanizmu procesu przerzutowania oraz zwrócono uwagę na poznane nowe potencjalne cele dla terapii przeciwnowotworowej i przeciwrzutowej.

Według D. R. Welch'a, model doświadczalny *in vivo*, mający na celu poznanie mechanizmu procesu przerzutowania, powinien spełniać dwa podstawowe warunki wynikające z teorii Pageta [12] o ziarnie i glebie (*„seed and soil”*): 1/ użyte komórki muszą posiadać zdolność do przerzutowania – zakotwiczenia się i proliferacji (ziarno); 2/ komórki te będą proliferować w naturalnym, korzystnym dla nich środowisku narządowym (gleba). W zależności od drogi wszczepienia komórek nowotworowych, uzyskujemy przerzuty tzw. „eksperymentalne” (sztuczne) lub „spontaniczne” (naturalne) [13].

Przerzuty eksperymentalne

Dla uzyskania przerzutów eksperymentalnych, komórki nowotworowe wprowadza się bezpośrednio do krwiobiegu (Tab. I). Po iniekcji dożyłnej (*i.v.*) część komórek no-

Tab. I. Przykłady lokalizacji przerzutów eksperymentalnych po podaniu myszom gołym komórek ludzkich nowotworów bezpośrednio do krwiobiegu

Droga podania	Nowotwór	Lokalizacja przerzutów		Piśmiennictwo
		główna	towarzysząca	
Tętnica szyjna	Rak piersi, czerniak	Mózg, kości, szpik kostny	-	[16,17]
Żyła ogonowa boczna	Różne	Płuca	-	[11]
Żyła ogonowa boczna + zamknięcie żyły czczej	Rak gruczołu krokowego	Kości: kręgi lędźwiowe, miednica, udo	Płuca	[18,19]
Żyła wrotna	Rak jelita grubego	Wątroba	-	[11]
Śledziona	Rak jelita grubego, żołądka	Wątroba	Nerki, węzły chłonne, pęcherzyki nasienne	[20]
Serce – lewa komora	Rak piersi	Mózg	Nerki, płuca	[16]

wanie wysokoprzerzutujących wariantów przeszczepialnych nowotworów, przy zastosowaniu metody selekcji subpopulacji lub klonów o wysokim potencjale przerzutowym. Przykładem jest metoda przeprowadzania kolejnych pasażów komórek izolowanych z przerzutów płucnych, np. komórek mysiego czerniaka B16, pasażowanych na przemian *in vitro* i *in vivo* (*i.v.*) [8]. Pewną modyfikację tej techniki wprowadzili autorzy pracujący nad uzyskaniem wysokoprzerzutującej odmiany komórek mysiego raka sutka, linii 16/C. Corbett i wsp. przeszczepiali fragmenty płuc, pochodzące od myszy z rosnącym podskórnym (*s.c.*) nowotworem, pod skórę myszy – biorcy. Uzyskano w ten sposób podlinię komórkową, która w 70-100% tworzyła przerzuty w płucach i w ok. 30% w węzłach chłonnych [9].

wotworowych przeżywa w krążeniu i zasiedla narząd, w którym może się rozwijać ognisko nowotworowe. Model ten nie uwzględnia istotnego etapu złożonego i wieloetapowego procesu przerzutowania – uwalniania komórek nowotworowych z guza pierwotnego do naczyń krwionośnych i limfatycznych [szczegóły omówiono w pracach: 14,15]. W Tabeli I przedstawiono możliwości uzyskania przerzutów eksperymentalnych o różnej lokalizacji zależnej od miejsca wprowadzenia komórek nowotworowych do krwiobiegu. Dla otrzymania przerzutów (np. raka piersi lub czerniaka) zlokalizowanych w mózgu wykorzystywane jest wstrzyknięcie do tętnicy szyjnej lub do lewej komory serca [16, 17]. Iniekcja komórek różnych nowotworów do żyły ogonowej bocznej najczęściej prowadzi do zasie-

dlenia płuc [11]. Gdy dodatkowo zostanie podwiązana żyła czcza – wprowadzone komórki (raka gruczołu krokowego) częściej zasiedlają kości niż płuca [18, 19]. W celu uzyskania przerzutów do wątroby (np. komórek raków przewodu pokarmowego, gruczołu krokowego lub innych) komórki nowotworowe wstrzykuje się do żyły wrotnej lub do śledziony [11, 20].

