

Received: 2012.08.23
Accepted: 2012.09.24
Published: 2012.11.15

„Błędne koła” glejaków: unaczynienie i inwazyjność*

“Vicious circles” of glioblastoma tumors: vascularization and invasiveness

Stanisław Szala, Magdalena Jarosz, Ryszard Smolarczyk, Tomasz Cichoń

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Glejak wielopostaciowy to szczególnie złośliwa postać nowotworu glejopochodnego. Nowotwór ten stanowi około 70% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów mózgu. Niestety, średni czas przeżycia chorych na glejaki złośliwe nie przekracza jednego roku. Nowotwory te charakteryzują się swoistym unaczynieniem (licznymi mikronaczyniami i naczyniami kłębuszkowymi) oraz szczególną inwazyjnością. Zarówno unaczynienie, jak i inwazyjność to złożone procesy, z których każdy tworzy swego rodzaju „błędne koło”. Wspólnym głównym elementem obu „błędnych kół” jest niedotlenienie. Powstająca w sąsiedztwie nieprawidłowych naczyń krwionośnych hipoksja stymuluje m.in. powstawanie nowych naczyń i inwazyjność komórek nowotworowych. Oba „błędne koła”, to w istocie procesy adaptacyjne pozwalające komórkom nowotworowym dostosować się do niedotlenianego środowiska nowotworowego. Procesy te odgrywają istotną rolę w progresji nowotworowej: swoistej ewolucji komórek nowotworowych. Wynikiem tej ewolucji są komórki wysoce agresywne, odporne na chemioterapię i radioterapię. Duże zdolności adaptacyjne komórek nowotworowych niekorzystnie wpływają na efektywność terapii przeciwnowotworowej. Skuteczne strategie terapeutyczne powinny być skierowane na rozerwanie obu „błędnych kół”. W pracy omówiono kilka takich strategii. Naszym zdaniem, skuteczne strategie terapeutyczne muszą się składać z kilku leków rozpoznających i rozrywających jednocześnie oba „błędne koła” unaczynienia i inwazyjności. Skutecznymi lekami mogą się także okazać leki hamujące i zmniejszające hipoksję w komórkach nowotworowych, np. leki hamujące aktywność HIF-1 α .

Słowa kluczowe:

„błędne koło” unaczynienia glejaków • „błędne koło” inwazyjności glejaków • niedotlenienie komórek nowotworowych • terapia przeciwnowotworowa

Summary

Glioblastoma multiforme is the most common and a particularly aggressive form of glial primary brain tumors. This malignancy accounts for ca. 70% of all diagnosed cases. Unfortunately, average survival of glioma patients does not exceed one year from diagnosis. Specific vascularization pattern (presence of numerous microvessels and glomerular vessels) and exceptional invasiveness are characteristic features of glioblastoma tumors. Both of these features reflect complex underlying processes forming two vicious circles. Common to both of these circles is the state of tumor underoxygenation. Hypoxia that occurs in the vicinity of abnormal tumor blood vessels stimulates formation of novel microvessels and invasiveness of tumor cells. In their essence, both of the vicious circles are processes allowing tumor cells to adapt to an underoxygenated tumor milieu. These processes play an important role in tumor progression, which reflects a specific type of evolution of cancer cells. Late effects of this evolution include appearance of highly

* Publikacja została sfinansowana z grantów MNiSW nr NN 401 587 540 i NN 401 018 337.

aggressive, chemo- and radiotherapy resistant neoplastic cells. Increased adaptation capabilities of such cancer cells have a negative influence on the therapeutic process. Effective therapeutic strategies should not be directed against single cancer cell markers; instead, they should be targeted so as to break both vicious cycles. Herein we discuss several such strategies. In our opinion, effective therapeutic approaches must include a combination of several agents that recognize and simultaneously break both vicious cycles, i.e. vascularization and invasiveness. Also, agents that decrease hypoxia in cancer cells, for example drugs inhibiting activity of HIF-1 α , might also prove therapeutically effective in such approaches.

Key words: vicious circle of glioma vascularization • vicious circle of glioma invasiveness • cancer cell underoxygenation • anticancer therapy

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1019657>

Word count: 3955

Tables: 2

Figures: 6

References: 98

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Szala, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: sszala@io.gliwice.pl

„Błędne koło to ciąg niekorzystnych sytuacji lub wydarzeń, które wynikają z siebie, powtarzają cyklicznie i z których trudno znaleźć wyjście.”

Słownik języka polskiego, PWN, Warszawa, 2007

WSTĘP

Glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme*) to złośliwa postać nowotworu glejopochodnego wywodzącego się z pnia astrocytarnego. W USA co roku na glejaki złośliwe zapada 3,19 osób na 100 000 mieszkańców [75]. Rocznie diagnozuje się około 14 000 nowych przypadków glejaków złośliwych. Nowotwory te stanowią 60–70% wszystkich zdiagnozowanych nowotworów mózgu [90]. Średni czas przeżycia chorych na glejaki złośliwe nie przekracza jednego roku. W przypadku leczenia skojarzonego radioterapii z temozolomidem średni czas przeżycia pacjentów dochodzi do 1,46 roku [79]. Wprowadzenie do tej terapii dodatkowo leku alkilującego – lomustyny zwiększa czas przeżycia pacjentów do 23,1 miesiąca [41].

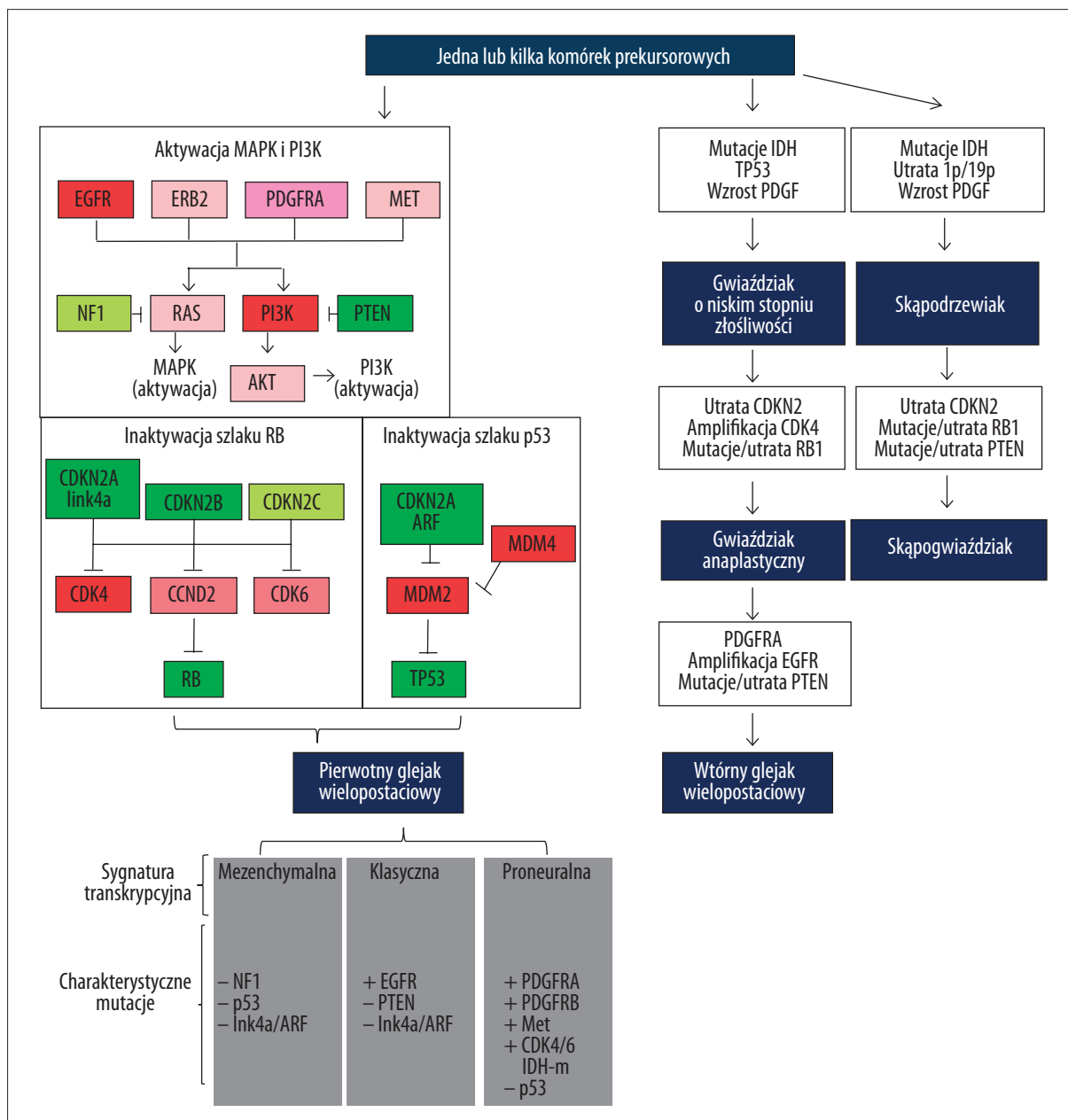
Pod względem histopatologicznym, glejaki wielopostaciowe charakteryzują się atypią i pleomorfizmem jąder komórkowych, dużą aktywnością proliferacyjną, swoistym unaczynieniem (licznymi mikronaczyniami i naczyniami kłębuszkowatymi), występowaniem regularnych układów komórek nowotworowych wokół ognisk nekrotycznych zwanych palisadami [49], a także obecnością struktur Scherera, satelitarnych skupisk komórek nowotworowych wokół naczyń i neuronów (tzw. satelitoza okołonaczyniowa i okołoneuronowa) [96].

