

Received: 2015.12.01
Accepted: 2016.11.02
Published: 2017.05.09

Procesy inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych opornych na chemioterapię*

Invasion and metastasis of tumour cells resistant to chemotherapy

Anna Nowakowska, Jolanta Tarasiuk

Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Streszczenie

Przerzuty nowotworowe odporne na chemioterapię są główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu chorych na nowotwory złośliwe. Stwierdza się często, że chemioterapeutyki skutecznie działające na ogniska pierwotne nowotworów, nie wykazują takiego samego działania na przerzuty odległe, w których szlaki sygnalizacyjne uległy istotnym modyfikacjom. Do czynników komórkowych odpowiedzialnych za wykształcanie potencjału metastatycznego komórek o oporności wielolekowej należą m.in. niektóre onkoproteiny, białka antyapoptotyczne, zmutowane białka supresorowe, proteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, integriny oraz receptor CD44. Wykazano również wpływ wielu chemioterapeutyków na wykształcanie potencjału metastatycznego komórek nowotworowych o oporności wielolekowej (MDR). Wyniki licznych badań wskazują, że geny zaangażowane w powstawanie fenotypu opornościowego i przerzutowego komórek nowotworowych są regulowane przez te same szlaki komórkowe przekazywania sygnałów. Należą do nich m.in. szlaki prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych HIF-1 α , NF- κ B, Ets1 oraz AP-1, pod których kontrolą znajdują się geny odpowiedzialne za wykształcanie potencjału metastatycznego komórek o oporności wielolekowej. Identyfikacja głównych czynników komórkowych odpowiedzialnych za wykształcanie potencjału metastatycznego komórek nowotworowych o oporności wielolekowej może doprowadzić do opracowania skutecznych metod leczenia chorych z nowotworami metastatycznymi opornymi na konwencjonalną chemioterapię.

Słowa kluczowe: komórki nowotworowe • oporność wielolekowa • inwazja • metastaza • szlaki sygnalizacyjne

Summary

Metastatic tumours resistant to chemotherapy are the major cause of the clinical failure in the treatment of malignant diseases. It is observed often that drugs active against primary tumours do not exhibit the same efficacy towards metastatic tumour cells having modified signaling pathways. Among cellular factors involved in the development of the metastatic potential of multidrug resistant tumour cells are some oncoproteins, antiapoptotic proteins, mutated suppressor proteins, integrins and CD44 receptor. It was also demonstrated that numerous chemotherapeutics have the effect on the emergence of the metastatic potential and multidrug resistance (MDR) phenomenon of tumour cells. The results of numerous studies suggest that genes involved in the development of MDR and metastatic phenotype of tumour

*Praca została sfinansowana przez Wydział Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego (grant nr 504-1000-240-852).

Key words:	tumour cells • multidrug resistance • invasion • metastasis • signaling pathways
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1237420
DOI:	11.1111/1111.111.
Word count:	6418
Tables:	2
Figures:	2
References:	122

Adres autorki: prof. dr hab. Jolanta Tarasiuk, Katedra Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: tarasiuk@univ.szczecin.pl

Wykaz skrótów: **5-FU** – 5-fluorouracyl, **ABC** – kasetta wiążąca ATP (ATP-binding cassette), **AP-1** – białko aktywujące 1 (activator protein 1), **BCRP** – białko oporności raka piersi (breast cancer resistant protein), **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; **CD44** – glikoproteina przelblonowa będąca receptorem kwasu hialuronowego, **CSCs** – nowotworowe komórki macierzyste, **DOX** – doksorubicyna, **DR** – daunorubicyna, **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix), **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu, **EGFR** – receptor naskórkowego czynnika wzrostu, **EMT** – przejście komórek z fenotypu epitelialnego do mezenchymalnego (epithelial-mesenchymal transition), **Ets1** – czynnik transkrypcyjny specyficzny w stosunku do E26 (E26 transformation specific), **FAK** – kinaza ogniskowo-adhezyjna, **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów, **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów, **HIF-1 α** – czynnik indukowany przez hipoksję 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α), **MDR** – oporność wielolekowa (multidrug resistance), **MDR1** – gen kodujący glikoproteinę P, **MMPs** – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases), **MRPs** – białka związane z opornością wielolekową (multidrug related resistance proteins), **MX** – mitoksantron, **NF- κ B** – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B, **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu, **P-gp** – glikoproteina P, **PTKs** – białkowe kinazy tyrozynowe, **SISgel** – prawidłowa sztuczna macierz zewnątrzkomórkowa, **TIMPs** – tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases), **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumour necrosis factor α), **topo II α** – topoisomeraza II α , **topo II β** – topoisomeraza II β , **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu, **uPAR** – receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu, **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń.

WSTĘP

W pracy omówiono zależności między zjawiskiem oporności wielolekowej (MDR, multidrug resistance) komórek nowotworowych a procesami ich przerzutowania.

Przerzuty nowotworowe odporne na chemioterapię są główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu chorych z nowotworami złośliwymi. Niepowodzenia wynikają w znacznym stopniu z diagnozowania nowotworów w zaawansowanym stadium rozwoju [32,106], jak również z dużej heterogenności biologicznej guzów nowotworowych, których komórki są w różnym stopniu wrażliwe na stosowane klinicznie leki przeciwnowotworowe. Stwierdza się też często, że chemioterapeutyki

skutecznie działające na ogniska pierwotne nowotworów, nie wykazują takiego samego działania na przerzuty odległe, w których szlaki sygnalizacyjne uległy istotnym modyfikacjom [31,106].

Odpowiedź komórek metastatycznych na chemioterapię jest również uzależniona od swoistego środowiska narządów, w których się rozwijają. Poszukiwanie swoistych czynników regulujących proces przerzutowania zaczęło się u schyłku XIX w., kiedy to Stephen Paget analizując wyniki sekcji zwłok 735 kobiet z rakiem piersi zauważył, że miejsca osiedlania się komórek przerzutowych nie są przypadkowe. Stwierdzono, że ogniska przerzutowe rozwijają się tylko wtedy, gdy odpowiednie komórki nowotworowe ze zdolnością przerzutową („seed” – ziarno)

dotrą do odpowiednich narządów, których mikrośrodowisko zapewni im właściwy wzrost („soil” – gleba) [33].

MECHANIZMY OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Za wykształcanie MDR komórek nowotworowych jest odpowiedzialnych wiele mechanizmów komórkowych. Do najważniejszych z nich należą:

- nadaktywność transporterów błonowych odpowiedzialnych za aktywny ATP-zależny eksport leków z komórek opornych (m.in. glikoproteiny P, P-gp; białka związane z opornością wielolekową 1, MRP1 oraz białka związane z opornością raka piersi, BCRP);
- zmiany ilościowe i konformacyjne celów molekularnych działania leków przeciwnowotworowych;
- wzmożony metabolizm leków powodujący zbyt szybkie ich przekształcanie do postaci nieaktywnej;
- intensyfikacja procesów naprawy uszkodzeń DNA;
- hamowanie apoptozy [105].

P-gp oraz MRP1, należące do nadrodziny transporterów ABC zawierających kasetę wiążącą ATP (ATP-binding cassette), są najlepiej opisanymi markerami oporności wielolekowej. Zwiększony poziom P-gp oraz MRP1 stwierdzono w różnych typach komórek nowotworowych. Ich dużą aktywność obserwuje się także w niektórych prawidłowych komórkach m.in. nadnerczy, nerek, płuc, jelita grubego i mózgu. Wykazują dużą swoistość substratów. Substratami dla P-gp są m.in. doksorubicyna (DOX), daunorubicyna (DR), mitoksantron (MX), kolchicyna, winkrystyna, winblastyna, taksol, etopozyd, tenipozyd, aktynomycyna-D i werapamil [14]. Wykazano również, że transfekcja genu kodującego MRP1 do komórek nowotworowych wywołuje ich oporność m.in. na DOX, DR, winkrystynę i etopozyd, co potwierdza, że transporter ten rozpoznaje wiele tych samych leków przeciwnowotworowych, co P-gp [65]. MRP1 do przeprowadzania aktywnego eksportu chemioterapeutyków wymaga dodatkowo glutationu, kwasu glukuronowego lub siarczanów, z którymi wiążą się leki zanim zostaną wyeksportowane na zewnątrz komórki [105]. Przedstawiono wiele przykładów synergicznego działania pompy MRP1 oraz izoenzymów transferaz glutationowych w wykształcaniu oporności na leki przeciwnowotworowe (m.in. na DOX, winkrystynę, etopozyd i chlorambucyl) [96]. Transferazy glutationowe wykorzystują zredukowany glutation w procesach metabolizowania chemioterapeutyków, w wyniku których zostają wytworzone polarne koniugaty, ułatwiając transport związków przeciwnowotworowych na zewnątrz komórki [5].

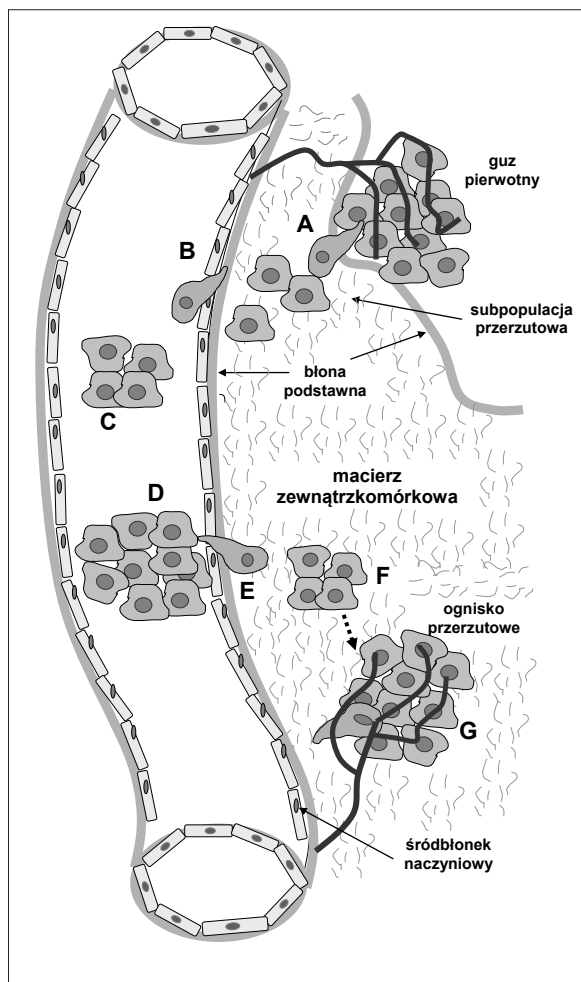
Białko BCRP jest natomiast uznawane za uniwersalny marker komórek macierzystych. Najprawdopodobniej odpowiada za proliferację i utrzymanie fenotypu populacji bocznej (SP, side population), która charakteryzuje się zwiększoną zdolnością do usuwania barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 przez to białko. Obec-

ność BCRP stwierdzono również w nowotworowych komórkach macierzystych (CSCs, cancer stem cells). Nadaktywność BCRP wywołuje oporność komórek nowotworowych m.in. na MX, irynotekan, gefitynib, imatynib oraz metotreksat [25,77].