W pracach doświadczalnych (w tym i własnych) z zastosowaniem ksenoprzeszczepów ludzkiego raka jelita grubego myszom bezgrasiczym stosowano iniekcje dośledzionowe (i.s.), dzięki którym można wykazać zdolność komórek tego nowotworu do tworzenia przerzutów w wątrobie [20]. Podnoszone są jednak zastrzeżenia związane ze stosowaniem tej drogi wprowadzania komórek nowotworowych. Dotyczą one przede wszystkim obserwowanego często przepływu komórek nowotworowych żyłą wrotną bezpośrednio do wątroby, bez rozwoju guza pierwotnego w śledzionie, a co za tym idzie, opuszczenia istotnego etapu w wielostopniowym procesie przerzutowania [21, 22]. Komórki nowotworowe, które zostały wprowadzone do bogato unaczynionego mięszu śledziony, zasiedlać mogą wątrobę nie dzięki swoistemu tropizmowi narządowemu, ale raczej dzięki czopowaniu naczyń krwionośnych wątroby. Dlatego też model ten określa się raczej modelem zasiedlania niż przerzutowania [23] lub modelem eksperymentalnego przerzutowania, zbliżonym do iniekcji dożylnych [24]. Niektórzy autorzy podkreślają jednak przydatność podania dośledzionowego, zwłaszcza dla zbadania zdolności komórek nowotworowych do kolonizacji wątroby. Okazuje się, że np. w przypadku ludzkiego raka nerki podanego i.s. myszom bezgrasiczym, nie powstają przerzuty w wątrobie [25], natomiast komórki linii ludzkiego raka okrężnicy CX-1, podane w ten sam sposób, już w ciągu 30 sekund po podaniu obecne są w zatokach żylnych wątroby, tworząc ogniska przerzutowe. Około 0,5% tych komórek opuszcza wątrobę, zasiedlając płuca, co jest, jak się przyjmuje, następstwem szczególnych właściwości komórek nowotworowych [24]. Wykazują one zróżnicowaną zdolność do przeżycia w mikrokrążeniu wątrobowym, do przylegania do śródbłonna naczyń krwionośnych wątroby oraz do migracji i proliferacji w środowisku mięszu wątroby, prawdopodobnie ze względu na zróżnicowaną wrażliwość na działanie cytotoksyczne komórek układu odpornościowego w wątrobie (np. komórek Kupfera) [24].

Przerzuty naturalne (spontaniczne)

Przerzuty naturalne, tzw. spontaniczne, uzyskuje się po przeszczepieniu komórek nowotworowych podskórnym (s.c.), domięśniowo (i.m.) lub do narządu, z którego pochodzi nowotwór (ortotopowo), co umożliwia śledzenie poszczególnych etapów złożonego procesu przerzutowania.

Do doświadczeń z zastosowaniem np. komórek raka jelita lub płuc wykorzystuje się także wstrzyknięcie pod torebkę nerki (src) [26]. Jednakże, środowisko, jakie stwarza się w ten sposób komórkom nowotworowym, nie może zastąpić miejsca, w którym rozwijają się one natu-

ralnie. Dynamika wzrostu miejscowego i zdolność do tworzenia przerzutów odbiegają od warunków naturalnych, które spełnione są w przypadku przeszczepu ortotopowego [27].

Najczęstszym miejscem wszczepiania komórek nowotworowych w celu otrzymania przerzutów spontanicznych jest tkanka podskórna. W wyniku podskórnego przeszczepienia ludzkich komórek nowotworowych myszom bezgrasiczym, dochodzi do rozwoju nowotworu w miejscu wszczepienia, jednakże bardzo rzadko dochodzi do rozwoju przerzutów [28].