Istnieje kilka systemów klasyfikacji glejaków. Morfologicznie wyróżnia się trzy główne rodzaje glejaków: gwiazdziaki, skąpodrzewiaki oraz skąpogwiazdziaki (typ mieszany) [91]. U gwiazdziaków występują wszystkie cztery stopnie zezłośliwienia (wg WHO: I–IV) [61],

u skąpodrzewiaków tylko II i III [61]. Stopień I zezłośliwienia to nowotwory w większości łagodne, dobrze ograniczone (gwiazdziaki włosowatokomórkowe). Stopień II to nowotwory naciekające o niskim stopniu zezłośliwienia (gwiazdziaki rozlane). Stopień III to nowotwory naciekające, anaplastyczne, z komórkową atypią, unaczynione (gwiazdziaki anaplastyczne). Stopień IV to nowotwory naciekające, wysoce złośliwe, unaczynione, z ogniskami nekrozy (glejaki wielopostaciowe) [59,91]. Glejaki wielopostaciowe mogą być tzw. glejakami pierwotnymi lub glejakami wtórnymi (rozwijającymi się z glejaków o niższym stopniu zezłośliwienia). Pod względem histopatologicznym oba typy glejaków są nie do odróżnienia [90].

W pierwotnych glejakach wielopostaciowych pojawiają się charakterystyczne mutacje, które aktywują szlaki sygnałowe MAPK i PI3K, a także inaktywują dwa szlaki sygnałowe kontrolowane przez Rb i TP53 [86] (ryc.1). We wtórnych glejakach wielopostaciowych oprócz m.in. mutacji genów *TP53*, *PDGF*, *PTEN*, *EGFR* pojawiają się także charakterystyczne mutacje genu *IDH*, które nie występują w glejakach pierwotnych [67].

Analizy sygnatur transkrypcyjnych pozwalają wyróżnić cztery subtypy komórek nowotworowych: mezenchymalny, klasyczny, proneuralny i neuralny [13,70,88] (ryc. 1). Subtyp mezenchymalny jest związany z mutacjami genów *NF1*, *p53*, *Ink4a/ARF*. Komórki tego subtypu „odpowiadają” na agresywną chemioterapię i radioterapię, a także na inhibitory Ras, PI3K i inhibitory angiogenezy. Subtyp klasyczny zawiera mutacje genów *PTEN*, *INK4a/ARF* i amplifikację *EGFR*. Komórki tego subtypu są wrażliwe na działanie klasycznych leków i radioterapię (komórki mają zachowany gen *p53*). Subtyp proneuralny z mutacjami genów *IDH*, *p53* i amplifikacjami genów *PDGFRA*, *PDGFRB* i *Met* jest wrażliwy na działanie inhibitorów HIF, PI3K i PDGFRA. Subtyp neuralny zawiera sygnaturę swoistą dla prawidłowych tkanek mózgu (pominięto go na ryc. 1).

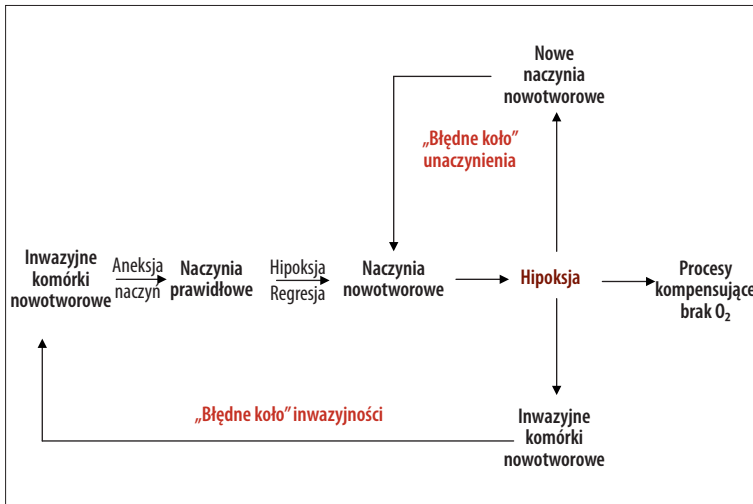


Ryc. 1. Zmiany mutacyjne w pierwotnych i wtórnych glejakiach wielopostaciowych. W glejakiach pierwotnych zasadnicze mutacje zachodzą w genach trzech głównych szlaków sygnałowych. Pierwszy z nich, związany z mutacjami genów kodujących czynniki wzrostowe aktywujące szlaki sygnałowe (MAPK i PI3K). W dwóch pozostałych szlakach zachodzi inaktywacja genów supresorowych (*RB1* i *TP53*). Kolorem zielonym oznaczono mutacje inaktywujące/delekcje, kolorem czerwonym mutacje aktywujące/amplifikacje (natężenie barwy oznacza liczbę mutacji). Cztery sygnatury transkrypcyjne pierwotnych glejaków reprezentują cztery typy komórek nowotworowych. Typ mezenchymalny związany jest z utratą genów *NF1* i *p53*, klasyczny z amplifikacją genu *EGFR* i utratą genów *PTEN* i *CDKN2A*, proneuralny z aktywacją genu *PDGFR*, mutacjami *IDH* i amplifikacją *CDK4* i *Met*. Czwartą sygnaturę (neuralną) jest podobna do sygnatury prawidłowych tkanek mózgu (nie uwzględniono jej na ryc.); wg [13]

Analizy proteomiczne pozwalają dodatkowo wyróżnić trzy klasy komórek. Dwie pierwsze związane są ze wzrostem poziomu białek EGFR i PDGF. Trzecia związana jest z obniżeniem poziomu białka NF1 [12]. Klasyfikacje oparte na kryteriach morfologicznych i molekularnych mogą być niezwykle przydatne w tzw. spersonalizowanej, indywidualnie dobranej dla każdego pacjenta, terapii.

Charakterystyczne fenotypowe cechy glejaków wielopostaciowych: zdolność do wytwarzania swoistego unaczynienia i inwazyjność (palisady i struktury Scherera są jej

przykładem) odgrywają znaczącą rolę w progresji nowotworowej. Obie cechy to w istocie powiązane ze sobą złożone procesy. Każdy z nich tworzy swego rodzaju „błędne koło” (ryc. 2). Pierwsze z tych kół dotyczy powstawania naczyń krwionośnych: nieprawidłowe naczynia nowotworowe powodują powstanie hipoksji, która z kolei stymuluje powstawanie nowych niesprawnych naczyń krwionośnych, a te z kolei indukują hipoksję (itd.) [25]. Drugie „błędne koło” związane jest z migracją komórek nowotworowych (ryc. 2). Inwazyjne komórki nowotworowe anektują prawidłowe naczynia. Wzrost komórek nowotworowych



Ryc. 2. Schemat relacji zachodzącej między unaczynieniem, inwazyjnością komórek nowotworowych glejaków, a mającą wpływ na ich powstawanie hipoksją. Przedstawiono dwa „błędne koła”: pierwsze z nich dotyczy powstawania unaczynienia, drugie inwazyjności. Szerszy opis tych relacji w tekście

Tabela 1. Niektóre procesy indukowane przez hipoksję w komórkach nowotworowych

- (1) Selekcja genotypów (mutacje p53)
- (2) Zmiany ekspresji genów:
 - zahamowanie apoptozy
 - wzrost autofagii
 - metaboliczne przeprogramowanie (glikoliza)
 - wzrost sygnalizacji z udziałem receptorów kinaz tyrozynowych
 - angiogeneza
 - przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT)
 - inwazyjność
 - przerzutowanie
 - immunosupresja
 - utrata stabilności genomowej (wzrost reaktywnych form O_2 , (ROS))
 - zahamowanie reperacji DNA
 - rekrutacja komórek stanu zapalnego
 - proliferacja
 - przeżycie/ żywotność

wokół naczyń powoduje ich stopniową inwolucję i regresję [48,95]. Powstająca wokół uszkodzonych naczyń hipoksja indukuje powstanie nowych naczyń nowotworowych oraz proliferację komórek nowotworowych. Generowana przez nieprawidłowe naczynia nowotworowe hipoksja stymuluje inwazyjność komórek nowotworowych [97]. Komórki nowotworowe migrują z rejonów niedotlenowanych i zasiedlają rejon wokół prawidłowych naczyń krwionośnych.