Do ważnych markerów MDR należą również topoisomerazy II. Są to zależne od ATP enzymy biorące udział w replikacji i transkrypcji materiału genetycznego komórki oraz w kondensacji chromatyny. Występują w dwóch izoformach - II α (topo II α) oraz II β (topo II β). Hamowanie funkcji topoisomerazy II powoduje powstawanie licznych uszkodzeń DNA, co prowadzi do eliminacji komórek w wyniku apoptozy. W przypadku wykształcenia oporności na leki cytotoksyczne, w komórkach nowotworowych wzrasta poziom określonej izoformy topoisomerazy (topo II α lub topo II β), która jest niewrażliwa na stosowane chemioterapeutyki [53].

PROCESY INWAZJI I PRZERZUTOWANIA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Proces tworzenia się przerzutów nowotworowych obejmuje wiele następujących po sobie kaskadowo zdarzeń (ryc. 1). Niedotlenienie w obrębie guza pierwotnego uaktywnia czynnik indukowany hipoksją (HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α), który jest czynnikiem transkrypcyjnym wpływającym na ekspresję wielu genów związanych m.in. z przeżyciem komórek nowotworowych i ich „przeprogramowaniem” na metabolizm beztlenowy. Za pośrednictwem HIF-1 α dochodzi także w warunkach niedotlenienia do uruchomienia procesów angiogenezy i metastazy, gdyż czynnik ten aktywuje ekspresję wielu genów proangiogennych i prometastycznych, m.in. genu kodującego czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) oraz genu kodującego jego receptor (VEGFR), jak również genu kodującego oksydazę lizylną (LOX), która reguluje aktywność kinazy ogniskowo-adhezyjnej (FAK, focal adhesion kinase) [7]. Pod wpływem dodatkowych czynników proangiogennych (m.in. bFGF, PDGF, IGF-2 oraz HGF) proliferujące komórki guza pierwotnego zaczyna otaczać sieć nowo powstałych naczyń krwionośnych, co sprzyja rozwojowi nowotworu. Uważa się, że lokalna migracja komórek do otaczającej je macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, extracellular matrix), a następnie wejście do układu krążenia zależy od zdolności przejścia z fenotypu epitelialnego do mezenchymalnego (EMT, epithelial-mesenchymal transition) kontrolowanego głównie przez czynniki transkrypcyjne Twist, Snail i Zeb. Jest to związane m.in. z obniżeniem ekspresji białek adhezyjnych (głównie kadheryny-E) [97,115]. W 2015 r. ukazały się natomiast dwie publikacje w prestiżowym czasopiśmie *Nature*, przedstawiające wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem transgenicznych modeli mysich raka piersi i gruczolakoraka przewodowego trzustki (charakteryzujących się brakiem aktywności Twist i Snail), które wskazują, że EMT nie jest konieczne do wywołania procesów inwazji i metastazy badanych komórek nowotworowych, natomiast uczestniczy w wykształcaniu przez nie oporności na chemioterapię [34,119].



Ryc. 1. Uproszczony schemat przebiegu procesów inwazji i przerzutowania nowotworów złośliwych: A – nabycie przez komórki nowotworowe zdolności do migracji i lokalna inwazja przez błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową (ECM), B – wejście komórek do układu krążenia, C – tworzenie małych agregatów niszczone przez naprężenia ścinające, D – tworzenie zatorów w naczyniach włosowatych układu krążenia, E – adhezja do błony podstawnej i wyjście z układu krążenia, F – namnażanie komórek nowotworowych w nowym miejscu, G – neoangiogeneza

Komórki nowotworowe tworzą w krwiobiegu agregaty. Małe agregaty są niszczone przez naprężenia ścinające (SS, shear stress) związane z laminarnym przepływem krwi, powstające kolejnymi warstwami cieczy. Natomiast większe agregaty są zatrzymywane w naczyniach włosowatych narządów docelowych. Następnie dochodzi do wynacznienia przerzutujących komórek, a potem do ich osiedlenia się w zrębie narządu w sąsiedztwie naczyń krwionośnych oraz do neoangiogenezy, co sprzyja rozwojowi wtórnych ognisk nowotworowych [51].

ECM, pełniąc funkcję integrującą tkanki, jest mieszaniną białek (do których należą m.in. kolageny, laminina, fibronektyna i elastyna) oraz proteoglikanów wydzielanych przez obecne w zrębie fibroblasty. Zwiększająca

się zdolność komórek do migracji jest w dużym stopniu wynikiem zmian strukturalnych ECM. Patologiczna macierz nowotworów charakteryzuje się ponad 75% utratą lamininy, kolagenu typu IV i kadheryny E oraz znacznie podwyższoną depozycją kolagenu typu I i III [41].

Rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych w organizmie, nieodłącznie związane z inwazją do otaczającej ECM, wymaga nadtrawienia struktury błony podstawnej, która jest wyspecjalizowaną, cienką warstwą ECM występującą m.in. między przypodstawną częścią błony komórek a zrębem tkanki łącznej. W odróżnieniu od innych typów ECM błona podstawna jest bogata w lamininę, kolagen typu IV, nidogen (entaktynę) i perlekan (proteoglikan, siarczan heparanu). Wykazano również, że poza podstawową funkcją, jaką jest zapewnienie komórkom strukturalnej podpory, błona podstawna bierze także udział w regulacji proliferacji, migracji, różnicowania i procesów przeżyciowych komórek [36].

Aktywowane w sąsiedztwie komórek nowotworowych enzymy proteolityczne degradują struktury ECM, co sprzyja ich przejściu, tj. intrawazacji do naczyń limfatycznych lub krwionośnych i tworzeniu ognisk przerzutowych [39]. Do najważniejszych proteinaz zaangażowanych w degradację ECM należą:

- metaloproteinazy (MMPs, matrix metalloproteinases) należące do rodziny Zn^{2+} -zależnych endopeptydaz;
- katepsyny (m.in. katepsyna B i L należące do proteinaz cysteinowych oraz katepsyna D należąca do proteinaz aspartylowych);
- składowe układu aktywatora plazminogenu (PAS, plasminogen activator system) należące do proteinaz serynowych (m.in. urokinazowy aktywator plazminogenu, uPA; receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu, uPAR); plazminogen, Plg; inhibitor aktywatora plazminogenu typu pierwszego, PAI-1 oraz inhibitor aktywatora plazminogenu typu drugiego, PAI-2) [21].

Główną fizjologiczną funkcją uPA jest konwersja Plg do aktywnej postaci plazminy, przy czym proces przebiega bardziej efektywnie, gdy uPA wiąże się ze swoistym receptorem tworząc kompleks uPA/uPAR [1]. Plazmina należy do proteinaz serynowych bezpośrednio degradujących składniki ECM (m.in. fibronektynę, lamininę oraz kolagen typu IV). Ponadto spełnia funkcję aktywatora prekursorowych postaci MMPs degradujących ECM [21].

Aktywność MMPs jest regulowana przez swoiste inhibitory tkankowe (TIMPs, tissue inhibitors of metalloproteinases), które paradoksalnie, poza hamowaniem MMPs mogą pełnić również funkcję ich aktywatorów (np. TIMP-2 w kompleksie z błonową MMP typu 1, tj. MT1-MMP aktywują pro-MMP-2) i w konsekwencji wpływać na progresję nowotworów złośliwych [12].

Proces migracji komórek nowotworowych jest również bardzo uzależniony od międzykomórkowych oddziały-

wań adhezyjnych zachodzących z udziałem kadheryn oraz interakcji komórek ze składnikami ECM, w które zaangażowane są integryny. Kadheryny należą do rodziny glikoprotein przez błonowych odpowiadających za prawidłowy kontakt między komórkami i za ich adhezję. Sugeruje się udział kilku kadheryn w rozwoju nowotworów (m.in. kadheryny E, P, N oraz 11), ale dotychczas najlepiej poznano rolę kadheryny E tworzącej kompleks z kateniną w tworzeniu przerzutów [43].

Integryny, należące do przez błonowych białek receptorowych, odpowiadają za kontakt komórki z ECM (m.in. fibronektyną, lamininą, kolagenem i witronektyną) i z innymi komórkami. Są złożone ze związanych niekowalencyjnie podjednostek α i β . Zidentyfikowano 18 podjednostek α oraz 8 podjednostek β , które mogą tworzyć różne kombinacje heterodimerów (co najmniej 24). Powinowactwo odpowiednich ligandów do receptorów integrynowych jest regulowane przez kaskady sygnałów zarówno zewnątrzkomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych, które odpowiednio pobudzają lub hamują aktywność heterodimerów $\alpha\beta$. Wykazano, że zaburzenie wytwarzania integryn w komórkach nowotworowych jest jedną z istotnych przyczyn nabywania przez nie zdolności do metastazy [100].

WPLYW CHEMIOTERAPEUTYKÓW NA WYKSZTAŁCANIE POTENCJAŁU METASTATYCZNEGO I OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Opisana we wstępnej części pracy teoria „seed and soil” zaproponowana przez Pageta znajduje potwierdzenie w wynikach współcześnie prowadzonych badań eksperymentalnych [31]. Wykazano m.in., że u myszy, którym wszczepiono komórki czerniaka złośliwego linii B16 nowotwór rozwijał się tylko w płucach oraz jajnikach implantowanych w mięśniach, natomiast ognisk przerzutowych nie stwierdzono w nerkach kontrolnie implantowanych w tkance mięśniowej [31].

Wyniki prowadzonych badań wskazują również, że swoiste mikrośrodowisko narządowe moduluje odpowiedź komórek nowotworowych na terapię lekami przeciwnowotworowymi. Staroselsky i wsp. wykazali, że komórki włókniakomięsaka linii UV2237 wstrzyknięte podskórnie myszom były wrażliwe na DOX, natomiast powstałe przerzuty płucne były odporne na działanie stosowanego chemioterapeutyku [103]. W innej pracy tego zespołu zbadano porównawczo rozwój nowotworu u myszy, którym wszczepiono komórki wrażliwe czerniaka złośliwego linii B16, z rozwojem u myszy inokulowanych komórkami opornymi na kolchicynę sublinii B16/Col/R. Stwierdzono, że komórki odporne cechuje większa zdolność do agregacji oraz ruchliwość i zdolność do tworzenia przerzutów w nerkach, śledzionie, kątnicy i otrzewnej [104].

