



Molecular mechanisms of neoplasia

Molekularne mechanizmy kierujące nowotworzeniem

Alicja Derkacz, Katarzyna Komosińska-Vassev

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ABSTRACT

The evolution of normal cells into neoplastic cells involves many stages. This paper describes six characteristics of tumour cells: maintenance of cell division-promoting signals, resistance to exogenous growth inhibitors, avoidance of apoptosis, acquisition of the ability to undergo an infinite number of divisions, induction of angiogenesis as well as activation of the ability to invade and metastasise. The listed and described characteristics of tumor cells are associated with genomic instability and the production of inflammation. Genomic instability promotes the formation of a diverse pool of cells, and the accumulation of traits of tumor cells leads to inflammation. The progress of science has enabled the addition of two further features acquired by cells during the process of neoplasia – modification of cellular metabolism and avoidance of recognition by the immune system.

KEY WORDS

angiogenesis, apoptosis, genomic instability, neoplastic progression

STRESZCZENIE

Ewolucja komórki prawidłowej w nowotworową obejmuje wiele etapów. W pracy opisano sześć cech charakteryzujących komórki nowotworowe: utrzymanie sygnałów stymulujących podziały komórkowe, oporność na egzogenne inhibitory wzrostu, unikanie apoptozy, nabywanie zdolności do nieskończonej liczby podziałów, indukcję angiogenezy oraz aktywację zdolności do inwazji i przerzutowania. U podłoża wymienionych cech leży nie tylko niestabilność genomu promująca wytworzenie zróżnicowanej genetycznie puli komórek, ale także stan zapalny, który wymaga wystąpienia wielu cech charakterystycznych dla komórek nowotworowych. Postęp badań pozwolił dodać dwie kolejne cechy nabyte przez komórki w czasie nowotworzenia – modyfikację metabolizmu komórkowego oraz unikanie rozpoznania przez system immunologiczny.

SŁOWA KLUCZOWE

angiogeneza, apoptoza, niestabilność genomu, progresja nowotworowa

Received: 09.07.2015

Revised: 19.08.2015

Accepted: 01.06.2016

Published online: 30.06.2017

Address for correspondence: Mgr Alicja Derkacz, Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41- 200 Sosnowiec, tel. +48 517 251 023, e-mail: alic87@op.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl



Maintaining proliferation signals

The progress in cancer research has created the thesis that tumours can not be considered only as a collection of dividing cells. Similarly, tumour biology can not be understood as a simple set of neoplastic cells characteristics because we should also take into account the existence and activity of normal cells in tumours, which together form a specific neoplastic microenvironment.

In healthy tissues, the number of cells is constant. On their surface, cells have receptors sensitive to growth factor receptors, which contain tyrosine kinase domains. They launch many signalling pathways regulating the cell cycle, growth, survival and metabolism. The source of proliferative signals, as well as their nature, is not fully known due to paracrine information transfer. The paracrine signal is characterized by the diffusion of signals into intercellular spaces, enabling communication with neighbouring cells. In turn, endocrine signals provide long-distance information to target cells. The analysis of both types of signalling is difficult. Understanding proliferation signals is also complicated by the location of growth factors in the intercellular spaces and extracellular matrix. The precise action of enzyme systems releasing and activating growth factors also hinders the understanding of normal cell proliferation mechanisms [1].

Mitogenic signalling has become better understood in neoplastic cells [1]. These cells have the ability to produce ligands of growth factors, resulting in autocrine proliferation. Another mechanism that supports proliferation is the stimulation of normal cells in the tumour stroma by neoplastic cells to produce growth factors.

The effect of crossing pathways derived from growth factor receptors as well as cell preferences to choose whether to signal above or below the receptor, on maintaining the proliferation signal remains poorly understood. It is known that some of the signalling pathways in neoplastic cells that lie below the receptor are activated, resulting in proliferation independent of extracellular growth factors. It is known that about 40% of human melanomas have mutations that alter the B-RAF protein conformation. This induces signalling of the MAP kinase pathway activated by MAP (Microtubule-associated protein), independent of growth systems [2]. Another example is mutations in the subunits of various phosphatidylinositol 3-kinase isoforms (PI3K), which cause hyperactivity of PI3K signalling, affecting mainly the AKT/PKB transmitter (serum/threonine protein kinase) (Fig. 1) [3].

The negative feedback mechanism is responsible for maintaining homeostasis in the flow of intracellular signals. Damage to this mechanism can enhance the proliferation signal, as exemplified by PTEN-phosphatase which deactivates PI3-kinase by decomposing

Podtrzymanie sygnałów proliferacyjnych

Postęp w badaniach nad nowotworzeniem zaowocował tezą, według której guzy nowotworowe nie mogą być rozpatrywane tylko jako zbiór dzielących się komórek. Podobnie biologia nowotworów nie może być rozumiana jako prosty zestaw charakterystycznych cech komórek nowotworowych, należy bowiem wziąć pod uwagę istnienie i działalność prawidłowych komórek w guzie, tworzących wspólnie swoiste środowisko guza.

W zdrowych tkankach liczba komórek jest utrzymywana na stałym poziomie. Na swojej powierzchni posiadają receptory wrażliwe na odbieranie czynników wzrostowych, zawierające domeny kinazy tyrozynowej. Uruchamiają wiele szlaków sygnałowych regulujących cykl komórkowy, wzrost komórki, jej przeżycie i metabolizm. Źródło sygnałów proliferacyjnych, a także ich charakter nie zostały do końca poznane z powodu parakrynnego przekazywania informacji. Sygnał parakrynnny charakteryzuje się dyfuzją sygnałów w przestrzeni międzykomórkowej, umożliwiając komunikację z sąsiednimi komórkami. Z kolei sygnał endokrynnny zapewnia przekaz informacji na duże odległości do komórek docelowych. Analiza obu typów sygnalizacji jest trudna. Poznanie sygnałów proliferacyjnych komplikuje także umiejscowienie czynników wzrostu w przestrzeniach międzykomórkowych i w macierzy pozakomórkowej. Precyzyjna działalność systemów enzymatycznych uwalniających i aktywujących czynniki wzrostowe również stanowi przeszkodę w poznaniu mechanizmów proliferacji komórek prawidłowych [1].

W komórkach nowotworowych sygnalizacja mitogenna została lepiej poznana [1]. Komórki te posiadają zdolność do produkowania ligandów czynników wzrostowych, wskutek czego proliferacja nabiera charakteru autokrynnego. Innym mechanizmem podtrzymania proliferacji jest stymulacja prawidłowych komórek wewnątrz zrębu guza przez komórki nowotworowe do wytwarzania czynników wzrostu.

Wpływ krzyżujących szlaków pochodzących z receptorów czynnika wzrostu, a także preferencje komórki co do wyboru sygnalizacji powyżej czy poniżej receptora na podtrzymanie sygnału proliferacji pozostaje nie do końca poznany. Wiadomo, że w komórkach nowotworowych część szlaków sygnalizacyjnych leżących poniżej receptora jest aktywowana, co skutkuje proliferacją niezależną od zewnątrzkomórkowych czynników wzrostu. Wiadomo, że około 40% ludzkich czerniaków posiada mutacje powodujące zmianę konformacji białka B-RAF. Indukuje to niezależną od systemów wzrostowych sygnalizację ścieżki kinazy białkowej RAF aktywowanej przez MAP (*Microtubule-associated protein*) [2]. Innym przykładem są mutacje w podjednostkach różnych izoform 3-kinazy fos-



its product – Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate (PIP₃). Mutations in the genes encoding the PTEN protein cause loss of its function [4], which increases PI3K signal transmission. Such inhibition of PTEN activity leads to the initiation of tumorigenesis, which can be observed in many cancer models [5]. It should be mentioned that methylation of the PTEN gene often causes tumour suppression in humans [6]. Another example is the mammalian target of rapamycin (mTOR), which coordinates the growth and metabolism of cells whose signals are transmitted in the same or opposite direction of PI3K protein signals. In some neoplastic cells, mTOR activity blocks PI3K signal transmission by negative feedback [7]. For example, the use of rapamycin inhibits mTOR activity which stimulates PI3K protein activity and its effector Akt/PKB, and this in turn increases the frequency of cell proliferation [8]. It is believed that the existence of negative feedback in different signal transmission pathways is very common in human neoplastic cells (Fig. 1) [9].

fatydyloinozytolu (*Phosphatidylinositol 3-kinase* – PI3K), które powodują hiperaktywację sygnalizacji PI3K, co wpływa głównie na przekaźnik AKT/PKB (*Serine/threonine protein kinase*) (ryc. 1) [3]. Mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego ma za zadanie utrzymanie homeostazy w przepływie sygnałów wewnątrzkomórkowych. Uszkodzenia tego mechanizmu są w stanie wzmagać sygnał proliferacji, czego przykładem jest PTEN-fosfataza, która dezaktywuje PI3-kinazę poprzez rozkład jej produktu – 3,4,5,-trójfosforanu fosfatidyloinozytolu (*Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate* – PIP₃). Mutacje w genach kodujących białko PTEN powodują utratę jego funkcji [4], co skutkuje zwiększeniem przesyłu sygnału PI3K. Takie zahamowanie aktywności PTEN prowadzi do inicjacji tumorogenezy, co można obserwować w wielu modelach rozwoju raka [5]. Należy wspomnieć, że metylacja genu kodującego PTEN często powoduje zahamowanie rozwoju guzów u ludzi [6].

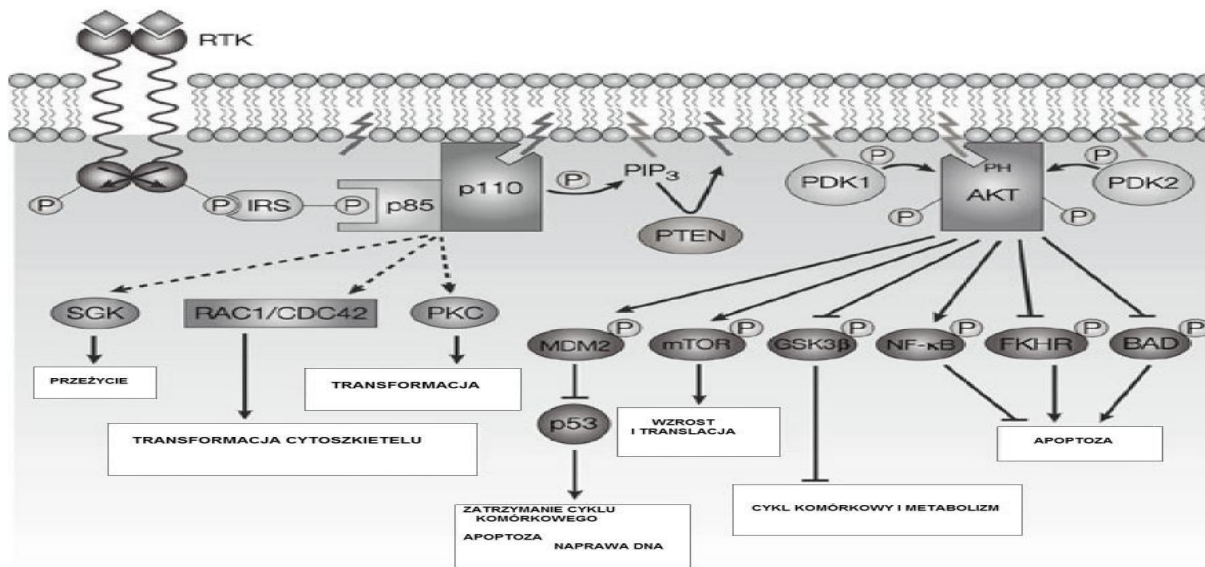


Fig. 1. Activation of the Akt/PKB pathway (Vivanco and Sawyers, 2002, modified).
Ryc. 1. Aktywacja ścieżki Akt/PKB (Vivanco i Sawyers, 2002, zmodyfikowano).

Recent research has undermined the validity of the thesis that the continually increasing expression of genes and protein transcriptional signals causes continuous proliferation of neoplastic cells. It has been shown that the excessive activity of RAS, MYC and RAF proteins can induce cell ageing. Cells from a cell culture, having elevated concentrations of RAS proteins, may transform into the non-proliferative state and in turn, cells producing a reduced amount of RAS do not age and continue to divide [5]. This is considered to be a kind of innate defence mechanism that aims to eliminate cells that produce an excessive number of signals promoting tumour growth.