Wspólnym, głównym elementem obu „błędnych kół” jest hipoksja. Powstająca w sąsiedztwie nieprawidłowych naczyń krwionośnych stymuluje nie tylko powstawanie nowych naczyń i inwazyjność komórek nowotworowych, ale także inne procesy kompensujące brak tlenu (m.in. metaboliczne przeprogramowanie komórek nowotworowych, autofagię, przeżycie (żywotność), immunosupresję, rekrutację

komórek stanu zapalnego, proliferację) (zob. tab. 1) [83]. Powstawanie unaczynienia i inwazyjność komórek nowotworowych to dwa ważne procesy, które pozwalają komórkom nowotworowym dostosować się do niedotlenowanego środowiska [53,65,84]. Duże zdolności adaptacyjne komórek nowotworowych do niedotlenowanego mikrośrodowiska zmniejszają skuteczność terapii przeciwnowotworowej [93]. W niedotlenowanych komórkach pojawia się bowiem wiele reakcji związanych np. z reperowaniem uszkodzeń DNA. W komórkach zostają zahamowane procesy apoptozy, zwiększa się niestabilność genomowa [93]. Procesy te zwiększają szanse przeżycia komórek nowotworowych. W warunkach hipoksji występuje także klasyczna selekcja genotypów: komórki z mutacjami genu *p53* mają większe szanse przeżycia niż genotypy z dzikim genem *p53* [42] (tab. 1).

W pracy omówimy złożone relacje („błędne koła”) jakie zachodzą między hipoksją, unaczynieniem i inwazyjnością komórek nowotworowych, a także strategie terapeutyczne pozwalające rozrywać oba „błędne koła”.

HIPOKSJA I UNACZYNIENIE GLEJAKÓW

W progresji nowotworowej, swoistej ewolucji komórek nowotworowych, istotną rolę odgrywają naczynia nowotworowe [44]. Naczynia nowotworowe to naczynia nieprawidłowe [3,25,63,64,82]. Chaotyczny przebieg naczyń, niewłaściwe połączenie między naczyniami, ślepe odnogi spowalniają przepływ krwi [27]. W naczyniach nowotworowych obserwuje się często zastoje, a nawet cofanie się krwi. Wewnątrz naczyń mogą pojawić się także skrzepy (śródnacyniowa tromboza) [11]. Naczynia takie nie są w stanie dostarczać komórkom nowotworowym wystarczającej ilości tlenu. W komórkach nowotworowych pojawia się niedotlenienie, hipoksja [82].

Sieć naczyń nowotworowych, zwłaszcza drobnych i małych, ulega stałemu przekształcaniu (remodelowaniu) [27]. Drobne naczynia ulegają przekształceniu pod wpływem różnych bodźców mechanicznych, a także samego ciśnienia krwi. Naczynia nowotworowe powstają i ulegają regresji. Przekształcanie naczyń ma wpływ na powstanie zmiennego utleniania. Hipoksja pojawia się w różnych miejscach nowotworu, ustępuje i zanika.

Niedotlenienie indukuje głównie dwa czynniki transkrypcyjne HIF-1 α i HIF-2 α [7,54]. Oba czynniki wspólnie kontrolują ekspresję niektórych genów kodujących białka biorące udział w transporcie glukozy (m.in. białko GLUT1), w homeostazie pH (CAIX) oraz w angiogenezie (VEGF). Czynniki HIF-1 α kontroluje samodzielnie ekspresję genów biorących udział w glikolizie (np. heksokinazę 1 i 2, fosfofruktokinazę), w wytwarzaniu tlenu azotu (iNOS), autofagii i apoptozie (białko BNIP3) [54].

Czynnik HIF-2 α kontroluje samodzielnie aktywność genów kodujących białka odpowiedzialne za tzw. „macierzystość” komórek nowotworowych (OCT4, NANOG i MYC [7]), a także białko DLL4 aktywujące białka NOTCH oraz angiopoetynę 2 biorącą udział w remodelowaniu naczyń krwionośnych [54]. Czynniki transkrypcyjne HIF-1 α jest stymulowany niskim stężeniem tlenu ($\leq 1\%$). Natomiast czynnik HIF-2 α aktywowany jest wyższym stężeniem (około 5%) [46]. Zharmonizowane współdziałanie wielu różnych genów (w tym genów kodujących białka „macierzystości”) indukowanych przez oba czynniki transkrypcyjne powoduje powstanie w komórkach nowotworowych stanu swoistej „plastyczności”: zdolności do odróżnicowania i transróżnicowania [45]. W procesie odróżnicowania następuje swoista rewersja fenotypu komórek nowotworowych do fenotypu słabo zróżnicowanych komórek embrionalnych [80]. Natomiast w procesie transróżnicowania dochodzi do powstania nietypowego fenotypu (np. z neuronalnych komórek macierzystych zamiast neuronów powstają komórki śródbłonkowe (EC)). Hipoksja może być jednym z głównych czynników środowiskowych stymulujących fenotypowe przekształcenie komórek nowotworowych w komórki mające cechy komórek macierzystych [45].

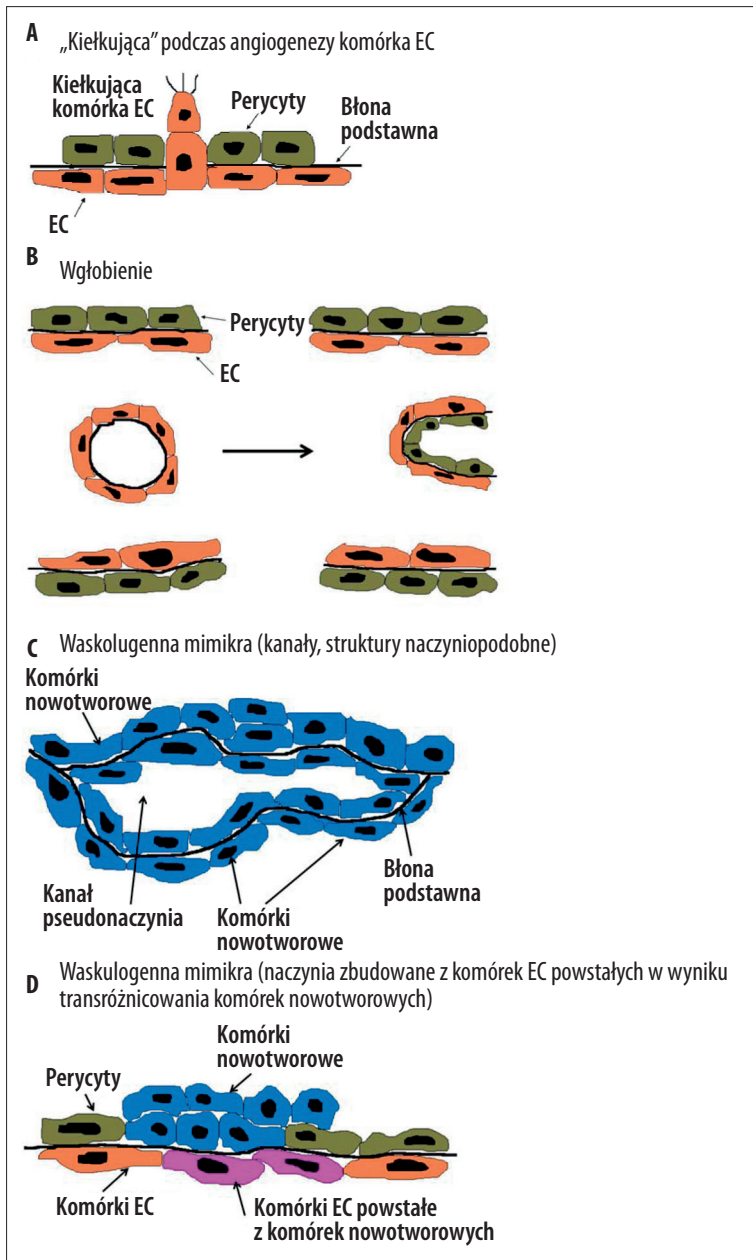
Zdolność do tworzenia własnych naczyń nowotworowych uważana jest za jedną z podstawowych cech komórek

nowotworowych [44]. Komórki nowotworowe wydzielają czynniki proangiogenne, które stymulują swoiste „kielkowanie” i chemotaktyczny wzrost komórek śródbłonkowych naczyń krwionośnych w kierunku źródła sygnałów (tzn. komórek wydzielających czynniki proangiogenne) (ryc. 3A). Powstawanie nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących, zwane angiogenezą, nadal jest uważane za podstawowy mechanizm powstawania nowotworowych naczyń krwionośnych [18]. Angiogeneza nowotworowa różni się jednak od angiogenezy występującej w tkankach prawidłowych. Angiogeneza prawidłowa stymulowana jest głównie przez VEGF i kontrolowana przez swoiste inhibitory, np. trombospondynę. Natomiast w angiogenezie nowotworowej bierze udział wiele różnych czynników wzrostowych, oprócz VEGF, także m.in. PDGF, TNF- α , FGF, HGF, IL-8, IL-6, TGF- β [94]. Niedawno wśród czynników proangiogennych stymulujących angiogenezę zidentyfikowano także białko HMGB1, cytokinę wydzielaną przez nekrotyczne komórki, która bierze udział w reakcji prozapalnej [87]. Ta różnorodność czynników proangiogennych, wydzielanych także przez komórki mikrośrodowiska (m.in. komórki reakcji zapalnej), czynników dominujących nad czynnikami hamującymi proces angiogenezy powoduje, że angiogeneza nowotworowa, w przeciwieństwie do prawidłowej, jest niekończącym się procesem pozbawionym kontroli. Główną rolę w jej powstawaniu odgrywa hipoksja.