Podobne wyniki uzyskano z zastosowaniem komórek raka jelita grubego linii CT-26 [27]. Wykazano, że komórki, które uległy kolonizacji w płucach myszy cha-

rakteryzował fenotyp oporności na DOX, natomiast komórki rozwijające się pod skórą zachowywały wrażliwość na ten chemioterapeutyk. Stwierdzono jednocześnie, że wzrost oporności komórek CT-26 na DOX korelował pozytywnie z aktywnością transkrypcyjną *MDR1* kodującego P-gp i poziomem produktu białkowego tego genu. Należy natomiast zaznaczyć, że wszystkie komórki nowotworowe CT-26 pozostawały wrażliwe na 5-fluorouracyl (5-FU), który nie jest substratem P-gp [27]. W dalszej części przeprowadzonych badań wykazano, że po przeniesieniu komórek opornych poza mikrośrodowisko płuc, dochodziło w nich do przywrócenia wrażliwości na DOX. Swoista dla określonego narządu wrażliwość na DOX cechowała także inne typy komórek nowotworowych, m.in. komórki raka jelita grubego linii KM12 oraz komórki czerniaka złośliwego linii B16 [31].

Wyniki badań Nokihary i wsp. przeprowadzone z wykorzystaniem ludzkich komórek drobnokomórkowego raka płuc linii SBC-3 wstrzykniętych myszom z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID), również potwierdzają istotną rolę P-gp w powstawaniu ognisk przerzutowych. Wskaźnik przerzutowości komórek opornych SBC-3/ADM charakteryzujących się wysokim poziomem P-gp był znacznie wyższy niż w przypadku komórek wrażliwych SBC-3, które cechuje bardzo niski poziom P-gp [78]. Podobne wyniki uzyskano w ludzkich komórkach raka wątroby HB8065/R opornych na epirubicynę, które wykazują 3-4-krotnie większą zdolność do migracji w porównaniu do wrażliwych komórek, z których się wywodzą (HB8065/S). Stwierdzono jednocześnie, że zahamowanie aktywności P-gp z zastosowaniem swoistego inhibitora PSC833 spowodowało obniżenie prawie o 25% wskaźnika migracji przez filtry pokryte Matrigelem, tj. modelową macierz zewnątrzkomórkową wytwarzaną przez mysie komórki mięsaka Engelbretha-Holma-Swarma (EHS) [11].

Potencjalnymi czynnikami, które mogą wpływać na powstawanie oporności wielolekowej nowotworów rozwijających się w określonych narządach mogą być również swoiste dla tych narządów czynniki wzrostowe. Stwierdzono m.in., że zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) indukuje oporność na taksol, DOX i 5-FU [102], insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1) wywołuje oporność na aktynomycynę D i DOX (wpływając na wzrost aktywności transkrypcyjnej *MDR-1* i onkogenu *c-H-Ras*) [38], a czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) na DOX i kamptotecynę (powodując hamowanie apoptozy) [68].

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań dowodzą, że zależności między fenotypem przerzutowym komórek nowotworowych i opornością wielolekową są też w dużym stopniu zależne od typu komórek i/lub zastosowanego leku przeciwnowotworowego.

Osmak i wsp. zbadali poziomy markerów inwazji i metastazy, tj. uPA, PAI-1 oraz katepsyn B, D, H i L w subliniach

ludzkiej komórek glejaka linii A1235), raka szyjki macicy linii HeLa i raka krtani linii HEP2, które wyprowadzono z zastosowaniem różnych związków przeciwnowotworowych, jako czynników selekcyjnych. Stwierdzono, że w komórkach A1235, w których wyindukowano oporność z użyciem cisplatyny nastąpił znaczący wzrost poziomu uPA i PAI-1 należących do bardzo ważnych markerów inwazyjności [83]. W przypadku komórek sublinii HeLa opornych na DOX i cisplatynę stwierdzono, że mają wysoki poziom PAI-1 i katepsyny D [81]. Komórki sublinii raka krtani HEP2 odporne m.in. na cisplatynę oraz winkrystynę cechował natomiast wysoki poziom katepsyn B i D oraz uPA [81,82].

Liang i wsp. [60] w badaniach z wykorzystaniem dwóch sublinii komórek raka pochodzącego z jamy nosowej, tj. sublinii RPMI-2650-M1 uzyskanej z użyciem melfalanu (M1) (należącego do leków alkilujących) oraz sublinii RPMI-2650Tx wyprowadzonej z zastosowaniem paklitakselu (należącego do taksoidów) wykazali, że tylko komórki RPMI-2650-M1 miały zwiększoną inwazyjność w sztucznej ECM. Stwierdzono również, że komórki te miały zwiększony poziom markerów inwazyjności, tj. podjednostek integrynowych: α_2 , α_5 , α_6 , β_1 i β_4 oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, a także charakteryzowały się silniejszą adhezją do kolagenu typu IV, lamininy i fibronektyny. Wykazano jednocześnie, że oporność inwazyjnych komórek RPMI-2650M1 korelowała ze znacząco zwiększonym poziomem białek MRP1, MRP2, a w mniejszym stopniu z P-gp, której poziom był tylko nieznacznie podwyższony. Autorzy pracy zasugerowali, że prawdopodobnie istnieją czynniki transkrypcyjne regulujące jednocześnie ekspresję genów kodujących białka z rodziny MRP oraz czynniki związane ze wzrostem inwazyjności komórek opornych. Mogą do nich należeć SP-1 i AP-1, gdyż zidentyfikowano dla nich swoje miejsca wiązania w sekwencjach promotorowych genów kodujących białka MRP oraz MMP-2 i MMP-9 [60,88]. W komórkach RPMI-2650Tx stwierdzono znaczący wzrost poziomu P-gp. Wydaje się natomiast, że mała inwazyjność tych komórek wynikała prawdopodobnie z obniżonej ekspresji podjednostki integrynowej α_2 rozpoznającej kolagen i lamininę [60].

W innej pracy tego zespołu przeprowadzonej z wykorzystaniem sublinii opornych komórek raka płuc linii DKLP, otrzymanych z użyciem dziesięciu powszechnie stosowanych leków przeciwnowotworowych, tj. etopozyny, winkrystyny, docetakselu, MX, 5-FU, metotrekstatu, cisplatyny, chlorambucylu oraz dwóch pochodnych nitrozomocznika – 1,3-bis(2-chloroetylo)-1-nitrozomocznika (BCNU) i lomustyny (CCNU) jako czynników selekcyjnych, stwierdzono, że wszystkie uzyskane sublinie odporne cechuje podwyższony poziom P-gp. W komórkach opornych wyprowadzonych z użyciem docetakselu zanotowano również wzrost poziomu MRP1, natomiast w komórkach otrzymanych z zastosowaniem MX stwierdzono zwiększenie ilości BCRP. Jednocześnie istotny wzrost inwazyjności i ruchliwości badany w warunkach *in vitro* zaobserwowano w komórkach

opornych uzyskanych z użyciem MX, 5-FU, metotrekstatu, cisplatyny, chlorambucylu oraz BCNU. Wszystkie uzyskane sublinie odporne charakteryzowały się również wysokim poziomem metaloproteinaz: MMP-2, MMP-9 i MMP-13 sprzyjających przerzutowaniu komórek nowotworowych [61].

Wpływ leków przeciwnowotworowych na fenotyp inwazyjny komórek nowotworowych był również przedmiotem badań Liu i wsp. Zaobserwowali, że 24 godz. inkubacja komórek wrażliwych raka trzustki linii SUT-2 i wywodzącej się z niej sublinii odpornej S2/TXT w docetakselom powodowała spadek zdolności do inwazji w Matrigelu komórek wrażliwych, które miały niski poziom P-gp, natomiast nie wpływała na inwazyjność komórek opornych S2/TXT charakteryzujących się nadaktywnością P-gp [63]. Przeciwnie wyniki badań uzyskali Belotti i wsp., którzy stwierdzili hamujący wpływ paklitakselu (należącego, podobnie jak docetaksel, do rodziny taksoidów) na ruchliwość opornych komórek raka jajnika [8].

Zastosowanie innej grupy leków przeciwnowotworowych, należących do inhibitorów receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), powodowało zahamowanie stymulowanej przez TNF- α inwazyjności, ruchliwości oraz adhezji wysoce inwazyjnych komórek raka piersi TamRMCF-7 opornych na tamoksyfen do białek ECM [45].

Przykłady zaobserwowanych różnic w zdolności komórek nowotworowych linii wrażliwych i sublinii opornych na działanie chemioterapeutyków do inwazji/metastazy przedstawiono w tab. 1.

Prace dotyczące badania korelacji między zwiększoną ekspresją genów kodujących białka MDR a fenotypem przerzutowym prowadzono też z użyciem komórek nowotworowych pochodzących z próbek klinicznych (tab. 2). Analiza 61 biopłatów pochodzących z pierwotnych guzów raka piersi oraz jego ognisk przerzutowych do węzłów chłonnych wykazała, że obecność transkryptów genu *MDR1* pozytywnie koreluje z liczbą powstających przerzutów [89]. Może to sugerować, że produkt ekspresji tego genu (P-gp) jest zaangażowany w kontrolę szlaków przekazywania sygnałów regulujących procesy związane z przerzutowaniem komórek nowotworowych.