Innym przykładem jest kinaza mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), będąca koordynatorem wzrostu i metabolizmu komórki, której sygnały przekazywane są w tym samym lub przeciwnym kierunku do sygnałów białka PI3K. W niektórych komórkach nowotworowych aktywność mTOR powoduje zablokowanie przesyłu sygnału PI3K poprzez ujemne sprzężenie zwrotne [7]. Na przykład zastosowanie rapamycyny prowadzi do zahamowania aktywności mTOR, co skutkuje zwiększeniem działania białka PI3K i jego efektora – Akt/PKB, który z kolei zwiększa częstotliwość proliferacji komórek [8]. Przypuszcza się, że istnienie ujemnego sprzężenia zwrotnego w różnych



No response to growth arrest signal

In addition to the induction and maintenance of proliferation, neoplastic cells have the ability to avoid systems that negatively control cell divisions involving suppressor genes. Examples are two well-known genes encoding TP53 and RB1 (Retinoblastoma protein), which act in the systems that decide on entering the proliferation pathway or activation of ageing and apoptosis. The RB1 protein integrates signals from both intracellular and extracellular sources. It determines growth and division in neoplasms – cancer cells with a dysfunctional RB1 protein pathway lack the ability to critically control the cycle, allowing continuous proliferation. On the other hand, the TP53 protein receives signals related to cellular stress, it reacts, among others, to signals that promote growth or abnormal levels of glucose, oxygen, and high degrees of genomic damage. In the case of signals indicating irreversible damage to cellular subsystems, the TP53 protein may initiate apoptosis. It should be noted that the effects of TP53 activation are complex. They differ in terms of the type of cell, strength, duration of the stressor action on the cell as well as the degree of genomic damage [10,11].

After reaching the appropriate population density, normal cells cease to divide, which is called contact inhibition. This phenomenon does not occur in cultures of many types of tumour cells, suggesting that a similar mechanism is blocked during tumour formation. There are two possible mechanisms that explain contact inhibition.

The first mechanism is based on the product of the NF2 gene, the neurofibromin-2 protein. The NF2 gene has long been regarded as a tumour suppressor because the loss of its function leads to neurofibromatosis type 2. The Neurofibromin-2 protein is responsible for the joining of of adhesion molecules (e.g. E-cadherin) on the cell surface with the transmembrane receptor containing the tyrosine kinase domain (e.g. EGF receptor), and thus it is responsible for strengthening cell adhesion that occurs with cadherin [12].

The second mechanism is based on the LKB1 epithelial polarization protein which maintains tissue cohesion and creates the epithelial structure. The LKB1 protein reverses the promitogenic effect of the Myc oncogene in solid epithelial structures. In turn, due to the inhibition of LKB1 expression, epithelial cohesion is destabilized and epithelial cells become susceptible to the action of Myc. The role of LKB1 as a tumour suppressor is also suspected as it is damaged in certain human neoplasms, confirming its anti-proliferative effect [13]. Frequently, both these mechanisms work synchronously and enable the formation of complex tissue structures by suppressing undesirable proliferative signals. At the same time, in many cancers their deactivation contributes to uncontrolled tumour growth.

ścieżkach przesyłu sygnału jest w ludzkich komórkach nowotworowych bardzo powszechne (ryc. 1) [9].

Najnowsze badania podważyły trafność tezy, że ciągle zwiększająca się ekspresja genów i sygnałów transkrypcyjnych białek skutkuje ciągłą proliferacją komórek nowotworowych. Wykazano, że nadmierna aktywność białek RAS, MYC i RAF może doprowadzić do indukcji starzenia się komórki. Komórki z hodowli komórkowej, mające zwiększone stężenie białek RAS, mogą przejść w stan nieproliferacyjny, a z kolei komórki produkujące zmniejszoną ilość białka RAS nie starzeją się i nadal się dzielą [5]. Uznawane jest to za pewien rodzaj wrodzonych mechanizmów obronnych, które mają na celu eliminację komórek produkujących nadmierną ilość sygnałów sprzyjających rozwojowi nowotworu.

Brak reakcji na sygnał zahamowania wzrostu

Poza indukcją i podtrzymywaniem proliferacji komórki nowotworowe mają zdolność unikania systemów negatywnie kontrolujących podziały komórkowe, angażujących geny supresorowe. Przykładem mogą być dwa dobrze poznane geny kodujące białko TP53 i RB1 (*Retinoblastoma protein*), działające w systemach decydujących o wejściu na drogę proliferacji lub o aktywacji starzenia się i apoptozy.

Białko RB1 integruje sygnały ze źródeł wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Decyduje o wzroście i podziałach w nowotworach – komórkom rakowym z dysfunkcyjną ścieżką białka RB1 brakuje możliwości krytycznego sterowania postępowaniem cyklu, co pozwalała na ciągłą proliferację. Z kolei białko TP53 odbiera sygnały związane ze stresem komórkowym, między innymi reaguje na sygnały promujące wzrost czy nieprawidłowy poziom glukozy, tlenu oraz na wysoki stopień uszkodzenia genomu. W razie sygnałów wskazujących na nieodwracalne uszkodzenie komórkowych podsystemów, białko TP53 może uruchomić apoptozę. Trzeba zauważyć, że skutki aktywacji TP53 są złożone. Różnią się zarówno w zależności od typu komórki, jak i od siły oraz czasu trwania stresora na komórkę, a także od stopnia zniszczenia genomu [10,11].

Prawidłowe komórki po osiągnięciu odpowiedniej gęstości populacji zaprzestają podziałów, co określa się mianem hamowania kontaktowego. Zjawisko to nie występuje w hodowlach wielu typów komórek nowotworowych, co sugeruje, że podobny mechanizm jest blokowany podczas tworzenia się guza. Istnieją dwa możliwe mechanizmy wyjaśniające hamowanie kontaktowe.

Pierwszy mechanizm opiera się na produkcji genu *NF2*, białku neurofibrominy-2. Gen *NF2* długo był uważany za supresor nowotworów, gdyż utrata jego funkcji prowadzi do neurofibromatozy typu 2. Białko neurofibrominy-2 odpowiedzialne jest za połączenie



Initiation of angiogenesis

During embryonic development, the circulatory system is made up of hemangioblast, while blood cells and blood vessels are built of angioblast that is not present in the postnatal period. Endothelial progenitor cells (EPC) constitute the population of cells in the peripheral blood of adults with differentiation potential similar to angioblast [14,15].

During embryogenesis, the formation of blood vessels occurs as a result of the creation of new endothelial cells and their merging into vessels in the process of vascularization [16]. New blood vessels transform into functional arteries, while new blood vessels are also formed from already existing ones, both in the process of arteriogenesis. The process of neoplasia activates angiogenesis, creating an ever-expanding vascular network as a result of so-called sprouting angiogenesis of endothelial cells and capillary ends [17], which enables tumour growth and nourishment [18]. The blood vessels created inside tumours as a result of continuous angiogenesis differ from normal tissue vessels [19]. The malignant vascular system is characterized by premature capillary hyperplasia, overly extensive vascular branching, a larger size, irregular blood flow, micro-haemorrhages and abnormal levels of endothelial cell proliferation. In neoplasms, angiogenesis is induced by proangiogenic signals that are initiated already in the early stages of tumour growth. Monocytes/macrophages participate in regulation of the vascular maturation process, and are responsible for controlling the interactions between vascular cells [20].

Angiogenesis is observed already in benign lesions, also in carcinoma in situ [21]. In different neoplasms, this process occurs at different rates. Some tumours, such as highly aggressive adrenal adenocarcinoma, are characterized by a poor blood system and contain ischemic regions, but with high levels of proliferation. Other neoplasms, such as neuroendocrine adrenal carcinoma, have an extensive network of blood vessels. Similar differences suggest the existence of a primary angiogenic signal that induces neovascularization controlled with varying intensity by both neoplastic cells and the tumour microenvironment.

The known pro and antiangiogenic factors are VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) and thrombospondin 1 (TSP1). The VEGF-A gene encodes ligands that are responsible for the growth of new blood vessels during prenatal and postnatal development while maintaining endothelial cell homeostasis and during physiological and pathological changes in the body [22]. The production of VEGF-A protein has been found in gastric tumours [23]. The final stages of the formation of a new blood vessel remain under the control of Ang-1 (Angiopoietin-1) and Ang-2 (Angiopoietin-2) proteins, which combine with their cellular receptor Tie-2 (Receptor tyrosine kinase) [24]. Tie-2

częstek adhezyjnych (np. E-kadheryn) na powierzchni komórki z transbłonowym receptorem zawierającym domenę kinazy tyrozynowej (np. receptor EGF), przez co odpowiada za umacnianie adhezji komórkowej zachodzącej przy pomocy kadheryn [12].

Drugi mechanizm opiera się na białku polaryzacji nabłonków LKB1, utrzymującym spójność tkanki i tworzącym strukturę nabłonka. Białko LKB1 odwraca efekt promitogeny onkogeny *Myc* w stałych strukturach nabłonkowych.

Z kolei w wyniku hamowania ekspresji LKB1 spójność nabłonka ulega destabilizacji i komórki nabłonkowe stają się podatne na działanie *Myc*. Podejrzewa się także rolę LKB1 jako supresora nowotworowego, który ulega uszkodzeniu w pewnych ludzkich nowotworach, co potwierdza jego działanie antyproliferycyjne [13]. Często obydwie wymienione mechanizmy działają synchronicznie i umożliwiają powstanie złożonych struktur tkankowych poprzez tłumienie niepożądanych sygnałów proliferacyjnych, a jednocześnie ich dezaktywacja w wielu nowotworach przyczynia się do niekontrolowanego wzrostu guzów.

Inicjowanie procesu angiogenezy

Podczas rozwoju embrionalnego układ krążenia tworzony jest z hemangioblastu, a komórki krwi i naczyń krwionośnych z angioblastu, który nie występuje w okresie postnatalnym. Populację komórek obecnych we krwi obwodowej osób dorosłych o podobnym potencjale różnicowania do angioblastu stanowią prekursorowe komórki śródbłonka – EPC (*Endothelial progenitor cells*) [14,15].

W czasie procesu embriogenezy tworzenie naczyń krwionośnych następuje w wyniku powstawania nowych komórek śródbłonkowych, łączenia się ich w naczynia w procesie waskularyzacji [16], tworzenia nowych naczyń krwionośnych, ulegających przekształceniu w funkcjonalne tętnice w procesie arteriogenezy, i tworzenia nowych naczyń krwionośnych z już istniejących w procesie angiogenezy. Proces nowotworzenia aktywuje angiogenezę, tworząc ciągle rozrastającą się sieć naczyń w wyniku tzw. pączkowania (*sprouting angiogenesis*) komórek śródbłonka ścian i końców naczyń włosowatych [17], co pozwala na rozrost i odżywianie się guza [18]. Naczynia krwionośne wytworzone wewnątrz guzów w wyniku ciągłej angiogenezy różnią się od naczyń tkanek prawidłowych [19]. Nowotworowy system naczyniowy charakteryzuje się przedwczesnym rozrostem włosowatym, zbyt rozległym rozgałęzieniem naczyń, większymi ich rozmiarami, nieregularnym przepływem krwi, mikrokrwotokami i nieprawidłowym poziomem proliferacji komórek śródbłonka. W nowotworach angiogeneza indukowana jest przez sygnały proangiogenne, które są inicjowane już w początkowych fazach rozwoju nowotworów. W regulacji procesu dojrzewania naczy-



receptor activation triggers a cascade of signals that affect the interactions between vascular endothelial cells and the surrounding supporting cells, leading to the remodelling of immature blood vessels and stabilization of mature vessels. An increase in the angiopoietin production in neoplastic cells has also been demonstrated in colorectal cancer [25]. Kinase D1 is involved in regulating angiogenesis by influencing the VEGF pathway [26]. Vessel normalization is possible thanks to drugs targeted at the VEGF pathway. Therapy targeted at the VEGF pathway, in combination with other anticancer drugs, lead to improved efficacy in the treatment of cervical, gastric, lung, colorectal, ovarian and breast cancer [27,28].

TSP-1 protein, angiostatin and endostatin belong to the group of endogenous angiogenesis inhibitors that are present in the blood systems of mice and humans. They act as physiological regulators modulating short-term angiogenesis during tissue renewal and wound healing.

Endostatin leads the signalling cascade: ephrins, Tumour necrosis factor- α (TNF- α) and is a cell adhesion regulator. Angiostatin inhibits angiogenesis by reducing proliferation as a result of extending the G₀ resting phase in the cell cycle [29] and disrupts normal functioning of the connections between endothelial cells, thereby inducing apoptosis. Reducing tumour vascularization significantly increases the level of neoplastic cell apoptosis [30]. The antiangiogenic action of angiostatin makes it possible to be used in antineoplastic therapy [30].

In turn, thrombospondin 1 is an extracellular glycoprotein that inhibits the proliferation and migration of endothelial cells as a result of interaction with CD36 on the surface of these cells. The TSP1 fragment binds to CD36, which leads to the expression of fatty acid synthase (FAS) ligand. The caspase cascade is activated, resulting in cell apoptosis.