Powstawanie naczyń krwionośnych w glejakach składa się z dwóch faz. W pierwszej fazie komórki glejaków wykorzystują do swego wzrostu naczynia gospodarza. Komórki nowotworowe anektują i zasiedlają naczynia prawidłowe. W drugiej fazie tworzą własną sieć naczyń krwionośnych. Proces powstania naczyń krwionośnych w doświadczalnych glejakach składa się z kilku etapów (zob. [48,95]):

- zasiedlanie okolic naczyń prawidłowych przez komórki nowotworowe, które wykazują swoisty tropizm do naczyń krwionośnych (niewykluczone, że za tropizm ten odpowiedzialna jest cytokina CXCL12 wydzielana przez komórki EC);
- odsunięcie przez komórki nowotworowe wypustek astrocytarnych od błony podstawnej; enzymatyczna degradacja błony podstawnej;
- proliferacja komórek nowotworowych;
- regresja, swoista involucja naczyń prawidłowych (stymulowana przez angiopoetynę 2 (Ang-2) wydzielaną przez komórki EC);
- dalsza destabilizacja naczyń prawidłowych;
- apoptoza komórek śródbłonkowych i nekroza komórek nowotworowych;
- hipoksja stymulująca proces angiogenezy (powstaje wokół uszkodzonych naczyń krwionośnych gospodarza).

Indukowana przez hipoksję angiogeneza to złożony proces powstawania naczyń nowotworowych [18,50,82,94]. Jednym z pierwszych etapów tego procesu jest aktywacja spoczynkowych komórek EC. Czynniki aktywujące komórki EC mogą być czynniki wzrostowe m.in.: VEGF, VEGF-C, ANG-2, FGF oraz niektóre chemokiny (np. IL-8/CXCL8). Czynniki te są wydzielane przez niedotleniane komórki nowotworowe, komórki reakcji zapalnej, a także przez perycyty. Czynniki proangiogenne mogą być także uwalniane z błony podstawnej przez metaloproteazy (MMP). Pod wpływem czynników proangiogennych komórki EC rozluźniają połączenia między sobą,



Ryc. 3. Podstawowe mechanizmy powstawania nowotworowych naczyń krwionośnych: (A) – angiogeneza, (B) – wgłobienie, (C i D) – dwa rodzaje waskulogennej mimikry

co powoduje rozszerzenie naczyń. Czynniki VEGF powoduje zwiększenie przepuszczalności warstwy komórek EC. Wydzielająca się z naczyń plazma staje się prowizoryczną macierzą pozakomórkową dla nowo powstających naczyń.

W „zaktywowanych” komórkach EC pojawia się tzw. komórka czołowa (tip cell) [18] (ryc. 3A). Dzięki filopodium komórka ta „rozpoznaje” gradient stężenia czynników proangiogennych wydzielanych przez komórki nowotworowe. W reakcji biorą także udział receptory VEGF, neuropiliny (NRP), a także białko NOTCH i jego ligandy: DDL4 i JAGGED. Proliferacja komórek śródbłonkowych znajdujących się za komórką czołową (stalk cells) jest kontrolowana m.in. przez NOTCH, WNT, PlGF, FGF.

Natomiast w procesie powstawania światła naczynia odgrywają rolę VE-kadheryny, CD34, sialomucyny, VEGF i białko HEDGEHOG [18]. Komórka czołowa, dzięki

filopodium, rozpoznaje także tzw. czynniki kierujące (sterujące): efryny i semaforyny. Komórki powstającego naczynia uwalniają cząsteczki EGFL7, które „informują” je o ich położeniu w macierzy pozakomórkowej. Dodatkowo, w komórkach EC zostaje uruchomiony „program hipoksyjny” kontrolowany przez HIF-1 α . Program ten w swoisty sposób „uczula” komórki śródbłonkowe na czynniki proangiogenne. W fuzji nowych naczyń z już istniejącymi swoistą rolę odgrywają makrofagi. Wiele podstawowych informacji dotyczących angiogenezy nowotworowej można znaleźć w pracy Carmeliet i Jaina [18].

Nie tylko komórki śródbłonkowe biorą udział w budowie naczyń nowotworowych. W powstawaniu i budowie naczyń, w pośredni zresztą sposób, biorą udział także komórki nowotworowe (ryc. 3C i 3D). Mające cechy komórek macierzystych (CSC) komórki nowotworowe (niewykluczone, że pod wpływem hipoksji [78]), ulegają swoistej transformacji

(transróżnicowaniu). W komórkach tych ujawnia się fenotyp komórek śródbłonkowych [58]. Proces ten nosi nazwę waskulogennej mimikry (WM) i jest przejawem swoistej „plastyczności” komórek nowotworowych mających cechy komórek macierzystych [80].

W wyniku WM powstają dwa rodzaje struktur naczyniowych [36]. Pierwsze z nich, to raczej struktury naczyniopodobne tworzące swoistą sieć kanałów, które mogą się łączyć z istniejącymi naczyniami krwionośnymi (ryc. 3C). Drugi rodzaj struktur naczyniowych to naczynia zbudowane z komórek nowotworowych, które uległy transróżnicowaniu do komórek EC (ryc. 3D) [36]. Według Ricci-Vitiani i wsp. [74] liczba naczyń krwionośnych w glejakach powstałych z komórek nowotworowych w wyniku WM waha się między 20 a 90%. Tak znaczna liczba powstałych naczyń zdaniem autorów ma świadczyć o tym, że proces transróżnicowania odgrywa ważną rolę w powstawaniu naczyń nowotworowych. Według patologów z grupy Rodrigueza [75] naczynia nowotworowe w glejakach są przeważnie zbudowane jednak z prawidłowych komórek EC. Liczba naczyń zbudowanych w wyniku WM ma nie przekraczać 10%. Niewykluczone, że proces WM odgrywa znikomą rolę w powstawaniu naczyń nowotworowych.

W glejakach obserwuje się także występowanie tzw. kłębuszków naczyniowych, splecionych naczyń krwionośnych przypominających swoją morfologią kłębuszki nerkowe. Naczynia te wydają się nie brać udziału w przepływie krwi [29].

Dość szczególnym procesem biorącym udział w powstawaniu naczyń jest tzw. wgłobienie [29] (ryc. 3B). W procesie wgłobienia naczynia większe rozpadają się na mniejsze. W małych naczyniach przepływ krwi jest wolniejszy niż w większych. Wgłobienie jest głównym procesem remodulującym, przekształcającym naczynia krwionośne.

W powstawaniu nowych naczyń krwionośnych sugerowano także udział tzw. waskulogenezy, powstawania naczyń z krążących w krwiobiegu prekursorów komórek śródbłonkowych. Brak jest jednak przekonujących danych wskazujących na udział waskulogenezy w powstawaniu naczyń nowotworowych [68].

Naczynia krwionośne, zarówno prawidłowe jak i nowotworowe, wraz z niektórymi komórkami mikrośrodowiska (m.in. miofibroblastami) mogą tworzyć dość złożone struktury zwane niszami (nisze to pojęcie raczej operacyjne) [9]. Nisze te „kontrolują” podstawowe funkcje nowotworowych komórek macierzystych: ich proliferację, zdolność do różnicowania [15]. Nisze mogą się znajdować w pobliżu naczyń krwionośnych (tzw. nisze utlenowane) lub w rejonach hipoksyjnych (tzw. nisze niedotlenowane) [9]. W niszach niedotlenowanych może dochodzić do swoistego odróżnicowania komórek nowotworowych. Niewykluczone, że w procesie tym pewną rolę odgrywa proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego EMT [9]. W wyniku tego procesu w komórkach nowotworowych mogą się ujawniać cechy komórek macierzystych: zdolność do różnicowania, samoodnowy i transróżnicowania.

Badania Pistollato i wsp. [72] wskazują, że słabo zróżnicowane macierzyste komórki glejaków są umiejscowione

głównie w warstwach komórek słabo utlenowanych. Natomiast komórki zróżnicowane znajdują się w regionach naczyniowych i utlenowanych. Komórki te są wrażliwe na działanie temozolomidu. Komórki umiejscowione w regionach słabo utlenowanych są raczej odporne na działanie tego leku [69].

HIPOKSJA I INWAZYJNOŚĆ KOMÓREK GLEJAKÓW

Komórki glejaków mają zdolność do przemieszczania się [65,84]. To właśnie ruchliwość komórek glejaków sprawia, że granice między tkanką nowotworową a prawidłową stają się nieostre i rozmyte. Utrudnia to niezmiernie usunięcie wszystkich komórek nowotworowych podczas zabiegów chirurgicznych. Nieusunięte komórki nowotworowe są główną przyczyną nawrotów choroby nowotworowej.

