

Received: 2006.05.02
Accepted: 2006.08.04
Published: 2006.09.01

Mechanizmy przerzutowania i molekularne markery progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego*

Mechanisms of metastasis and molecular markers of malignant tumor progression. I. Colorectal cancer

Maciej S. Wideł¹, Maria Wideł²

¹ Klinika Chirurgii Onkologicznej Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach

² Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Zdolność komórek nowotworowych do rozsiewu z pierwotnego ogniska do węzłów chłonnych, oraz do najbliższych i odległych tkanek i narządów jest nieodłączną cechą nowotworów złośliwych i jest ona główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu wielu typów nowotworów. Proces powstawania przerzutów jest kaskadą zjawisk obejmujących proteolizę, ruchliwość i migrację komórek, proliferację i neoangiogenezę. W pierwszym etapie komórki uwolnione z pierwotnego nowotworu muszą wnikać do naczyń chłonnych i/lub krwionośnych, drogą których następuje rozsiew. Krążące komórki mogą następnie migrować przez ściany naczyń do otaczających tkanek, gdzie osiedlają się, proliferują, indukują angiogenezę, tworząc ogniska przerzutowe. W procesie "intra- i ekstrawazacji" niezbędna jest aktywacja enzymów proteolitycznych zdolnych do degradacji macierzy pozakomórkowej, otaczającej warstwę śródbłonka naczyń, czy też budującą błonę podstawną tkanki nabłonkowej różnych narządów. Na tym etapie niezbędna jest aktywacja enzymów proteolitycznych, takich jak proteiny systemu plazminy, proteiny serynowe oraz metaloproteiny macierzowe. Jednocześnie następują zmiany ekspresji wielu glikoprotein i czynników odpowiedzialnych za adhezję komórek, takich jak integraliny powierzchniowe i za międzykomórkową komunikację, np. kadheryny. Z neoangiogenezą związana jest natomiast ekspresja markerów tego procesu, m.in. czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF), endogliny (CD105), transbłonowej glikoproteiny, która jest receptorem transformującego czynnika wzrostu, TGF- β , oraz neuropiliny (NRP), koreceptora dla VEGF.

Konwencjonalnie, prognozowanie przebiegu choroby nowotworowej i leczenia opiera się głównie na dokładnym określeniu stopnia zaawansowania klinicznego. Zrozumienie komórkowych procesów odpowiedzialnych za rozsiew nowotworów i poznanie molekularnych markerów inwazyjności może być użyteczne nie tylko do udoskonalania diagnostyki i prognozowania przebiegu choroby, ale także do opracowania leków "celowanych", skierowanych wybiórczo w stosunku do czynników odpowiedzialnych za inwazyjność nowotworów, oraz do opracowania nowych schematów terapeutycznych, pozwalających na zastosowanie takich leków. W niniejszym przeglądzie autorzy skoncentrowali się głównie na jednym typie nowotworu, raku jelita grubego, w którym przerzuty odległe, przede wszystkim do wątroby są główną przyczyną niepowodzeń, mimo chirurgicznego wyleczenia zmiany pierwotnej.

Słowa kluczowe:

przerzutowanie nowotworów • adhezja i migracja komórek • aktywność proteolityczna • angiogeneza • markery inwazyjności nowotworów • rak jelita grubego

*Praca sponsorowana z grantu Ministerstwa Edukacji i Nauki, nr: PBZ-KBN-091/P05/55.

Summary

The ability of neoplastic cells to dissemination from a primary tumor to lymphatic nodes and to adjacent and distant tissues and organs is an inseparable feature of malignant tumors and the main cause of failure in their treatment.

Metastasis formation is a multistage process which includes proteolysis, the motility and migration of cells, proliferation, and neoangiogenesis. In the first step, the cells released from the primary tumor have to penetrate to the blood or lymphatic vessels (intravasation), the road which dissemination follows. Circulating cells can then migrate through the walls of vessels to surrounding tissues (extravasation) where they settle, proliferate, and induce angiogenesis, creating metastases. Indispensable in the process of intra- and extravasation is the activation of proteolytic enzymes capable of degrading the extracellular matrix (ECM) surrounding the endothelium or creating the basement membrane of epithelial tissue in different organs. In this stage, the activation of proteolytic enzymes, such as proteinases of the plasmin system, serine proteinases, and matrix metalloproteinases (MMPs), is necessary. Simultaneously, changes occur in the expression of many superficial glycoproteins and factors responsible for cell adhesion (integrins) and intercellular communication (cadherins). Neoangiogenesis is connected with the expression of many markers of this process, among them vascular endothelial growth factor (VEGF), endoglin (CD105), a transmembranous glycoprotein which is a component of the receptor for transforming growth factor β (TGF β), as well as neuropilin (NRP), the co-receptor for VEGF.

Conventionally, the prognosis of neoplastic disease and its treatment are based mainly on exact clinical and histopathological staging. This prognosis could, however, be improved by measuring the molecular and cellular markers which play key roles in tumor progression. Understanding the cellular processes responsible for tumor dissemination can be useful not only in the diagnosis and prognosis of treatment results, but also in developing targeted drugs, selectively directed towards those factors responsible for tumor invasiveness, as well as in creating new therapeutic strategies permitting the use of such drugs. In the present review the authors concentrate mainly on one tumor type, colorectal carcinoma, in which distant metastases, predominantly to the liver, are the main cause of failure, in spite of surgical curing of the primary tumor.

Key words: metastasizing of tumors • adhesion and migration of cells • proteolytic activity • angiogenesis • markers of tumor invasiveness • colorectal cancer

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9632.pdf

Word count: 8566

Tables: –

Figures: 1

References: 200

Adres autorki: dr hab. Maria Widel, Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: widel@io.gliwice.pl

MECHANIZMY PRZERZUTOWANIA NOWOTWORÓW ZŁOŚLIWYCH

Wprowadzenie

Populacja komórek nowotworowych w guzie pierwotnym jest heterogenna pod względem biologicznym, co jest wynikiem gromadzenia się mutacji, zmian w ekspresji genów i niestabilności genetycznej w proliferujących komórkach. W procesie progresji nowotworu niektóre komórki nabywają cech fenotypu inwazyjnego, charakteryzującego się zdolnością do przerzutowania [155]. Powstawanie przerzutów jest procesem złożonym, wielostopniowym, o którym decydują takie cechy jak: aktywność proteolityczna komórek nowotworu, ich zdolności migracyjne, aktywność proliferacyjna i zdolność do neowaskularyzacji [111]. Do powstania przerzutu komórki nowotworowe uwolnione z guza

pierwotnego muszą dokonać inwazji otaczających tkanek: przekroczyć błonę podstawną leżącą u podstawy tkanek nabłonkowych, a także otaczającą warstwę komórek śródbłonka naczyń krwionośnych zaopatrujących guz, wniknąć do naczyń chłonnych i/lub krwionośnych (intravasation), następnie migrować przez ściany naczyń do otaczających tkanek (extravasation), gdzie w końcu osiedlają się, proliferują, indukują angiogenezę, tworząc ogniska przerzutowe. Błona podstawna jest wyspecjalizowaną siecią białek (proteoglikanów) macierzy pozakomórkowej (extracellular matrix – ECM), takich jak kolagen, laminina, fibronektyna, witronektyna, siarczan heparanu i inne, pełniących wielorakie funkcje. Oprócz tego, że jest ona mechaniczną barierą między nabłonkiem, czy też pomiędzy śródbłonkiem naczyń a otaczającą tkanką, pełni ona rolę kotwicy dla prawidłowych komórek, a także indukuje różnicowa-

nie i ogranicza migrację komórek prawidłowych [82,111]. Zdolność komórek nowotworowych do degradowania składników ECM, błony podstawnej, a także otaczającej tkanki podścieliska guza jest bezpośrednio związana z potencjałem przerzutowania [82,111]. Dzięki wydzielaniu różnych enzymów proteolitycznych, a zwłaszcza metaloproteinaz macierzowych oraz aktywatorów plazminogenu, komórki nowotworowe są zdolne do trawienia tkanek, przekraczania błony podstawnej i do przenikania przez ściany naczyń krwionośnych i limfatycznych.

Główne składniki macierzy pozakomórkowej (kolagen, fibronektyna, laminina) pełnią złożoną, często aktywną rolę w migracji i adhezji komórek. [80,82]. Na przykład kolagen, może być chemoatraktantem indukującym inwazję komórek nowotworowych. Pewne sekwencje aminokwasowe w cząsteczce fibronektyny zwane sekwencjami RGD (Arg-Gly-Asp) są natomiast ligandami receptorów integryn powierzchniowych [46,87]. Interakcja komórkowych integryn z białkami macierzy pozakomórkowej jest odpowiedzialna za adhezję i migrację komórek – procesy, które są nieodłącznymi elementami embriogenezy, angiogenezy, krzepnięcia i hemostazy oraz gojenia ran [80]. Powierzchniowe integryny są ważnymi czynnikami funkcjonowania zarówno prawidłowych komórek śródbłonna, jak i dynamicznych zmian towarzyszących progresji nowotworów w postaci inwazyjnej [82].

Inną grupę komórkowych czynników powierzchniowych stanowią kadheryny. Są one zależnymi od Ca^{2+} cząsteczkami adhezyjnymi, które w warunkach fizjologicznych są zaangażowane m.in. w proces embriogenezy i w utrzymanie architektury tkanek nabłonkowych, oraz w kontrolowanie proliferacji, różnicowania i śmierci komórek [52]. Zmiany ekspresji i regulacji tych cząsteczek mają również ścisły związek z inwazyjnością nowotworów.

Angiogeneza jest natomiast krytycznym procesem zarówno dla wzrostu guza pierwotnego, jak i dla tworzących się w wyniku rozsiewu komórek nowotworowych przerzutów [51]. Jedynie guz nie większy niż 1–2 mm³ może być zaopatrywany w tlen za pośrednictwem dyfuzji z otaczających tkanek, bowiem w miarę wzrostu masy guza, komórki pozbawione naczyń krwionośnych stają się niedotlenowane. Hipoksja indukuje czynnik transkrypcyjny HIF-1a (hypoxia inducible factor), który promuje transkrypcję wielu genów ułatwiających przetrwanie komórek w warunkach hipoksji [76], a także genów czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor – VEGF). Czynniki te stymulują migrację komórek śródbłonna naczyń w kierunku guza, ich proliferację i formowanie nowych naczyń krwionośnych [134,160]. Uproszczony schemat kaskady procesów przerzutowania przedstawiono na ryc. 1. Należy dodać, że najnowsze poglądy przypisują również płytkom krwi aktywną rolę w procesie tworzenia naczyń guzów nowotworowych (przegląd w [140]).

W kolejnych częściach artykułu omówione zostaną poszczególne etapy kaskady procesów przerzutowania i progresji nowotworów oraz najważniejsze molekularne czynniki zaangażowane w te procesy. Zdając sobie sprawę ze złożoności tych procesów i z ograniczonych możliwości dokładnego omówienia wszystkich markerów przerzutowania w różnych nowotworach w jednym artykule przeglą-

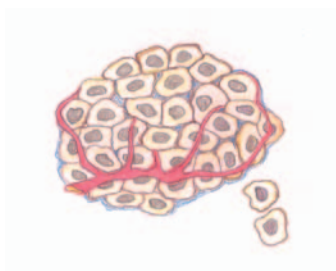
dowym, autorzy, po ogólnym omówieniu procesów przerzutowania, wspólnych dla różnych nowotworów, podjęli się szerszego omówienia molekularnych markerów przerzutowania w raku jelita grubego.

Enzymy proteolityczne i degradacja macierzy pozakomórkowej

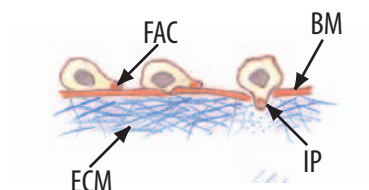
Komórki nowotworowe w procesie “intra- i ekstrawazacji” muszą przekroczyć błonę podstawną, otaczającą warstwę śródbłonna naczyń. Proces ten wymaga aktywacji enzymów proteolitycznych, takich jak proteinazy systemu plazminy, proteinazy serynowe oraz metaloproteinazy (metaloproteinazy) macierzowe (matrix metalloproteinases, MMPs), zwane także matryksynami (matrixins) [129].

Metaloproteinazy macierzowe należą do rodziny enzymów zawierających cynk. Są one głównymi enzymami, które są zdolne do degradacji błony podstawnej i składników macierzy pozakomórkowej. Metaloproteinazy są wytwarzane zarówno przez komórki nowotworowe, jak i przez komórki podścieliska guza. Wydzielane przez komórki jako proenzymy (pro-MMPs), ulegają aktywacji pozakomórkowo przez inne proteinazy tkankowe lub krążące w surowicy [129]. Dotąd poznano co najmniej 20 różnych enzymów z rodziny metaloproteinaz. Dzielą się one na 4 grupy w zależności od ich powinowactwa do komponentów macierzy pozakomórkowej: kolagenazy, żelatynazy, stromelizyny i matrylizyny. Metaloproteinaza 2 (MMP-2), zwana inaczej żelatynazą A (72 kDa gelatinase, IV collagenase) i metaloproteinaza 9 (MMP-9), inaczej żelatynaza B (92 kDa gelatinase, IV collagenase) zdolne są do rozkładu żelatyny i kolagenu [21]. Metaloproteinazy, zwłaszcza żelatynazy, ulegają także ekspresji w fibroblastach i w leukocytach modelując procesy zapalne [127].