Wobec napotykaných trudności w uzyskaniu dogodnego modelu dla przerzutów spontanicznych, po przeszczepieniu komórek nowotworowych podskórnym, czy pod torebkę nerki, opracowano model ortotopowy, w którym zawieszają komórki nowotworowych lub fragment guza umieszcza się w narządzie, z którego nowotwór pierwotnie się wywodzi (Tab. II) [29]. Największy wkład w badania dotyczące doskonalenia technik przeszczepiania nowotworów i w konsekwencji opracowania modeli przeszczepów ortotopowych nowotworów doświadczalnych włożyli naukowcy z grupy Fidlera [7, 28, 30, 31] oraz z grupy Hoffmana [29]. Stosuje się dwie zasadnicze metody wykonywania przeszczepów ortotopowych: wstrzykiwanie zawiesiny komórek nowotworowych oraz, uważana za doskonalszą, metoda mikrochirurgiczna, polegająca na wprowadzaniu i umocowaniu (np. przez wszycie) w odpowiednim narządzie skrawków guza nowotworowego (SOI – surgical orthotopic implantation). Zaletą tej ostatniej techniki jest zachowanie oddziaływań międzykomórkowych we wprowadzanych fragmentach guza nowotworowego [23, 29, 32, 33]. Szczegółowy opis modeli ortotopowych dla różnych typów nowotworów oraz lokalizację przerzutów przedstawiono w Tabeli II.

Szczególnym modelem doświadczalnym, w którym uzyskać można oddziaływanie ludzkich komórek nowotworowych z ludzką tkanką otaczającą nowotwór, jest przeszczepianie ludzkich komórek czerniaka myszy bezgrasiczej, której wcześniej przeszczepiono fragment ludzkiej skóry. W takich warunkach rozwija się guz nowotworowy, wykorzystujący ludzkie śródbłonki. Mysie śródbłonki widoczne są tylko na obrzeżu przeszczepionego fragmentu skóry. W ten sposób uzyskano wyższy odsetek przerzutów w płucach w porównaniu z konwencjonalnym ksenoprzeszczepem ortotopowym [34]. Metoda ta ograniczona jest tylko do przeszczepiania nowotworów wywodzących się ze skóry.

Wykazano, że komórki nowotworowe przeszczepiane ortotopowo różnią się dynamiką wzrostu miejscowego i rozwojem przerzutów w porównaniu do komórek przeszczepianych podskórnym [28, 29]. Przykłady zróżnicowanej lokalizacji przerzutów mysich nowotworów, zależnej od umiejscowienia guza pierwotnego, zestawiono w tabeli III (dane pochodzące z doświadczeń własnych). Guzy nowotworowe, rosnące pod skórą, otoczone są torebką łącznotkankową, której nie obserwuje się, gdy ten sam nowotwór przeszczepiony jest ortotopowo [28, 29]. Ponadto obserwuje się ich uboższe unaczynienie, być może związane z obniżonym wytwarzaniem czynników angio-

Tab. II. Przykłady zastosowania modeli ortotopowych w badaniach nad biologią procesu nowotworowego i przerzutowania