The methods of angiogenesis evaluation can be divided into direct [31,32] and indirect [33,34]. The direct methods are based on histopathological tests consisting of microscopic analysis of specimens to be examined, whereas indirect methods are used to determine angiogenic cytokine concentrations, mainly VEGF [33].

Avoiding apoptosis

Thanks to the apoptosis mechanism, improperly dividing or severely damaged cells are removed naturally. This is so-called programmed cell death. It is characterized by the activation of many specific biochemical pathways and synthesis of new proteins, or the presence of signalling particles, such as TNF- α (35) or FAS ligand (36). The multidimensional nature of the ways to avoid apoptosis most likely reflects the number of signals it induces.

nia biorą udział monocyty/makrofagi, odpowiadające za kontrolę wzajemnych oddziaływań pomiędzy komórkami utworzonych naczyń [20].

Tworzenie naczyń krwionośnych obserwuje się już w zmianach niezłośliwych, także w dysplazjach (*carcinoma in situ*) [21]. W różnych nowotworach proces ten następuje z różnym natężeniem. Niektóre guzy, jak wysoce agresywny gruczolakorak nadnerczy, charakteryzują się ubogim systemem krwionośnym i zawierają rejon niedokrwione, lecz o wysokim poziomie proliferacji. Inne nowotwory, jak np. neuroendokryny rak nadnerczy, mają rozbudowaną sieć naczyń krwionośnych. Podobne różnice sugerują istnienie pierwotnego sygnału angiogenego, wywołującego neowaskularyzację kontrolowaną ze zróżnicowanym natężeniem przez zarówno komórki nowotworowe, jak i mikrośrodowisko guza.

Znanymi czynnikami pro- i antyangiogennymi są czynnik wzrostu śródbłonna VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor-a*) i trombospodina TSP1 (*Trombospondin 1*). Gen VEGF-A koduje ligandy, które odpowiedzialne są za wzrost nowych naczyń krwionośnych w trakcie rozwoju prenatalnego i postnatalnego podczas utrzymania homeostazy komórek śródbłonna oraz podczas fizjologicznych i patologicznych zmian w organizmie [22]. Produkcję białka VEGF-A stwierdzono w guzach żołądka [23]. Końcowe etapy powstawania nowego naczynia krwionośnego pozostają pod kontrolą białek Ang-1 (*Angiopoietin-1*) i Ang-2 (*Angiopoietin-2*), które łączą się ze swoim receptorem komórkowym Tie-2 (*Receptor tyrosine kinase*) [24]. Aktywacja receptora Tie-2 uruchamia kaskadę sygnałów, wpływających na oddziaływanie między komórkami śródbłonna naczyń i otaczającymi je komórkami podporowymi, co doprowadza do przebudowy niedojrzałych naczyń krwionośnych i stabilizacji naczyń dojrzałych. Wzrost produkcji angiopoetyn w komórkach nowotworowych wykazano także w raku jelita grubego [25]. Kinaza D1 bierze udział w regulowaniu angiogenezy poprzez wpływ na ścieżkę VEGF [26]. Normalizacja naczyń możliwa jest dzięki lekom celowanym w ścieżkę VEGF. Terapie celowane w ścieżkę VEGF, w połączeniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi, prowadzą do poprawy skuteczności w leczeniu nowotworów szyjki macicy, żołądka, płuc, okrężnicy i odbytnicy, jajnika i sutka [27,28].

Białka TSP-1, angiostatyna i endostatyna należą do grupy endogennych inhibitorów angiogenezy, które obecne są w układach krwionośnych u myszy i człowieka. Działają jako fizjologiczne regulatory modulujące krótkotrwałą angiogenezę podczas odnowy tkanki i gojenia się ran.

Endostatyna prowadzi kaskadę sygnalizacji efriny, TNF- α (*Tumor necrosis factor-a*) oraz jest regulatorem adhezji komórkowej. Angiostatyna hamuje angiogenezę poprzez zmniejszenie proliferacji na skutek



Apoptosis regulators can be divided into extracellular signals inducing cell death based on FAS ligand, and intracellular integrating signals of various kinds. Each of them aims to activate proteases – caspase 8 and 9, respectively – by activating the proteolytic cascade until the final apoptosis phase, where the cell undergoes gradual disintegration and is absorbed by phagocytosis by macrophages.

The apoptotic pathway begins when the apoptotic inducer transmits a signal between the receptors and effectors, controlled by the B-cell leukaemia (Bcl) protein family. In turn, Bcl-2 protein [37] and, to a lesser extent, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-1 proteins are apoptosis inhibitors [21]. Bcl-2 family proteins share at least one of the four regions called Bcl-2 homology domains (BH) BH1-BH4. These domains condition the structure and function of the proteins. All four of them occur only in anti-apoptotic proteins. The function of Bcl-2 proteins consists primarily of connecting to pro-apoptotic Bax and Bac proteins, which are embedded in the outer mitochondrial membrane. In turn, the stimulated multi-domain death effectors Bax and Bac disrupt the cohesion of the mitochondrial membrane, thereby inducing the secretion of pro-apoptotic signalling proteins into the cytoplasm, the most important of which is cytochrome c. The released cytochrome causes a caspase cascade whose proteolytic effects induce changes leading to apoptosis [38].

Apoptosis can also be triggered by tumour suppressor TP53 as a DNA-damage causing factor inducing apoptosis by increasing the expression of NOx and Puma [39], as a response to DNA damage and other chromosome disorders. On the other hand, insufficient signals from the survival factor can lead to apoptosis by overexpression of the Bim protein [38]. Excessive signal generation by the Myc protein also triggers apoptosis [40]. Neoplastic cells have developed many strategies to circumvent apoptosis. These include the loss of TP53 protein function [39] as a DNA damage suppressor, as well as an increase in the expression of anti-apoptotic regulators or survival signals by decreasing the secretion of Bax, Bim and Puma pro-apoptotic factors. Stoppage of the ligand-induced signalling pathway is also important to inhibiting apoptosis (Fig. 2) [38].

Signalling pathways activated during apoptosis such as the P13K/Act and mTOR kinases pathway cross the pathways controlling autophagy. Autophagy is an important physiological response of cells induced in the conditions of cellular stress. It allows the cells to break up organelles such as ribosomes and mitochondria, and the resulting breakdown products are used in biosynthesis and metabolic reactions. The organelles to be digested are surrounded by intracellular vesicles, which then bind to lysosomes, and the organelles decompose under the influence of lytic enzymes. As

wydłużenia fazy spoczynku G_0 w cyklu komórkowym [29] i zaburza prawidłowe funkcjonowanie połączeń pomiędzy komórkami śródbłonna, indukując tym samym apoptozę. Zmniejszenie unaczynienia guza znacząco podnosi poziom apoptozy komórek nowotworowych [30]. Antyangiogenne działanie angiostatyny stwarza możliwość wykorzystania jej w terapii antynowotworowej [30].

Z kolei trombospondyna 1 to pozakomórkowa glikoproteina, która hamuje proliferację i migrację komórek śródbłonna w wyniku wytworzonej interakcji z CD36 na powierzchni tych komórek. Fragment TSP1 łączy się z CD36, co doprowadza do ekspresji ligandu FAS (*Fatty acid synthase*). Uruchamia się kaskada kaspaz, w wyniku czego dochodzi do apoptozy komórek.

Metody oceny procesu angiogenezy można podzielić na bezpośrednie [31,32] i pośrednie [33,34]. Metody bezpośrednie opierają się na badaniach histopatologicznych, polegających na analizie mikroskopowej badanego wycinka materiału, natomiast w metodach pośrednich stosuje się oznaczenia stężenia cytokin angiogennych, głównie VEGF [33].

Unikanie apoptozy

Dzięki mechanizmowi apoptozy w sposób naturalny usuwane są nieprawidłowo dzielące się lub poważnie uszkodzone komórki. Jest to tzw. programowana śmierć komórkowa. Charakteryzuje się ona aktywacją wielu swoistych szlaków biochemicznych, aktywacją syntezy nowych białek czy obecnością cząstek sygnalizujących, takich jak TNF- α (35) czy ligandu FAS [36]. Wieloogniskowość sposobów unikania apoptozy najprawdopodobniej odzwierciedla liczbę sygnałów, jakie ją indukują.

Regulatory apoptozy dzielą się na zewnątrzkomórkowe sygnały indukujące śmierć komórki, oparte na ligandzie FAS, i na wewnątrzkomórkowe integrujące sygnały o różnorodnym charakterze. Każdy z nich dąży do aktywacji proteazy – odpowiednio kaspazy 8 i 9 – uruchamiając kaskadę proteolizy, aż do ostatecznej fazy apoptozy, gdzie komórka ulega stopniowej dezintegracji i zostaje pochłonięta na drodze fagocytozy przez makrofagi.

Ścieżka apoptotyczna ma swój początek, gdy induktor apoptozy przekazuje sygnał pomiędzy receptorami a efektorami, kontrolowany przez rodzinę białek Bcl (*B-cell leukemia*). Z kolei białko Bcl-2 [37], a w mniejszym stopniu białka: Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A-1, są inhibitorami apoptozy [21]. Białka z rodziny Bcl-2 mają wspólny co najmniej jeden z czterech regionów nazywanych domenami homologicznymi z Bcl-2 (*Bcl-2 homology domains* – BH) BH1–BH4. Domeny te warunkują strukturę oraz funkcję białek. Wszystkie cztery występują tylko w białkach antyapoptotycznych. Działanie białek Bcl-2 polega przede wszystkim na łączeniu się do białek proapoptotycz-

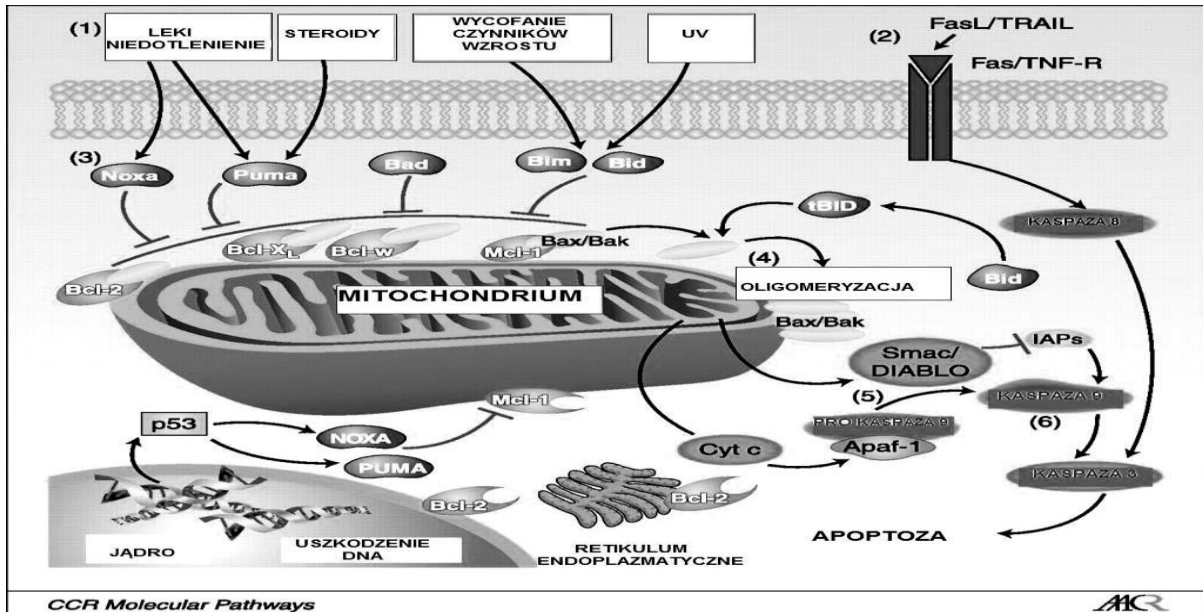


Fig. 2. Course of angiogenesis [Kang, Reynolds, 2009, modified].

Ryc. 2. Przebieg angiogenezy [Kang, Reynolds, 2009, zmodyfikowano].

result of this process, small mass metabolites are created, which allow the survival of many neoplastic cells in difficult conditions of nutrient deficiency. Among the autophagic effectors are proteins mediating in the formation of vesicles and delivering them to lysosomes.