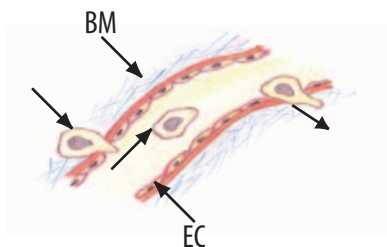
Profil ekspresji metaloproteinaz zmienia się prawdopodobnie wraz z progresją nowotworu. Na przykład, ekspresję MMP-9 obserwowano w liniach czerniaka wyprowadzonych z zaawansowanych postaci czerniaka, a nie była ona obecna w liniach wyprowadzonych z wczesnych postaci czerniaka [114]. Wydaje się, że w różnych nowotworach nadekspresji ulegają swoje metaloproteinazy i np. żelatynazy MMP-2 i -9 są głównie związane z progresją czerniaka. Wykazano, że ekspresja metaloproteinazy MMP-2 charakteryzowała inwazyjne postaci czerniaka i była niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [182]. Metaloproteinazy MMP-2 i -9 ulegają także nadekspresji w raku piersi [106,147]. W badaniach na 270 przypadkach raka piersi z ujemnymi węzłami chłonnymi metodami immunohistochemicznymi stwierdzono, że prawie 60% chorych wykazywało ekspresję MMP-2 lub MMP-9. Ekspresja jednego z tych enzymów, lub ich koekspresja znamienne korelowała z krótszym przeżyciem bezobjawowym chorych [106]. Również stężenie i aktywność sekrecyjnych postaci MMP-2 i -9 wzrasta we krwi chorych na raka piersi. Oceniane przedoperacyjnie w osoczu chorych na raka piersi, chorych z łagonymi guzami, a także osób zagrożonych nowotworem było znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej zdrowych dawczyń [168]. Natomiast w raku jelita grubego, korelację między ekspresją MMP-2 i MMP-9 a progresją nowotworu znajdowano tylko incydentalnie [33]. MMP-7 znana także jako matrylizyna 7 (matrilysin) wydaje się jedną z ważniejszych w przerzutowaniu raka je-



Utrata kontaktu i oderwanie się komórek od guza pierwotnego na skutek zaburzenia ekspresji powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych



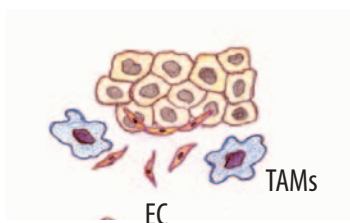
Migracja komórek: utworzenie ogniskowego kontaktu adhezyjnego (FAC), tworzenie inwadopodiów (IP) i degradacja błony podstawnej (BM) i macierzy pozakomórkowej (ECM)



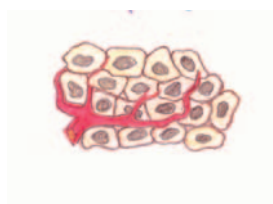
„Intrawazacja”, wędrówka w krwiobiegu lub w układzie limfatycznym i „ekstrawazacja” komórek nowotworowych przez ściany naczyń (EC, komórki śródbłónka)



Proliferacja komórek w nowym miejscu osiedlenia; guz awaskularny (poniżej 2 mm³) zaopatrywany w tlen i odżywiany za pośrednictwem dyfuzji



Dalsza proliferacja stymulowana przez makrofagi (TAMs) i chemotaksja komórek śródbłónka (EC) przez czynniki proangiogenne, m.in. VEGF indukowany przez HIF-1 ulegający ekspresji pod wpływem hipoksji



Samodzielnie funkcjonujący przerzut dzięki *de novo* utworzonym naczyniom krwionośnym

Ryc. 1. Uproszczony schemat inwazji i powstawania przerzutów nowotworów złośliwych

lita grubego [160], aczkolwiek wykazano jej udział w inwazji i przerzutowaniu innych nowotworów, m.in. w raku gruczołu krokowego [68], żołądka [91] i przełyku [194]. W przeciwieństwie do innych metaloproteinaz, które mogą być wytwarzane zarówno przez komórki guza, jak i komór-

ki podścieliska, MMP-7 jest wytwarzana wyłącznie przez komórki nowotworowe.

Wskazuje się, że metaloproteinazy odgrywają rolę nie tylko w degradowaniu błony podstawnej, ale mogą też

prawdopodobnie być regulatorami wzrostu i angiogenezy. Wykazano, że np. MMP-7 ułatwia biodostępność insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF) dzięki proteolizie białka IGFBP-3, wiążącego ten czynnik, promując przeżywalność komórek i unikanie apoptozy [126].

Aktywność proteolityczna MMP może być modulowana przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMP), których wykryto co najmniej 4 typy o znacznej homologii. Ich rola w procesie przerzutowania nie jest jednakże tylko hamująca, bowiem mogą one działać także jako cytokiny i czynniki wzrostowe stymulując proliferację komórek [73]. Aktywność metaloproteinaz zależy od odpowiedniej równowagi między tymi enzymami i ich inhibitorami tkankowymi. Na przykład jednocześnie z ekspresją MMP-2 obserwowano zwiększoną ekspresję inhibitora TIMP-2 na poziomie białka, zarówno w inwazyjnych, jak i w mniej inwazyjnych liniach czerniaka [75]. Inni [4], obserwowali natomiast, że nadekspresja TIMP-3 indukowała apoptozę w komórkach czerniaka. Wydaje się jednak, że stymulacja lub hamowanie wzrostu przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz może zależeć od typu komórek [73].

Niedawno wykonane badania immunohistochemiczne w grupie chorych na raka piersi z przerzutami do węzłów chłonnych [98] wykazały ekspresję TIMP-1 i -2 odpowiednio w 81 i 84% przypadków. Jednakże korzystnym czynnikiem rokowniczym był brak ekspresji inhibitora TIMP-1, a 10-letnie przeżycie chorych w 2 i 3 stopniu zaawansowania klinicznego obserwowano w 88% chorych bez ekspresji TIMP-1, podczas gdy tylko 61% chorych z jego ekspresją przeżywało ten okres [98]. Negatywny związek ekspresji inhibitora metaloproteaz z przeżyciem wydaje się nieoczekiwany, bowiem aktywność proteolityczna jest ważnym czynnikiem inwazyjności i przerzutowania. Zjawisko to może być jednak wyjaśnione na podstawie stymulującej roli TIMP-1 w procesie angiogenezy i proliferacji komórek, oraz hamowaniu apoptozy [190].

Inną grupę enzymów proteolitycznych, które biorą udział w degradacji macierzy pozakomórkowej stanowią proteazy serynowe, z których najważniejszą jest plazmina. Plazmina powstaje w wyniku aktywacji jej prekursora, plazminogenu, dzięki działaniu systemu aktywatora plazminogenu (plasminogen activation system – PAS). System aktywatora plazminogenu zawiera dwie proteinazy serynowe, tj. urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA) i tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR) i dwa inhibitory, PAI-1 i -2 [8]. Plazmina jest zdolna degradować komponenty ECM, takie jak fibronektyna, laminina i proteoglikany; aktywować inne enzymy proteolityczne (prometaloproteinazy); aktywować cytokiny, np. TGF- β oraz indukować angiogenezę. uPA wytwarzany przez komórki nowotworowe, a także przez komórki podścieliska guza jest wydzielany jako nieaktywny proenzym, który umiejscawia się na powierzchni komórek i dzięki wiązaniu z receptorem uPAR ulega aktywacji. uPA bierze udział w degradacji tkanek w procesach fizjologicznych i w inwazji nowotworów, a tPA jest istotny w procesie fibrynolizy [154]. Rolę uPA w inwazyjności nowotworów wykazano eksperymentalnie. Komórki ludzkiego raka gruczołu krokowego PC3 pozbawione (dzięki manipulacji genetycznej) aktyw-

ności proteolitycznej, lecz zdolne do wiązania się z receptorem uPAR, wykazywały obniżenie inwazyjności zarówno *in vitro* w "matrigelu" (sztucznej macierzy pozakomórkowej), jak i w warunkach *in vivo* [37]. Po wszczepieniu tak zmodyfikowanych komórek myszom bezgranicznie wzrost guza pierwotnego był podobny jak w wypadku komórek PC3 niemodyfikowanych, tj. wykazujących aktywność proteolityczną, natomiast odsetek przerzutów w płucach był 10–20-krotnie niższy, a w mózgu 40–100-krotnie niższy niż u zwierząt z guzami indukowanymi komórkami niemodyfikowanymi [37].

W warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy aktywatorami a inhibitorami plazminogenu. W nowotworach natomiast obserwuje się wzrost poziomu uPA [8,42,119,153]. Podobnie obserwuje się nadregulację receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu uPAR w tkance wielu typów nowotworów [8,62,146], a także jego rozpuszczalnej postaci suPAR we krwi i poziom ten wzrasta z progresją choroby [142,169]. Wydawać by się mogło, że wzrost poziomu inhibitorów plazminogenu będzie korzystnym czynnikiem prognostycznym, jednakże w wielu badaniach wykazano, że wzrost poziomu PAI wiąże się z progresją choroby i gorszym rokowaniem w różnych nowotworach, np. w raku piersi [115,119], a zwłaszcza w raku jelita grubego [8,135,137].

Adhezja i migracja komórek

Zmiany właściwości adhezyjnych i wzrost zdolności migracyjnych mają zasadniczy wpływ na inwazyjność i przerzutowanie nowotworów. Ruchliwość (motility) jest jedną z podstawowych cech inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych. Jest ona uwarunkowana zmianami struktury cytoskieletu komórki, tworzonego przez mikrofilamenty zbudowane głównie z aktyny [61]. Migracja komórek jest inicjowana przez różne czynniki sygnałowe, takie jak cytokiny, hormony, neuroprzekazniki i chemokiny. Sam proces migracji jest złożony i jest zależny od współdziałania wielu różnych czynników molekularnych, takich jak β -arrestyna (β -A), kinazy proteinowe, PKA i PKC, kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) i in. Następstwem działania tych czynników jest polimeryzacja i rozgałęzienie włókien aktyny i formowanie pseudopodiów. Interakcja aktyny z miozyną jest siłą napędową migracji [141].

Ważną funkcję w migracji komórek pełnią ułożone w błonach komórkowych cząsteczki adhezyjne (cell adhesion molecules – CAM). Liczną grupę CAM stanowią integryny. Integryny występują jako heterodimery składające się z dwóch niekonwalencyjnie związanych podjednostek, α i β . Dotąd poznano 16 podjednostek α i 8 podjednostek β , które tworzą 24 różne heterodimery [80]. Integryny są dominującymi receptorami elementów macierzy pozakomórkowej i wiążą się one z takimi elementami jak kolagen, witronektyna i fibronektyna. Poza funkcją adhezyjną pełnią rolę przekazników sygnałów do wnętrza komórki. Integryny, wiążąc się z białkami ECM, a także z innymi cząsteczkami adhezyjnymi np. PECAM-1 na komórkach śródbłonkowych lub z L1 – obecnym na leukocytach, komórkach nabłonkowych, a także na komórkach czerniaka, wpływają na wzrost i migrację komórek. Integryny składają się z 3 domen: zewnątrz błonowej, śródbłonkowej i wewnątrzkomórkowej. Zewnątrz błonowe domeny integryn wiążą

się często z właściwymi dla siebie ligandami, którymi są białka ECM o swoistych sekwencjach aminokwasowych Arg-Gly-Asp, zwanymi sekwencjami RGD. Domena wewnętrzna łączy się z kompleksem białkowym tworzącym tzw. ogniskowy kontakt adhezyjny (focal adhesion contact). Kompleks ten zawiera białka regulatorowe, takie jak FAK (focal adhesion kinase), białkowe kinazy tyrozynowe (PTK) z rodziny src, a także białka strukturalne – winkulinę (VIN) i paksilinę (PAX), które są łącznikami między integrzynami a aktyną cytoszkieletu [141]. Powierzchniowe integryny komórkowe, zwłaszcza te wiążące się z fibronektyną mają udział w procesie transformacji nowotworowej, inwazyjności i przerzutowaniu, a szczególną rolę w tych procesach odgrywają zmiany glikozylacji tych cząsteczek. Zaburzenia w glikozylacji integrzyn prowadzą do zmiany właściwości adhezyjnych, migracyjnych i wzrostu inwazyjności różnych nowotworów [39,100,112,152].

Proces kolonizacji narządów gospodarza przez komórki nowotworowe nie wydaje się procesem przypadkowym. Uważa się, że komórki nowotworowe wykazują pewne, właściwe dla danego typu nowotworu, preferencje do osiedlania się w szczególnych narządach [56]. Odbywa się to prawdopodobnie dzięki chemotaksji komórek nowotworowych w stosunku do cytokin wytwarzanych przez narządy gospodarza, dzięki wyjątkowo sprzyjającym warunkom środowiska w danym narządzie lub też dzięki selektywnej adhezji komórek nowotworowych do komórek śródbłonna naczyń w danym narządzie. Nadekspresja pewnych integrzyn wskazuje, że integryny są głównymi molekułami uczestniczącymi w tej selektywnej adhezji (przegląd w [46]). Tak np. integryna $\alpha v \beta 3$ pełni rolę w adhezji komórek czerniaka podczas kolonizacji węzłów chłonnych, a integryna $\alpha 2 \beta 1$ w tworzeniu przerzutów raka żołądka do węzłów, natomiast integryna $\alpha 3 \beta 1$ prawdopodobnie jest związana z tworzeniem przerzutów tego raka do otrzewnej [46].

W świetle najnowszych badań [89] wydaje się, że w powstawaniu przerzutów nowotworowych w swoistych narządach pewną rolę regulatorową pełnią hematopoetyczne komórki pnia. Wykazano, że szpik kostny myszy zaszczerpionych nowotworem LLC lub B16 zawiera progenitorowe komórki wykazujące ekspresję VEGFR-1 i integryny $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4), które zasiedlają swoiste dla danego nowotworu miejsca (narządy) przerzutowania jeszcze przed pojawieniem się przerzutów, tworząc w nich skupiska (nisze) ułatwiające umiejscawianie się komórek nowotworowych [89].

Istotną dla procesu przerzutowania i inwazji nowotworów grupę cząsteczek powierzchniowych stanowią kadheryny. Najlepiej poznano trzy rodzaje tych transbłonowych glikoprotein: E-kadherynę, P-kadherynę i N-kadherynę. Podczas gdy E-kadheryna i P-kadheryna są odpowiedzialne za prawidłowy kontakt i adhezję komórek nabłonkowych, to N-kadheryna ulega ekspresji jedynie w tkankach płodowych i pojawia się ponownie w nowotworach [78,99]. Cząsteczki E-kadheryny wiążą się wzajemnie z innymi, obecnymi na sąsiadujących komórkach, odpowiadając za utrzymanie integralności tkanki nabłonkowej [178]. Adhezja komórek zależna od E-kadheryny wymaga utworzenia kompleksu z innym białkiem cytoplazmatycznym, kateniną (catenin), która występuje w trzech różnych postaciach: α , β i γ . β -katenuina wiąże się z domeną cyto-

plazmatyczną E-kadheryny, natomiast α -katenuina tworzy kompleks z aktyną cytoszkieletu [200]. Zaburzenia ekspresji tego kompleksu mogą być związane z progresją nowotworów. Obniżona np. ekspresja E-kadheryny lub całkowita jej utrata występowała w błonach komórkowych słabo zróżnicowanego raka żołądka, a także w śluzówce żołądka z nasiloną dysplazją [200].

N-kadheryna nie występuje na komórkach prawidłowych, pojawia się natomiast na komórkach nowotworowych. Wiele badań wskazuje, że zmiany glikozylacji w cząsteczce oligosacharydu N-kadheryny, podobnie jak w wypadku integrzyn wpływają na aktywność migracyjną i zdolności przerzutowania nowotworów. Tym zmianom glikozylacji towarzyszą zmiany ekspresji różnych glikozylotransferaz [31].

Ważnym stymulatorem migracji komórek nowotworowych mogą być też obecne w guzie makrofagi [35,193]. Rola makrofagów w inwazyjności nowotworów jest omówiona w dalszym podrozdziale pracy.