Pochodzenie nowotworu	Miejsce transplantacji	Przerzuty	Piśmiennictwo
Jama ustna	Dno jamy ustnej	Płuca	[46]
Okrężnica	Ściana jelita – wstrzyknięcie zawiesiny komórek Błona surowicza lub podsurowicza ściany jelita ślepego lub okrężnicy – wszycie skrawków guza	Niski procent – wątroba, węzły chłonne Wątroba, węzły chłonne, karcinomatoza jamy brzusznej	[47] [22,23,48,49]
Żołądek	Błona podsurowicza - wstrzyknięcie zawiesiny komórek - wszycie skrawków guza	Węzły chłonne (7%) Węzły chłonne (100%), wątroba (70%), płuca, trzustka, nadnercza, nerki, rozsiew otrzewnowy	[23] [23,50]
Wątroba	Wątroba	Węzły chłonne, płuca, rozsiew otrzewnowy	[51]
Sutka	Poduszeczka tłuszczowa sutka – wstrzyknięcie zawiesiny komórek lub wszycie skrawków guza	Węzły chłonne, płuca	[16]
Jajnik	Pod torebkę jajnika – wszycie skrawków guza	Otrzewna, jelito grube, sieć	[52]
Płuca	Oskrzela – wstrzyknięcie zawiesiny komórek Jama opłucnej – wstrzyknięcie zawiesiny komórek Płuco – wszycie skrawków guza Żyła ogonowa boczna – wstrzyknięcie zawiesiny komórek	Brak przerzutów Brak przerzutów Drugie płuco, regionalne i odległe węzły chłonne Płuca, serce, wątroba	[53] [54] [27] [44]
Trzustka	Mięsz trzustki – wstrzyknięcie zawiesiny komórek lub wszycie skrawków guza	Naciekanie ściany żołądka i dwunastnicy przerzuty: wątroba, śledziona, węzły chłonne regionalne i odległe, nadnercza, przepona	[45,55]
Gruzoł krokowy	Mięsz boczny płata prostaty - wstrzyknięcie zawiesiny komórek lub wszycie skrawków guza	Moczowody, pęcherz moczowy, pęcherzyki nasienne, płuca, węzły chłonne	[19,33,56]
Nerka	Pod torebkę nerki lub do mięszu nerki – wstrzyknięcie zawiesiny komórek	Płuca, przepona, węzły chłonne, wątroba, trzustka, pęcherzyki nasienne	[25,38]
Pęcherz moczowy	Ściana pęcherza moczowego – wszycie lub przyklejenie skrawków guza	Regionalne węzły chłonne, wątroba, trzustka, przepona, płuca, sieć	[57]
Oplucna	Jama opłucnej – wszycie skrawków guza	Płuca, wątroba	[58]
Czerniak, czerniak oka	Skóra – śródskórnie Komora oka – wstrzyknięcie zawiesiny komórek	Płuca, węzły chłonne, mózg	[59]
Neuroblastoma	Nadnercze – wstrzyknięcie zawiesiny komórek	Brak przerzutów	[60]
Mięsak kości (osteosarcoma)	Kość piszczelowa – wstrzyknięcie zawiesiny komórek lub wprowadzenie skrawków guza	Płuca, regionalne i odległe węzły chłonne, wątroba	[61]

gennych (np. bFGF, VEGF czy IL-8) [35-37] oraz obniżoną produkcją enzymów proteolitycznych, uczestniczących w degradacji macierzy pozakomórkowej [3, 25, 37, 38]. Stosując model ludzkiego raka nerki, przeszczepianego myszom bezgrasiczym, wykazano, że produkcja urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PA) jest obniżona w guzach rosnących podskórnie, w porównaniu z guzami rosnącymi w nerce i przerzutami powstającymi w następstwie rozwoju guza po przeszczepie donerkowym [38]. Podobne zależności obserwowano dla kolagenazy IV [39] i żelatynyzy [40]. W wyjaśnianiu obserwowanych różnic

bierze się pod uwagę m.in. szczególne cechy fibroblastów pochodzących z różnych narządów. Wykazano, że hodowała *in vitro* komórek ludzkiego raka nerki z fibroblastami, pochodzącymi z różnych narządów myszy, prowadzi do obniżenia (w przypadku fibroblastów skórnych) lub zwiększenia (w obecności fibroblastów pochodzących z nerki lub płuc) wytwarzania w/w czynników. Wyniki tych doświadczeń wyraźnie wskazują na ważność uwzględnienia udziału mikrośrodowiska, otaczającego rozwijający się nowotwór, w wyborze modelu używanego do badań nad procesem nowotworowym.