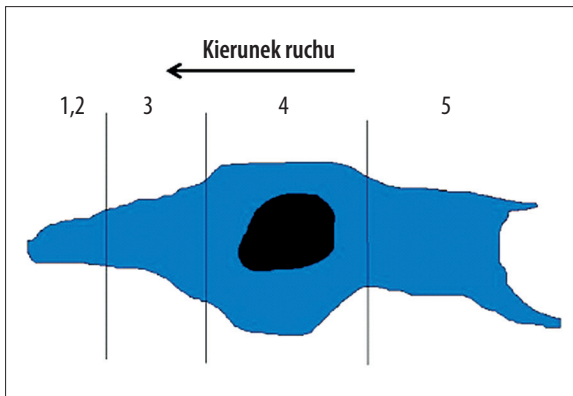
Jednym z pierwszych, który pod koniec lat trzydziestych ubiegłego stulecia zauważył zjawisko migracji komórek nowotworowych glejaków był Hans Joachim Scherer (wg [77]). Odrywające się od głównej masy guza komórki nowotworowe tworzyły odrębne skupiska komórek (struktury satelitarne) na naczyniach krwionośnych i neuronach oddalonych od nowotworu. Dziś wiemy, że za ruchliwość komórek nowotworowych odpowiedzialna jest głównie chemokina CXCL12 wydzielana przez komórki EC i neurony. Receptory tej chemokiny CXCR4 są umiejscowione w błonach komórek nowotworowych [96]. Wydzielana przez komórki EC i neurony chemokina CXCL12 stymuluje przemieszczanie się komórek nowotworowych w kierunku prawidłowych naczyń i neuronów. Ruchliwość komórek nowotworowych może być nie tylko stymulowana przez parakrynnie wydzielane czynniki. Istnieją dane wskazujące, że same komórki nowotworowe stymulują swoje przemieszczanie (regulacja autokrynną) [47].

Jedną z charakterystycznych cech glejaków są tzw. struktury palisadowe, regularne układy komórek nowotworowych znajdujące się w sąsiedztwie regionów nekrotycznych i niedotlenowanych. Hipoksja indukuje w komórkach palisadowych czynnik HIF-1 α , który aktywuje z kolei syntezę receptora CXCR4 [96]. Komórki palisadowe to migrujące komórki nowotworowe z regionów niedotlenowanych do regionów lepiej utlenowanych znajdujących się w sąsiedztwie prawidłowych naczyń krwionośnych [10]. Migracja tych komórek jest stymulowana przez chemokinę CXCL12 wydzielaną przez komórki EC.

HIF-1 α indukuje także syntezę innego receptora biorącego udział w przemieszczaniu się komórek: receptora MET [1,8]. Ligandem tego receptora jest białko HGF/SF (hepatocyste growth factor/scatter factor). Receptor MET bierze udział w regulacji aktywności kadheryn i integryn [40], białek biorących udział w oddziaływaniach komórka-komórka i komórka-macierz pozakomórkowa.

Inwazyjne przemieszczanie się komórek nowotworowych to proces składający się z kilku reakcji [85]:

- odrywania się komórek od głównej masy komórek nowotworowych;
- adhezji uwolnionych komórek do różnych elementów macierzy pozakomórkowej (ECM);
- enzymatycznej degradacji ECM, tworzenia miejsca (swoistych korytarzy) dla poruszających się komórek;



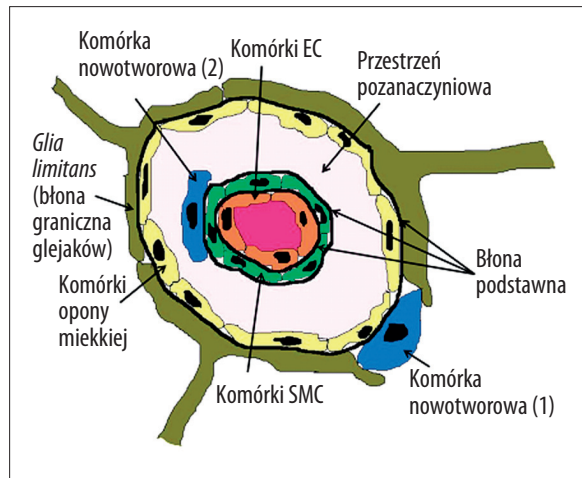
Ryc. 4. Schemat pięciu regionów komórki nowotworowej biorących udział w jej samodzielnym przemieszczaniu. Opis ruchu komórki w tekście

- migracji, przenikania macierzy pozakomórkowej.

Etap 1 wymaga zahamowania aktywności białek adhezyjnych (m.in. E-kadheryn) i jednocześnie wzrostu aktywności transbłonowego białka CD44 oraz N-kadheryn. Etap 2 to przyłączenie komórek do białek ECM: integryn i tenascyny C. Etap 3 to modyfikowanie białek ECM pod wpływem różnych proteaz (m.in. MMP-2, MMP-3, błonowych proteaz MT-MMP, dezyntegryn ADAM, plazminy i katepsyn). Niektóre z tych enzymów mogą być wydzielane przez same komórki nowotworowe, inne przez komórki mikrośrodowiska nowotworowego. Komórki mikrogleju biorą udział w przemieszczaniu się komórek nowotworowych glejaków wydzielając m.in. takie enzymy jak MMP-14/MT1-MMP, które z kolei aktywują metaloproteazę MMP-2 wydzielaną przez komórki glejaków [21]. Etap 4 to samodzielne przemieszczanie się komórek nowotworowych.

Pojedyncze komórki nowotworowe mogą się przemieszczać ruchem ameboidalnym lub ruchem podobnym do ruchu komórek mezenchymalnych (fibroblastów) [39]. Oprócz tych dwóch podstawowych sposobów przemieszczania się pojedynczych komórek nowotworowych istnieje także trzecia forma ruchu: ruch zbiorowy, ruch połączonych ze sobą komórek przemieszczających się za komórką wiodącą, liderową [38]. Rodzaj ruchu zależy od struktury, macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej. Poruszająca się ruchem ameboidalnym komórka nowotworowa w środowisku z bardzo gęstym utkaniem macierzy pozakomórkowej może zmienić sposób przemieszczania i zacząć poruszać się ruchem podobnym do ruchu komórek mezenchymalnych [39].

Samodzielne przemieszczanie się pojedynczych komórek nowotworowych to cyklicznie powtarzający się lokomocyjny proces składający się z pięciu etapów, w trakcie których komórka modyfikuje swój kształt (szkielet komórkowy), zmienia swoją pozycję i przekształca strukturę tkankową, przez które migruje [37]. W każdym z tych etapów bierze udział określony region komórki (zob. ryc. 4). Podczas etapu pierwszego, pod wpływem czynników chemotaktycznych, następuje „wybór” kierunku przemieszczania. W wyniku polimeryzacji aktyny, cytoszkielet komórki ulega swoistej polaryzacji i komórka wytwarza wypustki (pseudopodia). W drugim etapie proksymalny biegun komórki wiąże się z pozakomórkowymi substratami (kolagenem IV i lamininami). Jest to tzw. zogniskowana adhezja do podłoża. Podczas trzeciego etapu komórkowe proteazy



Ryc. 5. Schemat przekroju przez typowe naczynia krwionośne mózgu oraz lokalizację komórek nowotworowych podczas przemieszczania się: 1 – komórka przemieszczająca się w przestrzeni pozanaczyniowej, 2 – komórka przemieszczająca się poza naczyniem

rozbijają „stare” połączenia komórki z podłożem (tzw. zogniskowana proteoliza). W etapie czwartym enzym zwany GTP-azą Rho aktywuje miozynę II, która kurcząc się powoduje powstanie swoistego wewnątrzkomórkowego napięcia. Podczas etapu piątego dochodzi do zerwania wiązań z podłożem na dystalnym biegunie komórki (tzw. retrakcji). Etap ten umożliwia przemieszczenie się do przodu całej komórki [37].

Komórki glejaków przemieszczają się bądź wzdłuż naczyń krwionośnych bądź wzdłuż włókien nerwowych. W przemieszczaniu się komórek glejaków wzdłuż włókien nerwowych znaczną rolę odgrywają enzymy usuwające z osłonek włókien inhibitory hamujące wędrówkę komórek nowotworowych. Komórki glejaków za pomocą wydzielanych przez siebie enzymów MMP-14/MT1-MMP i MMP-2 inaktywują inhibitory migracji (Nogo-A, glikoproteinę związaną z mieliną oraz oligodendrytyczną mielinową glikoproteinę, które razem hamują wzrost aksonów i migrację komórek) [43].

Niewykluczone, że duża zawartość wody w macierzy pozakomórkowej i międzycząsteczkowe połączenia między włóknami mielinowymi a heparanem, tenascyną R, lektynami powoduje powstanie dużo łatwiejszej do sforsowania macierzy pozakomórkowej niż macierz utworzona z udziałem kolagenu [43].

Przemieszczające się wzdłuż naczyń krwionośnych komórki glejaków korzystają z błony granicznej (*glia limitans*) znajdującej się na granicy naczynia-parenchyma lub korzystają z tzw. przestrzeni pozanaczyniowej (perivascular space) [43]. Duże prawidłowe naczynia w mózgu są zbudowane z kilku warstw (zob. ryc.5). Warstwę zewnętrzną tworzy graniczna błona glejowa zbudowana z wypustek astrocytów, błona podstawna i warstwa komórek opony miękkiej. Między tą warstwą a następną warstwą zbudowaną z błony podstawnej znajduje się przestrzeń zwana przestrzenią pozanaczyniową. Następną warstwę tworzą komórki perycytów/mięśni gładkich, które wraz z błoną podstawną otaczają komórki śródbłonkowe. Ponieważ w mózgu nie występują naczynia limfatyczne ich rolę przejmują przestrzeń pozanaczyniowa, która zbiera i usuwa nadmiar płynów

z krwioobiegu. W małych naczyniach nie ma przestrzeni pozanaczyniowej. Błony *glia limitans* i podstawna komórka śródbłonkowa ulegają fuzji [43].