Another common point of autophagy and apoptosis is the Becin-1 protein belonging to the subfamily of apoptosis-inducing protein regulators [42]. Their BH3 domain allows binding of the Bcl-2/Bcl-xl protein. The stress-factorized BH3 domain releases Becin-1 from Bcl-2/Bcl-xl, allowing it to activate autophagy. This is achieved by secreting the proapoptotic Bax and Bac proteins that trigger apoptosis. The BH3 domain can induce apoptosis and autophagy depending on the physiological state of the cell. The induction of autophagy can probably be a barrier to carcinogenesis which begins independently or together with apoptosis. Autophagy is another obstacle that must be overcome in the process of cancerogenesis. In turn, nutrient deficiency, radiation therapy and certain cytotoxic drugs can induce autophagy and thus protect neoplastic cells and consequently, suppress the desired effect of cellular stress.

During stress, cancer cells contract through autophagy and enter latency, in which they become resistant to treatment with very potent anticancer drugs. There are no known genetic or physiological conditions that determine when and how autophagy allows cells to survive, and when it leads to their death. Detailed knowledge of apoptotic and antiapoptotic pathways and understanding of the functions of regulatory proteins involved in these pathways enable sensitization of neoplastic cells to apoptosis, thus improving the

ných Bax i Bac, które są osadzone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Z kolei pobudzone wielodomenowe efekторы śmierci Bax i Bac zakłócają spójność zewnętrznej błony mitochondrialnej, powodując przez to wydzielenie do cytoplazmy proapoptotycznych protein sygnalizacyjnych, z których najważniejszym jest cytochrom c. Uwolniony cytochrom powoduje kaskadę kaspaz, której proteolityczne działania indukują zmiany prowadzące do apoptozy [38].

Szlaki sygnałowe aktywowane podczas apoptozy, jak ścieżka P13K/Akt i kinaz mTOR, krzyżują się ze ścieżkami kontrolującymi autofagię. Autofagia to ważna fizjologiczna reakcja komórki indukowana w stanach stresu komórkowego. Umożliwia komórkom rozbijanie organeli, takich jak rybosomy czy mitochondria, a powstałe produkty rozpadu używane są w biosyntezie i reakcjach metabolicznych. Organelle, które mają być strawione, zostają otoczone przez wewnątrzkomórkowe pęcherzyki, które następnie łączą się z lizosomami, a organelle pod wpływem enzymów litycznych ulegają rozkładowi. W wyniku tego procesu powstają metabolity o małej masie, umożliwiające przetrwanie wielu komórkom rakowym w trudnych warunkach niedoboru składników odżywczych. Wśród efektorów autofagii znajdują się białka pośredniczące w formowaniu pęcherzyków i dostarczaniu ich do lizosomów.

Kolejny punkt wspólny autofagii i apoptozy to białko Becin-1, należące do podrodziny regulatorów białkowych indukujących apoptozę [42]. Ich domena BH3 pozwala wiązać białka Bcl-2/Bcl-xl. Domena BH3 sprzężona z czynnikiem stresu uwalnia Becin-1 od Bcl-2/Bcl-xl, przez co umożliwia mu uruchomienie autofagii. Jest to możliwe dzięki wydzielaniu proapo-



effectiveness of current therapies. This is possible due to the extrinsic induction of apoptosis by TRAIL signalling or inhibition of the antiapoptotic activity of Bcl-2 protein or IAP protein [43,44].

Unrestricted replication potential

Normal cells have a limited number of growth and division cycles. This involves natural proliferation barriers, the entry of cells into an irreversible non-proliferative state, and cell death. Tumour formation requires neoplastic cells to have unlimited replication potential and the transition from properly dividing cells to a continuous-dividing population which is referred to as immortalization.

Telomeres – protecting chromosome ends – are important in unrestricted replication. The length of telomeric DNA in a cell dictates how many generations of cells will appear before the majority of telomeres have been destroyed and consequently lose their protective functions. It is possible to immortalize cancer cells by maintaining a sufficient length of telomeric DNA. This condition can be achieved by the increased expression of telomerase or by a recombination-based telomere maintenance mechanism. Telomerase is an enzyme that adds repetitive telomeres to the ends of chromosomes, thereby extending telomeric DNA and is able to counter progressive telomere shortening [45].

The induction of ageing in certain cells can be delayed or even eliminated by improving conditions created within the culture. Primary cells newly isolated from the tissue to initiate tissue culture can grow unhindered until a crisis and the induction of apoptosis initiated by critically shorted telomeres [46,47,48,49]. Ageing induced by excessive or unstable oncogenic signalling is a defence mechanism against neoplasia, which has its origins in multiple deviations from the norm of proliferation, in high levels of carcinogenic signalling, and telomere shortening.

The ability to invade and form metastases

The progression of neoplasms is associated with their ability to create metastases. This is a complex process and includes: disconnection of primary tumour cells, transition to the basal membrane, entry into blood or lymphatic vessels, cell survival during migration without adhesion, settling in a new localization, transition from vessels to surrounding tissues, forming a secondary focus, adaptation and change of the local microenvironment to adapt it to its own needs. To prevent metastases, a protein called E-cadherin maintains cell adhesion by producing intercellular connections. The increased expression of E-cadherin acts antagonistically to the formation of metastases. In turn,

ptotycznych białek Bax i Bac, które uruchamiają apoptozę. Domena BH3 może indukować apoptozę i autofagię w zależności od fizjologicznego stanu komórki. Prawdopodobnie indukowanie autofagii może być barierą dla kancerogenezy powstającej niezależnie lub w połączeniu z apoptozą. Autofagia to kolejna przeszkoda, która musi być pokonana w procesie kancerogenezy. Z kolei niedobór składników odżywczych, radioterapia, pewne cytotoksyczne leki mogą wywołać wzmoczoną autofagię, a tym samym chronić komórki nowotworowe, a co za tym idzie tłumić pożądane działanie wywołania stresu komórkowego.

Podczas stresu komórki nowotworowe kurczą się na drodze autofagii, przechodząc w stan uśpienia, w którym stają się odporne na leczenie bardzo silnymi lekami o działaniu przeciwnowotworowym.

Nie są znane warunki genetyczne i fizjologiczne decydujące o tym, kiedy i w jaki sposób autofagia umożliwia komórkom przetrwanie, a kiedy prowadzi do ich śmierci.

Szczegółowe poznanie ścieżek apoptotycznych i antyapoptotycznych oraz zrozumienie funkcji białek regulatorowych zaangażowanych w te szlaki pozwala na uwrażliwienie komórek nowotworowych na apoptozę, a tym samym poprawę skuteczności obecnych terapii. Możliwe jest to dzięki zewnątrzpochodnemu wywołaniu apoptozy poprzez sygnalizację TRAIL lub zahamowanie antyapoptotycznej aktywności białka Bcl-2 lub białka IAP [43,44].

Nieograniczony potencjał replikacyjny

Komórki prawidłowe podlegają ograniczonej liczbie cykli wzrostu i podziałów. Wiążą się z tym naturalne bariery proliferacji, wejście komórki w nieodwracalny stan nieproliferacyjny, a także śmierć komórkowa. Tworzenie guza wymaga od komórek nowotworowych nieograniczonego potencjału replikacyjnego, a przejście od komórek dzielących się prawidłowo do populacji posiadającej zdolność ciągłego dzielenia się określa się jako unieśmiertelnianie.

Telomery – chroniące zakończenia chromosomów – mają duże znaczenie w nieograniczonej replikacji. Długość telomerowego DNA w komórce dyktuje, jak wiele pokoleń komórek zdąży się pojawić zanim większość telomerów ulegnie zniszczeniu, a w konsekwencji utraci funkcje ochronne. Unieśmiertelnianie komórek rakowych jest możliwe dzięki utrzymaniu wystarczającej długości telomerowego DNA. Stan ten może być osiągnięty poprzez wzmoczoną ekspresję telomerazy lub poprzez mechanizm podtrzymania funkcji telomerazy oparty na rekombinacjach. Telomeraza jest enzymem dodającym powtórzone sekwencje telomerowi do końców chromosomów, przez co rozszerza telomerowe DNA i jest w stanie przeciwdziałać postępującemu skracaniu telomerów [45].



the reduced expression of this protein enhances this ability. Another cadherin protein, N-cadherin, is expressed during the migration of mesenchymal cells and neurons in organogenesis. Over-expression of this protein in a developed organism allows tumour invasion.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulates a particular type of invasiveness known as mesenchymal [50]. Two other types of invasiveness have also been identified. The first type is collective invasion, typical of squamous cell carcinomas, where clusters of neoplastic cells in whole invade adjacent tissues. Such neoplasms rarely metastasise, hence this type of invasion does not have certain functions that facilitate their formation. The second type of invasiveness – the "amoeboid" form of invasion – is more common. Each cell exhibits morphological plasticity, which allows slipping through the slits in the extracellular matrix, as opposed to tracing paths through neoplastic cells as in the case of mesenchymal and collective invasiveness [51].

It is not currently known whether neoplastic cells involved in collective and amoeboid invasion use EMT or may benefit from completely different, unknown invasive processes.

As a result of the EMT phenomenon, epithelial cells lose their characteristic features, such as polarity, intercellular interaction and adhesion to the basilar membrane. In return, they acquire more mobility and the ability to migrate.

Transcription factors: Snail, Slug, Twist and Zeb1/2 lead EMT transition and related migration processes. These factors are also secreted by many malignant tumours. Some EMT regulators during over-expression cause metastases [52]. It is possible that EMT-inducing transcription factors are able to induce most of the stages of invasion cascade and metastases beyond the colonization stage. The temporal stability and nature of the mesenchymal state that arose as a result of EMT is not known.

In 2011, Hananan and Weinberg observed the secretion of transcriptional factors that induce EMT in certain non-epithelial tumour types, i.e. sarcomas and neuroectodermal tumours, but their role in the programming of malignant traits in these malignancies is poorly documented. It is not entirely clear whether acquisition of the features of invasiveness by neoplastic cells is triggered by EMT activation, or whether there are yet other alternative programs that direct invasiveness and metastasis.

The mutual penetration of stromal cells and tumour cells is a part of the acquired ability for invasive growth and metastasis. Mesenchymal stem cells (MCSs) found in the tumour stroma secrete CCL5/RANTES as a response to neoplastic cell signals. Then CCL5 interacts

Indukcja starzenia się w pewnych komórkach może być opóźniona lub nawet wyeliminowana dzięki polepszeniu warunków stworzonych wewnątrz kultury. Pierwotne komórki świeżo wyizolowane z tkanki w celu zapoczątkowania hodowli tkankowej mogą rozrastać się bez przeszkód, aż do momentu kryzysu i do indukcji apoptozy zapoczątkowanej przez krytycznie skrócone telomery [46,47,48,49]. Starzenie się indukowane przez nadmierne lub niestabilne sygnalizowanie onkogenne jest mechanizmem obronnym przed nowotworzeniem, który ma swój początek w wielorakich odchyleniach od normy dotyczących proliferacji, w wysokich poziomach sygnalizacji nowotworowej i w skróceniu telomerów.

Zdolność do inwazji i przerzutowania

Progresja nowotworów wiąże się z ich zdolnością do tworzenia przerzutów. Jest to złożony proces i zalicza się do niego: odłączenie komórek guza pierwotnego, przejście przez błonę podstawną, przedostanie się do naczyń krwionośnych lub limfatycznych, przeżycie komórek podczas wędrówki w warunkach braku adhezji, zasiedlenie nowych lokalizacji, przejście z naczyń do otaczających tkanek, utworzenie wtórnego ogniska oraz przystosowanie i zmiana lokalnego środowiska w celu dostosowania go do własnych potrzeb. Aby przeciwdziałać przerzutowaniu, białko o nazwie E-kadheryna utrzymuje przyleganie komórek poprzez wytwarzanie połączeń międzykomórkowych. Zwiększona ekspresja E-kadheryny działa antagoniście do tworzenia się przerzutów. Z kolei zmniejszona ekspresja tego białka nasila tę możliwość. Inne białko z rodziny kadheryn, N-kadheryna, ulega ekspresji podczas migracji komórek mezenchymalnych oraz neuronów w czasie organogenezy. Nadekspresja tego białka w wykształconym organizmie umożliwia inwazję nowotworową.

Proces EMT (*Epithelial-mesenchymal transition*) reguluje szczególnie typ inwazyjności określane mianem mezenchymatycznego [50]. Zidentyfikowano także dwa inne typy inwazyjności. Pierwszy typ to inwazja kolektywna, typowa dla raków płaskokomórkowych, polegająca na tym, iż skupiska komórek nowotworowych w całości naciekają na przyległe tkanki. Nowotwory takie rzadko tworzą przerzuty, więc ten typ inwazji nie posiada pewnych funkcji, które ułatwiają ich tworzenie. Drugi typ inwazyjności – „ameboidalna” forma inwazji – jest częściej spotykana. W jej trakcie każda komórka przejawia morfologiczną plastyczność, która umożliwia przeslizgiwanie się przez szczeliny w macierzy zewnątrzkomórkowej, w odróżnieniu od torowania sobie ścieżki poprzez komórki nowotworowe w przypadku mezenchymatycznej i kolektywnej inwazyjności [51].



with tumour cells to stimulate invasion. On the periphery of the tumour, macrophages can promote local invasion by providing matrix-damaging enzymes, such as cysteine-cathepsin proteases or metalloproteinases.