Tabela III. Preferencje narządowe w lokalizacji przerzutów w zależności od zastosowanej drogi podania mysich komórek nowotworowych*

Nowotwór	Lokalizacja przerzutów w zależności od drogi podania					
	s.c	i.p.	i.v.	i.s.	src	ortotopowa
rak sutka 16/C	węzły chłonne	wątroba płuca śledziona	płuca	wątroba	płuca, śledziona wątroba	płuca
czerniak B16	płuca	płuca, nerki wątroba śledziona	płuca	wątroba	płuca, śledziona, wątroba	płuca
rak płuc Lewis LL ₂	płuca	śledziona	płuca	wątroba	śledziona wątroba	płuca, serce
rak okrężnicy C38	węzły chłonne	śledziona wątroba	płuca	wątroba	śledziona	węzły chl., wątroba

* na podstawie własnych, niepublikowanych danych

Ludzkie komórki nowotworowe pochodzące z raka żołądka, przeszczepione ortotopowo myszom bezgrasiczym, wykazują wyższy poziom glikoproteiny-P, związanej z opornością wielolekową, niż te same komórki po podaniu ektopowym [32]. Jeśli komórki pobrane z przerzutu wątrobowego hodowano *in vitro*, ekspresja glikoproteiny-P obniżała się stopniowo do poziomu obserwowanego w komórkach linii wyjściowej. Sugeruje to, że na poziom wytwarzania tego białka mogą wywierać wpływ czynniki obecne w środowisku okołonowotworowym. Może to stanowić jedno z wyjaśnień zróżnicowania wrażliwości komórek nowotworowych na terapię w zależności od lokalizacji pierwotnego ogniska nowotworowego [7, 41-43].

Zarówno na modelu mysiego (CT-29), jak i ludzkiego (KM12L4) raka okrężnicy, przeszczepianego myszom, a więc zarówno w układzie syngenicznym i ksenogenicznym, wykazano, że efekt terapii przeciwnowotworowej zależy od bezpośredniego środowiska, w którym rozwija się nowotwór. Stwierdzono zróżnicowaną wrażliwość na dokсорubicynę (DXR) i 5-fluorouracyl (5-FU) myszy obciążonych tymi nowotworami, rosnącymi po wszczepieniu różnymi drogami. Przerzuty wątrobowe, obserwowane zarówno po przeszczepie ortotopowym, jak i po podaniu i.s., okazały się niewrażliwe na DXR i 5-FU. Zmiany nowotworowe rozwijające się w płucach, po iniekcji komórek nowotworowych i.v., były odporne tylko na DXR. Natomiast guzy rosnące podskórnie okazały się wrażliwe na ten lek. Z kolei guzy pierwotne w śledzionie (po podaniu i.s.) i w jelicie (po przeszczepie ortotopowym) wykazały wyższą wrażliwość na leczenie 5-FU niż DXR [7].

Zróżnicowaną wrażliwość na terapię przeciwnowotworową, zależną od drogi wszczepienia nowotworu, zaobserwowano również w innych modelach mysich przeszczepialnych nowotworów, a mianowicie w czerniaku B16F-10 i raku płuc Lewis [Wietrzyk i wsp. 1999, dane niepublikowane]. W doświadczeniach tych kojarzono podawanie cytotstatyku (cyklofosfamid, 100mg/kg, jednorazowo – CY) z preparatem antyangiogennym – genisteiną (100mg/kg przez 10 kolejnych dni).