Angiogeneza

Wzrost guzów nowotworowych jest ściśle zależny od angiogenezy [51], procesu, który polega na tworzeniu nowych naczyń z komórek śródbłonna naczyń już istniejących [133], a także na rekrutacji komórek progenitorowych śródbłonna z krwi krążącej [157], ich proliferacji i różnicowaniu, na degradacji macierzy pozakomórkowej i migracji komórek śródbłonna w tkankach do miejsc docelowych formowania naczyń [133]. Czynniki stymulujące proliferację komórek śródbłonna są wydzielane przez komórki gospodarza lub przez komórki samego nowotworu a wykorzystywane są przez nowotwór. Takimi stymulatorami neoangiogenezy są: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, bFGF, czynnik wzrostu hepatocytów, HGF, czynnik martwicy nowotworu, TNF, transformujący czynnik wzrostu, TGF β -1, płytkowy czynnik wzrostu komórek śródbłonna, PDGF, angiogenina, interleukina 8 oraz czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, VEGF [180,197]. Angiogeneza towarzyszy też zjawiskom fizjologicznym, takim jak proces gojenia ran, ciąży, regeneracja endometrium. Spośród wymienionych czynników proangiogennych istotną rolę w procesie angiogenezy odgrywa VEGF. Jest on glikoproteiną wiążącą się z proteoglikanami macierzy pozakomórkowej, a także mitogenem i czynnikiem wzrostu komórek śródbłonna, powodującym jednocześnie wzrost przepuszczalności naczyń [133]. Najnowsze dane dowodzą, że oprócz zasadniczej funkcji proangiogennej VEGF pełni rolę w neurogenezie, a także jako czynnik neuroprotekcyny (przegląd w [131]). Znanych jest sześć różnych postaci VEGF, oznaczanych literami od A do F. Najbardziej poznana postacią jest VEGF-A, która z kolei występuje w czterech izoformach, VEGF-121, -165, -189 i -205 (liczby określają ilości aminokwasów). VEGF-121 i -165 występują w postaci rozpuszczalnej, wydzielanej przez komórki, natomiast VEGF-189 i -205 są związane z błoną komórkową [176]. Czynniki te działają jako przekaźniki sygnałów poprzez związanie z jednym z trzech receptorów z rodziny kinazy tyrozynowej: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) i VEGFR-3 (Flk-4), obecnych na komórkach śródbłonna. Receptory VEGF są homodimerami zbudowanymi z trzech funkcjonalnych elementów: zewnątrzkomórkowego (składającego się z 7 domen immunoglobulinopodobnych), trans-

błonowego (zawierającego domenę hydrofobową) oraz wewnątrzkomórkowego (zawierającego domenę o aktywności kinazy tyrozynowej) [131]. Poszczególne izoformy VEGF łączą się ze swoistymi dla nich receptorami. I tak receptory VEGFR-1 i -2, oddziałują głównie z VEGF-A, ale receptor VEGFR-1 oddziałuje również z VEGF-B i PlGF (placenta growth factor), natomiast VEGF-C i -D są ligandami receptorów VEGFR-2 i VEGFR-3 (przegląd w [131]). VEGFR-1 aktywuje migrację i różnicowanie komórek. VEGFR-2 aktywuje natomiast proliferację i modyfikuje przepuszczalność naczyń. VEGFR-1 i -2 ulegają ekspresji głównie w śródbłonku naczyń krwionośnych, biorąc udział w angiogenezie, natomiast ekspresja VEGFR-3 zachodzi w śródbłonku naczyń limfatycznych sugerując jego ważną rolę w limfangiogenezie [183]. Wiele badań wskazuje, że ekspresja VEGF wzrasta w nowotworach złośliwych, a jego ekspresja jest sprzężona ze wzrostem mikrośrodowiska [148,175]. Wykazano też, że hipoksja indukuje wzmoczone wytwarzanie VEGF przez komórki nowotworowe, a jego wiązanie z receptorami, które ulegają ekspresji głównie na komórkach śródbłonka powoduje wzrost przepuszczalności naczyń i migrację tych komórek w kierunku guza, gdzie tworzą nową sieć na potrzeby nowotworu [43,44]. Należy dodać, że obecnie przypisuje się również płytkom krwi aktywną rolę w rozwoju unaczynienia guzów nowotworowych, a mechanizm ten jest zależny od tworzenia skrzepu i oddziaływania płytek krwi z komórkami śródbłonka naczyń [140].

Sugeruje się, że użytecznym markerem neoangiogenezy w nowotworach może być transbłonowa glikoproteina CD105 (endoglina). Endoglina jest receptorem transformującego czynnika wzrostu, TGF- β 1 i - β 3. Ulega ona nadekspresji w śródbłonku naczyń krwionośnych tkanek, w których zachodzi waskularyzacja, a szczególnie w powstających *de novo* naczyniach krwionośnych nowotworów. Wykazano, że gęstość unaczynienia w raku piersi oceniana na podstawie immunohistochemicznej reakcji z przeciwciałem anti-CD105 była niezależnym czynnikiem prognostycznym. Reakcja ta pozwalała na odróżnienie nowo powstałych naczyń związanych z nowotworzeniem od już istniejących naczyń krwionośnych w tkance, które nie mogły być odróżnione na podstawie reakcji z przeciwciałem anti-CD34 [97]. Antygen CD34 jest bowiem nie tylko markerem komórek śródbłonkowych nowo powstałych naczyń, ale jest ogólnym markerem komórek śródbłonka (panendothelial marker) [97]. Ponadto duże stężenie endogliny krążącej również korelowało z obecnością przerzutów w raku piersi [105].

Kolejnym markerem neowaskularyzacji może być neuropilina 1 (NRP1). Neuropilina jest również transbłonową glikoproteiną, która jest receptorem semaforin, mediatorów procesu wydłużania neuronów, a także działa jako koreceptor VEGF, wiążąc się z VEGF₁₆₅. Jej ekspresja występuje na komórkach śródbłonka, a także w nowotworach [54].

Ekspresja neuropiliny stymuluje migrację komórek nowotworowych *in vitro* w sztucznej macierzy pozakomórkowej, oraz promuje proces angiogenezy i progresję nowotworów *in vivo* [120]. Guzy nowotworowe indukowane u szczurów sztucznymi konstruktami komórek z ekspresją genu NRP-1 wykazywały znaczny, 2,5–7-razy szybszy wzrost w po-

równaniu z guzami indukowanymi komórkami bez tego genu (kontrolnymi). Ponadto, gęstość unaczynienia była znacznie większa w guzach z ekspresją NRP1 w porównaniu z kontrolą [120]. Jednocześnie guzy NRP1-pozytywne wykazywały wyższy, w porównaniu z kontrolą poziom proliferujących komórek nowotworowych i epitelialnych, ocenianych na podstawie wyznakowania antygenu PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Ekspresję neuropiliny 1 (NRP1), obserwowano w wielu nowotworowych liniach komórkowych [7], a także w guzach nowotworowych, takich jak rak gruczołu krokowego [101], nerwiaki zarodkowe [48], gwiaździaki [40] i rak jajnika [66]. W tym ostatnim obserwowano koekspresję neuropiliny-1 z VEGF i somatostatyną, potencjalnym czynnikiem antyangiogennym, co sugeruje, że somatostatyna może również pełnić rolę w angiogenezie raka jajnika [66].

Rola naskórkowego czynnika wzrostu EGF i jego receptora EGFR w progresji nowotworów

Czynniki wzrostowe i ich transbłonowe receptory pełnią ważną rolę w proliferacji, różnicowaniu, adhezji i migracji komórek. Jednym z najbardziej poznanych czynników wzrostowych jest naskórkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor, EGF). EGF jest wytwarzany przez różnego typu komórki prawidłowe i wydzielany do środowiska, a jego działanie auto- i parakryne odbywa się poprzez receptory EGFR. Rodzina receptorów kinazy tyrozynowej EGFR, znana także pod nazwą ErbB, obejmuje 4 różne receptory: EGFR/ErbB-1, HER2-neu/ErbB-2, HER3/ErbB-3 i HER4/ErbB-4 [195]. Receptory te są zbudowane z trzech domen: zewnątrzkomórkowej, wiążącej ligandy, krótkiej domeny śródbłonowej i cytoplazmatycznej domeny o aktywności kinazy tyrozynowej. Aktywacja receptora EGFR przez wiązanie z EGF lub innymi ligandami, np. TGF- α , neuroregulinami, inicjuje kaskadę przekazywania sygnałów prowadzącą do proliferacji, migracji komórek, angiogenezy oraz hamowania apoptozy [67,173,195]. Receptory EGFR w wielu nowotworach, takich jak rak piersi, szyjki macicy, jajnika, trzustki, prostaty, głowy i szyi, ulegają nadekspresji, dysregulacji i mutacji (przegląd w [67]). Na przykład prawie 75% przypadków gruczolakoraka jelita grubego wykazuje ekspresję EGFR o różnym stopniu nasilenia, a wyższa ekspresja wiąże się z gorszym rokowaniem [57]. Podobnie w niedrobnokomórkowym raku płuca wzrost ekspresji EGFR obserwowany jest w około 60% przypadków i jest on sprzężony z gorszym rokowaniem, zwłaszcza jeżeli jednocześnie obserwuje się wzrost ekspresji receptora HER2-neu [138]. Zablokowanie receptora EGFR poprzez wiązanie go ze swoistym przeciwciałem jest więc uzasadnioną metodą terapii celowanej w wielu nowotworach [67,173,174].

Rola populacji komórek leukocytnych w migracji, inwazji i przerzutowaniu nowotworów

Infiltrujące guz komórki leukocytnie obejmują: makrofagi, neutrofile, eozynofile, komórki dendrytyczne, komórki tuczne i limfocyty. Mimo iż w przeszłości uważano, że obecność tych naciekających guz komórek jest wyrazem odpowiedzi immunologicznej gospodarza na rozwijający się nowotwór, współczesne poglądy poparte badaniami klinicznymi przypisują leukocytom aktywną rolę w progresji nowotworów. Ponieważ makrofagi stanowią główną kom-

ponentę populacji leukocytów infiltrujących guz, ich udział w progresji nowotworów wydaje się zasadniczy.

Udział makrofagów w odpowiedzi immunologicznej i w procesach regeneracyjnych jest powszechnie znany. Makrofagi, komórki wywodzące się z krążących monocytów, są jednymi z pierwszych komórek pojawiających się w miejscu infekcji i zranienia, gdzie pełnią wielorakie funkcje. Makrofagi, poza tym, że aktywnie niszczą różne patogeny dzięki wytwarzaniu reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (NRS), wytwarzają cytokiny i chemokiny, dzięki którym mobilizują inne komórki układu immunologicznego [149]. Wytwarzając natomiast czynniki wzrostowe, angiogenne i proteazy biorą udział w regeneracji uszkodzonych tkanek [149]. Biorą one też aktywny udział w procesach morfogenezy wielu tkanek. Wykazano to m.in. na przykładzie morfogenezy gruczołu mlecznego u myszy [59].

Makrofagi są prawdopodobnie również bezpośrednio zaangażowane w progresję i przerzutowanie nowotworów. Coraz powszechniej uznaje się przewlekłe procesy zapalne za jedną z przyczyn powstawania nowotworów [9,36]. Na przykład przewlekłe wrzodziejące zapalenie okrężnicy prowadzi do raka jelita grubego [85]. Makrofagi towarzyszące nowotworowi (tumor associated macrophages, TAMs) są „przyciągane” przez guz dzięki różnym czynnikom wzrostowym i chemokinom wytwarzanym przez komórki nowotworowe. Badania kliniczne wykazują, że wzrost gęstości (liczby) TAMs w tkance guza jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym, zwłaszcza w raku piersi, gruczołu krokowego, jajnika i szyjki macicy. W innych nowotworach dane są niejednoznaczne [13]. W raku jelita grubego wzrost odsetka makrofagów był wręcz korzystnym czynnikiem prognostycznym, jednakże badania obejmowały niewielką liczbę chorych [130].

Makrofagi są wielofunkcyjnymi komórkami, których fenotyp jest modyfikowany przez czynniki lokalnego środowiska i w pewnych warunkach mogą one hamować rozwój nowotworu, w innych zaś promować jego progresję. Na przykład duże stężenie rozpuszczalnej postaci czynnika wzrostu CSF-1 (colony stimulating factor-1), wytwarzanego przez komórki nowotworowe, powoduje troficzne ukierunkowanie makrofagów w stosunku do guza, potęgując jego progresję, jednocześnie CSF-1 wraz z interleukiną 6 (IL-6) hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych, a tym samym możliwość prezentowania przez nie antygenów limfocytom. Przeciwnie, CSF-1 związany z błoną komórek nowotworowych potęguje cytotoksyczne właściwości makrofagów. Ponadto transmembranowy CSF-1 wraz z IL-4, -12 i -13 sprzyja dojrzewaniu komórek dendrytycznych, które prezentując antygeny nowotworowe cytotoksycznym limfocytom T wspomagają makrofagi w niszczeniu guza [149].

Makrofagi obecne w środowisku guza ułatwiają też angiogenezę, degradują i remodelują macierz pozakomórkową promując migrację komórek. Uważa się, że na wczesnym etapie przerzutowania tworzy się parakrynną pętlę między komórkami nowotworu i makrofagami: komórki nowotworowe wyrażają receptory naskórkowego czynnika wzrostu (EGFRs), i wydzielają CSF-1, który „przyciąga” makrofagi i pobudza je do ekspresji i wydzielania EGF, zamykając wspomnianą pętlę [35].

Komórki nowotworowe cechuje ponadto bardzo duża ruchliwość wzdłuż włókien kolagenu, w kierunku naczyń krwionośnych. Ta wzajemna stymulacja komórek nowotworowych przez EGF a makrofagów przez CSF-1 prowadzi do deregulacji polimeryzacji aktyny indukując proces tworzenia pseudopodiów, które w komórkach makrofagów są nazywane pseudosomami, a w komórkach nowotworowych invadopodiami [35,193]. Makrofagi towarzyszące guzom (TAMs) oprócz EGF wytwarzają wiele czynników wzrostowych, które stymulują wzrost i migrację komórek nowotworowych. Są to: czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), a także transformujący czynnik wzrostu TGF- β i interleukinę 6 (IL-6). Czynniki wzrostu wydzielane przez TAMs promują więc proliferację komórek, a także ich przeżywalność dzięki unikaniu sygnałów apoptotycznych przez utratę zdolności adhezji do macierzy pozakomórkowej [149].

Farmakologiczne zablokowanie ścieżki sygnałowej przez receptory EGF prowadziło do zahamowania „intrawazacji” w guzach eksperymentalnych [191], a dane kliniczne wykazują, że nadekspresja czynnika CSF-1 w komórkach raka piersi i EGF w makrofagach są niezależnymi niekorzystnymi wskaźnikami prognostycznymi [102,108].

Należy wspomnieć również, że oprócz makrofagów, pewną rolę w progresji nowotworów mogą pełnić także komórki tuczne i neutrofile. Infiltrujące komórki tuczne znajdowano w wielu nowotworach, takich jak rak jelita grubego, piersi i płuca [108 i pozycje tam cytowane]. Podczas gdy w jednych nowotworach obserwowano, iż kumulacja komórek tucznych była związana z bardziej inwazyjnym przebiegiem choroby [158], to w raku jelita grubego wzmocniona obecność mastocytów była wskaźnikiem lepszego rokowania [136]. Proinwazyjna rola komórek tucznych wynika z ich zdolności indukowania angiogenezy. Aktywowane przez nowotwór komórki tuczne wydzielają angiogenne czynniki wzrostu, takie jak VEGF, bFGF, IL-8, i TNF- α [54], wiele proteaz, zwłaszcza MMP-9, a także innych cytokin, takich jak: IL-1, -3, -4 i -8 i interferon- γ [158].