In metastatic breast cancer, tumour associated macrophages (TAMs) provide epidermal growth factor (EGF) to breast cancer cells, while neoplastic cells stimulate macrophages by means of CSF-1 (Cerebrospinal fluid-1). Interactions of this kind facilitate intravasation and the spread of metastases.

Neoplastic cells that have passed through EMT in the initial invasion and metastatic spread may undergo a reverse process known as mesenchymal-epithelial transition (MET) [50]. This plasticity may result in the formation of new cancer colonies, histopathologically similar to early stage cancer cells that have never undergone EMT. Probably, cancer cells only partially pass through EMT, thus acquiring new mesenchymal features and still possessing epithelial features.

The process of forming metastases can be divided into two main phases: the physical spread of cancer cells to distant tissues and their adaptation to foreign micro-environments. These two phases lead to colonization, or the growth of micrometastases to the size of macroscopic tumours. Colonization is not strictly linked to physical spread, as is demonstrated by the examples of patients with multiple micrometastases that have never grown into macroscopic metastatic tumours.

In the case of neoplasms of the breast or melanoma, a primary tumour may release systemic suppressors that cause micrometastases to be dormant, and surgical removal of the primary tumour exacerbates metastases. Macroscopic metastases may appear decades after surgery or pharmacological removal of the primary tumour [53]. Such secondary tumours clearly reflect dormant micrometastases that have solved the complex problem of tissue colonization. Micrometastases may lack other skills due to the characteristics of cancer needed for vigorous growth such as the ability to activate angiogenesis. Under experimental conditions, dormant micrometastases were unable to form macroscopic tumours, which was attributed to their inability to activate angiogenesis. In addition, recent studies have shown that the lack of nutrients can lead to intensive autophagy, as a result of which cancer cells contract and enter a state of reversible latency. When the microenvironment of the tissue changes, for example access to nutrients appears, such cells can again begin to grow and proliferate. Other micrometastasis latency mechanisms may include suppressive growth signals produced in normal tissues of the extracellular matrix.

Both in mice and humans, neoplastic cells can spread very early, spreading from seemingly non-invasive, still non-malignant pathological lesions [54,55]. What is more, micrometastases may originate from primary,

Obecnie nie wiadomo, czy komórki nowotworowe biorące udział w kolektywnej i ameboidalnej inwazji korzystają z przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego EMT czy może korzystają z zupełnie odmiennych, niepoznanych procesów inwazyjnych.

W wyniku zjawiska EMT komórki nabłonkowe tracą swoje charakterystyczne cechy, takie jak polarność, oddziaływanie międzykomórkowe i przyleganie do błony podstawnej. W zamian nabywają większą ruchliwość i zdolność do migrowania. Czynniki transkrypcyjne: Snail, Slug, Twist i Zeb1/2, prowadzą przejście EMT i powiązane z nim procesy migracyjne. Czynniki te są wydzielane również przez wiele złośliwych guzów. Niektóre z regulatorów EMT podczas nadekspresji wywołują przerzuty [52]. Możliwe, że czynniki transkrypcyjne indukujące EMT są w stanie indukować większość etapów kaskady inwazji i przerzutów, poza etapem kolonizacji. Czasowa stabilność i natura stanu mezenchymalnego, która zaistniała w wyniku EMT, nie jest do końca poznana.

Hanahan i Weinberg w 2011 zaobserwowali wydzielanie czynników transkrypcyjnych indukujących EMT w pewnych nienabłonkowych typach guzów, tj. w mięsakach i guzach neuroektodermalnych, lecz ich rola w programowaniu cech złośliwych w tych guzach jest słabo udokumentowana. Nie do końca wiadomo również, czy nabywanie inwazyjności komórek nowotworowych następuje poprzez aktywację EMT, czy też istnieją nieznane jeszcze alternatywne programy kierujące inwazyjnością i przerzutowaniem.

Wzajemne przenikanie się komórek zrębu oraz komórek nowotworowych jest częścią nabytej zdolności do inwazyjnego wzrostu i przerzutów. Mezenchymatyczne komórki zrębu (*Mesenchymal stem cell*, MCSs) obecne w zrębie guza wydzielają CCL5/RANTES jako odpowiedź na sygnały pochodzące z komórek nowotworowych. Następnie CCL5 wzajemnie oddziałują z komórkami nowotworowymi, stymulującymi inwazję. Makrofagi na peryferiach guza mogą sprzyjać lokalnej inwazji poprzez dostarczanie enzymów niszczących macierz, np. proteazy cysteino-katepsynowe lub metaloproteinazy.

W przerzutowym raku piersi makrofagi skojarzone z rakiem (*tumor associated macrophages* – TAMs) dostarczają czynnik wzrostu naskórka (*epidermal growth factor* – EGF) do komórek raka piersi, podczas gdy komórki nowotworowe stymulują makrofagi za pomocą CSF-1 (*Cerebrospinal fluid-1*). Interakcje tego rodzaju ułatwiają intrawazację do układu krążenia i rozszerzanie przerzutów.

Komórki nowotworowe, które przeszły przez EMT w początkowej inwazji i przerzutowym rozprzestrzenianiu się, mogą przejść przez proces odwrotny, zwany przejściem mezenchymalno-nabłonkowym (*Mesenchymal-epithelial transition* – MET) [50]. Ta plastyczność może skutkować formowaniem nowych kolonii rakowych, podobnych histopatologicznie do



tumours that are not visibly invasive, but have neovasculature that lacks coherence in the vascular lumen. Although neoplastic cells can spread from such precancerous lesions and settle in the bone marrow or other tissues, it is not known whether they can colonize sites and develop into evident micrometastases. Tumour cells that have spread from a primary tumour to distant tissues can no longer benefit from activated signals inducing invasion or EMT nor from stroma signals that had been used in the initial tumour.

Most disseminated cancer cells are usually poorly adapted, at least initially, to the microenvironment of the tissue in which they have settled. However, some types of tissue microenvironments are assumed to favour the development of disseminated neoplastic cells. Each type of disseminated tumour cell must adapt appropriately in order to survive in the microenvironment of the foreign tissue. Such adaptations may require the activation of hundreds of different colonization programs, each corresponding to a specific cancer cell and specific microenvironment.

Having developed such an ability to colonize cells in colonies, which is adapted each individual tissue, they can spread further, not only to new places in the body, but also return to the primary tumour. Colonization programs, which are tissue-specific and evident among primary tumour cells, may have originated not in the classic development of primary tumours, but in cells that resettled at the site of the primary tumour. Cell phenotypes as well as gene expression programs for tumour cell populations found in primary tumours can be significantly modified by inverse migration of their progeny cells from distant metastases.

Additional features of neoplastic cells

Two additional tumour features that have an influence on the pathogenesis of neoplastic diseases have been added to the previously developed neoplasia model. One of them is the ability of tumour cells to modify and redirect metabolism, which leads to more effective maintenance of proliferation. Cancer cells also gain the ability to bypass the immune system, in particular T and B lymphocytes. Inflammation, which is generated by the innate immune system cells, aims to fight infection and heal wounds, while in neoplasms it instead has an impact on the maintenance of tumour characteristics. These additional features of tumour cells have not yet been finally confirmed, therefore they are not main features and are called emerging characteristics.

There are properties of neoplastic cells that influence the acquisition of characteristic features and emerging features. They include genomic instability and mutagenicity that result in a series of genetic changes that accelerate tumour progression.

komórek w początkowym stadium raka, które nigdy nie przeszły przez EMT. Prawdopodobnie komórki rakowe przechodzą przez EMT tylko częściowo, nabywając w ten sposób nowe mezenchymatyczne cechy i jednocześnie ciągle posiadając cechy nabłonkowe.

Proces tworzenia przerzutów może być podzielony na dwie główne fazy: fizyczne rozprzestrzenianie się komórek rakowych do oddalonych tkanek i ich adaptacja do obcych mikrośrodków. Te dwie fazy prowadzą do kolonizacji, czyli wzrostu mikroprzerzutów do postaci makroskopijnych guzów. Kolonizacja nie jest ściśle połączona z fizycznym rozprzestrzenianiem się, co pokazują przykłady pacjentów, u których liczne mikroprzerzuty nigdy nie urosły do makroskopijnych rozmiarów guzów przerzutowych.

W przypadku nowotworów piersi czy czerniaka pierwotny guz może uwalniać systemowe czynniki supresorowe, które sprawiają, że mikroprzerzuty są uśpione, a chirurgiczne usunięcie guza pierwotnego powoduje nasilenie przerzutów. Makroskopijne przerzuty mogą pojawiać się po dziesiątkach lat od usunięcia chirurgicznego lub farmakologicznego wyeliminowania guza pierwotnego [53]. Takie nowotwory wtórne ewidentnie odzwierciedlają uśpione mikroprzerzuty, które rozwiązały złożony problem kolonizacji tkanek. Mikroprzerzutom może brakować innej umiejętności wynikającej z cech charakterystycznych raka, potrzebnej do energicznego wzrostu, takiej jak umiejętność aktywowania angiogenezy. W warunkach eksperymentalnych uśpione mikroprzerzuty nie były w stanie utworzyć makroskopijnych nowotworów, co przypisano ich niemożności aktywowania angiogenezy. Ponadto ostatnie badania ukazały, że brak substancji pokarmowych może prowadzić do intensywnej autofagii, wskutek której komórki rakowe kurczą się i wchodzą w stan odwracalnego uśpienia. Gdy zmieni się mikrośrodkowisko tkanki, np. pojawi się dostęp do składników odżywczych, takie komórki mogą znowu zacząć intensywnie rosnąć i proliferować. Inne mechanizmy uśpienia mikrometastatystycznego mogą zawierać supresorowe sygnały wzrostu wytwarzane w prawidłowych tkankach macierzy zewnątrzkomórkowej.

Zarówno u myszy, jak i ludzi komórki nowotworowe mogą rozsiewać się bardzo wcześnie, rozprzestrzeniając się z pozornie nieinwazyjnych jeszcze niezrezyalizowanych zmian patologicznych [54,55]. Ponadto mikroprzerzuty mogą pochodzić z pierwotnych guzów, które nie są w widoczny sposób inwazyjne, ale posiadają neowaskulaturę, której brakuje spójności w ścianach naczyń. Chociaż komórki nowotworowe mogą rozsiewać się z takich zmian przednowotworowych i osadzić się w szpiku kostnym lub innych tkankach, nie wiadomo, czy mogą kolonizować miejsca i rozwijać się do postaci istotnych makroprzerzutów. Komórki nowotworowe, które z początkowego guza rozprze-



Genetic instability

Some genetic mutations provide cell subclones with selected characteristics that allow them to grow and dominate in the local tissue environment. Multi-stage tumour development can be thus seen as the advancement of clonal expansion. It is possible to start its following stages by cells acquiring the mutated genotype. Inherited phenotypes, for instance the inactivation of tumour suppressor genes, may also be acquired through epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, histone modification or non-mutational alterations in gene expression regulation [56].

The rate of spontaneous mutations during every cell division is usually very slow, which is conditioned by DNA repair systems. When acquiring further mutations needed to initiate cancerogenesis, cancer cells often increase the rate of mutation. This variability has been achieved through increased sensitivity to mutagenic factors as well as through the already existing genomic damage. Additionally, mutation accumulation can be accelerated by damage to the systems responsible for overall genomic stability. Under normal conditions, these systems direct genetically damaged cells either on the path of apoptosis or ageing. Their key element is the gene coding TP53 protein, referred to as the "guardian of the genome" [57]. The task of such genes as TP53 is to:

- detect DNA damage and activating repair mechanisms
- activate DNA repair systems
- deactivate and intercept mutagenic molecules before destroying DNA.

From the genetic point of view, these "caring" genes behave similarly to tumour suppressor genes as their functions may be lost during its development. These losses are caused either by inactivating mutations or epigenetic repression.

The loss of telomeric DNA in many tumours generates karyotype instability and the associated amplification and removal of chromosomal segments. Genetic changes vary from one type of neoplasm to another. Damage to the structural maintenance and repair systems of the genome affects genomic stability [58].

Discovering the pathways responsible for the response to DNA damage going beyond conventional cell repair and survival, or directing a cell to the pathway of apoptosis, and provides new cancer treatment strategies [59].