U myszy obciążonych czerniakiem B16F-10, rosnącym po podaniu dożylnym lub śródskórnym (ortotopowym), zastosowane programy leczenia okazały się podobnie skuteczne. Po dożylnym podaniu komórek czerniaka, stosowanie CY prowadziło do 38% zahamowania rozwoju kolonii nowotworowych w płucach. Stosowanie genisteiny powodowało 27% zahamowanie liczby przerzutów w płucach. Natomiast skojarzone leczenie, tj. podanie CY, a następnie genisteiny, powodowało 66% zahamowanie rozwoju kolonii nowotworowych w płucach w odniesieniu do kontroli. Gdy nowotwór rozwijał się śródskórnie po podaniu ortotopowym, stosowanie CY prowadziło do 58% zahamowania wzrostu guza pierwotnego, podawanie genisteiny – 42% zahamowania, a skojarzone leczenie prowadziło do 69% zahamowania wzrostu guza pierwotnego. Po dootrzewnowym przeszczepie nowotworu nie obserwowano efektu terapeutycznego ani CY ani genisteiny stosowanych i.p. oddzielnie. Natomiast skojarzone leczenie prowadziło do statystycznie istotnego

przedłużenia czasu życia zwierząt ponad czas życia nieleczonej kontroli (22,5%).

U myszy zaszczipionych różnymi drogami komórkami raka płuc Lewis obserwowano, że efektywność przeciwprzerzutowa stosowania wyłącznie CY i skojarzonego podawania CY oraz genisteiny jest wysoka, zarówno po dożylnym podaniu komórek nowotworowych (81 i 85% zahamowania liczby kolonii w płucach w porównaniu do kontroli), jak i po wszczepieniu podskórnym komórek nowotworowych (82 i 87% zahamowania liczby kolonii w płucach). Jednakże, zdolność tych preparatów, stosowanych systemowo (i.p.), do zahamowania przyrostu masy guza podskórnego jest niższa (48 i 55%). Podawanie wyłącznie genisteiny powodowało wysoką efektywność terapeutyczną jedynie w odniesieniu do redukcji liczby kolonii w płucach, po wprowadzeniu komórek nowotworowych dożylnie (94% redukcji liczby kolonii). Gdy nowotwór ten wszczepiono podskórnie, działanie genisteiny było wyraźnie słabsze – liczba kolonii w płucach obniżyła się o 45%, a masa guza pierwotnego o 34% w porównaniu do wartości kontrolnych [Wietrzyk i wsp. 1999, dane niepublikowane].

Stosując iniekcję dożylną, uznawaną jako ortotopową drogę podania komórek ludzkiego drobnokomórkowego raka płuc myszom bezgrasiczym wykazano [43, 44], że odpowiedź myszy na stosowanie cisplatyny (CP) lub mitomycyny (MMC) różni się od odpowiedzi po wszczepieniu s.c. komórek nowotworowych [44]. W przypadku podania ortotopowego (i.v.) uzyskano dobry efekt terapeutyczny, stosując CP; podanie MMC nie było skuteczne. Podobny typ wrażliwości i oporności obserwuje się u pacjentów chorych na raka płuc. Natomiast po wszczepieniu s.c. komórek nowotworowych, nowotwór okazał się niewrażliwy na stosowanie CP, a wrażliwy na MMC [44].

W innym eksperymencie terapeutycznym myszom bezgrasiczym wszczepiano podskórnie lub ortotopowo komórki linii ludzkiego raka trzustki PANC-4. Stosowano następnie MMC lub 5-FU, uzyskując mało znaczący efekt w przypadku guzów rosnących podskórnie. Natomiast w przypadku guzów rosnących ortotopowo, po stosowaniu 5-FU, zahamowanie wzrostu guzów miejscowych było nieznaczne i wynosiło tylko 20% w stosunku do kontroli. 5-FU nie miał również wpływu na rozwój przerzutów. Zastosowanie w tym modelu MMC, prowadziło do 54% zahamowania przyrostu masy guzów pierwotnych, rosnących w trzustce. U zwierząt tych nie stwierdzono obecności przerzutów w wątrobie i w otrzewnej [45].