Wyniki przeprowadzonej przez Schneidera i wsp. analizy biopłatów tkankowych zaawansowanego raka piersi pobranych przed rozpoczęciem leczenia i w czasie chemioterapii świadczą dodatkowo o tym, że badanie ekspresji *MDR1* i określanie poziomu P-gp ma duże znaczenie predykcyjne dotyczące prognozowania powstania przerzutów do węzłów chłonnych pachowych po wprowadzeniu chemioterapii [98]. Wyniki innych badań dotyczących również pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem piersi wykazały, że poziom białka MRP1 jest wyższy w komórkach przerzutujących do węzłów chłonnych niż w komórkach guza pierwotnego [120]. Podobne

Tabela 1. Przykłady różnic w zdolności komórek nowotworowych linii wrażliwych i sublinii opornych na działanie chemioterapeutyków do inwazji/metastazy

Komórki nowotworowe	Zaobserwowane różnice	Piśmiennictwo
komórki czerniaka linii B16	komórki oporne na kolchicynę sublinii B16/Col/R cechowała w warunkach <i>in vitro</i> większa zdolność do agregacji i ruchliwość w sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz zdolność w warunkach <i>in vivo</i> do lokalnego wzrostu w nerkach, śledzionie, kątnicy i otrzewnej niż komórki linii wrażliwej B16	[104]
komórki drobnokomórkowego raka płuc linii SBC-3	wskaźnik przetrzutowości komórek opornych sublinii SBC-3/ADM charakteryzujących się wysokim poziomem glikoproteiny P (P-gp), określony u myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID), był znacznie wyższy niż w przypadku komórek wrażliwych SBC-3, które cechuje niski poziom P-gp	[78]
komórki glejaka linii A1235	w komórkach opornych sublinii A1235 AT i A1235 CT, w których wyindukowano oporność z użyciem cisplatyny nastąpił znaczący wzrost poziomu urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA) i inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1), należących do bardzo ważnych markerów inwazyjności, w porównaniu z poziomem obserwowanym dla komórek linii wrażliwej A1235	[83]
komórki raka szyjki macicy linii HeLa	w komórkach sublinii opornych, w których wyindukowano oporność z użyciem doksorubicyny (DOX) (HeLa DA i HeLa DK) oraz cisplatyny (HeLa CA i HeLa CK) stwierdzono znaczący wzrost poziomu PAI-1 i katepsyny D, należących do bardzo ważnych markerów inwazyjności, w porównaniu z poziomem obserwowanym dla komórek linii wrażliwej HeLa	[81]
komórki raka krtani linii HEP2	komórki sublinii opornych, w których wyindukowano oporność z użyciem cisplatyny (CA3) oraz winkrystyny (VA3 i VK2) cechował wysoki poziom katepsyn B i D oraz uPA, należących do bardzo ważnych markerów inwazyjności, w porównaniu z poziomem obserwowanym dla komórek linii wrażliwej HEP2	[81,82]
komórki raka przegrody nosowej linii RPMI-2650	komórki sublinii RPMI-2650-MI, w których wyindukowano oporność z użyciem melfalanu charakteryzowały się znaczącym wzrostem poziomu białek eksportujących MRP1 i MRP2 w porównaniu z poziomem obserwowanym dla komórek linii wrażliwej RPMI-2650 oraz wykazywały zwiększoną inwazyjność w sztucznej ECM; komórki oporne posiadały zwiększony poziom podjednostek integrynowych: $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ i $\beta 4$ oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 należących do bardzo ważnych markerów inwazyjności	[60]
komórki raka płuc linii DKLP	komórki sublinii opornych uzyskane z użyciem 5-fluorouracylu, mitoksantronu, metotreksatu, cisplatyny, chlorambucylu oraz 1,3-bis(2-chloroetylo)-1-nitrozomocznika cechował podwyższony poziom P-gp w porównaniu z poziomem obserwowanym dla komórek linii wrażliwej DKLP oraz istotny wzrost inwazyjności i ruchliwości badany w warunkach <i>in vitro</i> ; komórki uzyskanych sublinii opornych charakteryzowały się również podwyższonym poziomem MMP-2, MMP-9 i MMP-13 sprzyjających ich przetrzutowaniu	[61]
komórki kostniakomięsaka linii OSCORT	komórki, które migrowały do sztucznej ECM charakteryzowała niższa wrażliwość na DOX w porównaniu z komórkami niewykazującymi zdolności do migracji	[42]
komórki raka piersi linii MCF-7		
komórki włókniakomięsaka linii HT1080	ECM indukowała oporność tych komórek na DOX, co może być konsekwencją aktywacji szlaków komórkowych stymulowanych przez integrynę $\beta 1$	[85]
komórki kostniakomięsaka linii OSCORT		
komórki drobnokomórkowego raka płuc linii SCLC	komórki traktowane etopozydem, cisplatyną i DOX charakteryzowały się zwiększoną adhezją do składników ECM tj. fibronektyny, lamininy i kolagenu typu IV przebiegającą za pośrednictwem integryny $\beta 1$ niż komórki kontrolne, co wywoływało w nich oporność na apoptozę	[91,92]

Tabela 2. Charakterystyka komórek nowotworowych pochodzących z próbek klinicznych nowotworów pierwotnych oraz ognisk przerzutowych

Materiał kliniczny	Charakterystyka komórek nowotworowych	Piśmiennictwo
61 próbek klinicznych raka piersi	poziom transkryptów genu <i>MDR1</i> kodującego glikoproteinę P (P-gp) w badanych biopatach pozytywnie korelował z liczbą powstających przerzutów do węzłów chłonnych	[89]
52 próbki kliniczne raka piersi	poziom transkryptów genu <i>MDR1</i> w badanych biopatach pozytywnie korelował z liczbą powstających przerzutów do węzłów chłonnych pachowych; wskazano, że określanie poziomu mRNA tego genu może mieć znaczenie predykcyjne w prognozowaniu powstawania przerzutów po wprowadzeniu chemioterapii	[98]
32 próbki kliniczne pierwotnego raka piersi i 63 próbki kliniczne przerzutów do węzłów chłonnych	poziom białka MRP1 był wyższy w komórkach przerzutujących do węzłów chłonnych niż w komórkach guza pierwotnego	[120]
95 próbek klinicznych raka jelita grubego	podwyższony poziom P-gp był skorelowany pozytywnie z nasileniem inwazji komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych i węzłów chłonnych	[112]

wyniki uzyskali Weinstein i wsp., którzy przeprowadzili analizę próbek klinicznych raka jelita grubego wykazując, że podwyższony poziom P-gp był skorelowany z nasileniem inwazji komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych i węzłów chłonnych [112].

Wpływ ECM na procesy inwazji/metastazy i oporności wielolekowej komórek nowotworowych

Wyniki prowadzonych badań wskazują na istotny udział ECM w progresji nowotworów oraz modulacji działania leków przeciwnowotworowych. Pogany i wsp. stwierdzili, że ECM pełni główną rolę w przechodzeniu komórek nowotworowych w stan uśpienia oraz chroni je przed toksycznym działaniem leków przeciwnowotworowych. Stwierdzono m.in., że ECM indukuje oporność na DOX w komórkach raka piersi (MCF-7), włókniakomięśaka (HT1080) i kostniakomięśaka (OSCORT). Obniżona toksyczność DOX względem tych komórek może być wynikiem aktywacji szlaków komórkowych stymulowanych przez integrynę β_1 . Wydaje się również, że ECM może także prowadzić do zwiększenia aktywności samonaprawczej komórek poddanych działaniu leków przeciwnowotworowych [85].

Wyniki badań przeprowadzonych z użyciem opornych na chemioterapię komórek OSCORT dowiodły, że składniki ECM, a zwłaszcza siarczan heparanu, powodują wzrost poziomu MMP-9, integryny β_1 oraz topo II, co zwiększa ich inwazyjność [41,42]. Podobne wyniki uzyskano z wykorzystaniem komórek raka jelita grubego linii KM12. Autorzy tych badań zaobserwowali, że proteoglikany siarczanu heparanu obecne w ECM wpływają na wzrost inwazyjności badanych komórek nowotworowych przez pobudzanie aktywności onkogenów *erb-B2* oraz *erb-B3* [122].

Zbadano również wpływ DOX na komórki OSCORT, które migrowały do trójwymiarowego żelu ECM. Stwierdzono,

że komórki te miały podwyższony poziom i aktywność topo II, jak również zwiększoną ilość podjednostki integrynowej β_1 oraz podwyższoną aktywność MMP-9. Zaobserwowano również ich mniejszą wrażliwość na toksyczne działanie DOX w porównaniu z komórkami OSCORT niewykazującymi zdolności do migracji, ale tylko w przypadku zastosowania wysokich stężeń DOX i krótkiego czasu inkubacji. Stwierdzono bowiem, że 24-godz. inkubacja z zastosowaniem niskich stężeń tego chemioterapeutyku wpływała w istotny sposób na obniżenie potencjału inwazyjnego komórek OSCORT [42]. Podobne zależności zaobserwowano również badając wpływ nietoksycznych stężeń DOX na inwazyjność ludzkich komórek czerniaka złośliwego linii A2058. Stwierdzono, że związek ten selektywnie hamował aktywność MMP-1 oraz obniżał zdolność komórek do inwazji macierzy kolagenowej, przy czym stwierdzono, że mechanizmy tych zjawisk były niezależne od P-gp [10].

Wzrost poziomu topo II wskazuje na ochronny wpływ ECM na działanie cytotoksyczne inhibitorów tego enzymu. Taką zależność zaobserwowano w komórkach raka jelita grubego linii LS174T i LiM6 [54]. Wyniki badań z zastosowaniem komórek drobnokomórkowego raka płuc (SCLC) traktowanych etopozydem, cisplatyną i DOX wykazały, że przebiegająca za pośrednictwem integryny β_1 adhezja tych komórek do składników ECM, tj. fibronektyny, lamininy i kolagenu typu IV, wywoływała oporność na apoptozę prawdopodobnie przez pobudzenie aktywacji białkowych kinaz tyrozynowych (PTKs), hamujących apoptozę przez zablokowanie aktywacji kaspazy-3 przez inhibitory topo II [91,92].

Zbadano również wpływ ECM na zdolność komórek OSCORT do repopulacji po inkubacji z DOX. Stwierdzono, że komórki hodowane po wcześniejszej 4 godz. ekspozycji na ten lek w obecności sztucznej ECM cechował obniżony poziom białka p53, zmniejszona fragmentacja DNA i niższy indeks apoptotyczny. Ponadto stwierdzono,

że komórki te były zdolne do proliferacji w przeciwieństwie do komórek pozbawionych kontaktu z ECM [40]. Przedstawione wyniki świadczą o tym, że ECM wpływa w znaczący sposób na niepowodzenia terapii ludzkiego kostniakomięsaka.

Wyniki innych badań, w których porównywano ekspresję genów związanych z nowotworzeniem w komórkach raka pęcherza moczowego 5 różnych linii (SV-HUC-1, TCCSUP, RT4 i J82 i 253 JB-V) hodowanych bez ECM oraz odpowiednio w obecności prawidłowej sztucznej ECM (SISgel) i patologicznej macierzy (Matrigel) wskazują na istotną rolę ECM w kształtowaniu fenotypu złośliwego komórek nowotworowych. Przeprowadzona analiza z użyciem mikromacierzy wykazała, że 33 spośród 1186 badanych genów związanych z kancerogenezą uległy ekspresji w trójwymiarowej hodowli prowadzonej w obecności ECM (SISgel i Matrigel), w porównaniu z hodowlą tradycyjną. Były to głównie geny związane z regulacją cyklu komórkowego, replikacją i naprawą DNA oraz apoptozą (m.in. *c-Myc*, *p53*, *E2F* oraz geny, których produkty białkowe uczestniczą w szlakach sygnalizacyjnych zależnych od TGF- β 1). Zaobserwowano, że profil ekspresji genów w komórkach hodowanych w Matrigelu (silny wzrost ekspresji genów związanych ze szlakami przeżyciowymi zachodzącymi z udziałem kinazy AKT1), różnił się znacząco od profilu komórek znajdujących się w obecności prawidłowej ECM, chociaż nie zanotowano w nich zwiększonej aktywności genów związanych z supresją fenotypu złośliwego nowotworów. Uzyskane wyniki sugerują, że wzrost komórek raka pęcherza moczowego w macierzy prawidłowej może hamować niektóre z cech złośliwości nowotworu [28].