Metabolism

Continuous, uncontrolled proliferation is the essence of neoplastic disease because it requires the adaptation of energy metabolism to drive growth and cell division. Under aerobic conditions, normal cells process glucose into pyruvate in the process of glycolysis and

strzeniły się do odległych tkanek, nie mogą już czerpać korzyści z aktywowanych sygnałów indukujących inwazję czy EMT oraz z sygnałów zrębu, z których korzystały znajdując się w guzie w początkowym stadium.

Większość rozsianych komórek rakowych zazwyczaj jest słabo zaadaptowana, przynajmniej początkowo, do mikrośrodowiska tkanki, w której się znalazły. Jednakże, niektóre typy mikrośrodowisk tkankowych z założenia są przyjazne rozwojowi rozsianych komórek nowotworowych. Każdy rodzaj rozsianej komórki nowotworowej musi odpowiednio się przystosować, by przetrwać w mikrośrodowisku obcej tkanki. Takie adaptacje mogą wymagać aktywacji setek różnych programów kolonizacyjnych, z których każdy będzie odpowiadał konkretnej komórce nowotworowej i konkretnemu mikrośrodowisku.

Rozwinąwszy taką dopasowaną do każdej tkanki z osobna umiejętność kolonizowania komórki w koloniach mogą rozsiewać się dalej, nie tylko do kolejnych nowych miejsc w organizmie, ale także wracać do guza pierwotnego. Programy kolonizacyjne charakterystyczne dla danych tkanek, które są ewidentne wśród komórek guza pierwotnego, mogą brać swój początek nie w klasycznym rozwoju pierwotnego nowotworu, ale od komórek, które osadziły się powtórnie w miejscu pierwotnego guza. Fenotypy komórek, a także programy ekspresji genów populacji komórek nowotworowych znajdujących się w guzach pierwotnych, mogą ulec znacznej modyfikacji na skutek odwrotnej migracji ich komórek potomnych z odległych przerzutów.

Cechy dodatkowe komórek nowotworowych

Do wcześniej opracowanego modelu nowotworzenia dodano dwie dodatkowe cechy charakterystyczne nowotworu, które wywierają wpływ na patogenezę chorób nowotworowych. Jedną z nich jest umiejętność modyfikowania i przekierowania metabolizmu przez komórki nowotworowe, co prowadzi do bardziej efektywnego utrzymania proliferacji. Komórki rakowe zyskują także zdolność omijania systemu immunologicznego, w szczególności limfocytów T i B. Stan zapalny wygenerowany przez komórki wrodzonego systemu immunologicznego ma na celu zwalczanie infekcji i gojenie ran, natomiast w nowotworach zamiast tego wpływa na utrzymywanie cech charakterystycznych raka. Wymienione dodatkowe cechy komórek nowotworowych nie zostały jeszcze ostatecznie potwierdzone, dlatego też nie zalicza się ich do charakterystycznych cech głównych i nazywa wyłaniającymi się cechami.

Istnieją właściwości komórek nowotworowych, które wpływają na nabycie cech charakterystycznych i cech nazwanych wyłaniającymi. Zalicza się do nich niestabilność genomu i zdolność do mutowania, które powo-



into carbon dioxide in the mitochondria. Under anaerobic conditions, inefficient glycolysis is the main process. Otto Warburg was the first to observe anomalies in energy metabolism in cancer cells. He noted that even in the presence of oxygen, tumour cells can reprogram glucose metabolism, resulting in a condition called "aerobic glycolysis." Such an override in metabolism seems illogical as tumour cells have to compensate for an 18-fold lower rate of ATP production by glycolysis compared to mitochondrial oxidative phosphorylation [60]. The energy deficit is compensated by the activation of glucose transporters, especially GLUT1, which significantly increase the import of glucose to the cytoplasm. This phenomenon has been documented in many human cancers. It has been shown that glycolytic drive is associated with activated oncogenes (e.g. MYC) [61] and mutant tumour suppressors (e.g. TP53), whose mutations in tumour cells act to their advantage.

The dependence of tumour cells on glycolysis can be further highlighted in hypoxia, which affects many tumours: systems reacting to hypoxia work pleiotropically to regulate the activity of glucose transporters and many other enzymes in glycolysis pathways. Both RAS and hypoxia can independently increase the concentration of hypoxia-inducible transcription factor 1 (HIF1 α) [38] and HIF2 α (Hypoxia-inducible transcription factor 2), which in turn regulate glycolysis. Functional justification of the glycolytic switch in tumour cells is elusive because of the relatively low efficiency of ATP production in glycolysis compared to mitochondrial oxidative phosphorylation [60]. An increased level of glycolysis can direct its intermediates to different pathways, including the synthesis of nucleosides and amino acids. In addition, the metabolism described by Warburg appears to be present in a number of rapidly dividing embryonic tissues, which once again suggests its role in supporting extensive biosynthesis programs required for active cell proliferation.

Some tumours contain subpopulations of neoplastic cells that differ from each other in terms of energy production pathways. The first subpopulation consists of glucose-dependent (Warburg effect) cells that secrete lactate, while cells from the second subpopulation selectively import and use the lactate produced by their neighbours as the main source of energy, using part of the citric acid cycle. These two populations apparently operate in symbiosis: oxygen-depleted cancer cells depend on glucose as fuel and absorb lactate as waste, which in turn is imported and selectively used as fuel by better oxygenated cells [62]. Such cooperation between cells reflects the adaptation of normal physiological mechanisms by tumour cells, such as in the muscles. It is clear that oxygenation in the range from normal oxygen concentration to hypoxia in cancer cells is not necessarily static, probably

dują powstanie serii zmian genetycznych przyspieszających progresję guza.

Niestabilność genomu

Pewne zmutowane genotypy warunkują subklonówkomórek wybrane cechy, umożliwiające ich przyrost i dominację w środowisku lokalnej tkanki. Wieloetapowy rozwój guza może być więc ukazany jako postępowanie klonalnej ekspansji. Uruchamianie kolejnych jej etapów jest możliwe poprzez nabywanie przez komórki zmutowanego genotypu. Dziedziczne fenotypy, np. inaktywacja genów supresorowych guza, mogą być nabyte także poprzez mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i modyfikacje histonów czy też niemutacyjne zmiany regulacji ekspresji genów [56].

Tempo spontanicznych mutacji jest zazwyczaj bardzo wolne podczas każdego podziału komórek, co zapewniają systemy naprawy DNA. Podczas nabywania kolejnych mutacji potrzebnych, by rozpocząć kancerogenezę, komórki rakowe często zwiększają tempo mutacji. Ta zmienność została osiągnięta dzięki zwiększonej wrażliwości na czynniki mutagenne oraz poprzez istniejące już uszkodzenia genomu. Dodatkowo akumulacja mutacji może zostać przyspieszona przez uszkodzenia systemów odpowiedzialnych za ogólną stabilność genomu. Systemy te w warunkach prawidłowych kierują genetycznie zniszczone komórki albo na drogę apoptozy, albo starzenia się. Ich kluczowym elementem jest gen kodujący białko TP53, określane jako „strażnik genomu” [57]. Zadaniem genów, takich jak gen *TP53*, jest:

- wykrywanie uszkodzeń DNA i aktywacja mechanizmów naprawczych,
- aktywowanie systemów naprawy zniszczonego DNA,
- dezaktywacja i przechwytywanie cząsteczek mutagennych zanim zniszczą DNA.

Z genetycznego punktu widzenia te „opiekunckie” geny zachowują się podobnie do genów supresorowych guza, gdyż ich funkcje mogą zostać utracone podczas jego rozwoju. Straty te powodowane są albo przez inaktywujące mutacje, albo poprzez epigenetyczną represję.

Utrata telomerowego DNA w wielu guzach generuje kariotypową niestabilność oraz powiązaną z nią amplifikację i usuwanie segmentów chromosomowych. Zmiany genetyczne różnią się od siebie w zależności od typu nowotworu. Utrata telomerowego DNA w wielu guzach generuje kariotypową niestabilność oraz powiązaną z nią amplifikację i usuwanie segmentów chromosomowych. Uszkodzenia w systemach podtrzymywania struktury i naprawy genomu wpływają na niestabilność genomu [58].

Poznanie szlaków odpowiedzi na uszkodzenia DNA wychodzących poza konwencjonalne ścieżki naprawy



due to the instability and chaotic organization of neoplastic neovasculature [60]. Modified metabolism occurs in neoplastic cells as commonly as other features called characteristic features. Determining reprogrammed energy metabolism as a new emerging feature seems reasonable, emphasizing both its relevance and unresolved issues around functional independence from the main characteristic features [45].

Inflammation

Primary theories assumed that immune responses reflect the attempt to destroy tumours by the immune system and indeed there is increasing evidence for anti-tumour reactions in different types of neoplasms. It is known, however, that there are mechanisms to avoid the destruction of the tumour caused by the immune system. Inflammation in tumours facilitates carcinogenesis and progression, and thus helps malignancies in the early stages of acquiring characteristic features. The correlation between inflammation and the pathogenesis of cancer is also important [63]. In some cases, inflammation is already visible at the earliest stages of neoplasia and promotes tumour growth. It can support the characteristic features of tumours by supplying the neoplastic environment with bioactive molecules, such as growth factors supporting proliferation signalling, survival factors that limit cell death, pro-angiogenic factors, matrix modifying enzymes, supporting angiogenesis, invasion and metastasis as well as induction signals activating EMT and other processes that facilitate tumour characteristic features.

In addition, inflammatory cells secrete reactive oxygen species that in turn act mutagenically on nearby cells and thereby accelerate their genetic evolution towards malignancy. The long-term theory of immunological surveillance suggests that cells and tissues are constantly monitored by the immune system which is in constant alert, and that such immunological surveillance is responsible for recognizing and eliminating the vast majority of tumours in the initial stage, as well as emerging tumours [64]. Solid tumours that actually appear are able to avoid detection by various weapons of the immune system or they can limit the range of immunological activities and thus avoid destruction. It can be assumed that the role of defective immunological monitoring is confirmed by the intensive development of tumours in immunosuppressed patients. Most of them are, however, tumours caused by a virus, and this suggests that controlling this class of neoplasms normally depends on reducing the virus in infected patients, in part by eliminating infected cells. These observations cast light on the likely role of the immune system in reducing the formation of more than 80% of tumours of non-viral aetiology.

i przeżycia komórki lub skierowanie komórki na ścieżkę apoptozy stwarza możliwości opracowania nowych strategii leczenia przeciwnowotworowego [59].

Metabolizm

Ciągła, niekontrolowana proliferacja reprezentuje kwintesencję choroby nowotworowej, gdyż wymaga przystosowania metabolizmu energetycznego tak, aby napędzać wzrost i podział komórki. W warunkach tlenowych normalne komórki przetwarzają glukozę do pirogronianu w procesie glikolizy, a następnie do dwutlenku węgla w mitochondriach. W warunkach anaerobowych głównym procesem jest mało wydajna glikoliza. Otto Warburg jako pierwszy zaobserwował anomalie metabolizmu energii w komórkach nowotworowych. Zauważył, że nawet w obecności tlenu komórki nowotworowe mogą przeprogramować metabolizm glukozy, co doprowadza do stanu zwanego „aerobową glikolizą”. Takie przesterowanie metabolizmu wydaje się nielogiczne, gdyż komórki nowotworowe muszą zrekompensować 18-krotnie niższą wydajność produkcji ATP zapewnianej przez glikolizę w stosunku do mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej [60]. Deficyt energetyczny jest wyrównywany przez uruchamianie transporterów glukozy, szczególnie GLUT1, co znacznie zwiększa import glukozy do cytoplazmy. Zjawisko to zostało udokumentowane w wielu ludzkich nowotworach. Okazało się, że napędzanie glikolityczne jest związane z aktywowanymi onkogenami (np. MYC) [61] i zmutowanymi supresorami nowotworów (np. TP53), których mutacje w komórkach nowotworowych działają na ich korzyść.

Zależność komórek nowotworowych od glikolizy może być jeszcze podkreślona w warunkach niedotlenienia, które dotyczy wielu guzów: systemy reakcji na hipoksję działają plejotropowo, aby regulować działanie transporterów glukozy i wielu innych enzymów w ścieżkach glikolizy. Zarówno białko RAS, jak i hipoksja mogą samodzielnie zwiększać stężenia czynników transkrypcji HIF1 α (*Hypoxia-inducible transcription factor 1*) [38] i HIF2 α (*Hypoxia-inducible transcription factor 2*), które z kolei regulują glikolizę. Funkcjonalne uzasadnienie glikolitycznego przełącznika w komórkach nowotworowych jest nieuchwytnie, ze względu na stosunkowo niską efektywność wytwarzania ATP w procesie glikolizy, w stosunku do mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej [60]. Zwiększony poziom glikolizy pozwala na kierowanie jej produktów na różne ścieżki, w tym do syntezy nukleozydów i aminokwasów. Ponadto, metabolizm opisany przez Warburga wydaje się obecny w wielu szybko dzielących się tkankach zarodkowych, co po raz kolejny sugeruje rolę we wspieraniu szeroko zakrojonych programów biosyntezy, które są wymagane dla aktywnej proliferacji komórek.