Rola neutrofilów w progresji nowotworów jest mniej poznana. Eksperymenty wykazują, że neutrofile towarzyszące guzom stymulują angiogenezę wytwarzając czynniki proangiogenne, takie jak VEGF i IL-8 [164], ułatwiają inwazję wytwarzając metaloproteiny macierzowe, a także stymulują proliferację dzięki wytwarzaniu cytokin [167]. Jednakże badania kliniczne z jednej strony wykazują, że obecność neutrofilów naciekających guz wiązała się z gorszą prognozą, np. w raku płuca [12], z drugiej zaś strony, przeciwnie, wzmocniona infiltracja neutrofilów była wskaźnikiem dobrej prognozy w raku żołądka [18].

MARKERY INWAZYJNOŚCI W RAKU JELITA GRUBEGO

Rak jelita grubego jest często stwierdzanym nowotworem złośliwym, dotyczącym głównie społeczeństwa krajów wysoko rozwiniętych gospodarczo. Według niektórych danych za rok 2004 zachorowalność na ten nowotwór, zarówno wśród mężczyzn jak i wśród kobiet w krajach Unii Europejskiej zaczyna przewyższać nawet zachorowalność na raka płuca i raka piersi [15] i plasuje się na pierwszym miejscu. W krajach całej Europy zachorowalność na raka

jelita grubego prawie dorównuje zachorowalności na raka płuca. W roku 2004 zarejestrowano w Europie 376,4 tysięcy nowych zachorowań na raka jelita grubego, jednocześnie w tym samym czasie zanotowano prawie 204 tysiące zgonów [15]. Mimo miejscowego usunięcia guza w wyniku chirurgicznej resekcji lub chirurgii skojarzonej z przedoperacyjną radioterapią, przerzuty do wątroby i węzłów chłonnych są główną przyczyną niepowodzeń nawet w przypadkach przedoperacyjnie mało zaawansowanych. Przerzuty do wątroby są przyczyną śmierci około jednej trzeciej leczonych chorych [165,172]. Głównymi czynnikami prognostycznymi w raku jelita grubego są takie parametry klinikopatologiczne jak: stopień zaawansowania wg TNM lub klasyfikacji Duke'a, głębokość nacieku, inwazja do naczyń krwionośnych i limfatycznych, zajęcie węzłów chłonnych oraz stopień zróżnicowania [10,34,165]. Na podstawie tych czynników nie zawsze jednak można przewidzieć wyniki leczenia chirurgicznego, bowiem pod względem prognozy istnieje znaczna heterogenność nawet w grupach o podobnym stopniu zaawansowania TMN, a u wielu chorych mogą istnieć klinicznie nieuchwytnie mikroprzerzuty już w trakcie zabiegu [10,34,165]. Dlatego też znajomość dodatkowych, molekularnych czynników prognostycznych związanych z fenotypem przerzutowania mogłaby pomóc w wyborze ewentualnej terapii uzupełniającej. Jest to szczególnie istotne w przypadku raka jelita grubego w stopniu II (Duke B), bowiem część chorych mogłaby uniknąć niepotrzebnej chemioterapii uzupełniającej, zaś część chorych, która mogłaby odnieść korzyści z takiej terapii, nie zawsze jest poddawana chemioterapii [60].

Czynniki genetyczne progresji raka jelita grubego

Badania czynników genetycznych leżących u podstawy procesu transformacji nowotworowej prawidłowego nabłonka jelita wskazują na utratę funkcji genów supresorowych *APC* (adenomatous polyposis coli), *p53*, *DCC* (deleted in colon cancer) i mutację onkogenu *K-RAS* jako na procesy prowadzące poprzez etap dysplazji i gruczolaka do rozwoju raka [49]. Konsekwencją utraty funkcji tych genów w wyniku mutacji lub delecji jest zakłócenie dróg sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za kontrolę proliferacji i apoptozy [20], a także wzrost zdolności migracyjnych komórek [132,150]. Wykazano, że gen *APC*, poprzez swój produkt białkowy zawierający motywy aminokwasowe, które wiążą się z β -kateniną, ma udział w organizacji cytoszkieletu komórki [132]. W wyniku mutacji *APC*, β -katenina nie jest degradowana, a jej stabilizacja prowadzi do zakłócenia drogi sygnałowej poprzez gen znany pod nazwą Wnt, regulującej wzrost i różnicowanie, a także ruchliwość komórek [11,132]. Również mutacja onkogenu *K-RAS* prowadzi do zmian w organizacji cytoszkieletu aktyny, a w konsekwencji do obniżenia adhezji i wzrostu ruchliwości komórek. Wykazano, że komórki ludzkiego raka okrężnicy, linii HCT116, które mają jeden allel tego genu dziki, zaś drugi zmutowany (*K-RAS^{G13D}*) cechują się słabą adhezją i znaczną migracją w warunkach *in vitro* [150]. Eksperymentalnie indukowana delecja zmutowanego genu *K-RAS^{G13D}* przywracała tym komórkom zdolność do tworzenia włókien sprężystych i kompleksu adhezyjnego (FAC), którym towarzyszył wzrost adhezji do ECM i obniżenie migracji [150].

60–70% przypadków raka jelita grubego wykazuje utratę heterozygotyczności na chromosomie 17 w *locus* dla genu

p53 [19,20] i około 70% na chromosomie 18, przy czym w *locus* dla genu *DDC* (18q21) utrata heterozygotyczności występuje u 30–40% chorych [25]. Gen *DDC* koduje transbłonowe białko adhezyjne komórek nerwowych, mające udział w regulacji procesów różnicowania i proliferacji [28], a jego poziom zmniejsza się w komórkach raka jelita grubego w zaawansowanych stadiach [25]. Również utrata heterozygotyczności na chromosomie 18 może mieć negatywne implikacje prognostyczne w raku jelita grubego, jeżeli delecja dotyczy genu *DNAM-1* kodującego pewne cząsteczki adhezyjne z rodziny immunoglobulin [171]. Zwrócono także uwagę na potencjalną rolę genu *SMAD4*, zwanego także *DPC4* (deleted in pancreatic carcinoma 4) w progresji raka jelita grubego [6,63,162]. Gen ten, będący głównym przekaznikiem w obrębie drogi sygnałowej zależnej od TGF- β , jest umiejscowiony na chromosomie 18q21. Reguluje on proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek [6]. Mimo iż mutacje tego genu lub jego delecje są częstsze u chorych z odległymi przerzutami raka jelita grubego niż u chorych bez przerzutów, to jego rola w progresji tego nowotworu nie jest ustalona [6,63,125,162].

Niedawno wykazano także, że obniżenie ekspresji genu *p21^{WAF1/CIP1}* jest związane z przerzutowaniem raka jelita grubego do węzłów i wątroby [124]. Gen ten, oprócz genu *p53* i *bcl-2* jest regulatorem cyklu komórkowego i apoptozy [124]. Ta ostatnia praca wykazuje ponadto, że wskaźnik naciekania naczyń (venous invasion – VI) oceniany po wybarwieniu specjalną techniką EVG (elastica van Gieson stein) znamienne koreluje z obecnością przerzutów do wątroby i węzłów chłonnych.

Markery angiogenezy w raku jelita grubego i ich znaczenie prognostyczne

Wydaje się, że angiogeneza, tj. tworzenie nowych naczyń krwionośnych otaczających guz i w obrębie guza jest najważniejszym warunkiem zarówno wzrostu guza pierwotnego jak i rozwoju przerzutów. Gęstość mikrounaczynienia koreluje z progresją w wielu nowotworach [186]. Rak jelita grubego, jak zresztą wiele innych nowotworów, jest zdolny promować angiogenezę dzięki sekrecji czynników wzrostowych, takich jak VEGF, HGF PDEGF, które stymulują proliferację komórek śródbłonna, ich migrację i formowanie naczyń.

W procesie progresji raka jelita grubego gen VEGF ulega nadregulacji. Stwierdzono wyższą ekspresję genu VEGF na poziomie mRNA w inwazyjnej postaci gruczolakoraka w stosunku do postaci przedinwazyjnych [188]. Ekspresja genu VEGF badana techniką hybrydyzacji i Northern blotingu korelowała z przerzutowaniem i z klinicznym stopniem zaawansowania (Duke A–D), a wysoki poziom mRNA wiązał się z obniżonym przeżyciem chorych [83]. Ponadto, badania immunohistochemiczne ekspresji białka VEGF u chorych na raka jelita grubego w jednolitej grupie z nowotworem w stopniu Duke B wykazały obecność tego markera, nie tylko w śródbłonku, ale także w komórkach nowotworowych i była ona również związana ze znamienne krótszym przeżyciem chorych [14].

Również sekrecyjna postać VEGF może być wykrywana w surowicy i/lub osoczu krwi chorych na raka jelita grubego [17,96,187] i koreluje ona ze stopniem klinicznego

zaawansowania TNM i z wielkością guza [17]. Wykazano, że oceniany przedoperacyjnie poziom VEGF w surowicy chorych na raka jelita grubego był znamienne wyższy u chorych, u których wystąpiły odległe przerzuty niż u chorych bez przerzutów w okresie obserwacji 27–37 miesięcy (mediana odpowiednio 713 pg/ml vs. 314 pg/ml) [26]. Ponadto poziom VEGF był silnym czynnikiem predykcyjnym przeżycia bezobjawowego niezależnie od zajęcia węzłów chłonnych, zwłaszcza kiedy analizy Kaplana-Meiera dokonywano w odrębnych grupach zaawansowania Duke B i Duke C [26].

Podczas gdy poziom VEGF we krwi, mierzony przedoperacyjnie znamienne wzrasta u chorych na raka jelita grubego w stosunku do poziomu w grupie kontrolnej i utrzymuje się na wysokim poziomie po operacji, to poziom receptora tego czynnika, VEGFR-1, jest niższy niż w kontroli zarówno przed, jak i po operacji [27,128]. Zaobserwowano, że poziom sVEGFR-1 był znamienne sprzężony z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych [128]. Inni autorzy obserwowali natomiast ścisłą kolokalizację VEGFR-2 i VEGF-C w guzach pierwotnych raka jelita grubego i w węzłach chłonnych, co sugeruje, że interakcja obu tych czynników jest istotna dla rozsiewu nowotworu do węzłów [41].

Kolejnym markerem inwazyjności raka jelita grubego może być endogлина (CD105). Stwierdzano korelację ekspresji endogliny w naczyniach kapilarnych guza pierwotnego z obecnością przerzutów raka jelita grubego do węzłów [161]. Gęstość unaczynienia guza pierwotnego oceniana na podstawie ekspresji endogliny wykazywała ponadto ścisły związek z obecnością przerzutów do wątroby [161]. W innych badaniach stwierdzono immunocytochemicznie, że ekspresja endogliny występuje wyłącznie w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych raka jelita grubego, nie występuje natomiast w naczyniach podścieliska guza [104].

Najnowsze badania technikami immunocytochemicznymi w systemie tzw. tkankowych mikromacierzy (tissue microarrays) wykazują, że ekspresja antygenu CD105 jest swoistym markerem neowaskularyzacji w raku okrężnicy. Podczas gdy w prawidłowej śluzówce jelita ekspresję CD105 w komórkach śródbłonna naczyń wykazywało poniżej 21% kapilar, to w naczyniach kapilarnych związanych z guzem aż 80% było wyznakowanych pozytywnie [123]. Znamienne wyższa niż w zdrowej śluzówce ekspresja endogliny występowała w obszarze guza i korelowała ona z głębokością nacieku. Przeciwnie ekspresja innych antygenów waskularyzacji, takich jak CD31 i VEGF, nie różniła się i była równomiernie wyrażona w strukturach zdrowego jelita i nowotworu [123]. CD31, cząsteczka powierzchniowa z rodziny immunoglobulin (pan endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1) jest markerem mikrounaczynienia nie tylko nowo tworzącej się sieci w nowotworach, a jego ekspresja sięga 80–90% w prawidłowej śluzówce jelita w sąsiedztwie nowotworu, a także podobnie w gruczolaku, i w gruczolakoraku okrężnicy. W przypadku VEGF, chociaż jego ekspresja była większa w gruczolakoraku niż w gruczolaku, nie obserwowano korelacji tej ekspresji z głębokością nacieku [123]. Ponadto obserwowano, że z progresją nowotworu od wysoko zróżnicowanego gruczolaka, poprzez nisko zróżnicowanego gruczolaka, do raka okrężnicy, eks-

presja CD 105 wzrastała [5]. Endogлина może też ulegać sekrecji i przenikać do krwiobiegu. Ekspresji CD105 obserwowanej w naczyniach guza towarzyszył jednocześnie wysoki poziom endogliny krążącej w surowicy chorych na raka jelita grubego [104].

Mediatorami inwazyjności raka jelita grubego związanymi z neoangiogenezą mogą też być neuropiliny [143]. Neuropilina1 (NRP-1), koreceptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń ulegała nadekspresji we wszystkich 20 badanych przypadkach ludzkiego gruczolakoraka okrężnicy [143]. Badania immunohistochemiczne na skrawkach mrożonych z użyciem przeciwciał monoklonalnych i badania techniką hybrydyzacji *in situ* na skrawkach parafinowych wykazały obecność NRP-1 wyłącznie w tkance nowotworowej i jej całkowity brak w przyległej zdrowej śluzówce jelita [143].

Niektórzy autorzy wskazują, że cyklooksygenaza 2 (COX-2) może być zaangażowana w proces angiogenezy [29,117,177,189]. Zaobserwowano, że koinkubacja komórek śródbłonna z komórkami nowotworowymi z nadekspresją COX-2 prowadziła do tworzenia „kanalików” [177], a zahamowanie aktywności cyklooksygenazy 2 również hamowało ten proces [151]. Sugeruje się, że COX-2 jest regulatorem wytwarzania VEGF i angiogenezy [151]. Istnieją dowody potwierdzające rolę COX-2 w patogenezie raka jelita grubego [45], a jej ekspresja rośnie ze wzrostem stopnia zaawansowania, głębokością nacieku i obecnością przerzutów w węzłach i wątrobie, a ponadto ekspresja COX-2 bywa ściśle sprzężona z ekspresją VEGF i MMP-2 [192].

Enzymy proteolityczne w progresji raka jelita grubego

Dane kliniczne o prognostycznej roli metaloproteinaz jako markerów progresji raka jelita grubego są niejednoznaczne. Collins i wsp. [33] wykazali znamienne wzrost ekspresji MMP-2 na poziomie mRNA, ze wzrostem stopnia klinicznego (Duke C vs. B), podczas gdy stosunek MMP-2 do inhibitora tkankowego TIMP-1 i -2 nie zmieniał się. Już wcześniej obserwowano wzrost ekspresji mRNA MMP-2 w gruczolakoraku okrężnicy [103] w stosunku do ekspresji w zdrowej tkance jelita i gruczolaka, a wzrost ten, potwierdzony również immunohistochemicznie znamienne korelował ze stopniem zaawansowania wg skali Duke’a. Nie obserwowano natomiast znamienych różnic w ekspresji mRNA MMP-9 w tkance nowotworowej i w zdrowej śluzówce jelita u chorych na raka okrężnicy [116]. Nie znajdowano też związku między ekspresją mRNA MMP2 i MMP-9 a TIMP-1 i TIMP-2. Również inni autorzy [70], mimo iż obserwowali wzrost ekspresji MMP-9 w tkance nowotworowej we wszystkich stadiach wg Duke’a, nie znajdowali zależności między stopniem nasilenia ekspresji mRNA a stopniem zaawansowania klinicznego. Przeciwnie, Zheng i wsp. [198,199], ocenili, że wzrost poziomu mRNA MMP-9 w tkance raka jelita grubego w stosunku do poziomu w zdrowej tkance jelita wzrastał wraz z progresją choroby i był negatywnym wskaźnikiem prognostycznym zarówno dla przeżycia bez objawów choroby, jak i przeżycia całkowitego.