CZYNNIKI KOMÓRKOWE ODPOWIEDZIALNE ZA WYKSZTAŁCANIE FENOTYPU OPORNOŚCIOWEGO I PRZERZUTOWEGO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

W komórkach nowotworowych nasilają się procesy prowadzące do jednoczesnego wykształcenia fenotypu opornościowego i przerzutowego tych komórek. Niżej opisano kilka ważniejszych czynników komórkowych uczestniczących w rozwoju potencjału metastatycznego komórek opornych.

Onkoproteiny

Dobrze udokumentowano jednoczesny wpływ takich onkogenów jak *ras*, *myc* i *erbB* na fenotyp opornościowy i przerzutowy komórek nowotworowych. Wykazano, że transfekcja onkogenu *H-ras* do fibroblastów zarodków szczurzych transfekowanych genem oporności na neomycynę powodowała powstanie fenotypu inwazyjnego, którego markerem była MMP-9. Wstrzyknięcie transfekowanych komórek szczurom powodowało powstanie ognisk przerzutowych w płucach [86]. Jednak transfekowanie fibroblastów szczurzych zarodków onkogenami *H-Ras* i *myc* wywoływało ich oporność na DOX, winkrystynę, MX i 1- β -D-arabino furanozylocytozynę (Ara-C) [75]. Wykazano też, że inkubacja cechujących się nade-

kspresją *H-Ras* komórek raka pęcherza moczowego linii T24 opornych na genisteinę z PD58059 i U0126 (będącymi inhibitorami kinaz białkowych MEK i ERK), przywracało tym komórkom wrażliwość na genisteinę [57].

Benard w jednej ze swoich prac [9] wykazał, że silnie przerzutujące komórki niedojrzałego nerwiaka charakteryzowała istotnie wyższa ekspresja onkogenu *N-myc* w porównaniu do komórek guza pierwotnego. Cechał ją również istotny wzrost poziomu mRNA genu *MDR1*, którego promotor znajduje się pod kontrolą *N-myc*. W badanym modelu *N-myc* prowadził również do stymulacji angiogenezy, przerzutowania komórek i wykształcenia oporności za pośrednictwem swoistych genów, do których należały *PGY1* i *GST3*. Natomiast komórki raka jelita grubego linii LoVo z zablokowanym *c-Myc* cechował trzykrotny wzrost wrażliwości na winblastynę, co było związane z indukcją apoptozy, której towarzyszył wzrost poziomu białka *p53* i zmniejszenie ilości anty-apoptotycznego czynnika - *Bcl-2* [13].

Rodzina onkogenów *c-erbB* wpływa na wiele procesów związanych z metastazą [30]. Nadekspresję *c-erbB-2* stwierdzono u 50% pacjentów z odległymi przerzutami nowotworowymi. W badaniach przeprowadzonych *in vivo* zaobserwowano również, że *erbB-3* indukuje potencjał inwazyjny i pobudza przejście komórek nowotworowych raka piersi do naczyń krwionośnych [114]. Jednocześnie dowiedziono, że ekspresja *c-erbB-2* w komórkach raka żołądka linii MKN-7 i KATO III jest związana z ich opornością na cisplatynę. Wykazano też, że zastosowanie oligonukleotydu antysensownego przeciwko *c-erbB-2* przywracało wrażliwość badanych komórek na cisplatynę [35].

Białka antyapoptotyczne

Produkt białkowy genu *BCL2* pełni ważną rolę supresora apoptozy, gdyż jego zwiększony poziom chroni komórkę przed apoptozą przez hamowanie aktywności białek proapoptotycznych Bax. Stwierdzono, że komórki raka nerki linii SN12C transfekowane genem *BCL2* charakteryzowała większa oporność na DOX oraz wyższy potencjał przerzutowy *in vivo* [2]. Zaobserwowano również, że komórki niedrobnokomórkowego raka płuc linii NCI-H157 transfekowane genem *BCL2* cechowały się 15-krotnym zwiększeniem inwazyjności *in vitro*, 4-krotnym wzrostem liczby przerzutów do płuc oraz wzrostem poziomu ekspresji *MMP-2* w porównaniu do komórek kontrolnych [18]. Wyniki prac Ricca i wsp. przeprowadzone z wykorzystaniem komórek MCF-7(ADR) opornych na DOX świadczą o tym, że *BCL2* wpływa na procesy przerzutowania badanych komórek opornych z udziałem czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B) [90].

Białka supresorowe nowotworów

Dotąd udowodniono udział kilku genów supresorowych w wykształcaniu fenotypu opornościowego i przerzutowego komórek nowotworowych, m.in. *p53* i *Nm23*.

Wykazano, że inaktywacja lub delecja w obszarze genu kodującego białko p53 jest jedną z najczęstszych zmian prowadzących do wykształcania oporności na chemioterapeutyki i nabycie potencjału przerzutowego komórek nowotworowych. Prawidłowo funkcjonujące białko p53 hamuje ekspresję genów *MDR1* i *MRP1*, kodujących białka eksportujące leki chroniąc w ten sposób komórki przed nabyciem cech oporności [99]. Analiza próbek klinicznych raka jelita grubego wykazała istnienie zależności między ekspresją p53 oraz poziomem P-gp tylko w obecności mutacji w sekwencji kodującej p53 [24]. W innych badaniach przeprowadzonych przez Li i wsp. stwierdzono, że przerzutówce komórki czerniaka złośliwego linii MMAN transfekowane zmutowanym p53 charakteryzowała obniżona wrażliwość na kamptotecynę oraz 2-3-krotny spadek indeksu apoptotycznego, podczas gdy inkubacja komórek MMAN typu dzikiego z kamptotecyną prowadziła do ich apoptozy przez obniżenie poziomu Bcl-2 oraz P-gp [58]. Natomiast obniżenie ekspresji p53 w modelowej linii raka endometrium Hec50 było związane z wykształceniem oporności na gefitynib, będący inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR [3]. Produkty białkowe genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny p53 biorą też udział w procesach adhezji, angiogenezy, migracji komórek oraz kontroli organizacji ECM i cytoszkieletu. Stwierdzono, że utrata funkcjonalności białka p53 jest związana m.in. ze zwiększeniem aktywności GTPaz Rho (RhoA i Rac), zachodzącym z udziałem PI3K/Akt oraz wzrostem aktywności Cdc-42, co zwiększa zdolność komórek nowotworowych do przerzutowania [93].

Pierwszy gen supresorowy związany z procesem przerzutowania, *Nm-23* zidentyfikowano w mysich komórkach czerniaka złośliwego. W badaniach zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wykazano, że spadek jego ekspresji wiąże się ze wzrostem potencjału metastatycznego [106]. Stwierdzono jednocześnie, że ekspresja *Nm-23* wiąże się nie tylko z hamowaniem procesu przerzutowania, ale również ze wzrostem wrażliwości na niektóre leki przeciwnowotworowe. Badania próbek klinicznych niedrobnokomórkowego raka płuc potwierdziły związek między białkiem *Nm-23-H1* a nasileniem apoptozy i wzrostem wrażliwości na DOX [108]. Zaobserwowano też, że komórki raka kolczystokomórkowego przelyki linii YES-2 transfekowane plazmidem zawierającym fragment cDNA *Nm-23-H1* w orientacji antysensowej charakteryzowały się wzrostem oporności na cisplatynę [47]. Mechanizm wykształcania tej oporności wiązał się prawdopodobnie ze wzrostem aktywności Na⁺/K⁺-ATP-azy w odpowiedzi na wewnątrzkomórkową akumulację cisplatyny [64]. Badając próbki kliniczne stwierdzono również, że ekspresja *Nm-23* będącego antymetastatycznym genem raka przelyki wiązała się ze wzrostem wrażliwości na cisplatynę i dłuższym czasem przeżycia pacjentów [109].

Dotychczas zidentyfikowano wiele innych genów supresorowych związanych z metastazą (m.in. *KAI1*, *KiSS1*, *BRMS1* i *MKK4*) [19,111,118], ale ich rola w wykształcaniu oporności wielolekowej nie została jeszcze wyjaśniona.

Proteinazy

Jak już przedstawiono wyżej, aktywność niektórych proteinaz jest związana nie tylko z procesami inwazji i przerzutowania, ale również z opornością na leki przeciwnowotworowe [11,60,81,82]. Stwierdzono, że komórki raka stercza linii PC3 z zablokowaną funkcją genów *uPA* i *uPAR*, wyróżniały się nie tylko znacznym obniżeniem inwazyjności, ale również częściej poddawały się procesowi apoptozy, co może sugerować związek *uPA* i *uPAR* z hamowaniem apoptozy. Sugeruje się, że *uPA* po związaniu się ze swoim receptorem (*uPAR*) aktywuje szlak sygnalizacyjny prowadzący do aktywacji kinaz ERK i białka Stat3 [87]. Wyniki badań D'Alessio i wsp. wykazały, że zahamowanie aktywności *uPAR* w komórkach czerniaka złośliwego za pomocą oligonukleotydów antysensowych obniża tempo namnażania się komórek czerniaka linii M20 oraz powoduje spadek inwazyjności ocenianej *in vitro* w Matrigelu, jak również 78% redukcję przerzutów do płuc i około 45% zmniejszenie masy guza pierwotnego obserwowane w warunkach *in vivo* [22].

Wyniki badań ekspresji *MMP-2* i *MDR1* wykazały, że w przypadku obu genów była ona znacząco wyższa w ogniskach przerzutowych do węzłów chłonnych niż w guzach pierwotnych. Nie stwierdzono jednak istnienia korelacji między ekspresją tych genów w przerzutach do węzłów chłonnych [66]. Uważa się, że zależność między ekspresją *MMP-2* i *MDR1* ma charakter pośredni. Wyniki badań przeprowadzonych z użyciem komórek czerniaka opornych na DOX (M14 ADR) wykazały, że w tym procesie może pośredniczyć receptor CD44. Wydaje się, że P-gp będąca produktem ekspresji *MDR1* działa w kooperacji z CD44 poprzez szlak sygnalizacyjny zachodzący z udziałem kinaz ERK1/2 i MAPK i że aktywacja tego szlaku prowadzi do ekspresji *MMP-2*, *MMP-3* oraz *MMP-9*, powodując wzrost aktywności proteolitycznej i potencjału inwazyjnego badanych komórek [20].