In recent years, increasingly stronger evidence from experiments in mice and clinical epidemiology suggests that the immune system acts as an important barrier to the formation and development of tumours [65]. When mice deprived of various components of the immune system were evaluated for the development of tumours caused by carcinogens, the tumours were observed to grow more frequently and more rapidly in immunodeficient mice compared to immunocompetent ones. In particular, deficiencies in the function of CD8 + cytolytic T cells (CTLs), CD4 + Th1 helper cells, or natural killer cells (NK cells) led to a significant increase in the number of tumours. Research results indicate that at least in some experimental models, both innate and adapted immune mechanisms are capable of significantly contributing to immunological surveillance and thus to tumour destruction.

Transplantation experiments have shown that neoplastic cells that originally developed in mice with immune deficiencies are often ineffective in the formation of secondary tumours in synergistic immunocompetent hosts, while tumour cells from immunocompetent mice are equally effective in causing malignancies in both types of hosts. Highly immunogenic neoplastic cell clones are routinely eliminated in immunocompetent hosts – the process is called immunoeediting [50]. As a result of this process, tumour cells recruit only those cells which are immunogenically weak, using them for the growth and generation of homogeneous tumours. Such cells can then colonize in both immunodeficient and immunocompetent hosts, becoming immune cells under the control of neoplastic cells. Conversely, when cancer cells are formed in patients with immune deficiencies, they are not selectively destroyed and may instead prosper with their immunogenic counterparts. While cells derived from such unedited tumours are serially transplanted to syngeneic recipients, immunogenic cancer cells are discarded as a result of destruction by the competent immune systems of secondary tumours.

In the case of these particular experiments, the question remains as to whether chemical carcinogens causing such tumours are susceptible to the generation of neoplastic cells that are particularly immunogenic. Clinical epidemiology increasingly confirms the existence of anti-cancer immunological reactions in some human cancers. For example, patients with colorectal or ovarian neoplasms into which many CTL and NK cells infiltrate, have better prognosis than those lacking such a number of NK lymphocytes [66,67].

For these particular experiments, no answer remains as to whether chemical carcinogens causing such tumours are susceptible to the generation of neoplastic cells that are particularly immunogenic. Clinical epidemiology increasingly confirms the existence of anti-

Niektóre guzy zawierają w sobie subpopulacje komórek nowotworowych, które różnią się od siebie ścieżkami wytwarzania energii. Pierwsza subpopulacja składa się z zależnych od glukozy („efekt Warburga”) komórek, które wydzielają mleczan, natomiast komórki drugiej subpopulacji selektywnie importują i wykorzystują mleczan wytwarzany przez ich sąsiadów, jako główne źródło energii, używając do tego części cyklu kwasu cytrynowego. Te dwie populacje najwidoczniej działają w symbiozie: niedotlenione komórki nowotworowe zależą od glukozy będącej paliwem i wchłaniającej mleczan jako odpad, który jest z kolei importowany i wybiórczo używany jako paliwo przez lepiej dotlenione komórki [62]. Taka współpraca między komórkami odzwierciedla zaadaptowanie przez komórki nowotworowe prawidłowych mechanizmów fizjologicznych, działających np. w mięśniach. Jest oczywiste, że dotlenienie w zakresie od prawidłowego stężenia tlenu do hipoksji w komórkach nowotworowych niekoniecznie jest statyczne, prawdopodobnie w wyniku niestabilności i chaotycznej organizacji neowaskulatury nowotworu [60]. Zmiany metabolizmu występuje w komórkach nowotworowych tak powszechnie, jak inne cechy nazwane cechami charakterystycznymi. Wyznaczenie przeprogramowanego metabolizmu energii jako nowej wyłaniającej się cechy wydaje się zasadne, podkreśla bowiem zarówno jego istotność, jak i nierozwiązane kwestie wokół funkcjonalnej niezależności od charakterystycznych cech głównych [45].

Stan zapalny

Pierwotne teorie zakładały, że reakcje immunologiczne odzwierciedlają próby zniszczenia guza przez układ odpornościowy i rzeczywiście istnieje coraz więcej dowodów na przeciwnowotworowe reakcje w różnych typach nowotworowych. Wiadomo natomiast, że istnieją mechanizmy prowadzące do unikania destrukcji guza, spowodowanej działaniem systemu odpornościowego. Stan zapalny w nowotworach ułatwia kancerogenezę i progresję, a co się z tym wiąże, pomaga nowotworom w początkowym stadium nabywania charakterystycznych cech. Istotna jest również korelacja pomiędzy stanem zapalnym a patogenezą raka [63].

Stan zapalny w niektórych przypadkach jest widoczny już na najwcześniejszych etapach nowotworzenia i sprzyja wzrostowi nowotworów. Może wspomagać cechy charakterystyczne nowotworu poprzez zaopatrzenie środowiska nowotworu w bioaktywne cząsteczki, np. czynniki wzrostu podtrzymujące sygnalizację proliferacyjną, czynniki przetrwania ograniczające śmierć komórki, czynniki proangiogenne, enzymy modyfikujące macierz, wspomagające angiogenezę, inwazję i przerzuty, oraz indukcyjne sygnały aktywu-



cancer immune reactions in some human cancers. For example, patients with colorectal or ovarian neoplasms into which many CTL and NK cells infiltrate have better prognosis than those lacking such numerous NK cells [66,67].

It has been observed that some recipients of transplanted organs, subjected to immunosuppression, develop tumours coming from the donors, suggesting that in seemingly healthy donors, cancer cells were kept in a state of latency by the fully functioning immune system. However, the epidemiology of patients undergoing continuous immunosuppression does not indicate a significantly increased incidence of major non-viral forms of human cancers. This may be an argument against the importance of immunological surveillance as an effective barrier to cancerogenesis and cancer development [4]. Nevertheless, patients undergoing immunosuppression as well as those with HIV are predominantly immunodeficient, especially in T and B cells, and thus do not represent complex immune deficiencies. In contrast, in genetically modified mutant mice lacking both NK and CTL cells, complex immune deficiency occurs. It is therefore possible that such patients, thanks to NK cells and other innate immune cells, still have immune defense capability against cancer.

Tumour microenvironment

Tumour microenvironment is a kind of niche for neoplastic cells that ensures their existence and enables further progression [68]. Initially, the microenvironment was considered to be a homogeneous structure. It is now known that it is composed of a variety of cells, including tumour fibroblasts, immune cells, endothelial cells of lymphatic and blood vessels, peripheral blood and lymphatic pericytes and the extracellular matrix. The cellular multiplicity of the tumour microenvironment makes cancer cells gain some kind of autonomy [69]. By ensuring tumour cells existence, microenvironmental cells affect invasive tumour growth, colonization of further organs, and redirection of the immune system function favourable for neoplastic cells [64].

SUMMARY

Discovering and understanding molecular mechanisms managing neoplasia increases the effectiveness of modern antineoplastic therapies and attempts to conquer tumours. Therefore, both neoplastic cells and tumour-specific microenvironmental cells have become goals of modern cancer therapy. Although drugs act directly on tumour cells and are targeted at specific molecular pathways, they are ineffective as neoplastic

jące EMT i inne procesy stanowiące udogodnienie dla cech charakterystycznych nowotworu.

Ponadto komórki zapalne wydzielają reaktywne formy tlenu, które z kolei działają mutagennie na pobliskie komórki, a przez to przyspieszają ich genetyczną ewolucję w kierunku zezłośliwienia. Wieloletnia teoria nadzoru immunologicznego sugeruje, że komórki i tkanki są bezustannie monitorowane przez pozostający w pogotowiu układ odpornościowy oraz że taki nadzór immunologiczny jest odpowiedzialny za rozpoznawanie i eliminację zdecydowanej większości nowotworów w stadium początkowym, a także powstających guzów [64]. Lite nowotwory, które rzeczywiście się pojawiają, są w stanie uniknąć wykrycia przez różnorodną broń układu immunologicznego lub potrafią ograniczyć zasięg działań immunologicznych, a przez to uniknąć zniszczenia. Można przypuszczać, że rola wadliwego monitoringu immunologicznego potwierdza intensywny rozwój nowotworów u pacjentów z immunosupresją. Większość z nich to jednakże nowotwory wywołane przez wirus, co sugeruje, że kontrola nad tą klasą nowotworów normalnie zależy od zredukowania wirusa u zakażonych pacjentów, po części przez wyeliminowanie zainfekowanych komórek. Obserwacje te rzucają światło na prawdopodobną rolę układu immunologicznego w ograniczeniu powstawania ponad 80% guzów o niewirusowej etiologii.

W ostatnich latach coraz mocniejsze dowody pochodzące zarówno z doświadczeń na myszach, jak i z epidemiologii klinicznej sugerują, że układ odpornościowy działa jak istotna bariera do formowania i rozwoju guza [65]. Kiedy myszy pozbawione różnych składników układu immunologicznego poddane zostały ocenie pod kątem rozwoju guzów wywołanych przez czynniki rakotwórcze, zaobserwowano, że nowotwory rosną częściej i szybciej u myszy z niedoborem odporności w porównaniu z myszami immunokompetentnymi. W szczególności niedobory w funkcji CD8⁺ cytotoksycznych limfocytów T (*Cytolytic T cell* – CTLs), komórek pomocniczych T CD4⁺ Th1 lub komórek NK (*natural killer*) prowadziły do znacznego wzrostu liczby nowotworów. Wyniki badań wskazują, że przynajmniej w niektórych modelach eksperymentalnych zarówno wrodzone, jak i zaadaptowane mechanizmy układu immunologicznego są w stanie przyczynić się znacznie do nadzoru immunologicznego, a przez to do zniszczenia nowotworu.

Eksperymenty transplantacyjne wykazały, że komórki nowotworowe, które początkowo powstały u myszy z niedoborami odpornościowymi, są często nieefektywne w tworzeniu wtórnych guzów u synergicznych immunokompetentnych gospodarzy, podczas gdy komórki nowotworowe guzów powstałych u immunokompetentnych myszy są tak samo efektywne w wywoływaniu guzów u obydwu typów gospodarzy. Wysoce immunogenne klony komórek rakowych są ruty-



cells become drug-resistant. Drugs directed against normal tumour microenvironment cells may also fail to function because of their ability to induce drug resistance. Access to neoplastic cells is also limited due to the increased interstitial pressure within tumours and slowed blood flow in neoplastic vessels. The genetic instability of cancer cells contributes to the disappearance of therapeutic goals, hence ongoing studies in the search for new therapeutic targets and new generation drugs that will be effective in cells resistant to the drugs used to date.

nowo eliminowane u immunokompetentnych gospodarzy – proces zwany jest immunoedycją [50]. W wyniku tego procesu komórki nowotworowe rekrutują tylko komórki, które są słabo immunogenne, wykorzystując je do wzrostu oraz do generowania jednolitych guzów. Takie komórki mogą potem kolonizować u gospodarzy zarówno z niedoborami odporności, jak i tych immunokompetentnych, stając się komórkami odpornościowymi pod władaniem komórek nowotworowych. Odwrotnie, kiedy komórki rakowe powstają u pacjentów z niedoborami odporności, nie są selektywnie niszczone i mogą w zamian prosperować z ich immunogennymi odpowiednikami. Podczas gdy komórki pochodzące z takich nieedytowanych nowotworów są seryjnie transplantowane do syngenicznych odbiorców, immunogenne komórki rakowe są odrzucane w wyniku niszczenia przez kompetentne układy odpornościowe wtórnych guzów.

W przypadku tych konkretnych eksperymentów bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy chemiczne czynniki rakotwórcze wywołujące takie guzy są podatne na generowanie komórek nowotworowych, które są szczególnie immunogenne. Epidemiologia kliniczna coraz częściej potwierdza istnienie antyrakowych reakcji immunologicznych w niektórych ludzkich nowotworach. Na przykład pacjenci z nowotworami jelita grubego lub jajników, do których przenika wiele komórek CTL i NK, mają lepsze rokowania niż ci, którym brakuje takich licznych limfocytów NK [66,67].