W ciągu ostatnich lat znacznie pogłębiono wiedzę na temat mechanizmu procesu przerzutowania i możliwości ingerowania w ten proces, poznając nowe cele dla potencjalnej terapii przeciwnowotworowej, uwzględniającej działanie przeciwprzerzutowe. Jednak w praktyce klinicznej, obecność przerzutów jest nadal czynnikiem związanym ze złym rokowaniem, m.in. ze względu na niewrażliwość w tej fazie rozwoju choroby nowotworowej na stosowane leki i strategie leczenia. Niezwykle ważnym wydaje się więc wzbogacenie aktualnie stosowanych modeli doświadczalnych w terapii przeciwnowotworowej, o nowe modele umożliwiające głębsze rozumienie

złożonego procesu przerzutowania oraz badanie nowych czynników i strategii efektywnego leczenia przeciwrzutowego.

Dr Adam Opolski

Zakład Immunologii Nowotworów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
ul. R. Weigla 12
53-114 Wrocław
e-mail opolski@immuno.iitd.pan.wroc.pl

Piśmiennictwo

- Gutman M, Fidler IJ. Biology of human colon cancer metastasis. *World J Surg* 1995; 19: 226-34.
- Slack NH, Bross JDJ. The influence of site of metastasis on tumor growth and response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1975; 32: 78-86.
- Singh RK, Tsan R, Radinsky R. Influence of the host microenvironment on the clonal selection of human colon carcinoma cells during primary tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 140-50.
- Price JE. Analyzing the metastatic phenotype. *J Cellular Biochem* 1994; 56: 16-22.
- Staroselsky A N, Radinsky R, Fidler IJ i wsp. The use of molecular genetic markers to demonstrate the effect of organ environment on clonal dominance in a human renal-cell carcinoma grown in nude mice. *Int J Cancer* 1992; 51: 130-38.
- Kitadai Y, Radinsky R, Bucana CD i wsp. Regulation of carcinoembryonic antigen expression in human colon carcinoma cells by the organ microenvironment. *Am J Pathol* 1996; 149: 1157-66.
- Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A i wsp. Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 209-22.
- Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature (New Biol)* 1973; 242: 148-9.
- Corbett HT, Griswold DP, Roberts BJ i wsp. Biology and therapeutic response of a mouse mammary adenocarcinoma (16/C) and its potential as a model for surgical adjuvant chemotherapy. *Canc Treat Rep* 1978; 62: 1471-88.
- Mulé JJ, Jicha DL, Rosenberg S.A. The use of congenitally immunodeficient mice to study human tumor metastases and immunotherapy. *J Immunother* 1992; 12: 196-8.
- Manzotti C, Audisio RA, Pratesi G. Importance of orthotopic implantation for human tumors as model systems: relevance to metastasis and invasion. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11: 5-14.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; 1: 571-3.
- Welch DR. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 272-306.
- Radzikowski C, Opolski A. Postęp w badaniach nad problemem przerzutów nowotworowych. *Nowotwory* 1998; 40 (supl. 1): 3-19.
- Radzikowski C, Opolski A, Wietrzyk J. Rola angiogenezy w dynamice wzrostu nowotworu. *Post Hig Med Dośw* 1998; 52: 553-76.
- Price JE. Metastasis from human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39: 93-102.
- Miner KM, Kawaguchi T, Uba GW i wsp. Clonal drift of cell surface, melanogenic and experimental metastasis properties of in vivo-selected brain meninges-colonizing murine B16 melanoma. *Cancer Res* 1982; 42: 4631-8.
- Shverin DH, Kukreja SC, Ghosh L i wsp. Development of skeletal metastasis by human prostate cancer in athymic nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1988; 6: 401-9.
- Rembrink K, Romijn JC, van der Kwast TH i wsp. Orthotopic implantation of human prostate cancer cell lines: a clinically relevant animal model for metastatic prostate cancer. *Prostate* 1997; 31: 168-74.
- Giavazzi R, Jessup JM, Campbell DE i wsp. Experimental nude mouse model of human colorectal cancer liver metastases. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 1303-8.
- Opolski A, Wietrzyk J, Duś D i wsp. Metastatic potential and saccharide antigens expression of human colon cancer cells xenotransplanted into athymic nude mice. *Folia Microbiol* 1998; 43: 507-10.