W badaniach potencjału metastatycznego komórek nowotworowych dużo uwagi poświęca się również glikoproteinie CD147, będącej induktorem metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (EMMPRIN, extracellular matrix metaloproteinase inducer). Glikoproteina występuje na powierzchni komórek i uczestniczy w aktywacji szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do transkrypcji genów kodujących metaloproteinazy [67]. Stwierdzono, że nasiloną ekspresją *CD147* jest związana z indukcją wytwarzania MMPs przez fibroblasty i komórki śródbłonka oraz ze wzrostem inwazyjności komórek nowotworowych [37]. Zaobserwowano też, że w opornych komórkach nowotworowych MCF-7/AdrR, poziom CD147 jest znacznie podwyższony w porównaniu z poziomem obserwowanym w komórkach wrażliwych [117]. Komórki te są również odporne na anoikis, tj. na rodzaj programowanej śmierci komórki w wyniku utraty kontaktu z podłożem przez hamowanie proapoptotycznego białka Bim, zachodzące za pośrednictwem szlaku sygnalizacyjnego związanego z kinazami MAP [116]. Stwierdzono również, że zahamowanie ekspre-

sji genu kodującego CD147 za pomocą shRNA uwrażliwiało komórki ludzkiego raka jajnika linii HO-8910 pm na paklitaksel [121].

Białka adhezyjne

Postuluje się, że zmiany ekspresji białek adhezyjnych, tj. kadheryn i integryn mogą także doprowadzić do nasilenia procesów inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych, w tym komórek opornych na chemioterapię.

Kadheryny

Obserwowane często zmniejszenie ekspresji kadheryny E na powierzchni komórek nowotworowych jest związane m.in. z aktywacją szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt prowadzącą do aktywacji czynnika transkrypcyjnego Snail. Następstwem osłabionej adhezji międzykomórkowej wywołanej obniżeniem poziomu kadheryny E jest odłączenie od niej β -kateniny. Białko to przemieszcza się do jądra komórkowego i wchodzi w interakcję z czynnikiem transkrypcyjnym LEF/TCF (lymphoid enhancer factor/T cell factor), który aktywuje ekspresję genów kodujących białka charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych (m.in. wimentynę, integryny oraz receptor CD44). Obniżenie aktywności kadheryny E może także doprowadzić do wzrostu ekspresji genów kodujących kadherynę N i kadherynę 11, których aktywność koreluje ze wzrostem inwazyjności komórek nowotworowych, co stwierdzono m.in. w komórkach raka pęcherza moczowego i raka piersi [79].

Wyniki przytaczanych już badań opublikowanych w *Nature* wykazały natomiast, że zastosowanie miR-200 prowadzące do supresji czynników transkrypcyjnych Snail1/2, Twist i Zeb1/2 promujących EMT powodowało wprawdzie zwiększenie poziomu kadheryny E, ale nie zapobiegało metastazie badanych komórek raka piersi tri-PyMT do płuc. Wykazano natomiast dużo większą ich wrażliwość na cyklofosamid, DOX, paklitaksel i 5-FU [34]. Podobne wyniki przedstawili autorzy drugiej cytowanej pracy opublikowanej w *Nature*, którzy stwierdzili, że delekcja genów *Snail* i *Twist* prowadząca do zahamowania EMT i podwyższenia poziomu kadheryny E nie zapobiegała metastazie komórek gruczolakoraka przewodowego trzustki do płuc i wątroby, natomiast zwiększała wrażliwość nowotworu na leczenie gemcytabiną [119].

Integryny

Omówione wcześniej wyniki badań Lianga i wsp. wykazały, że komórki raka przegrody jamy nosowej odporne na melfalan (RPMI-2650Ml) cechował wzrost podjednostek integrynowych α_2 , α_5 , α_6 , β_1 i β_4 , czemu towarzyszyło zwiększenie aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz wzrost adhezji i nasilona inwazyjność badanych komórek opornych w Matrigelu [60].

Badania Duensinga i wsp. przeprowadzone z użyciem ludzkich komórek raka nerki pochodzących z przerzu-

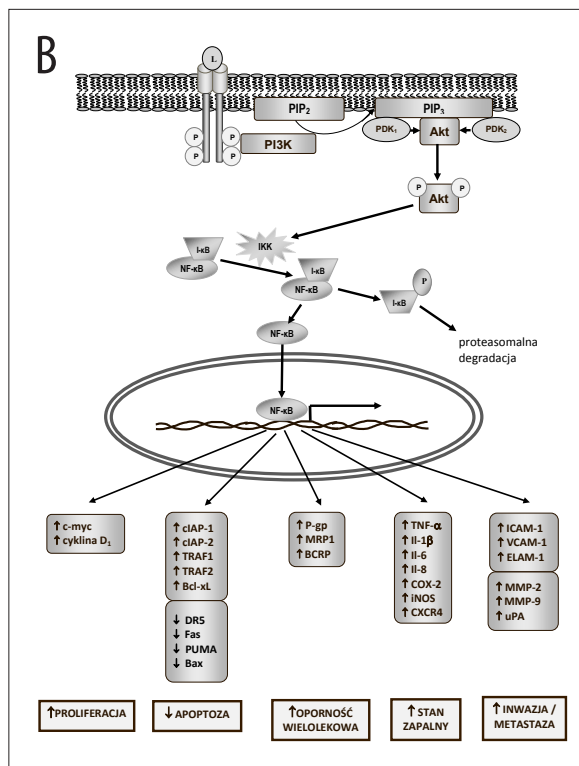
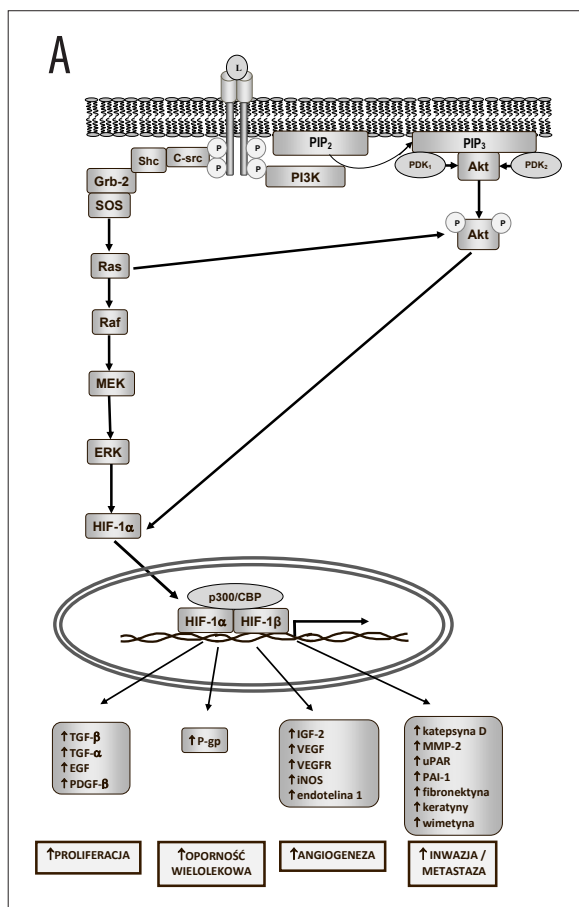
tów skórnych sublinii Caki-1/V1 i Caki-1/V10 opornych na winblastynę, wskazują również na rolę integryny β_1 w kształtowaniu oporności na ten lek. Zaobserwowano wzrost poziomu tej integryny w komórkach Caki-1/V10 hodowanych w obecności winblastyny o wysokim stężeniu (10 ng/ml), w porównaniu do komórek wrażliwych Caki-1 oraz do komórek Caki-1/V1 traktowanych niskim stężeniem winblastyny (1 ng/ml). Komórki odporne Caki-1/V10 wyróżniała również najbardziej nasilona adhezja do kolagenu typu IV [29]. Damiano i wsp. badali natomiast rolę receptorów integrynowych dla fibronektyny ($\alpha_4\beta_1$ i $\alpha_5\beta_1$) w wykształcaniu oporności komórek nowotworowych na DOX i melfalan z użyciem komórek szpiczaka mnogiego linii RPMI 8226, w których wykryto obecność obu receptorów. Zaobserwowano, że komórki po opłaszczeniu fibronektyną stawały się bardziej odporne na te chemioterapeutyki niż komórki hodowane w zawiesinie [23].

Interesujące wyniki uzyskano również z użyciem wysoce inwazyjnych komórek MCF-7/ADR opornych na DOX, które charakteryzowały się podwyższonym poziomem integryny α_6 oraz obniżoną ilością integryny α_2 w porównaniu z komórkami linii wrażliwej MCF-7. Stwierdzono bowiem, że dodanie do hodowli przeciwciał skierowanych przeciwko α_6 i β_1 całkowicie hamowało inwazję komórek opornych MCF-7/ADR [76]. Wykazano również, że integryna β_1 jest także zaangażowana w rozwój oporności linii komórkowych raka piersi z nadekspresją receptora typu 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER-2) na lapatynib i trastuzumab [46].

W komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc linii PC9 zaobserwowano też, że erlotynib będący inhibitorem receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) powodował wzrost poziomu integryny β_1, α_2 i α_5 oraz nasilenie adhezji komórkowej. Zablokowanie wytwarzania integryny β_1 za pomocą siRNA przywracało komórkom wrażliwość na ten lek przez obniżenie aktywności kinaz Src i Akt [48].