Komórki nowotworowe przemieszczają się zatem albo po zewnętrznej stronie naczyń (między wypustkami komórek glejowych i zewnętrznej błonie podstawnej) albo wewnątrz przestrzeni pozakomórkowej (wykorzystując do tego celu wewnętrzną błonę podstawną) (zob. ryc.5). Podczas migracji wzdłuż *glia limitans* komórki nowotworowe odsuwają astrocyty i, penetrując błonę podstawną i warstwę komórek opony miękkiej, przemieszczają się do światła przestrzeni pozanaczyniowej. Wędrujące wzdłuż naczyń komórki nowotworowe zatrzymują się w rozwidleniach naczyń i zaczynają się dzielić [35]. Niewykluczone, że właśnie w rozwidleniach naczyń mogą powstawać nisze, skupiska komórek mikrośrodowiska biorące udział w progresji komórek nowotworowych. Nisze te mogą powstawać między komórkami śródbłonkowymi a wypustkami astrocytów [19].

Przemieszczające się komórki nowotworowe wykorzystują głównie receptory integrynowe, przede wszystkim $\alpha 3 \beta 1$ wiążące się z lamininami i kolagenem IV. Podczas wędrowki wzdłuż *glia limitans*, komórki nowotworowe korzystają także z fibronektyny i witronektyny oraz homofilowych połączeń między N-kadherynami, L1-CAM i NCAM [43]. Jak dotąd, nie stwierdzono przenikania komórek nowotworowych glejaków do światła naczyń [35,43].

UNACZYNIENIE I INWAZYJNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH JAKO CELE TERAPEUTYCZNE

Oba omawiane procesy: powstawanie unaczynienia i inwazyjność komórek nowotworowych to dwa ważne procesy adaptacyjne [65,84]. Procesy te są swoistymi reakcjami komórek nowotworowych na hipoksję generowaną przez niesprawne naczynia nowotworowe. Niedobór tlenu jest kompensowany przez wytworzenie nowych naczyń, a niedotlenienie stymuluje pojawienie się nowotworowych komórek macierzystych (cancer stem cells) mających takie cechy fenotypowe jak inwazyjność, zdolność do stymulacji angiogenezy czy immunosupresji umożliwiającej ucieczkę spod nadzoru immunologicznego. Hipoksja generuje zatem powstanie dwóch odrębnych fenotypów: fenotypu proangiogenego i fenotypu proinwazyjnego. Oba fenotypy wydają się wzajemnie wykluczać: komórki nowotworowe są bądź proangiogenne i nieinwazyjne, bądź antyangiogenne i proinwazyjne [76].

Auf i wsp. [2] zauważyli, że zahamowanie aktywności białka IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1), jednego z sensorów stresu związanego z nieprawidłową konformacją białek (unfolded protein response), nie tylko hamuje aktywność proangiogenych czynników, takich jak VEGF-A, IL-1 β , IL-6, IL-8, ale podnosi także stężenie białek SPARC, dekoryny, trombospondyny 1, typowych inhibitorów angiogenezy, które są jednocześnie czynnikami stymulującymi inwazyjność komórek nowotworowych. Inwazyjne komórki nowotworowe wykazują wyraźny tropizm do prawidłowych naczyń.

Powtórzmy raz jeszcze: unaczynienie i inwazyjność komórek nowotworowych to dwa ściśle ze sobą powiązane procesy. Oba procesy są bardzo uzależnione od hipoksji

powstającej wokół niesprawnych, dysfunkcyjnych naczyń nowotworowych (zob. ryc. 2). Oba procesy odgrywają istotną rolę w progresji nowotworowej: swoistej ewolucji komórek nowotworowych [44]. Końcowym efektem tej ewolucji są wysoce agresywne, odporne na chemioterapię [26] i radioterapię [5] komórki nowotworowe.

Naszym zdaniem, skuteczne czynniki terapeutyczne powinny rozrywać oba „błędne koła” (zob. ryc. 6). Rzecz jasna, tak sformułowane cele terapeutyczne nie wykluczają innych celów terapeutycznych, innych rozwiązań terapeutycznych [22,24,28,60,92] (zob. tab. 2).

Teoretycznie, skutecznymi i swoistymi czynnikami rozrywającymi „błędne koło” unaczynienia powinny być leki antyangiogenne (np. Avastin [23]). Okazuje się jednak, że przewlekłe stosowanie tych leków może prowadzić do powstania tzw. polekowej hipoksji, która stymuluje inwazyjność komórek nowotworowych, a także ich zdolność do przerzutowania [31,32,66]. Oporność na leki antyangiogenne można ominąć stosując strategię terapeutyczną zwaną „normalizacją” nowotworowych naczyń krwionośnych [17,51].

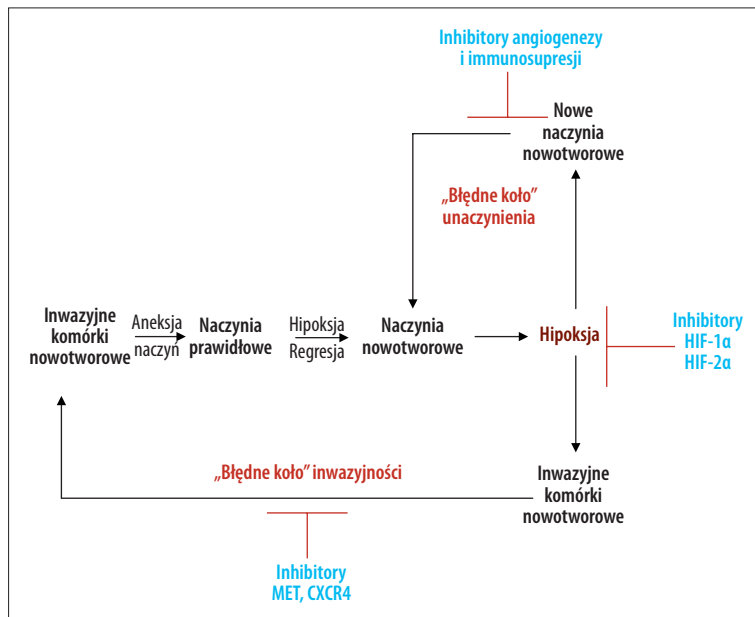
Podczas „normalizacji” naczynia stają się mniej przepuszczalne. Część nieprawidłowych naczyń nowotworowych ulega zniszczeniu, a towarzysząca naczyniom hipoksja, w trakcie „normalizacji”, ulega zanikowi. „Znormalizowane” naczynia umożliwiają lepszy transport leków do komórek nowotworowych. Odpowiednio stosowane leki antyangiogenne powinny zatem „uczulać” komórki nowotworowe na leki przeciwnowotworowe [55]. Niestety, część komórek nowotworowych mających cechy komórek macierzystych jest jednak oporna na działanie chemioterapeutyków [26] czy radioterapii [5]. Pozostawienie nawet kilka żywych nowotworowych komórek macierzystych w organizmie chorego wiąże się z ryzykiem nawrotu, wznowy choroby nowotworowej.

Rozwiązanie, które może skutecznie omijać oporność komórek nowotworowych to rozwiązanie, które jest skierowane przeciwko angiogenezie i które jednocześnie stymuluje odpowiedź odpornościową skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym [81,82]. Są to kombinacje leków, które w dość swoisty sposób polaryzują środowisko nowotworowe ze środowiska proangiogenego i immunosupresyjnego na środowisko antyangiogenne i immunostymulujące [83]. Przykładem takiego rozwiązania jest np. kombinacja szczepionki DNA skierowanej przeciwko endoglinie (CD105), która występuje nie tylko na powierzchni komórek śródbłonkowych, ale także na powierzchni niektórych komórek nowotworowych, z cytokiną stymulującą zarówno odpowiedź odpornościową swoistą jak i nieswoistą, np. IL-12. Kombinacja taka skutecznie hamowała wzrost guzów nowotworowych u doświadczalnych zwierząt [52].

Czynnikami rozrywającymi „błędne koło” związane z inwazyjnością mogą być leki hamujące aktywność receptorów MET i CXCR4 (ryc. 6). Hamowanie inwazyjności komórek nowotworowych, zwłaszcza glejaków, może nastręczać jednak wiele trudności. Mechanizmy przemieszczania się zarówno prawidłowych komórek macierzystych w mózgu, jak i komórek glejaków są niezwykle podobne, stąd bezpośrednie hamowanie inwazyjności glejaków może mieć niekorzystny wpływ na aktywność prawidłowych komórek mózgu [91].