Ekspresja metaloproteinaz badana na poziomie białka wydaje się lepszym markerem inwazyjności raka jelita gru-

tego niż na poziomie mRNA, aczkolwiek również nie zawsze wykazuje ona związek z inwazyjnością nowotworu. Obserwowano np, że ekspresja MMP-2 oceniana immunohistochemicznie korelowała ze stopniem Duke'a [103]. Badania technikami ELISA, hybrydyzacji *in situ* i Western-blotingu wykazały wzrost koncentracji żelatynazy MMP-2 we wszystkich, poza I, stopniem zaawansowania, w porównaniu z koncentracją w zdrowej śluzówce i w gruczolakach, a ponadto wzrostowi poziomu MMP-2 ze wzrostem stopnia klinicznego towarzyszył spadek poziomu inhibitora TIMP-2 [22]. Interesujące, że wzrost poziomu MMP-2 nie występował w przypadku przerzutów, a stosunek MMP-2/TIMP-2 nawet zmniejszał się [22]. Inne badania wykazały, że zarówno poziom białka MMP-2, jak i MMP-9 był zależny od stopnia zaawansowania w skali Duke'a [90], a miejscem lokalizacji MMP-9 ocenianej immunohistochemicznie, były szczególnie obszary czynnej inwazji leżące w sąsiedztwie komórek odczynu zapalnego [85].

Badania immunohistochemiczne ekspresji aktywatora plazminogenu, uPA i jego receptora uPAR, a także inhibitorów PAI-1 i -2 wykonane w grupie 71 chorych na raka jelita grubego wykazały, że głównie ekspresja uPAR wzrastała ze wzrostem inwazyjności guza pierwotnego, a poziom ekspresji receptora był znacząco wyższy w guzach, którym towarzyszyły przerzuty do wątroby [93]. Jednocześnie występowała nadekspresja VEGF i była ona częściej obserwowana w guzach u chorych z zajęciem węzłów chłonnych i wątroby. Autorzy sugerują, że oba te czynniki działają synergistycznie w procesie przerzutowania raka jelita grubego do wątroby. Koekspresja VEGF i wysokiego poziomu uPAR była wskaźnikiem gorszego rokowania [93]. Inne badania wykonane w grupie 50 chorych na raka okrężnicy również wykazały jednoczesny wzrost ekspresji VEGF z elementami układu aktywatora plazminogenu [8]. Ekspresja uPA, uPAR, PAI-1 i VEGF korelowała ze stopniem Duke'a i z inwazją do węzłów chłonnych, przy czym ekspresja wszystkich tych markerów była znacząco wyższa w przypadku inwazji do węzłów chłonnych niż w przypadku raka okrężnicy bez zajęcia węzłów [8].

Poziom sekrecyjnych postaci czynników układu aktywatora plazminogenu wzrasta również we krwi chorych na raka jelita grubego i inne nowotwory przewodu pokarmowego. Na podstawie badań techniką ELISA w raku jelita grubego i żołądka obserwowano wzrost poziomu uPA w surowicy chorych, oprócz wzrostu poziomu tego markera w tkance, i był on silnym czynnikiem rokowniczym wystąpienia przerzutów [69]. Wykazano również, że mierzony przedoperacyjnie poziom rozpuszczalnej postaci receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu (suPAR) może być niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego [169], przy czym, wyższy poziom tego receptora był związany z krótszym przeżyciem chorych, a różnice te były wysoce istotne w stopniu zaawansowania Duke B i C [169]. Kwestią nierozstrzygniętą pozostaje wciąż wartość graniczna poziomu tego markera, powyżej której ewidentnie rośnie ryzyko przerzutów. W cytowanej pracy [169] przyjęto arbitralnie wartość graniczną suPAR=1,37 ng/ml, odpowiadającą medianie dla całej grupy (Duke A–D) badanych, prawie 600 chorych. Również wyłącznie w raku odbytnicy wykazano, że wysoki poziom suPAR był niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [50], jednakże autorzy nie byli w stanie odróżnić pacjentów z dużym i ma-

łym ryzykiem progresji w obrębie stopni zaawansowania Duke B i Duke C.

Sekrecyjna postać inhibitora plazminogenu PAI-1 oznaczana przedoperacyjnie w osoczu może również być czynnikiem prognostycznym w raku jelita grubego. Oceniono techniką ELISA na dużej grupie ponad 600 chorych [137], że wysoki poziom PAI-1 (>0,5 jednostek umownych/mg białka) obserwowany jest w ~60% przypadków i znacząco obniża on przeżycie chorych (współczynnik ryzyka 1,5) w porównaniu z grupą chorych o niskim poziomie tego inhibitora.

Stwierdzono, że PAI-1 wykazuje aktywność prokoagulacyjną [16]. Dodany do hodowli komórek śródbłonna linii HUVEC stymulował tworzenie mikrocząsteczek endotelialnych, będących wynikiem apoptozy, charakteryzujących się eksternalizacją fosfatydylocholiny, kofaktora procesu aktywacji trombiny [16]. W świetle najnowszych poglądów, przypisujących czynną rolę trombocytom w powstawaniu przerzutów nowotworowych dzięki mechanizmowi indukowania angiogenezy [140] zależnej od skrzepu, prokoagulacyjna rola inhibitorów plazminogenu może sprzyjać przerzutowaniu nowotworów, i wyjaśniać obserwowany klinicznie negatywny związek PAI-1 z przebiegiem choroby [8, 135, 137].

Cząsteczki powierzchniowe jako markery inwazyjności raka jelita grubego

Wiele różnorodnych cząsteczek powierzchniowych ma swój udział w przerzutowaniu raka jelita grubego. Należą do nich cząsteczki z rodziny integryn, z rodziny genów immunoglobulin (w tym kadheryny, międzykomórkowe cząsteczki adhezyjne ICAM, naczyniowe cząsteczki adhezyjne VCAM, płytkowo-śródbłonkowe cząsteczki adhezyjne PECAM i CEA), a także antygeny, takie jak sLe^x, inaczej CA 19-9 i sLe^x, receptory czynników wzrostu, receptory metaloproteinaz związanych z błoną (MT-MMP) i receptory uPAR, receptory hormonów i cytokin [65].

Jak wspomniano, komórki różnych nowotworów wykazują preferencje narządowe w procesie przerzutowania. Występowania przerzutów raka jelita grubego najczęściej w wątrobie nie da się wytłumaczyć jedynie tym, iż jest to najbliższy narząd, który komórki uwolnione z guza pierwotnego napotykać w swojej wędrówce. Główną rolę w selektywnej kolonizacji wątroby pełnią cząsteczki adhezyjne [160], aczkolwiek adhezja komórek nowotworowych do komponentów poszczególnych narządów jest zależna zarówno od ekspresji różnych cząsteczek powierzchniowych, jak i od swoistego składu macierzy pozakomórkowej (ECM) w danym narządzie [65]. Jak wykazały badania na szczurach z wykorzystaniem przyżyciowej mikroskopii fluorescencyjnej, adhezja komórek raka okrężnicy do komórek śródbłonna naczyń w wątrobie była uwarunkowana interakcją integryn α_6 -, β_1 - i β_4 z ligandami na komórkach naczyń, a szybka ekstrakwazacja komórek nowotworowych do tkanki miększej wątroby była zależna od integryn α_2 -, α_6 -, β_1 - i β_4 - [47]. Ponadto wykazano, że adhezja komórek raka okrężnicy do śródbłonna naczyń zatokowych wątroby jest też zależna od obecności ligandów sialinowych (pochodnych kwasu sialowego) selektyn, jak sialil Lewisa a (sLe^a, znany także jako antygen CA 19-9), a zablokowa-

nie sLea w komórkach ludzkiego raka okrężnicy, HT 29, za pomocą przeciwciał monoklonalnych znamienne redukowało adhezję tych komórek do naczyń [47].

Chociaż ekspresja integrzyn przybiera różnorodne postaci w raku jelita grubego w wyniku kombinacji parowania różnych podjednostek α i β , w wielu badaniach wykazano, że obniżenie ekspresji integrzyn jest związane z wyższym stopniem zaawansowania choroby (przegląd w [65]).

Kadheryny, mediatory kontaktu komórka-komórka współdziałają z α - i β -kateniną, białkami cytoplazmatycznymi, które są łącznikami między kadherynami a białkami cytoszkieletu komórki. W raku jelita grubego zwykle jest obserwowane obniżenie ekspresji E-kadheryny i/lub α - i β -kateniny [65], co sprzyja uwalnianiu się komórek od guza pierwotnego.

Niedawno zwrócono uwagę na osteopontynę (OPN) jako na potencjalny kliniczny marker progresywności raka jelita grubego [1,2,196]. Osteopontyna jest wiążącą wapń ufosforowaną glikoproteiną, która wiąże się do powierzchniowych integrzyn poprzez motyw RGD. OPN jest konstytutywnie związana z niektórymi tkankami, takimi jak nerki i zmineralizowane tkanki (kości, zęby) i ulega sekrecji do płynów ustrojowych. OPN ulega nadekspresji w różnych stanach patologicznych: stany zapalne, choroby nerek, remodelowanie kości. Dane literaturowe wskazują, że ulega ona nadekspresji w różnych nowotworach, a jej poziom w surowicy u chorych z przerzutami jest znacznie podwyższony (przegląd w [53]). Rola osteopontyny w progresji nowotworów wiąże się głównie z jej oddziaływaniem z receptorami na powierzchni komórek. Wiążąc się z integrzynami, osteopontyna bierze udział w indukcji szlaków przekazywania sygnałów do migracji poprzez ogniskowy kompleks adhezyjny (FAC). Natomiast wiążąc się z innymi cząsteczkami adhezyjnymi, takimi jak CD44 (H-CAM), głównymi receptorami hialuronianu, może ona również indukować migrację i inwazję komórek [185]. OPN może także wpływać na inwazyjność komórek nowotworowych indukując aktywność proteolityczną przez nadregulację ekspresji urokinazowego aktywatora plazminogenu. Ta droga sygnalizacyjna może prowadzić do zmiany ekspresji genów charakterystycznych dla fenotypu inwazyjnego, np. NF- κ B, VEGF i uPA [53]. Najnowsze badania z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych do identyfikacji nowych markerów progresywności raka okrężnicy, pozwoliły na wyodrębnienie spośród wielu tysięcy genów, około 100, których ekspresja różniła się w zależności od inwazyjności tego nowotworu. Następnie analiza metodą Northern-blotingu wykazała, że osteopontyna była tym białkiem, którego nadekspresja znacząco się wiązała z inwazyjnym przebiegiem choroby [1,2].

Badania ostatnich lat potwierdziły, że znany powszechnie antygen karcynoembrionalny CEA jest jedną z cząsteczek adhezyjnych, należących do rodziny immunoglobulin [95,118]. CEA jest glikoproteiną związaną z powierzchnią błon komórek embrionalnych i nowotworowych przez glikozylofosfatydilinozitol zakotwiczoną w błonie. Nie ma on jednak domeny śródbłonowej i cytoplazmatycznej [179] i jest łatwo uwalniany do krwiobiegu. CEA ulega ekspresji we wszystkich gruczolakorakach i jest znajdowany zarówno wewnątrz- jak i pozakomórkowo [65]. Komórki śródbłon-

ka wykazują również ekspresję CEA na swojej powierzchni, dlatego też komórki gruczolakoraka łatwo przylegają do komórek śródbłonka na zasadzie interakcji CEA-CEA [65]. Już wcześnie badania kliniczne wykazują znaczenie oceny poziomu CEA w monitorowaniu przebiegu raka okrężnicy. Oznaczany przedoperacyjnie wysoki poziom CEA w surowicy był niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u chorych z tym nowotworem [58]. Wzrost poziomu CEA po resekcji nowotworu często jest wskaźnikiem rychłego ujawnienia się przerzutów, zwłaszcza w wątrobie [113]. Podobnie podwyższone stężenie CEA w surowicy chorych na raka odbytnicy w III stopniu zaawansowania klinicznego mierzone przedoperacyjnie i w tydzień po operacji wiązało się z wyższym ryzykiem wznowy i przerzutów i znamienne niższym 5-letnim przeżyciem chorych [145]. Najnowsza analiza mierzonego przedoperacyjnie poziomu sekrecyjnej postaci CEA dokonana dla prawie tysięcznej grupy chorych na raka jelita grubego wykazała znamiennej zależność między poziomem tego markera a przeżyciem chorych, ale tylko w grupie z nowotworem w III stopniu zaawansowania [144].

Rola CEA w przerzutowaniu raka jelita grubego do wątroby zdaje się polegać na modyfikowaniu środowiska wątroby w kierunku sprzyjającym migracji i adhezji komórek nowotworowych. Ostatnie badania Gangopadhyay i wsp. [55] wykazały, że CEA przez wiązanie się z receptorem na komórkach Kupffera indukuje uwalnianie przez nie wielu cytokin, m.in. IL-1, IL-6 i TNF- α . Te z kolei indukują ekspresję cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 na komórkach śródbłonka, ułatwiając adhezję.

Istnieją dowody, że receptory naskórkowego czynnika wzrostu, EGFR odgrywają ważną rolę w patogenezie raka jelita grubego. Oceniana immunohistochemicznie ekspresja EGFR w komórkach tego nowotworu rośnie ze wzrostem zaawansowania klinicznego i w stopniu IV znajdowana jest w 72–82%, przypadków [57]. Ponadto, ekspresja EGFR wydaje się związana z gorszym rokowaniem, tj. zarówno krótszym okresem przeżycia, jak i ze wzrostem ryzyka przerzutów [57,107].

Przedstawione markery molekularne inwazyjności raka jelita grubego należą do najbardziej poznanych, pełna lista tych czynników jest jednak otwarta i ulega wciąż systematycznemu poszerzaniu.

PERSPEKTYWY KLINICZNE TERAPII CELOWANEJ WOBEC CZYNNIKÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA INWAZYJNOŚĆ NOWOTWORÓW

Terapia celowana z użyciem leków, które skierowane byłyby wybiórczo przeciwko czynnikom odpowiedzialnym za inwazyjność nowotworów stwarza potencjalne możliwości zapobiegania przerzutom w wielu inwazyjnych nowotworach. Jednakże tego typu terapia jest wciąż w fazie eksperymentów.

Terapia antyangiogenna, która jest przedmiotem intensywnie rozwijającego się działu badań, ukierunkowana jest na hamowanie czynników angiogennych np. za pomocą przeciwciał anti-VEGF i anti-bFGF, lub też na aktywowanie endogennych inhibitorów angiogenezy: angiostatyny, endostatyny, interleukiny 10 i in. [79,122,139]. Również terapia genowa z zastosowaniem genów kodujących naturalne inhibitory angiogenezy, endostatynę, angiostatynę lub

wazostatynę była skuteczna w hamowaniu angiogenezy u zwierząt z nowotworami [23,24,30], zwłaszcza w skojarzeniu z chemioterapią [84].