- Opolski A, Laskowska A, Madej J i wsp. Metastatic potential of human CX-1 colon adenocarcinoma cells is dependent on the expression of sialosyl Le^a antigen. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16: 673-681.
- Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mice: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 1994; 56: 4-8.
- Ishii S, Mizoi T, Kawano K i wsp. Implantation of human colorectal carcinoma cells in the liver studied by in vivo fluorescence videomicroscopy. *Clin Exp Metastasis* 1996; 14: 153-64.
- Naito S, von Eschenbach AC, Fidler IJ. Different growth pattern and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1987; 78: 377-85.
- Khleif SN, Curt GA. Animal models in drug development. W: Holland J. F., i wsp. (red.) *Cancer Medicine*. London: Lea & Febiger, Philadelphia; 1993, XV-5: s. 653-66.
- Wang X, Fu X, Hoffman RM. A patient-like metastasising model of human lung adenocarcinoma constructed via thoracotomy in nude mice. *Anticancer Res* 1992; 12: 1399-402.
- Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1990; 50: 6130-8.
- Hoffman RM. Orthotopic is orthodox: why are orthotopic-transplant metastatic models different from all other models? *J Cell Biochem* 1994; 56: 1-3.
- Fidler IJ. The biology of human cancer metastasis. *Acta Oncol* 1991; 30: 668-75.
- Fidler IJ. Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 229-43.
- Furukawa T, Kubota T, Watanabe M i wsp. Differential chemosensitivity of local and metastatic human gastric cancer after orthotopic transplantation of histologically intact tumor tissue in nude mice. *Int J Cancer* 1993; 54: 397-401.
- An Z, Wang X, Geller J i wsp. Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice. *Prostate* 1998; 34: 169-74.
- Juhász I, Albelda SM, Elder DE i wsp. Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* 1993; 143: 528-37.
- Singh RK, Bucana CD, Gutman M i wsp. Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 1994; 145: 365-74.
- Fukumura D, Yuan F, Monsky WL i wsp. Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1997; 151: 679-88.
- Greene GF, Kitadai Y, Pattaway CA i wsp. Correlation of metastasis-related gene expression with metastatic potential in human prostate carcinoma cells implanted in nude mice using an in situ messenger RNA hybridisation technique. *Am J Pathol* 1997; 150: 1571-82.
- Gohji K, Nakajima M, Boyd D i wsp. Organ-site dependence for the production of urokinase-type plasminogen activator and metastasis by human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 1997; 151: 1655-61.
- Gohji K, Kamidono S. Role of organ-specific fibroblasts in metastasis of human renal cell carcinoma: regulation of type IV collagenase production from human renal cell carcinoma by organ-specific fibroblasts. *Hinyokiko Kyo* 1994; 40: 909-17.
- Gohji K, Nakajima M, Fabra A i wsp. Regulation of gelatinase production in metastatic renal cell carcinoma by organ-specific fibroblasts. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 152-60.
- Dong Z, Radinsky R, Fan D i wsp. Organ-specific modulation of steady-state mdm gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 913-20.
- Kuo T-H, Kubota T, Watanabe M i wsp. Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res* 1993; 13: 627-30.
- Guilbaud N, Kraus-Berthier L, Saint-Dizier D i wsp. Antitumor activity of S 16020-2 in two orthotopic models of lung cancer. *Anti-Cancer Drugs* 1997; 8: 276-82.
- Kuo T-H, Kubota T, Watanabe M i wsp. Orthotopic reconstitution of human small-cell lung carcinoma after intravenous transplantation in SCID mice. *Anticancer Res* 1992; 12: 1407-10.
- Furukawa T, Kubota T, Watanabe M i wsp. A novel „patient-like” treatment model of human pancreatic cancer constructed using orthotopic transplantation of histologically intact human tumor tissue in nude mice. *Cancer Res* 1993; 53: 3070-2.
- Davies M, Prime SS, Stone AM i wsp. Overexpression of autocrine TGF-beta 1 suppresses the growth of spindle epithelial cells in vitro and in vi-