Tabela 2. Niektóre cele terapeutyczne glejaków oraz leki rozpoznające te cele

Strategie	Cele	Przykładowe leki	Literatura
Hamowanie angiogenezy, hamowanie powstawania nisz	Naczynia nowotworowe (VEGF, VEGFR-2)	Liczne leki antyangiogenne: m.in. Bevacizumab (Avastin), Pazopanib, Sunitinib	Dietrich i wsp. [28]
Hamowanie aktywności białek szlaków sygnałowych	PDGFR EGFR PI3K IL-6 NOTCH SH4	Imatinib Getitinib, Erlotinib Inhibitory Akt Przeciwciała anti-IL-6 Inhibitory γ -sekreazy Cyklopamina	Dietrich i wsp. [28] Dietrich i wsp. [28] Eyler i wsp. [33] Wang i wsp. [89] Fan i wsp. [34] Bar i wsp. [6]
Hamowanie inwazyjności	CXCR4 MET	AMD3100 Przeciwciała anti-MET	Duda i wsp. [30] Cecchi i wsp. [20]
Hamowanie niedotlenienia	HIF-1 α	Digoksyna	Zhang i wsp. [98]
Hamowanie glikolizy	Metabolizm komórek niedotlenianych	Dwuchloroocetan	Michelakis i wsp. [62]
Hamowanie adhezji komórek nowotworowych	Białko L1CAM	shRNA	Bao i wsp. [4]
Stymulacja różnicowania	Receptory BMP Receptory kwasu retinowego	BMP4 Kwas retinowy (w konfiguracji <i>trans</i>)	Piccirillo i wsp. [71] Campos i wsp. [16]
Niszczanie komórek glejaków	Komórki glejaków	Komórki macierzyste z genami terapeutycznymi	Kim [57] Porada i Porada [73]



Ryc. 6. „Ménage à trois”: trzy główne strategie terapeutyczne próbujące rozerwać dwa „błędne koła”: unaczynienie i inwazyjność komórek nowotworowych glejaków

Obiecującym rozwiązaniem może być natomiast hamowanie aktywności czynników transkrypcyjnych HIF-1 α i HIF-2 α [93,98]. Zahamowanie aktywności HIF-1 α prowadzi do zahamowania unaczynienia (hamowanie aktywności VEGF), a także inwazyjności komórek nowotworowych (hamowanie aktywności receptorów MET i CXCR4).

Warte uwagi mogą być także leki, które działają na metabolizm niedotlenianych komórek nowotworowych, zwłaszcza te leki, które działają na glikolizę [14,56]. Lekiem takim jest dwuchloroocetan, który hamuje aktywność dehydrogenazy

pirogronianowej, zwiększa dopływ pirogronianu do mitochondriów i stymuluje utlenienie glukozy. Reakcje te indukują apoptozę z udziałem mitochondriów i hamują wzrost nowotworów [62]. Tego typu leki rozrywają zarówno „błędne koło” związane z unaczynieniem, jak i „błędne koło” związane z inwazyjnością komórek nowotworowych (ryc. 6).

Oryginalnym rozwiązaniem terapeutycznym jest tzw. terapia komórkowa, która wykorzystuje niezwykle tropizm komórek macierzystych (prawidłowych neuralnych komórek macierzystych lub prawidłowych mezenchymalnych

komórek macierzystych) do komórek glejaków. Komórki macierzyste mogą więc posłużyć jako nośniki terapeutycznych genów (np. genów kodujących niektóre cytokiny: IL-4, IL-12, IL-18) [57,73].

Skuteczna terapia skierowana przeciwko nowotworom mózgu jest wypadkową wielu trudnych do uchwycenia

czynników: swoistości danego leku, zdolności rozpoznawania przez lek określonego celu terapeutycznego, adaptacyjnych właściwości komórek nowotworowych, stanu ich rozproszenia w parenchymie, a także zdolności bariery krew-mózg w transporcie leków. Skuteczność terapii przeciwnowotworowej będzie zależała od udanego połączenia wielu tych czynników.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Allen M., Louise Jones J.: Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J. Pathol.*, 2011; 223: 162–176
- [2] Auf G., Jabouille A., Guérit S., Pineau R., Delugin M., Bouchechareilh M., Magnin N., Favereaux A., Maitre M., Gaiser T., von Deimling A., Czabanka M., Vajkoczy P., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M.: Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 15553–15558
- [3] Baluk P., Hashizume H., McDonald D.M.: Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2005; 15: 102–111
- [4] Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.*, 2008; 68: 6043–6048
- [5] Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N.: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006; 444: 756–760
- [6] Bar E.E., Chaudhry A., Lin A., Fan X., Schreck K., Matsui W., Piccirillo S., Vescovi A.L., DiMeco F., Olivi A., Eberhart C.G.: Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*, 2007; 25: 2524–2533
- [7] Bar E.E.: Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain. Pathol.*, 2011; 21: 119–129
- [8] Bertout J.A., Patel S.A., Simon M.C.: The impact of O2 availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 967–975
- [9] Borovski T., De Sousa E., Melo F., Vermeulen L., Medema J.P.: Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.*, 2011; 71: 634–639
- [10] Brat D.J., Castellano-Sanchez A.A., Hunter S.B., Pecot M., Cohen C., Hammond E.H., Devi S.N., Kaur B., Van Meir E.G.: Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res.*, 2004; 64: 920–927
- [11] Brat D.J., Van Meir E.G.: Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Invest.*, 2004; 84: 397–405
- [12] Brennan C., Momota H., Hambarzumyan D., Ozawa T., Tandon A., Pedraza A., Holland E.: Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS One*, 2009; 4: e7752
- [13] Brennan C.: Genomic profiles of glioma. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 2011; 11: 291–297
- [14] Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W.: Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11: 85–95
- [15] Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B., Oh E.Y., Gaber M.W., Finklestein D., Allen M., Frank A., Bayazitov I.T., Zakharenko S.S., Gajjar A., Davidoff A., Gilbertson R.J.: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 2007; 11: 69–82
- [16] Campos B., Wan F., Farhadi M., Ernst A., Zeppernick F., Tagscherer K.E., Ahmadi R., Lohr J., Dicus C., Gdynia G., Combs S.E., Goidts V., Helmke B.M., Eckstein V., Roth W., Beckhove P., Lichter P., Unterberg A., Radlwimmer B., Herold-Mende C.: Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 2715–2728
- [17] Carmeliet P., Jain R.K.: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011; 473: 298–307
- [18] Carmeliet P., Jain R.K.: Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011; 10: 417–427
- [19] Cayre M., Canoll P., Goldman J.E.: Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.*, 2009; 88: 41–63
- [20] Cecchi F., Rabe D.C., Bottaro D.P.: Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2012; 16: 553–572
- [21] Charles N.A., Holland E.C., Gilbertson R., Glass R., Kettenmann H.: The brain tumor microenvironment. *Glia*, 2012; 60: 502–514
- [22] Cheng L., Bao S., Rich J.N.: Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.*, 2010; 80: 654–665
- [23] Chinot O.L., de La Motte Rouge T., Moore N., Zeaiter A., Das A., Phillips H., Modrusan Z., Cloughesy T.: AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Adv. Ther.*, 2011; 28: 334–340
- [24] Chung A.S., Lee J., Ferrara N.: Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2010; 10: 505–514
- [25] De Bock K., Cauwenberghs S., Carmeliet P.: Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2011; 21: 73–79
- [26] Dean M., Fojo T., Bates S.: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 275–284
- [27] Dewhirst M.W., Cao Y., Moeller B.: Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer*, 2008; 8: 425–437
- [28] Dietrich J., Diamond E.L., Kesari S.: Glioma stem cell signaling: therapeutic opportunities and challenges. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010; 10: 709–722
- [29] Döme B., Hendrix M.J., Paku S., Tóvári J., Tímár J.: Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.*, 2007; 170: 1–15
- [30] Duda D.G., Kozin S.V., Kirkpatrick N.D., Xu L., Fukumura D., Jain R.K.: CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 2074–2080
- [31] Ebos J.M., Kerbel R.S.: Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2011; 8: 210–221
- [32] Ebos J.M., Lee C.R., Cruz-Munoz W., Bjarnason G.A., Christensen J.G., Kerbel R.S.: Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 2009; 15: 232–239
- [33] Eyler C.E., Foo W.C., LaFiura K.M., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells*, 2008; 26: 3027–3036
- [34] Fan X., Khaki L., Zhu T.S., Soules M.E., Talsma C.E., Gul N., Koh C., Zhang J., Li Y.M., Maciaczyk J., Nikkha G., DiMeco F., Piccirillo S., Vescovi A.L., Eberhart C.G.: NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells*, 2010; 28: 5–16
- [35] Farin A., Suzuki S.O., Weiker M., Goldman J.E., Bruce J.N., Canoll P.: Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*, 2006; 53: 799–808
- [36] Folberg R., Maniatis A.J.: Vasculogenic mimicry. *APMIS*, 2004; 112: 508–525
- [37] Friedl P., Alexander S.: Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 2011; 147: 992–1009
- [38] Friedl P., Gilmour D.: Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; 10: 445–457
- [39] Friedl P., Wolf K.: Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.*, 2010; 188: 11–19
- [40] Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C., Vande Woude G.: Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer*, 2012; 12: 89–103