Rozpoczęto badania kliniczne z zastosowaniem inhibitorów angiogenezy. Zaobserwowano, że preparat ABT-510, pochodna naturalnej trombospondyny zastosowana u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami litymi zatrzymywała progresję choroby u około 15% chorych, powodując akceptowalną klinicznie toksyczność [74]. Terapia antyangiogenna z użyciem przeciwciała anti-VEGF o nazwie bevacizumab (Avastin®), uderzających szczególnie w ulegający nadekspresji VEGF w śródbłonku naczyń w guzach, łączona z chemioterapią fluorouracylem (5-FU) i leukovorinem (LV) przechodzi badania kliniczne w raku jelita grubego. Wyniki badań II fazy wykazały statystycznie znamienne wzrost klinicznej odpowiedzi zaawansowanego raka jelita grubego na leczenie 5-FU/LV w połączeniu z bevacizumabem w porównaniu z leczeniem wyłącznie za pomocą 5-FU/LV [88]. Również wstępne wyniki III fazy wykazały wzrost skuteczności leczenia raka jelita grubego z zastosowaniem tego przeciwciała w połączeniu z irinotekaniem, 5-FU i LV (schemat IFL/bevacizumab), w stosunku do leczenia tylko IFL [81]. Bevacizumab w połączeniu z interferonem alfa przechodzi też III fazę badań w raku nerki [159]. Na ostateczne wyniki jednakże należy jeszcze poczekać.

Terapia celowana z użyciem inhibitorów receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) jest zaakceptowaną metodą w leczeniu zaawansowanego raka jelita grubego. Cetuximab (Erbix), chimeryczne przeciwciało monoklonalne (mysie przeciwciało połączone z ludzką immunoglobuliną G1) jest zarejestrowany w Unii Europejskiej (także w Polsce) do stosowania razem z irinotekaniem jako leczenie drugiego rzutu zaawansowanego raka jelita grubego z przerzutami odległymi po wyczerpaniu możliwości wcześniejszej chemioterapii [181]. Badanie II fazy przeprowadzone na grupie 329 chorych na rozsianego raka jelita grubego potwierdziło skuteczność tego leku, w skojarzeniu z irinotekaniem, wyrażoną zarówno wzrostem odsetka chorych odpowiadających na leczenie jak i wydłużeniem czasu do progresji choroby w porównaniu do leczenia samym irinotekaniem [38]. Skuteczność cetuximabu jako leku pierwszego rzutu w raku jelita grubego jest przedmiotem badań klinicznych, brak jednak wyników III fazy [181]. Przedmiotem badań klinicznych jest także inne, w pełni humanizowane przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw EGFR o nazwie panitumumab (ABX-EGF), a wstępne wyniki badań są zachęcające [67,181].

Jeżeli istnieje związek przyczynowy między procesami zapalnymi (indukowanymi przez patogenne drobnoustroje, a także przez chemiczne czynniki toksyczne) z nowotworzeniem i progresją, to wydaje się zasadne stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSAIDs), których działanie skierowane jest głównie na hamowanie aktywności cyklooksygenazy 2. Enzym ten przede wszystkim jest zaangażowany w metabolizm prostaglandyn, które są wytwarzane m.in. przez makrofagi, a te są mediatorami procesów zapalnych. Badania kliniczne potwierdzają skuteczność NSAIDs w obniżaniu ryzyka raka jelita grubego [163]. Swoisty inhibitor COX-2, celecoxib i inne inhibitory cyklooksygenazy 2 są wykorzystywane w skojarzeniu z chemioterapią w badaniach klinicznych (przegląd w [174]).

Makrofagi “wyedukowane” przez komórki nowotworowe do pełnienia niewątpliwie wspierającej roli w progresji i przerzutowaniu nowotworów wydają się jedną z targetów celowanej. Jak wykazują badania, na razie eksperymentalne, zahamowanie wytwarzania CSF-1 przez makrofagi, za pośrednictwem manipulacji genetycznej i użycia myszy transgenicznych pozbawionych genu CSF-1, mimo iż nie zapobiegało rozwojowi raka sutka u tych myszy, to znamienne opóźniało pojawianie się przerzutów [109]. Natomiast ekspresja genu CSF-1 u myszy transgenicznych i typu dzikiego prowadziła do przyspieszenia progresji guza i pojawiania się przerzutów w płucach, a procesom tym towarzyszyła zwiększona infiltracja makrofagów do guza pierwotnego. CSF-1 zatem może regulować potencjał przerzutowania i infiltrację makrofagów do guza. Ponadto ekspresja receptorów CSF-1 (CSF-1R), była ograniczona tylko do makrofagów [109]. Również dzięki zastosowaniu antysensownych oligonukleotydów CSF-1 i blokadzie tego czynnika wzrostu w komórkach podścieliska skutecznie zapobiegano przerzutom ksenogenicznych przeszczepów ludzkiego raka embrionalnego i raka jelita grubego u myszy bezgrasiczych [3]. Jednocześnie obserwowano znamienne zahamowanie wzrostu guza pierwotnego, obniżenie ekspresji MMP-2 w komórkach i osłabienie aktywności angiogennej badanych nowotworów.

Inhibitory metaloproteinaz, enzymów degradujących ECM były skuteczne w hamowaniu inwazji komórek ludzkiego raka trzustki linii Capan1 i AsPC1 w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem sztucznej macierzy. Jednocześnie, obniżały one liczbę przerzutów do wątroby i zmniejszały śmiertelność bezgrasiczych myszy z nowotworem indukowanym przez iniekcję komórek obu tych linii [86]. Również zablokowanie aktywności enzymatycznej urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA) na powierzchni komórek ludzkiego raka gruczołu krokowego (PC3), bez zahamowania jego zdolności wiązania receptora powodowało znaczne obniżenie potencjału przerzutowania tego nowotworu do węzłów, mózgu i płuc u myszy bezgrasiczych [37].

Próby zastosowania antagonistów (inhibitorów) integrzyn, których działanie skierowane jest głównie na zablokowanie sekwencji wiążących motyw RGD wykazują skuteczność takiej terapii na zwierzętach (przegląd w [46]). Zastosowanie cyklicznego peptydu zawierającego motyw RGD, który blokował receptory integryny $\alpha_v\beta_3$ na witroniektynie i fibroniektynie znamienne redukował liczbę przerzutów chemicznie indukowanego raka okrężnicy u szczurów i obniżało gęstość tworzonych naczyń krwionośnych w guzach [64]. W innych doświadczeniach [156], antagonistą integryny $\alpha_v\beta_3$ (związek S247), który blokuje wiązanie tej integryny do witroniektyny, nie tylko hamował tworzenie przerzutów w wątrobie myszy z przeszczepialnym rakiem jelita grubego, ale znamienne przedłużał całkowite przeżycie zwierząt poddanych takiej kuracji. Badania immunohistochemiczne wykazały oprócz zmniejszenia liczby przerzutów w wątrobie, także zmniejszenie liczby naczyń w powstałych przerzutach, oraz wzrost odsetka komórek apoptotycznych w endotelium [156].

Supresja osteopontyny przez transfekcję plazmidu zawierającego małe interferujące RNA (siRNA) i wprowadzenie go do komórek mysiego gruczolakoraka okrężnicy linii CT26 prowadziła do obniżenia aktywności migracyjnej

komórek w warunkach *in vitro*, oraz do znamienego obniżenia liczby przerzutów w wątrobie w warunkach *in vivo*. Jednocześnie obserwowano, że supresja OPN znamienie korelowała z obniżeniem ekspresji metaloproteiny 2 [184]. Być może wykorzystanie siRNA do zahamowania ekspresji obu tych markerów inwazyjności komórek raka jelita grubego okaże się w przyszłości możliwe do zastosowania w klinice.

PODSUMOWANIE

Niepowodzenia w leczeniu nowotworów nie są wynikiem niewyleczenia zmiany pierwotnej, lecz wynikiem rozsiewu choroby i przerzutów. Mimo postępu i doskonalenia metod w diagnostyce radiologicznej i histopatologicznej nie zawsze możemy na podstawie wyników tych badań pro-

gnozować przebieg choroby i podjąć właściwe leczenie. Dotyczy to zwłaszcza nowotworów odznaczających się szczególną zdolnością do przerzutowania a jednocześnie znaczną heterogennością biologiczną, do których należy rak jelita grubego. Wydaje się, że umiejętność rozpoznawania nowotworów o wysokim ryzyku przerzutowania, na podstawie molekularnych znamion inwazyjności pozwoliłaby na bardziej precyzyjne prognozowanie, ale także stwarzałyby szansę na opracowanie nowych docelowych terapii z zastosowaniem inhibitorów tych procesów. Pozostaje jednak wciąż wiele do zbadania w zakresie poznania istotnych markerów inwazyjności i ich współdziałania w progresji danego typu nowotworu, a także opracowanie w miarę modelowych systemów badawczych *in vitro* i *in vivo* do celów klinicznych zanim odpowiednia terapia zostanie wprowadzona do praktyki.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agrawal D., Chen T., Irby R., Quackenbush J., Chambers A.F., Szabo M., Cantor A., Coppola D., Yeatman T.J.: Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 2002; 94: 513–521
- [2] Agrawal D., Chen T., Irby R., Quackenbush J., Chambers A.F., Szabo M., Cantor A., Coppola D., Yeatman T.J.: Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C. R. Biol.*, 2003; 326: 1041–1043
- [3] Aharinejad S., Abraham D., Paulus P., Abri H., Hofmann M., Grossschmidt K., Schafer R., Stanley E.R., Hofbauer R.: Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5317–5324
- [4] Ahonen M., Baker A.H., Kahari V.M.: Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res.*, 1998; 58: 2310–2315
- [5] Akagi K., Ikeda Y., Sumiyoshi Y., Kinoshita J., Miyazaki M., Abe T.: Estimation of angiogenesis with anti CD105 immunostaining in process of colorectal cancer development. *Surgery*, 2002; 131: S109–S113
- [6] Alazazouzi H., Alhopuro P., Salovaara R., Sammalkorpi H., Järvinen H., Mecklin J.P., Hemminki A., Schwartz S.Jr., Aaltonen L.A., Arango D.: SMAD4 a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 2606–2611
- [7] Bachelder R.E., Crago A., Chung J., Wendt M.A., Robinson G., Mercurio A.M.: Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 5736–5740
- [8] Baker E.A., Bergin F.G., Leaper D.J.: Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. *Mol. Pathol.*, 2000; 53: 307–312
- [9] Balkwill F., Mantovani A.: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001; 357: 539–545
- [10] Bamias A., Basdanis G., Xanthakis I., Pavlidis N., Fountzilas G.: Prognostic factors in patients with colorectal cancer receiving adjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy: a pooled analysis of two randomized studies. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, 2005; 36: 29–38
- [11] Behrens J., Lustig B.: The Wnt connection to tumorigenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 2004; 48: 477–487
- [12] Bellocq A., Antoine M., Flahault A., Philippe C., Crestani B., Bernaudin J.F., Mayaud C., Milleron B., Baud L., Cadranet J.: Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am. J. Pathol.*, 1998; 152: 83–92
- [13] Bingle L., Brown N.J., Lewis C.E.: The role of tumour associated macrophages in tumour progression: implication for new anticancer therapies. *J. Pathol.*, 2002; 196: 254–265
- [14] Boxer G.M., Tsiompanou E., Levine T., Watson R., Begent R.H.: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumor Biol.*, 2005; 26: 1–8
- [15] Boyle P., Ferlay J.: Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann. Oncol.*, 2005; 16: 481–488
- [16] Brodsky S., Malinowski K., Golightly M., Jesty J., Goligorsky S.: Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*, 2002; 106: 2372–2378
- [17] Broll R., Erdmann H., Duchrow M., Oevermann E., Schwandner O., Markert U., Bruch H.P., Windhovel U.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) – a valuable serum tumor marker in patients with colorectal cancer? *Eur. J. Surg. Oncol.*, 2001; 27: 37–42
- [18] Caruso R.A., Bellocco R., Pagano M., Bertoli G., Rigoli L., Inferrera C.: Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Mod. Pathol.*, 2002; 15: 831–837
- [19] Caunningham J., Lust J.A., Schaid D.J., Bren G.D., Carpenter H.A., Rizza E., Kovach J.S., Thibodeau S.N.: Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, 1992; 52: 1974–1980
- [20] Cawkwell L., Lewis F.A., Quirke P.: Frequency of allele loss of DCC, p53, Rb1, WT1, NF1, NM23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *Br. J. Cancer*, 1994; 70: 813–818
- [21] Chambers A.F., Matrisian L.M.: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997; 89: 1260–1270
- [22] Chan C.C., Menges M., Orzechowski H.D., Orendain N., Pistorius G., Feifel G., Zeitl M., Stallmach A.: Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int. J. Colorectal. Dis.*, 2001; 16: 133–140
- [23] Chen C.T., Lin J., Li Q., Phipps S.S., Jakubczak J.L., Stewart D.A., Skripchenko Y., Forry-Schaudies S., Wood J., Schnell C., Hallenbeck P.L.: Antiangiogenic gene therapy for cancer via systemic administration of adenoviral vectors expressing secreted endostatin. *Hum. Gene Ther.*, 2000; 11: 1983–1996
- [24] Chen Q.R., Kumar D., Stass S.A., Mixon A.J.: Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res.*, 1999; 59: 3308–3312
- [25] Chetty R., Naidoo R., Schneider J.: Allelic imbalance and microsatellite instability of the DDC gene in colorectal cancer in patients under the age of 35 using fluorescent DNA technology. *Mol Pathol.*, 1998; 51: 35–38
- [26] Chin K.F., Greenman J., Gardiner E., Kumar H., Topping K., Monson J.: Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 2000; 83: 1425–1431
- [27] Chin K.F., Greenman J., Reusch P., Gardiner E., Marme D., Monson J.: Changes in serum soluble VEGFR-1 and Tie-2 receptors in colorectal cancer patients following surgical resections. *Anticancer Res.*, 2004; 24: 2353–2357
- [28] Cho K.R., Fearon E.R.: DDC: Linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Eur. J. Cancer*, 1995; 31A: 1055–1060
- [29] Cianci F., Cortesini C., Bechi P., Fantappie O., Messerini L., Vannacci A., Sardi I., Baroni G., Boddi V., Mazzanti R., Masini E.: Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2001; 121: 1339–1347