Receptor CD44

Na istnienie zależności między fenotypem przerzutowym i opornością wielolekową komórek nowotworowych wskazuje również związek między receptorem kwasu hialuronowego, tj. CD44 i P-gp. Wykorzystując mikroskopię konfokalną oraz metodę rezonansowego fluorescencyjnego przeniesienia energii (FRET) stwierdzono ich kolokalizację w jednej mikrodomenie błonowej komórek nowotworowych [6] oraz wykazano wspólną kontrolę ekspresji genów kodujących te białka [69]. Wydaje się, że mechanizm oddziaływania pobudzonego przez hialuronian receptora CD44 na poziom i aktywność białek ABC zaangażowanych w wykształcanie fenotypu oporności wielolekowej może być związany ze stabilizacją tych transporterów przez bliskie sąsiedztwo w błonie. Stwierdzono bowiem, że zastosowanie antagonisty kwasu hialuronowego powoduje szybką internalizację zarówno białek ABC, jak i CD44 do



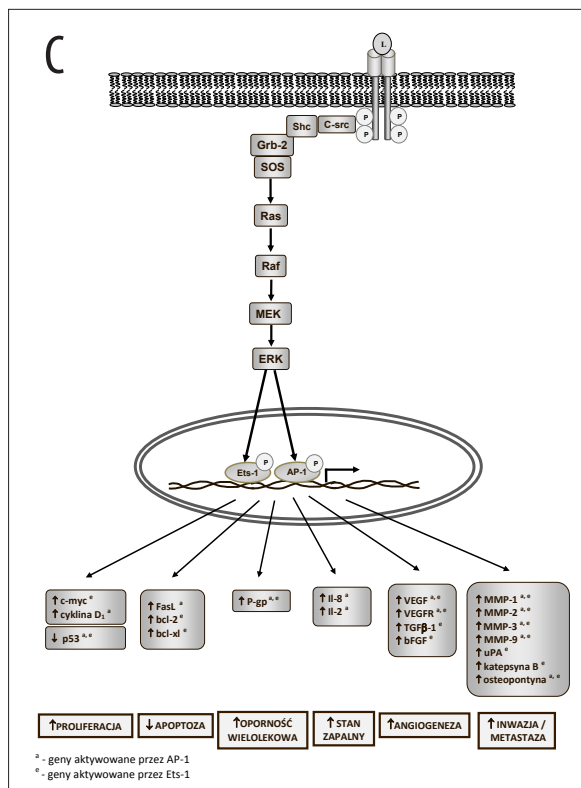
Ryc. 2. Schematy szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do ekspresji genów, związanych z wykształcaniem potencjału metastazy komórek nowotworowych opornych na chemioterapię, znajdujących się pod kontrolą następujących czynników transkrypcyjnych:

A) HIF-1α, Akt – cytoplazmatyczna kinaza serynowo-treoninowa, EGF – naskórkowy czynnik wzrostu, ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (extracellular signal-regulated kinase), Grb2 – białko adapterowe, HIF-1α,β – czynniki indukowane przez hipoksję, IGF-2 – insulinopodobny czynnik wzrostu, iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu, L – ligand, MEK – aktywator kinazy ERK, MMP-2 – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2 (matrix metalloproteinase 2), p300/CBP – koaktywator transkrypcyjny wiążący cykliczny monofosforan adenyliczny (cAMP), PAI-1 – inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1, PDGF-β – płytkopochodny czynnik wzrostu β, PDK 1, 2 – kinazy zależne od trifosforanu inozytoli, P – grupa fosforanowa, P-gp – glikoproteina P, PI3K – kinaza fosfatydyloinozytoli 3, PIP2 – inozytolo-(1,4)-difosforan, PIP3 – inozytolo-(1,4,5)-trifosforan, Raf – cytoplazmatyczna kinaza serynowo-treoninowa, Ras – małe białko G o aktywności GTPazy, Shc – białko adapterowe, SOS – aktywator wymiany nukleotydów guaninowych, C-src – cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa, TGF-α, β – transformujące czynniki wzrostu α i β, uPAR – receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń, VEGFR – receptor czynnika wzrostu śródbłonnka naczyń

B) NF-κB, Akt – cytoplazmatyczna kinaza serynowo-treoninowa, Bax – białko proapoptyczne z podrodziny Bcl-2 (Bcl-2-associated protein X), Bcl-xL – białko antyapoptyczne (B-cell lymphoma-extra-large), BCRP – białko oporności raka piersi (breast cancer resistant protein), cIAP-1, 2 – białka komórkowe hamujące apoptozę 1, 2 (cellular inhibitors of apoptosis 1, 2), c-myc – czynnik transkrypcyjny regulujący cykl komórkowy, COX-2 – cyklooksygenaza-2, CXCR4 – receptor chemokiny C-X-C typu 4, DR5 – receptor śmierci 5 (death receptor 5), ELAM-1 – cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłonnka (endothelial-leukocyte adhesion molecule), Fas – receptor śmierci związany z apoptozą komórek, ICAM-1 – cząsteczka adhezji uczestnicząca w przyleganiu komórek (intracellular adhesion molecule), IKK – kinaza inhibitora czynnika jądrowego kapp B (IκB), IL-1β – interleukina 1β, IL-6, 8 – interleukiny-6, -8, iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu, I-κB – inhibitor czynnika jądrowego kapp B (NF-κB), L – ligand, MMP-2, MMP-9 – metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej 2, 9 (matrix metalloproteinases 2,9), MRP1 – białko związane z opornością wielolekową (multidrug related resistance protein 1), NF-κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny kapp B, P – grupa fosforanowa, P-gp – glikoproteina P, PDK 1, 2 – kinazy zależne od trifosforanu inozytoli, P-gp – glikoproteina P, PI3K – kinaza fosfatydyloinozytoli 3, PIP2 – inozytolo-(1,4)-difosforan, PIP3 – inozytolo-(1,4,5)-trifosforan, PUMA – białko proapoptyczne należące do podrodziny BH3-only (p53 upregulated modulator of apoptosis), TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α (tumour necrosis factor α), TRAF – białko adaptorowe wiążące się do receptora TNF (TNF-R associated factor), uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu, VCAM – cząsteczka adhezji do śródbłonnka naczyń (vascular cell adhesion molecule)

wewnątrz komórek [70]. Postuluje się także, że CD44 może odpowiadać za kontakt P-gp z cytoszkieletem komórek. Stwierdzono jednocześnie, że związki oddziałujące z P-gp wpływają na internalizację CD44 [69].

Zaobserwowano również, że zastosowanie substratów P-gp (np. winblastyny) oraz zahamowanie ekspresji *MDR1* za pomocą siRNA ograniczało migrację i zmniejszało inwazyjność komórek opornych raka piersi wywodzących się z linii MCF-7 i raka jajnika wyprowadzonych z linii A2780 w warunkach *in vitro* [69]. Wyniki badań



C) Ets-1 i AP-1, AP-1 – białko aktywujące 1 (activator protein 1), Bcl-2 – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy (B-cell leukemia/lymphoma-2), Bcl-xL – białko antyapoptotyczne (B-cell lymphoma-extralarge), bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, c-myc – czynnik transkrypcyjny regulujący cykl komórkowy, ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (extracellular signal-regulated kinase), Ets1 – czynnik transkrypcyjny swoisty w stosunku do E26 (E26 transformation specific), FasL – ligand receptora Fas, Grb2 – białko adapterowe, IL-2, 8 – interleukiny -2,-8, L – ligand, MEK – aktywator kinazy ERK, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 1, 2, 3, 9 (matrix metalloproteinases), P – grupa fosforanowa, p53 – białko o masie cząsteczkowej wynoszącej 53 kDa będące supresorem nowotworów, P-gp – glikoproteina P, Raf – kinaza serynowo-treoninowa, Ras – mała białka G o aktywności GTPazy, Shc – białko adapterowe, SOS – aktywator wymiany nukleotydów guaninowych, C-src – cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa, TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu β-1, uPA – urokinazowy aktywator plazminogenu, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, VEGFR – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń

przeprowadzonych z użyciem komórek opornych czerniaka złośliwego M14 ADR charakteryzujących się fenotypem inwazyjnym wskazują również, że P-gp i CD44 mogą współuczestniczyć w procesach prowadzących do wzrostu migracji i inwazyjności komórek nowotworowych [74]. Ohashi i wsp. także uważają, że powstanie fenotypu opornego niedrobnokomórkowego raka płuc zależy od interakcji między CD44 i kwasem hialuronowym, będącym jego ligandem. Zaobserwowano bowiem, że komórki H322 transfekowane genem *CD44* hodowane w naczyniach opłaszczonych kwasem hialuronowym stawały się bardziej odporne na cisplatynę niż komórki hodowane w medium kontrolnym z dodatkiem

BSA. Cechowała je też zwiększona ekspresja *MRP2*. Jednocześnie wykazano, że zastosowanie MK571, będącego inhibitorem *MRP2* przywracało komórkom wrażliwość na cisplatynę [80]. Stwierdzono też, że traktowanie komórek opornych raka piersi MCF-7/Adr małymi oligomerami kwasu hialuronowego powodowało zablokowanie aktywacji *CD44* oraz prowadziło do przywrócenia wrażliwości badanych komórek opornych na wiele leków przeciwnowotworowych, m.in. DOX, taksol, winkrystynę oraz metotreksat [71].

Wykazano jednocześnie, że wytwarzanie hialuronianu stymuluje induktor metaloproteinaz, tj. *CD147* występujący w błonie komórkowej w bliskim sąsiedztwie *CD44*. Przypuszcza się, że wiele skutków nadmiernego wytwarzania kwasu hialuronowego jest związane z nadekspresją *CD147* [67,71]. Wyniki badań prowadzonych przez Li i wsp. wskazują, że kwas hialuronowy, jego receptor, tj. *CD44* oraz *CD147* mogą współdziałać w wykształcaniu oporności wielolekowej komórek nowotworowych na kilku poziomach, m.in. przez wpływ na szlaki związane z przeżyciem komórek oraz przez nasilenie ekspresji genów kodujących transportery ABC [59]. Stwierdzono m.in., że traktowanie komórek opornych raka piersi MCF-7/Adr substratami P-gp, tj. winkrystyną, paklitakselem i DOX prowadzi do wzrostu poziomu *CD147*, *MMP-2*, *MMP-9* i *EGFR* oraz do zwiększenia inwazyjności badanych komórek opornych [59].

SZLAKI SYGNALIZACYJNE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH ZWIĄZANE Z REGULACJĄ EKSPRESJI GENÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA WYKSZTAŁCANIE FENOTYPU OPORNOŚCIOWEGO I PRZERZUTOWEGO KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Wyniki licznych badań wskazują, że geny zaangażowane w powstawanie fenotypu opornościowego i przerzutowego komórek nowotworowych są regulowane przez te same szlaki komórkowe przekazywania sygnałów. Należą do nich m.in. szlaki prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych HIF-1α, NF-κB, Ets1 oraz AP-1, pod których kontrolą znajdują się geny odpowiedzialne za wykształcanie potencjału metastatycznego komórek o oporności wielolekowej (ryc. 2).