- [41] Glas M., Happend C., Rieger J., Wiewrodt D., Bähr O., Steinbach J.P., Wick W., Kortmann R.D., Reifenberger G., Weller M., Herrlinger U.: Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 1257–1261
- [42] Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., Housman D.E., Koch C.J., Lowe S.W., Giaccia A.J.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 1996; 379: 88–91
- [43] Gritsenko P.G., Ilina O., Friedl P.: Interstitial guidance of cancer invasion. *J. Pathol.*, 2012; 226: 185–199
- [44] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646–674
- [45] Heddeston J.M., Li Z., Lathia J.D., Bao S., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br. J. Cancer*, 2010; 102: 789–795
- [46] Heddeston J.M., Li Z., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle*, 2009; 8: 3274–3284
- [47] Hoelzinger D.B., Demuth T., Berens M.E.: Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2007; 99: 1583–1593
- [48] Holash J., Maisonpierre P.C., Compton D., Boland P., Alexander C.R., Zagzag D., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J.: Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 1999; 284: 1994–1998
- [49] Huse J.T., Holland E.C.: Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat. Rev. Cancer*, 2010; 10: 319–331
- [50] Jain R.K., di Tomaso E., Duda D.G., Loeffler J.S., Sorensen A.G., Batchelor T.T.: Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2007; 8: 610–622
- [51] Jain R.K.: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 2005; 307: 58–62
- [52] Jarosz M., Jazowiecka-Rakus J., Cichoń T., Głowala-Kosińska M., Smolarczyk R., Smagor A., Malina S., Sochanik A., Szala S.: Therapeutic antitumor potential of endoglin-based DNA vaccine combined with immunomodulatory agents. *Gene Ther.*, 2012 (w druku)
- [53] Jensen R.L.: Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *J. Neurooncol.*, 2009; 92: 317–335
- [54] Keith B., Johnson R.S., Simon M.C.: HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 12: 9–22
- [55] Kerbel R.S.: Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science*, 2006; 312: 1171–1175
- [56] Keunen O., Johansson M., Oudin A., Sanzey M., Rahim S.A., Fack F., Thorsen F., Taxt T., Bartos M., Jirik R., Miletic H., Wang J., Stieber D., Stuhr L., Moen I., Rygh C.B., Bjerkvig R., Niclou S.P.: Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 3749–3754
- [57] Kim S.U.: Neural stem cell-based gene therapy for brain tumors. *Stem Cell Rev.*, 2011; 7: 130–140
- [58] Kirschmann D.A., Sefter E.A., Hardy K.M., Sefter R.E., Hendrix M.J.: Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.*, 2012; 18: 2726–2732
- [59] Kordek R.: Gwiażdździaki – klasyfikacja histokliniczna i molekularna. *Polski Przegląd Neurologiczny*, 2010; 6 (Supl.A): 11–12
- [60] Lamszus K., Günther H.S.: Glioma stem cells as a target for treatment. *Target. Oncol.*, 2010; 5: 211–215
- [61] Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P.: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*, 2007; 114: 97–109
- [62] Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R.: Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br. J. Cancer*, 2008; 99: 989–994
- [63] Nagy J.A., Chang S.H., Dvorak A.M., Dvorak H.F.: Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer*, 2009; 100: 865–869
- [64] Nagy J.A., Chang S.H., Shih S.C., Dvorak A.M., Dvorak H.F.: Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010; 36: 321–331
- [65] Onishi M., Ichikawa T., Kurozumi K., Date I.: Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol.*, 2011; 28: 13–24
- [66] Páez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Viñals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D., Casanovas O.: Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 2009; 15: 220–231
- [67] Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.M., Gallia G.L., Olivari A., McLendon R., Rasheed B.A., Keir S., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Busam D.A., Tekleab H., Diaz L.A. Jr, Hartigan J., Smith D.R., Strausberg R.L., Marie S.K., Shinjo S.M., Yan H., Riggins G.J., Bigner D.D., Karchin R., Papadopoulos N., Parmigiani G., Vogelstein B., Velculescu V.E., Kinzler K.W.: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 2008; 321: 1807–1812
- [68] Patenaude A., Parker J., Karsan A.: Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. *Microvasc. Res.*, 2010; 79: 217–223
- [69] Persano L., Rampazzo E., Della Puppa A., Pistollato F., Basso G.: The three-layer concentric model of glioblastoma: cancer stem cells, microenvironmental regulation, and therapeutic implications. *ScientificWorldJournal*, 2011; 11: 1829–1841
- [70] Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W.F., Soriano R.H., Wu T.D., Misra A., Nigro J.M., Colman H., Soroceanu L., Williams P.M., Modrusan Z., Feuerstein B.G., Aldape K.: Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 2006; 9: 157–173
- [71] Piccirillo S.G., Reynolds B.A., Zanetti N., Lamorte G., Binda E., Broggi G., Brem H., Olivari A., Dimeco F., Vescovi A.L.: Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, 2006; 444: 761–765
- [72] Pistollato F., Abbadi S., Rampazzo E., Persano L., Della Puppa A., Frasson C., Sarto E., Scienza R., D'Avella D., Basso G.: Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells*, 2010; 28: 851–862
- [73] Porada C.D., Almeida-Porada G.: Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2010; 62: 1156–1166
- [74] Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M., Todaro M., Ivernicci G., Cenci T., Maira G., Parati E.A., Stassi G., Larocca L.M., De Maria R.: Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 2010; 468: 824–828
- [75] Rodriguez F.J., Orr B.A., Ligon K.L., Eberhart C.G.: Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget*, 2012; 3: 98–106
- [76] Sakariassen P.Ø., Prestegarden L., Wang J., Skafnesmo K.O., Mahesparan R., Molthoff C., Sminia P., Sundlisæter E., Misra A., Tysnes B.B., Chekenya M., Peters H., Lende G., Kalland K.H., Øyan A.M., Petersen K., Jonassen I., van der Kogel A., Feuerstein B.G., Terzis A.J., Bjerkvig R., Enger P.Ø.: Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 16466–16471
- [77] Sciumè G., Santoni A., Bernardini G.: Chemokines and glioma: invasion and more. *J. Neuroimmunol.*, 2010; 224: 8–12
- [78] Soda Y., Marumoto T., Friedmann-Morvinski D., Soda M., Liu F., Michiue H., Pastorino S., Yang M., Hoffman R.M., Kesari S., Verma I.M.: Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 4274–4280
- [79] Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 2005; 352: 987–996
- [80] Sugimoto K., Gordon S.P., Meyerowitz E.M.: Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell. Biol.*, 2011; 21: 212–218
- [81] Szala S.: Angiogenesis and immune suppression: yin and yang of tumor progression? *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 598–612
- [82] Szala S., Jarosz M.: Tumor blood vessels. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 437–446
- [83] Szala S., Mitrus I., Sochanik A.: Can inhibition of angiogenesis and stimulation of immune response be combined into a more effective antitumor therapy? *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010; 59: 1449–1455
- [84] Tate M.C., Aghi M.K.: Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics*, 2009; 6: 447–457

- [85] Teodorczyk M., Martin-Villalba A.: Sensing invasion: cell surface receptors driving spreading of glioblastoma. *J. Cell Physiol.*, 2010; 222: 1–10
- [86] The Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 2008; 455: 1061–1068
- [87] van Beijnum J.R., Nowak-Sliwinska P., van den Boezem E., Hautvast P., Buurman W.A., Griffioen A.W.: Tumor angiogenesis is enforced by autocrine regulation of high-mobility group box 1. *Oncogene*, 2012 (w druku)
- [88] Verhaak R.G., Hoadley K.A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M.D., Miller C.R., Ding L., Golub T., Mesirov J.P., Alexe G., Lawrence M., O’Kelly M., Tamayo P., Weir B.A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., Jakkula L., Feiler H.S., Hodgson J.G., James C.D., Sarkaria J.N., Brennan C., Kahn A., Spellman P.T., Wilson R.K., Speed T.P., Gray J.W., Meyerson M., Getz G., Perou C.M., Hayes D.N.; Cancer Genome Atlas Research Network.: Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 2010; 17: 98–110
- [89] Wang H., Lathia J.D., Wu Q., Wang J., Li Z., Heddleston J.M., Eyler C.E., Elderbroom J., Gallagher J., Schuschu J., MacSwords J., Cao Y., McLendon R.E., Wang X.F., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells*, 2009; 27: 2393–2404
- [90] Wen P.Y., Kesari S.: Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 492–507
- [91] Westphal M., Lamszus K.: The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2011; 12: 495–508
- [92] Wick W., Weller M., Weiler M., Batchelor T., Yung A.W., Platten M.: Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro. Oncol.*, 2011; 13: 566–579
- [93] Wilson W.R., Hay M.P.: Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2011; 11: 393–410
- [94] Wong M.L., Prawira A., Kaye A.H., Hovens C.M.: Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *J. Clin. Neurosci.*, 2009; 16: 1119–1130
- [95] Zagzag D., Amirnovin R., Greco M.A., Yee H., Holash J., Wiegand S.J., Zabski S., Yancopoulos G.D., Grumet M.: Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab. Invest.*, 2000; 80: 837–849
- [96] Zagzag D., Esencay M., Mendez O., Yee H., Smirnova I., Huang Y., Chiriboga L., Lukyanov E., Liu M., Newcomb E.W.: Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer’s structures. *Am. J. Pathol.*, 2008; 173: 545–560
- [97] Zagzag D., Lukyanov Y., Lan L., Ali M.A., Esencay M., Mendez O., Yee H., Voura E.B., Newcomb E.W.: Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab. Invest.*, 2006; 86: 1221–1232
- [98] Zhang H., Qian D.Z., Tan Y.S., Lee K., Gao P., Ren Y.R., Rey S., Hammers H., Chang D., Pili R., Dang C.V., Liu J.O., Semenza G.L.: Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 19579–19586

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.