- [30] Cichon T., Jamroz L., Glogowska J., Missol-Kolka E., Szala S.: Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: inhibition of primary tumor growth and metastatic spread. *Cancer Gene Ther.*, 2002; 9: 771–777
- [31] Ciołczyk-Wierzbicka D., Amoresano A., Casbarra A., Hoja-Łukowicz D., Lityńska A., Laidler P.: The structure of the oligosaccharides of N-cadherin from human melanoma cell lines. *Glycoconjugate J.*, 2004; 20: 483–492
- [32] Ciołczyk-Wierzbicka D., Gil D., Hoja-Łukowicz D., Lityńska A., Laidler P.: Carbohydrate moieties of N-cadherin from human melanoma cells. *Acta Biochim. Polon.*, 2002; 49: 991–998
- [33] Collins H.M., Morris T.M., Watson S.A.: Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br. J. Cancer*, 2001; 84: 1664–1670
- [34] Compton C., Fenoglio-Preiser C.M., Pettigrew N., Fielding L.P.: American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*, 2000; 88: 1739–1757
- [35] Condeelis J., Pollard J.W.: Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion and metastasis. *Cell*, 2006; 124: 263–266
- [36] Coussens L.M., Werb Z.: Inflammation and cancer. *Nature*, 2002; 420: 860–867
- [37] Crowley C.W., Cohen R.L., Lucas B.K., Liu G., Shuman M.A., Levinson A.D.: Prevention of metastasis by inhibition of urokinase receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 5021–5025
- [38] Cunningham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrik A., Verslype C., Chau I., Van Cutsem E.: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351: 337–345
- [39] Dennis J.W., Granovsky M., Warren C.E.: Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1473: 21–34
- [40] Ding H., Wu X., Roncari L., Lau N., Shannon P., Nagy A., Guha A.: Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int. J. Cancer*, 2000; 88: 584–522
- [41] Duff S.E., Jeziorska M., Rosa D.D., Kumar S., Haboubi N., Sherlock D., O'Dwyer S.T., Jayson G.C.: Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy. *Eur. J. Cancer*, 2006; 42: 112–117
- [42] Duffy M.J., Reilly D., McDermott E., O'Higgins N., Fennelly J.J., Andreasen P.A.: Urokinase plasminogen activator as a prognostic marker in different subgroups of patients with breast cancer. *Cancer*, 1994; 74: 2276–2280
- [43] Dvorak H.F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 4368–4380
- [44] Dvorak H.F., Sioussat T.M., Brown L.F., Berse B., Nagy J.A., Sotrel A., Manseau E.J., Van de Water L., Senger D.R.: Distribution of vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) in tumors: Concentration in tumor blood vessels. *J. Exp. Med.*, 1991; 174: 1275–1278
- [45] Eberhart C.E., Coffey R.J., Radhika A., Giardiello F.M., Ferrenbach S., DuBois R.N.: Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 1994; 107: 1183–1188
- [46] Eble J., Heier J.: Integrins in cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2006; 6: 89–105
- [47] Enns A., Gassman P., Schluter K., Korb T., Spiegel H.-U., Senninger N., Haier J.: Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J. Gastrointest. Surg.*, 2004; 8: 1049–1059
- [48] Fakhari M., Pullirsch D., Abraham D., Paya K., Hofbauer R., Holzfeind P., Hofmann M., Aharinejad S.: Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer*, 2002; 94: 258–263
- [49] Fearon E.R., Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759–767
- [50] Fernebro E., Madsen R.R., Fernö M., Brünner N., Bendahl P.O., Christensen I.J., Johnson A., Nilbert M.: Prognostic importance of the soluble plasminogen activator receptor, suPAR, in plasma from rectal cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 2001; 37: 486–491
- [51] Folkman J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990; 82: 4–6
- [52] Freemont A.J., Hoyland J.A.: Cell adhesion molecules. *Clin. Mol. Pathol.*, 1996; 49: M321–M330
- [53] Furger K.A., Menon R.K., Tuck A.B., Bramwell V.H.C., Chambers A.F.: The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr. Mol. Med.*, 2001; 1: 621–632
- [54] Gagnon M.L., Bielenberg D.R., Gechtman Z., Miao H.Q., Tekashima S., Soker S., Klagsbrun M.: Identification of natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *In vivo* expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 2573–2578
- [55] Gangopadhyay A., Lazure D.A., Tomas P.: Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 1998; 16: 703–712
- [56] Gassmann P., Enns A., Haier J.: Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation. *Onkologie*, 2004; 27: 577–582
- [57] Goldstein N.S., Armin M.: Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in Patients with American Joint Committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma. *Cancer*, 2001; 92: 1331–1346
- [58] Goslin R., Steele G. Jr., Macintyre J., Mayer R., Sugarbaker P., Cleghorn K., Wilson R., Zameck N.: The use of preoperative plasma CEA levels for the stratification of patients after curative resection of colorectal cancer. *Ann. Surg.*, 1980; 192: 747–751
- [59] Gouon-Evans V., Rothenberg M.E., Pollard J.W.: Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development*, 2000; 127: 2269–2282
- [60] Graziano F., Cascinu S.: Prognostic molecular markers for planning adjuvant chemotherapy trials in Dukes' B colorectal cancer patients: how much evidence is enough? *Ann. Oncol.*, 2003; 14: 1026–1038
- [61] Grębecka L.: Ruchliwość inwazyjnych komórek nowotworowych: ruch ameboidalny i jego podstawy molekularne. *Nowotwory*, 2002; 52(Suppl.3): 66–72
- [62] Grondahl-Hansen J., Peters H.A., van Putten W.L., Look M.P., Pappot H., Ronne E., Dano K., Klijn J.G., Brunner N., Foekens J.A.: Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1995; 1: 1079–1087
- [63] Hadžija M.P., Radošević S., Kovačević D., Lukač J., Hadžija M., Spaventi R., Pavelić K., Kapitanović S.: Status of the DPC4 tumor suppressor gene in sporadic colon adenocarcinoma of Croatian patients: identification of a novel somatic mutation. *Mutat. Res.*, 2004; 548: 61–73
- [64] Haier J., Goldmann U., Hotz B., Runkel N., Keilholz U.: Inhibition of tumor progression and neoangiogenesis using cyclic RGD-peptides in chemically induced colon carcinoma in rats. *Clin. Exp. Metastasis*, 2002; 19: 665–672
- [65] Haier J., Nasralla M., Nicolson G.L.: Cell surface molecules and their prognostic values in assessing colorectal carcinomas. *Ann. Surg.*, 2000; 231: 11–24
- [66] Hall G.H., Turnbull L.W., Bedford K., Richmond I., Helboe L., Atkin S.L.: Neuropilin-1 and VEGF correlate with somatostatin expression and microvessel density in ovarian tumours. *Int. J. Oncol.*, 2005; 27: 1283–1288
- [67] Harari P.M.: Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat. Cancer*, 2004; 11: 689–708
- [68] Hashimoto K., Kihira Y., Matuo Y., Ysui T.: Expression of matrix metalloproteinase-7 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human prostate. *J. Urol.*, 1998; 160: 1872–1876
- [69] Herszenyi L., Plebani M., Carraro P., De Paoli M., Roveroni G., Cardin R., Foschia F., Tulassay Z., Naccarato R., Farinati F.: Proteases in gastrointestinal neoplastic diseases. *Clin. Chim. Acta*, 2000; 291: 171–187
- [70] Heslin M.J., Yan J., Johnson M.R., Weiss H., Diasio R.B., Urist M.M.: Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann. Surg.*, 2001; 233: 786–792
- [71] Hirohashi S.: Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am. J. Pathol.*, 1998; 153: 333–339
- [72] Hiromatsu Y., Toda S.: Mast cells and angiogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, 2003; 60: 64–69
- [73] Hoashi T., Kadono T., Kikuchi K., Etoh T., Tamaki K.: Differential growth regulation in human melanoma cell lines by TIMP-1 and TIMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 288: 371–379
- [74] Hoekstra R., de Vos F.Y., Eskens F.A., Gietema J.A., van der Gaast A., Groen H.J., Knight R.A., Carr R.A., Humerickhouse R.A., Verweij J., de Vries E.G.: Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 5188–5197

- [75] Hofman U.B., Westphal J.R., Waas E.T., Zendman A.J.W., Cornelissen I.M.H.A., Ruiter D.J., van Muijen G.N.: Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer*, 1999; 81: 774–782
- [76] Höckel M., Vaupel P.: Tumor hypoxia: Definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2001; 93: 266–276
- [77] Hsu M.Y., Meier F.E., Nesbit M., Hsu J.Y., Van Belle P., Elder D.E., Herlyn M.: E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.*, 2000; 156: 1515–1525
- [78] Hsu M.Y., Wheelock M.J., Johnson K.R., Herlyn M.: Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 1996; 1: 188–194
- [79] Huang S., Xie K., Bucana C.D., Ullrich S.E., Bar-Eli M.: Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 1996; 2: 1969–1979
- [80] Humphries M.J., Newham P.: The structure of cell adhesion molecules. *Trends Cell Biol.*, 1998; 8: 78–83
- [81] Hurwitz H., Fahrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F.: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 2335–2342
- [82] Hynes R.O.: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992; 69: 11–25
- [83] Ishigami S.-I., Arai S., Furutani M., Niwano M., Harada T., Mizumoto M., Mori A., Onodera H., Imamura M.: Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 1998; 78: 1379–1384
- [84] Jazowiecka-Rakus J., Jarosz M., Szala S.: Combination of vasostatin gene therapy with cyclophosphamide inhibits growth of B16(F10) melanoma tumours. *Acta Biochim. Pol.*, 2006; 53: 199–202
- [85] Jeziorska M., Haboubi N.Y., Schofield P.F., Ogata Y., Nagase H., Woolley D.E.: Distribution of gelatinase B (MMP-9) and type IV collagen in colorectal carcinoma. *Int. J. Colorectal Dis.*, 1994; 9: 141–148
- [86] Jimenez R.E., Hartwig W., Antoniu B.A., Compton C.C., Warshaw A.L., Fernandez Del Castillo C.: Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control. *Ann. Surg.*, 2000; 231: 644–654
- [87] Johansson S., Svineng G., Wennerberg K., Armulik A., Lohikangas L.: Fibronectin-integrin interactions. *Front. Biosci.*, 1997; 2: d126–d146
- [88] Kabbinavar F., Hurwitz H.I., Fehrenbacher L., Meropol N.J., Novotny W.F., Lieberman G., Griffing S., Bergsland E.: Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU) leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2003; 21: 60–65
- [89] Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggero D., Shmelkov S.V., Jensen K.K., Rafii S., Lyden D.: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005; 438: 820–827
- [90] Kim T.S., Kim Y.B.: Correlation between expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in colorectal adenocarcinoma. *J. Korean Med. Sci.*, 1999; 14: 263–270
- [91] Kitoh T., Yanai H., Saitoh Y., Nakamura Y., Matsubara Y., Kitoh H., Yoshida T., Okita K.: Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer. *J. Gastroenterol.*, 2004; 39: 434–440
- [92] Kolodziej P.A.: DDC's function takes shape in the nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1997; 7: 87–92
- [93] Konno H., Abe J., Kaneko T., Baba M., Shoji A., Sunayama K., Kamiya K., Tanaka T., Suzuki S., Nakamura S., Urano T.: Urokinase receptor and vascular endothelial growth factor are synergistically associated with the liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2001; 92: 516–523
- [94] Kornfeld D., Ekblom A., Ihre T.: Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study. *Gut*, 1997; 41: 522–525
- [95] Krop-Wątorek A., Lisowska E.: Carcinoembryonic antigen as an adhesion molecule. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1998; 46: 129–136
- [96] Kumar H., Heer K., Greenman J., Kerin M., Monson J.R.: Soluble FLT-1 is detectable in the sera of colorectal and breast cancer patients. *Anticancer Res.*, 2002; 22: 1877–1880
- [97] Kumar S., Ghellal A., Li C., Byrne G., Haboubi N., Wang J.M., Bundred N.: Breast carcinoma: Vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.*, 1999; 59: 856–861
- [98] Kuvaja P., Talvensaaari-Mattila A., Paakko P., Turpeenniemi-Hujanen T.: The absence of immunoreactivity for tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) but not TIMP-2, protein is associated with a favorable prognosis in aggressive breast carcinoma. *Oncology*, 2005; 68: 196–203
- [99] Laidler P., Gil D., Pituch-Noworolska A., Ciołczyk D., Książek D., Przybyło M., Lityńska A.: Expression of β 1-integrins and N-cadherin in bladder cancer and melanoma cell lines. *Acta Biochim. Polon.*, 2000; 47: 1159–1170
- [100] Laidler P., Lityńska A.: Tumor cell N-glycans in metastasis. *Acta Biochim. Polon.*, 1997; 44: 343–357
- [101] Latil A., Bieche I., Pesche S., Valeri A., Fournier G., Cussenot O., Lideau R.: VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int. J. Cancer*, 2000; 89: 167–171
- [102] Leek R.D., Harris A.L.: Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2002; 7: 177–189
- [103] Levy A.T., Cioce V., Sobel M.E., Garbisa S., Grigioni W.F., Liotta L.A., Stetler-Stevenson W.G.: Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 1991; 51: 439–444
- [104] Li C., Gardy R., Seon B.K., Duff S.E., Abdalla S., Renehan A., O'Dwyer S.T., Haboubi N., Kumar S.: Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br. J. Cancer*, 2003; 88: 1424–1431
- [105] Li C., Guo B., Wilson P.B., Stewart A., Byrne G., Bundred N., Kumar S.: Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2000; 89: 122–126
- [106] Li H.C., Cao D.C., Liu Y., Hou Y.F., Wu J., Lu J.S., Di G.H., Liu G., Li F.M., Ou Z.L., Jie C., Shen Z.Z., Shao Z.M.: Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004; 88: 75–85
- [107] Li S., Kim J.S., Kim J.M., Cho M.J., Yoon W.H., Song K.S., Yeo S.G., Kim J.S.: Epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in locally advanced rectal-cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2006; 65: 705–712
- [108] Lin E.Y., Gouon-Evans V., Nguyen A.V., Pollard J.W.: The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2002; 7: 147–162
- [109] Lin E.Y., Nguyen A.V., Russell R.G., Pollard J.W.: Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 727–740
- [110] Lin E.Y., Pollard J.W.: Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br. J. Cancer*, 2004; 90: 2053–2058
- [111] Liotta L.A., Rao C.N., Wewer U.M.: Biochemical interactions of tumor cells with basement membrane. *Ann. Rev. Biochem.*, 1986; 55: 1037–1057
- [112] Lityńska A., Przybyło M., Poheć E., Kremser E., Hoja-Lukowicz D., Sulowska U.: Does glycosylation of melanoma cells influence their interactions with fibronectin? *Biochimie*, 2006; 88: 527–534
- [113] Lucha P.A. Jr, Rosen L., Olenwine J.A., Reed J.F.3rd, Riether R.D., Stasik J.J.Jr, Khubchandani I.T.: Value of carcinoembryonic antigen monitoring in curative surgery for recurrent colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum*, 1997; 40: 145–149
- [114] MacDougall J.R., Matrisian L.M.: Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 1995; 14: 351–362
- [115] Manders P., Tjan-Heijnen V.C., Span P.N., Grebenchtchikov N., Geurts-Moespot A., van Tienoven D.T., Beex L.V., Sweep F.C.: Complex of urokinase-type plasminogen activator with its type-1 inhibitor predicts poor outcome in 576 patients with lymph-node negative breast carcinoma. *Cancer*, 2004; 101: 486–494
- [116] Masuda H., Aoki H.: Host expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in normal colon tissue affects metastatic potential of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 1999; 42: 393–397