U niektórych biorców z przeszczepionymi organami poddanych immunosupresji zaobserwowano, że rozwijają się u nich nowotwory pochodzące od dawcy, co sugeruje, że u pozornie zdrowych dawców komórki rakowe trzymane były w stanie uśpionym przez w pełni działający układ odpornościowy. Epidemiologia pacjentów poddawanych ciągłej immunosupresji nie wskazuje jednak na istotnie zwiększone występowanie ważniejszych form niewirusowych ludzkich nowotworów. Może to stanowić argument przeciwko ważności nadzoru immunologicznego, jako efektywnej bariery dla kancerogenezy i rozwoju raka [4]. Jednakże pacjenci poddani immunosupresji oraz pacjenci z HIV przeważnie przejawiają niedobory odpornościowe, szczególnie w komórkach T i B, a tym samym nie reprezentują złożonych niedoborów odpornościowych. Dla kontrastu, u genetycznie modyfikowanych zmutowanych myszy, którym brakuje zarówno komórek NK, jak i CTL, następuje złożony niedobór odpornościowy. Możliwe jest więc, że tacy pacjenci dzięki komórkom NK i innym wrodzonym komórkom odpornościowym ciągle posiadają zdolność do obrony immunologicznej przed rakiem.



Mikrośrodowisko guza

Mikrośrodowisko guza stanowi pewnego rodzaju niszę dla komórek nowotworowych zapewniającą im byt i umożliwiającą dalszą progresję [68]. Początkowo mikrośrodowisko uważane było za strukturę homogenną. Obecnie wiadomo, że tworzą je różnorodne komórki, do których należą: nowotworowe fibroblasty, komórki układu odpornościowego, komórki śród-błonkowe naczyń krwionośnych i limfatycznych, perycyty naczyń krwionośnych i limfatycznych, a także macierz pozakomórkowa. Wieloskładnikowość komórkowa mikrośrodowiska guza sprawia, że komórki nowotworowe uzyskują pewnego rodzaju autonomię [69]. Zapewniając byt komórkom nowotworowym, komórki mikrośrodowiska mają wpływ na inwazyjny rozrost guza, na kolonizację kolejnych narządów oraz na przekierowanie funkcji układu immunologicznego na korzystne dla komórek nowotworowych [64].

PODSUMOWANIE

Poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów kierujących nowotworzeniem zwiększa skuteczność współczesnej terapii przeciwnowotworowej i prób ugodzenia w piętę achillesową nowotworu.

Celami współczesnej terapii przeciwnowotworowej stają się dlatego zarówno komórki nowotworowe, jak i swoiste dla nowotworów komórki mikrośrodowiska. Choć stosowane leki działają bezpośrednio na komórki nowotworowe i skierowane są na konkretne ścieżki molekularne, okazują się nieskuteczne. Komórki nowotworowe stają się lekooporne. Leki skierowane przeciwko prawidłowym komórkom tworzącym mikrośrodowisko nowotworowe również mogą nie spełniać swojej funkcji, z uwagi na ich zdolność do indukowania lekooporności.

Dostęp leków do komórek nowotworowych jest ograniczony także z powodu zwiększonego ciśnienia śródmiąższowego panującego wewnątrz guzów nowotworowych i spowolnionego przepływu krwi w naczyniach nowotworowych. Niestabilność genetyczna komórek nowotworowych przyczynia się do zaniku celów terapeutycznych, stąd też trwają nieustanne badania w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych i leków nowych generacji, które będą wywierać wpływ na komórki odporne na dotychczas zastosowane leki.

REFERENCES

1. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin. Transl. Oncol.* 2006; 8(2): 77–82.
2. Davies M.A., Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 2010; 29(41): 5545–5555.
3. Yuan T.L., Cantley L.C., Chae Y.S., Sohn S.K., Kang B.W., Moon J.H., Lee S.J., Jeon S.W., Park J.S., Park J.Y., Choi G.S. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27(41): 5497–5510.
4. Kim J.G., Chae Y.S., Sohn S.K., Kang B.W., Moon J.H., Lee S.J., Jeon S.W., Park J.S., Park J.Y., Choi G.S. Clinical significance of genetic varia-



tions in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in Korean patients with colorectal cancer. *Oncology* 2010; 79(3–4): 278–282.

5. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.M., Abrams S.L., Wong E.W., Chang F., Lehmann B., Terrian D.M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A.M., Franklin R.A. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773(8): 1263–1284.
6. Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M.C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Basecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A.M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J.A. Roles of the Raf/NEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy – implication for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011; 3(3): 192–222.
7. Chappell W.H., Steelman L.S., Long J.M., Kempf R.C., Abrams S.L., Franklin R.A., Basecke J., Stivala F., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Mazzarino M.C., Nicoletti F., Libra M., Maksimovic-Ivanic D., Mijatovic S., Montalto G., Cervello M., Laidler P., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Evangelisti C., Cocco L., Martelli A.M., McCubrey J.A. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011; 2(3): 135–164.
8. Grabiński N., Bartkowiak K., Grupp K., Brandt B., Pantel K., Jücker M. Distinct functional roles of Akt isoforms for proliferation, survival, migration and EGF-mediated signalling in lung cancer derived disseminated tumor cells. *Cell Signal*. 2011; 23(12): 1952–1960.
9. Vivanco I., Sawyers C.L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2(7): 489–501.
10. Pinto E.M., Ribeiro R.C., Figueiredo B.C., Zambetti G.P. TP-53 Associated Pediatric Malignancies. *Genes Cancer* 2011; 2(4): 485–490.
11. Choschzick M., Hantaredja W., Tennstedt P., Gieseck F., Wölber L., Simon R. Role of TP53 mutations in vulvar carcinomas. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2011; 30(5): 497–504.
12. Yi Z.Y., Feng L.J., Xiang Z., Yao H. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *J. Invest. Surg.* 2011; 24(2): 67–76.
13. Huang X., Wullschlegel S., Shpiro N., McGuire V.A., Sakamoto K., Woods Y.L., McBurnie W., Fleming S., Alessi D.R. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN deficient mice. *Biochem. J.* 2008; 412(2): 211–221.
14. Tomczyk M., Nowak, Jaźwa A. Śródbłonek w fizjologii i patogenezie chorób. *Post. Bioch.* 2013; 59: 357–365.
15. Lee P.S., Poh K.K. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J. Stem Cells*. 2014; 6: 355–366.
16. King A., Balaji S., Keswani S.G., Crombleholme T.M. The Role of Stem Cells in Wound Angiogenesis. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3(10): 614–625.
17. De Bock K., Georgiadou M., Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab.* 2013; 18(5): 634–647.
18. Shahneh F.Z., Baradaran B., Zamani F., Aghebbati-Maleki L. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Hum Antibodies*. 2013; 22(1–2): 15–19.
19. McDonald D.M., Choyke P.L. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.* 2003; 9(6): 713–725.
20. Benton G., Arnaoutova I., George J., Kleinman H.K., Koblinski J. Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2014; 79–80: 3–18.
21. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2008; 8(8): 592–603.
22. Korc M. Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol. Cancer*. 2003; 2: 8.
23. Wang X., Chen X., Fang J., Yang C. Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013; 6(4): 586–597.
24. Moss A. The angiopoietin: Tie 2 interaction: a potential target for future therapies in human vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24(6): 579–592.
25. Conde-Agudelo A., Papageorgiou A.T., Kennedy S.H., Villar J. Novel biomarkers for predicting intrauterine growth restriction: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2013; 120(6): 681–694.
26. Ren B. Protein Kinase D1 Signaling in Angiogenic Gene Expression and VEGF-Mediated Angiogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016; 4: 37.
27. Khan K.A., Bicknell R. Anti-angiogenic alternatives to VEGF blockade. *Clin. Exp. Metastasis* 2015; 33(2): 197–210.
28. Arjaans M., Schröder C.P., Oosting S.F., Dafni U., Kleibeuker J.E., de Vries E.G. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2016; 7(16): 21247–21258. doi: 10.18632/oncotarget.6918.
29. Fagiani E., Lorentz P., Kopfstein L., Christofori G. Angiopoietin-1 and 2 exert antagonistic functions in tumor angiogenesis, yet both induce lymphangiogenesis. *Cancer Res.* 2011; 1; 71(17): 5717–5727.
30. Wietecha M.S., Cerny W.L., DiPietro L.A. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 367: 3–32.
31. Cao Y. VEGF-targeted cancer therapeutics-paradoxical effects in endocrine organs. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014; 10: 530–539.
32. Dong R., Yang G.D., Luo N.A., Qu Y.Q. HuR: a promising therapeutic target for angiogenesis. *Gland. Surg.* 2014; 3(3): 203–206.
33. Funakoshi T., Lee C.H., Hsieh J.J. A systematic review of predictive and prognostic biomarkers for VEGF-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Cancer Treat. Rev.* 2014; 40(4): 533–547.
34. Katoh M., Nakagama H. FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med. Res. Rev.* 2014; 34(2): 280–300.
35. Wu Y., Zhou B.P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer*. 2010; 16; 102(4): 639–644.
36. Kang M.H., Reynolds C.P. Bcl-2 inhibitors: Targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15; 15(4): 1126–1132.
37. Bean G.R., Ganesan Y.T., Dong Y., Takeda S., Liu H., Chan P.M., Huang Y., Chodosh L.A., Zambetti G.P., Hsieh J.J., Cheng E.H. PUMA and BIM are required for oncogene inactivation-induced apoptosis. *Sci. Signal.* 2013; 26; 6(268): ra20.
38. Steckley D., Karajgikar M., Dale L.B., Fuerth B, Swan P, Drummond-Main C, Poulter MO, Ferguson SS, Strasser A, Cregan SP. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 2007; 21; 27(47): 12989–12999.
39. Nakano K., Vousden K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*. 2001; 7(3): 683–694.
40. Nilsson J.A., Cleveland J.L. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*. 2003; 22(56): 9007–9021.
41. Keith B., Simon M.C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007; 4; 129(3): 465–472.
42. Katagri H., Nakayama K., Razia S. Loss of autophagy-related protein Beclin 1 may define poor prognosis in ovarian clear cell carcinomas. *Int. J. Oncol.* 2015; 47: 2037–2044.
43. Fox J.L., MacFarlane M. Targeting cell death signalling in cancer: minimising 'Collateral damage'. *Br. J. Cancer*. 2016; 115(1): 5–11. doi: 10.1038/bjc.2016.111.
44. Pistrutto G., Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(4): 603–619.
45. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674.
46. Ince, T.A., Richardson, A.L., Bell, G.W., Saitoh M., Godar S., Karnoub A.E., Iglehart J.D., Weinberg R.A. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell* 2007; 12(2): 160–170.
47. Passos J.F., Saratzki G., von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(22): 7505–7513.
48. Zhang H., Herbert, B.S., Pan, K.H., Shay J.W., Cohen S.N. Disparate effects of telomere attrition on gene expression during replicative senescence of human mammary epithelial cells cultured under different conditions. *Oncogene* 2004; 23(37): 6193–6198.
49. Sherr C.J., DePinho R.A. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; 102(4): 407–410.
50. Polyak K., Weinberg R. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9(4): 265–273.
51. Song S., Ewald A.J., Stallcup W., Werb Z., Bergers G. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.* 2005; 7(9): 870–879.
52. Peinado H., Portillo F., Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48 (5–6): 365–375.
53. Gupta G.P., Massague J. Cancer Metastasis: building a framework. *Cell*. 2006; 127(4): 679–695.



54. Coghlin C., Murray G.I. Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J. Pathol.* 2010; 222(1): 1–15.
55. Klein, C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer.* 2009; 9(4): 302–312.
56. Storchova Z., Pellman D. From polyploidy to aneuploidy genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004; 5(1): 45–54
57. Lane D.P. Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15–16.
58. Anderson G.R., Stoler D.L., Brenner B.M. Cancer: the evolved consequence of a destabilized genome. *Bioessays* 2001; 23(11): 1037–1046.
59. Mirzayans R., Andrais B., Kumar P., Murray D. The Growing Complexity of Cancer Cell Response to DNA-Damaging Agents: Caspase 3 Mediates Cell Death or Survival? *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(5); pii: E708.
60. Kroemer G., Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell.* 2008; 13(6): 472–482.
61. Dang C.V., Kim J.W., Gao P., Yustein J. The interplay between MYC and HIF on cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2008; 8(1): 51–56.
62. Koukourakis M.J., Giatromanolaki A., Harris A.L., Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas; a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* 2006; 15; 66(2): 632–637.
63. Smyth M.J., Dunn G.P., Schreiber R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 2006; 90: 1–50.
64. Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(10): 715–727.
65. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 329–360.
66. Nelson B.H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.* 2008; 222: 101–116.
67. Pagés F., Galon J., Dieu-Nosjean M.C., Tartour E., Sautés-Fridman C., Fridman W.H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010; 25; 29(8): 1093–1102.
68. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer* 2009 9(4): 285–293.
69. Wels J., Kaplan R.N., Rafii S., Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev.* 2008; 22(5): 559–574.
70. Hu M., Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2008; 18(1): 27–34.