- [117] Masunga R., Kohno H., Dhar D.K., Ohno S., Shibakita M., Kinugasa S., Yoshimura H., Tachibana M., Kubota H., Nagasue N.: Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 4064–4068
- [118] Maxwell P.: Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker. *Br. J. Biomed. Sci.*, 1999; 56: 209–214
- [119] Meo S., Dittadi R., Peloso L., Gion M.: The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node negative breast cancer. *Int. J. Biol. Markers*, 2004; 19: 282–288
- [120] Miao H.Q., Lee P., Lin H., Soker S., Klagsbrun M.: Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J.*, 2000; 14: 2532–2539
- [121] Michaud-Levasque J., Demuele M., Beliveau R.: Stimulation of cell surface plasminogen activation by membrane-bound melanotransferrin: a key phenomenon for cell invasion. *Exp. Cell Res.*, 2005; 308: 479–490
- [122] Min H.Y., Doyle L.V., Vitt C.R., Zandonella C.L., Stratton-Thomas J.R., Shuman M.A., Rosenberg S.: Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngenic mice. *Cancer Res.*, 1996; 56: 2428–2433
- [123] Minhajit R., Mori D., Yamasaki F., Sugita Y., Satoh T., Tokunaga O.: Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch.*, 2006; 448: 127–134
- [124] Mitomi H., Mori A., Kanazawa H., Nishiyama Y., Ihara A., Otani Y., Sada M., Kobayashi K., Igarashi M.: Venous invasion and down-regulation of p21WAF1/CIP1 are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepatogastroenterology*, 2005; 52: 1421–1426
- [125] Miyaki M., Iijima T., Konishi M., Sakai K., Ishii A., Yasuno M., Hishima T., Koike M., Shitara N., Iwama T., Utsunomiya J., Kuroki T., Mori T.: Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene*, 1999; 18: 3098–3103
- [126] Miyamoto S., Yano K., Sugimoto S., Ishii G., Hasebe T., Endoh Y., Kodama K., Goya M., Chiba T., Ochiai A.: Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its protease activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.*, 2004; 64: 665–671
- [127] Mook O.R., Frederiks W.M., Van Noorden C.J.: The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1705: 69–89
- [128] Myśliwiec P., Piotrowski Z., Zalewski B., Kukliński A., Pawlak K.: Plasma VEGF-A and its soluble receptor R1 correlate with the clinical stage of colorectal cancer. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 2004; 49(Suppl.1): 85–87
- [129] Nagase H., Woessner J.F.Jr.: Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 21491–21494
- [130] Nakayama Y., Nagashima N., Minagawa N., Inoue Y., Katsuki T., Onitsuka K., Sako T., Hirata K., Nagata N., Itoh H.: Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.*, 2002; 22: 4291–4296
- [131] Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J.Z.: VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 573–583
- [132] Näthke I.: Relationship between the role of the adenomatous polypsis coli protein in colon cancer and its contribution to cytoskeletal regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, 2005; 33: 694–697
- [133] Nguyen T.H.: Mechanism of metastasis. *Clin. Dermatol.*, 2004; 22: 209–216
- [134] Nicosia R.F.: What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am. J. Pathol.*, 1998; 153: 11–16
- [135] Nielsen H.J., Christensen I.J., Sorensen S., Moesgaard F., Brunner N., The RANX05 Colorectal Cancer Study Group: Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2000; 7: 617–623
- [136] Nielsen H.J., Hansen U., Christensen I.J., Reimert C.M., Brunner M., Moesgaard F.: Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J. Pathol.*, 1999; 189: 487–495
- [137] Nielsen H.J., Pappot H., Christensen I.J., Brunner N., Thorlacius-Ussing O., Moesgaard F., Dano K., Grondahl-Hansen J.: Association between plasma concentration of plasminogen activator inhibitor-1 and survival in patients with colorectal cancer. *Brit. Med. J.*, 1998; 316: 829–830
- [138] Onn A., Correa A.M., Gilcrease M., Isobe T., Massarelli E., Bucana C.D., O'Reilly M.S., Hong W.K., Fidler I.J., Putnam J.B., Herbst R.S.: Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 136–143
- [139] O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J.: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994; 79: 315–328
- [140] Paduch R.: Przerzut nowotworowy-znaczenie agregacji komórek nowotworowych z płytkami krwi. *Onkol. Pol.*, 2005; 8: 229–238
- [141] Palm D., Lang K., Brandt B., Zaenker K.S., Entschladen F.: *In vitro* and *in vivo* imaging of cell migration: two interdepending methods to unravel metastasis formation. *Semin. Cancer Biol.*, 2005; 15: 396–404
- [142] Pappot H., Hoyer-Hansen G., Ronne E., Hansen H.H., Brunner N., Dano K., Grondahl-Hansen J.: Elevated plasma levels of urokinase plasminogen activator receptor in non-small cell lung cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 1997; 33: 867–872
- [143] Parikh A.A., Fan F., Liu W.B., Ahmad S.A., Stoeltzing O., Reinmuth N., Bielenberg D., Bucana C.D., Klagsbrun M., Ellis L.M.: Neuropilin-1 in human colon cancer. Expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2004; 164: 2139–2151
- [144] Park I.J., Kim H.C., Yu C.S., Yoo J.H., Kim J.C.: Cutoff values of preoperative s-CEA levels for predicting survivals after curative resection of colorectal cancer. *J. Korean Med. Sci.*, 2005; 20: 624–627
- [145] Park Y.A., Lee K.Y., Kim N.K., Baik S.H., Sohn S.K., Cho C.W.: Prognostic effect of preoperative change of serum carcinoembryonic antigen level: A useful tool for detection of systemic recurrence in rectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2006; 13: 645–650
- [146] Pedersen H., Brunner N., Francis D., Osterlind K., Ronne E., Hansen H.H., Dano K., Grondahl-Hansen J.: Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor, and type 1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue. *Cancer Res.*, 1994; 54: 4671–4675
- [147] Pellikainen J.M., Ropponen K.M., Kataja V.V., Kellokoski J.K., Eskelinen M.J., Kosma V.M.: Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with special reference to activator protein-2, HER-2 and prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 7621–7628
- [148] Perrone G., Vincenzi B., Santini D., Verzi A., Tonini G., Vetrani A., Rabbitti C.: Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density and clinico-pathological features in colon cancer. *Cancer Lett.*, 2004; 208: 227–234
- [149] Pollard J.W.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 71–78
- [150] Pollock C.B., Shirasawa S., Sasazuki T., Kolch W., Dhillon A.S.: Oncogenic K-Ras is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res.*, 2005; 65: 1244–1250
- [151] Prescott S.M.: Is cyclooxygenase-2 the alpha and omega in cancer? *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 1511–1513
- [152] Prokopishyn N., Puzon-McLaughlin W., Takada Y., Laferte S.: Integrin $\alpha\beta 1$ expressed by human colon cancer cells is a major carrier of oncodevelopmental carbohydrate epitopes. *J. Cell. Biochem.*, 1999; 72: 189–209
- [153] Przybyłowska K., Smolarczyk K., Kulig A., Romanowicz-Makowska H., Dziki A., Ulańska J., Pander B., Błasiak J.: Antigen levels of the urokinase-type plasminogen activator and its gene polymorphisms in colorectal cancer. *Cancer Lett.*, 2002; 181: 23–30
- [154] Pyke C., Kristensen P., Ralfkiaer E., Grondahl-Hansen J., Eriksen J., Blasi F., Dano K.: Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.*, 1991; 138: 1059–1067
- [155] Radzikowski C., Opolski A., Wietrzyk J.: Postęp w badaniach procesu wzrostu inwazyjnego i przerzutowania. *Nowotwory*, 2002; 52(Suppl.30): 56–65
- [156] Reinmuth N., Liu W., Ahmad S.A., Fan F., Stoeltzing O., Parikh A.A., Bucana C.D., Gallick G., Nickols M.A., Westlin W.F., Ellis L.M.: $\alpha\beta 3$ integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res.*, 2003; 63: 2079–2087
- [157] Ribatti D., Vacca A., Dammacco F.: New no-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. *Eur. J. Cancer*, 2003; 39: 1835–1841
- [158] Ribatti D., Vacca A., Nico B., Crivellato E., Roncali L., Dammacco F.: The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br. J. Haematol.*, 2001; 115: 514–521

- [159] Rini B.I., Halabi S., Taylor J., Small E.J., Schilsky R.L.: Cancer and leukemia group B 90206: A randomized phase III trial of interferon-alpha or interferon-alpha plus antivascular endothelial growth factor antibody (bevacizumab) in metastatic renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 2584–2586
- [160] Rudmik L.R., Magliocco A.M.: Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.*, 2005; 92: 347–359
- [161] Saad R.S., Liu Y.L., Nathan G., Celebrezze J., Medich D., Silverman J.F.: Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod. Pathol.*, 2004; 17: 197–203
- [162] Salovaara R., Roth S., Loukola A., Launonen V., Sistonen P., Avizienyte E., Kristo P., Järvinen H., SoucheInytskyi S., Sarlomo-Rikala M., Aaltonen L.A.: Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut*, 2002; 51: 56–59
- [163] Sansbury L.B., Millikan R.C., Schroeder J.C., Moorman P.G., North K.E., Sandler R.S.: Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of colon cancer in a population-based, case-control study of African Americans and Whites. *Am. J. Epidemiol.*, 2005; 162: 548–558
- [164] Schaidt H., Oka M., Bogenrieder T., Nesbit M., Satyamoorthy K., Berking C., Matsushima K., Herlyn M.: Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *Int. J. Cancer*, 2003; 103: 335–343
- [165] Scheele J., Stangl R., Altendorf-Hofmann A.: Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br. J. Surg.*, 1990; 77: 1241–1246
- [166] Senda T., Shimomura A., Iizuka-Kogo A.: Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat. Sci. Int.*, 2005; 80: 121–131
- [167] Shamamian P., Schwartz J.D., Pocock B.J., Monea S., Whiting D., Marcus S.G., Mignatti P.: Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J. Cell Physiol.*, 2001; 189: 197–206
- [168] Somiari S.B., Shriver C.D., Heckman C., Olsen C., Hu H., Jordan R., Arciero C., Russel S., Garguillo G., Hooke J., Somiari R.J.: Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. *Cancer Lett.*, 2006; 233: 98–107
- [169] Stephens R.W., Nielsen H.J., Christensen J., Thorlacius-Ussing O., Sorensen S., Dano K., Brünner N.: Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999; 91: 869–874
- [170] Stephens R.W., Pedersen A.N., Nielsen H.J., Hamers M.J., Hoyer-Hansen G., Ronne E., Dybkjaer E., Dano K., Brunner N.: ELISA determination of soluble urokinase receptor in blood from healthy donors and cancer patients. *Clin. Chem.*, 1997; 43: 1868–1876
- [171] Storojeva I., Boulay J.L., Ballabeni P., Buess M., Terraciano L., Laffer U., Mild G., Herrmann R., Rochlitz C.: Prognostic and predictive relevance of DNAM-1, SOCS6 and CADH-7 Genes on chromosome 18q in colorectal cancer. *Oncology*, 2005; 68: 246–255
- [172] Sugihara K., Hojo K., Moriya Y., Yamasaki S., Kosuge T., Takayama T.: Pattern of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Br. J. Surg.*, 1993; 80: 1032–1035
- [173] Tabernero J., Macarulla T., Ramos F.J., Beselga J.: Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer. *Ann. Oncol.*, 2005; 16: 1740–1748
- [174] Tabernero J., Salazar R., Casado E., Martinelli E., Gomez P., Baselga J.: Targeted therapy in advanced colon cancer: the role of new therapies. *Ann. Oncol.*, 2004; 15(Suppl.4): iv55–iv62
- [175] Takahashi Y., Kitadai Y., Bucana C.D., Cleary K.R., Ellis L.M.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.*, 1995; 55: 3964–3968
- [176] Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J.C., Abraham J.A.: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 11947–11954
- [177] Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N.: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 1998; 93: 705–716
- [178] Uemura T.: The cadherin superfamily at the synapse: more members, more missions. *Cell*, 1998; 93: 1095–1098
- [179] Ugorski M., Baczyńska D.: Antygen karcynoeembrionalny: rola w progresywnym wzroście nowotworowym. *Nowotwory*, 2002; 52(Suppl.3): 51–56
- [180] Ugurel S., Rapp G., Tilgen W., Reinhold U.: Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J. Clin. Oncol.*, 2001; 19: 577–583
- [181] Utracka-Hutka B.: Leczenie celowane chorych na raka jelita grubego – aktualny stan wiedzy. *Współczesna Onkologia*, 2006; 10: 121–127
- [182] Vaisanen A., Tuominen H., Kallioinen M., Turpeenniemi-Hujanen T.: Matrix metalloproteinase-2 (72kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumor progression and may have prognostic value. *J. Pathol.*, 1996; 180: 283–289
- [183] Veikkola T., Karkkainen M., Cleasson-Welsh L., Alitalo K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.*, 2000; 60: 203–212
- [184] Wai P.Y., Mi Z., Guo H., Sarraf-Yazdi S., Gao C., Wei J., Marroquin C.E., Clary B., Kuo P.C.: Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses *in vitro* and *in vivo* CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 741–751
- [185] Weber G.F., Ashkar S., Cantor H.: Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 1997; 109: 1–9
- [186] Weidner N.: Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.*, 1995; 147: 9–19
- [187] Werther K., Christensen I.J., Nielsen H.J., Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group.: Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2002; 86: 417–423
- [188] Wong M.P., Cheung N., Yuen S.T., Leung S.Y., Chung L.P.: Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumor progression. *Int. J. Cancer*, 1999; 81: 845–850
- [189] Wu A.W., Gu J., Li Z.F., Ji J.F., Xu G.W.: COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10: 2323–2326
- [190] Wurtz S.O., Schroll A.-S., Sorensen N.M., Lademann U., Christensen I.J., Mouridsen H and Brunner N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2005; 12: 215–227
- [191] Wyckoff J., Wang W., Lin E.Y., Wang Y., Pixley F., Stanley E. R., Graf T., Pollard J. W., Segall J., Condeelis J.: A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res.*, 2004; 64: 7022–7029
- [192] Xiong B., Sun T.J., Hu W.D., Cheng F.L., Mao M., Zhou Y.F.: Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol.*, 2005; 28; 11: 1105–1108
- [193] Yamaguchi H., Wyckoff J., Condeelis J.: Cell migration in tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2005; 17: 559–564
- [194] Yamashita K., Mori M., Shiraishi T., Shibuta K., Sugimachi K.: Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 1169–1174
- [195] Yarden Y.: The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer*, 2001; 37(Suppl.4): S3–S8
- [196] Yeatman T.J., Chambers A.F.: Osteopontin and colon cancer progression. *Clin. Exp. Metastasis*, 2003; 20: 85–90
- [197] Yoon S.S., Kim S.H., Gonen M., Heffernan N.M., Detwiller K.Y., Jarnagin W.R., D'Angelica M., Blumgart L.H., Tanabe K.K., DeMatteo R.P.: Profile of plasma angiogenic factors before and after hepatectomy for colorectal cancer liver metastases. *Ann. Surg. Oncol.*, 2006; 13: 353–362
- [198] Zheng Z.S., Guillem J.G.: Colocalisation of matrix metalloproteinase-9-mRNA and protein in human colorectal cancer stromal cells. *Br. J. Cancer*, 1996; 74: 1161–1167
- [199] Zheng Z.S., Guillem J.G.: Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer and liver metastases. *Br. J. Cancer.*, 1995; 72: 575–582
- [200] Zhou Y.N., Xu C.P., Han B., Li M., Qiao L., Fang D.C., Yang J.M.: Expression of E-cadherin and b-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J. Gastroenterol.*, 2002; 8: 987–993