Kinaza fosfatydyloinozytolu-3 (PI3K) i aktywowana przez nią kinaza Akt tworzą jedno z najważniejszych ogniw przekazujących sygnały w komórkach nowotworowych, zaangażowane w nabywanie przez nie cech opornościowych i inwazyjnych. Wiadomo, że aktywność antyapoptotycznego szlaku sygnalizacyjnego PI3K/Akt jest zwiększona w wielu rodzajach nowotworów, co wiąże się również z nasiloną ekspresją genów kodujących transportery ABC (P-gp, *MRP1* i *BCRP*) zaangażowane w wykształcanie oporności wielolekowej komórek nowotworowych [56,70,73]. Obserwowane obniżenie wrażliwości komórek nowotworowych na stosowane leki przeciwnowotworowe, po ich kontakcie z lamininą (będącą jednym z głównych białek błony podstawnej) bądź Matrigelem, może być skutkiem zahamowania apoptozy na drodze zależnej od kinazy Akt. Uważa się, że kontakt składników ECM (m.in. fibronektyny, lami-

niny oraz kolagenu IV) z ich receptorami integrynowymi $\beta 1$ uruchamia kaskadę przeżyciową zależną od kinaz PI3K/Akt [15]. W komórkach raka jelita grubego opornych na oksaliplatinę zaobserwowano też obniżoną aktywność receptora śmierci Fas i wzrost poziomu MMP-7 oraz rozregulowanie szlaku sygnalizacyjnego zachodzącego z udziałem kinaz aktywowanych mitogenami (MAPKs). Zablockowanie działania MMP-7 przez 1,10-fenantrolinę lub zahamowanie ekspresji MMP-7 z użyciem siRNA przywracało wrażliwość badanych komórek na oksaliplatinę i zdolność do indukcji apoptozy [4].

Szlak PI3K/Akt wpływa także na aktywację czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α w warunkach niedotlenienia komórki, co wywołuje m.in. wzrost aktywności kinazy ogniskowo-adhezyjnej FAK. Wykształcanie fenotypu przerzutowego komórek nowotworowych zależy w dużym stopniu od aktywności kinazy Src, która pobudza FAK, odpowiedzialną za kontrolę proliferacji komórek i ich zdolności do przeżywania oraz regulację rozprzestrzeniania się i adhezji [44]. Zależność między poziomem FAK oraz stopniem zaawansowania klinicznego nowotworów i ich zdolnością do przerzutowania potwierdzono wynikami analizy próbek klinicznych, m.in. raka stercza [94], piersi, jelita grubego [16,84] oraz mięsaków [84]. Wykazano, że nadmierna aktywność HIF-1 α powoduje wzrost poziomu ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za proliferację, oporność wielolekową, stymulowanie angiogenezy oraz inwazję i przerzutowanie komórek nowotworowych [55,107]. Inną, alternatywną drogą aktywacji HIF-1 α jest szlak kinaz Raf/MEK1/ERK, inicjowany przez receptory czynników wzrostowych i białka Ras [52] (ryc. 2a).

Innym ważnym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez kinazy PI3K/Akt jest NF- κ B (ryc. 2b). Wiadomo, że czynnik ten wpływa na ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne (m.in. TNF- α , IL-1 β , IL-6 i -8) oraz inne czynniki uczestniczące w rozwoju stanów zapalnych (m.in. COX-2, iNOS i CXCR4). Wykazano również, że NF- κ B odpowiada za indukcję ekspresji wielu genów związanych z proliferacją komórek nowotworowych (m.in. *c-myc* i genu kodującego cyklinę D), jak również procesami przeżyciowymi (jest aktywatorem ekspresji genów wielu białek antyapoptotycznych, m.in. *ciAP-1*, *ciAP-2*, *TRAF1*, *TRAF2* i *Bcl-xL* oraz prowadzi do zahamowania ekspresji ważnych genów proapoptotycznych, m.in. *DR5*, *Fas*, *PUMA* i *Bax*). Stwierdzono także, że NF- κ B aktywuje ekspresję genów oporności wielolekowej, tj. *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* [62,101,110] oraz bierze udział w kształtowaniu fenotypu inwazyjnego/przerzutowego przez indukcję genów kodujących białka adhezyjne (m.in. *ICAM-1*, *VCAM-1*, *ELAM-1*) oraz proteiny odpowiedzialne za trawienie ECM (m.in. *MMP-2* i *MMP-9* oraz *uPA*). NF- κ B może również pośrednio aktywować *MMP-2* i *uPA* z zaangażowaniem prozapalnej COX-2 [62,107].

W badaniach dotyczących szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do wykształcania potencjału metastatycznego komórek nowotworowych opornych na chemioterapeu-

tyki dużo uwagi poświęca się również szlakom wywołującym aktywację czynników transkrypcyjnych AP-1 i Ets-1 (ryc. 2c). Aktywacja czynników AP-1 i Ets1 jest regulowana przez kinazy serynowo-treoninowe aktywowane mitogenami (MAPKs), które przekazują sygnały inicjowane przez czynniki wzrostu, cytokiny, hormony oraz interakcje „komórka-komórka” i „komórka-ECM”. Czynniki te aktywują szlaki zachodzące z udziałem ERK1/2, JNK/SAPK oraz p38 [113]. Miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny AP-1 znajduje się w sekwencjach promotorowych większości *MMPs* [113]. Aktywuje on też ekspresję genów, których produkty białkowe uczestniczą w rozwoju stanów zapalnych oraz w regulacji proliferacji komórkowej, stymulowaniu angiogenezy, rozwoju oporności wielolekowej oraz nabywaniu potencjału metastatycznego komórek nowotworowych. Czynnikiem transkrypcyjnym Ets1 aktywuje również geny związane z regulacją proliferacji oraz powstaniem fenotypu opornościowego i inwazyjnego komórek nowotworowych [26]. Wydaje się, że interakcja między Ets1 i p53 jest głównym mechanizmem prowadzącym do nadekspresji *MDR1* w komórkach kostniakomięsaka i raka jelita grubego [95]. Stwierdzono również, że wzrost ekspresji *Ets1* w różnych subliniach opornych komórek raka piersi MCF-7 wiąże się z nasileniem transkrypcji *MDR1*, *MMP-1* i *MMP-9* oraz TGF- β 1, co indukuje zmiany zwiększające wytwarzanie proangiogennych czynników VEGF i bFGF [50].

Wykazano również, że kwas hialuronowy stymuluje aktywację szlaków sygnalizacyjnych zachodzących z udziałem PI3K/Akt, ErbB2, β -kateniny oraz COX-2 [72]. Stwierdzono m.in., że interakcja hialuronianu z CD44 prowadzi do aktywacji wielu receptorowych kinaz tyrozynowych oddziałujących z EGF, IGF, HGF i PDGF. Pobudzany przez kwas hialuronowy receptor CD44 jest także aktywatorem szlaków sygnalizacyjnych zachodzących z udziałem białek Ras, co prowadzi do nasilenia fenotypu inwazyjnego komórek nowotworowych [17].

Stwierdzono także udział szlaków sygnalizacyjnych z zaangażowaniem kinazy białkowej C (PKC) i kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) w aktywowaniu ekspresji *MDR1* i *MMP-9* w komórkach opornych rMCF-7, co wskazuje na znaczącą rolę tych szlaków w wykształcaniu fenotypu metastatycznego komórek nowotworowych o oporności wielolekowej [49].

PODSUMOWANIE

Wyniki licznych badań wskazują, że geny zaangażowane w powstawanie fenotypu opornościowego i przerzutowego komórek nowotworowych są regulowane przez te same szlaki komórkowe przekazywania sygnałów. Dlatego też identyfikacja głównych czynników komórkowych odpowiedzialnych za wykształcanie potencjału metastatycznego komórek nowotworowych o oporności wielolekowej może doprowadzić do opracowania skutecznych strategii leczenia nowotworów metastatycznych opornych na konwencjonalną chemioterapię.

PISMIENICTWO

- [1] Aguirre Ghiso J.A., Alonso D.F., Farfás E.F., Gomez D.E., de Kier Joffé E.B.: Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 263: 295-304
- [2] Ahn K.S., Bae E., Jeon S.S., Yoon S.S., Lee Y.Y., Choi H.Y.: Microenvironment effects on promoting upregulation of matrix metalloproteinases in bcl-2-overexpressing renal cell carcinoma as a response to doxorubicin treatment inducing the production of metastasis. *Tumour Biol.*, 2007; 28: 181-188
- [3] Albitar L., Carter M.B., Davies S., Leslie K.K.: Consequences of the loss of p53, RB1, and PTEN: relationship to gefitinib resistance in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2007; 106: 94-104
- [4] Almendro V., Ametller E., García-Recio S., Collazo O., Casas I., Augé J.M., Maurel J., Gascón P.: The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin. *PLoS One*, 2009; 4: e4728
- [5] Backos D.S., Franklin C.C., Reigan P.: The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, 2012; 83: 1005-1012
- [6] Bacso Z., Nagy H., Goda K., Bene L., Fenyvesi F., Matkó J., Szabó G.: Raft and cytoskeleton associations of an ABC transporter: P-glycoprotein. *Cytometry A*, 2004; 61: 105-116
- [7] Baker A.M., Bird D., Welti J.C., Gourlaouen M., Lang G., Murray G.I., Reynolds A.R., Cox T.R., Erler J.T.: Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer Res.*, 2013; 73: 583-594
- [8] Belotti D., Rieppi M., Nicoletti M.I., Casazza A.M., Fojo T., Taraboletti G., Giavazzi R.: Paclitaxel (Taxol[®]) inhibits motility of paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 1996; 2: 1725-1730
- [9] Bénard J.: Genetic alterations associated with metastatic dissemination and chemoresistance in neuroblastoma. *Eur. J. Cancer*, 1995; 31A: 560-564
- [10] Benbow U., Maitra R., Hamilton J.W., Brinckerhoff C.E.: Selective modulation of collagenase 1 gene expression by the chemotherapeutic agent doxorubicin. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 203-208
- [11] Bjørnland K., Lehne G., Johansen H.T., Fodstad O., Rugstad H.E., Aasen A.O., Ree A.H.: Human hepatoma cells rich in P-glycoprotein display enhanced in vitro invasive properties compared to P-glycoprotein-poor hepatoma cells. *Oncol. Res.*, 1998; 10: 255-262
- [12] Bratland A., Ragnhildstveit E., Bjørnland K., Andersen K., Maelandsmo G.M., Fodstad O., Saatcioglu F., Ree A.H.: The metalloproteinase inhibitor TIMP-2 is down-regulated by androgens in LNCaP prostate carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2003; 20: 541-547
- [13] Bressin C., Bourgarel-Rey V., Carré M., Pourroy B., Arango D., Braguer D., Barra Y.: Decrease in c-Myc activity enhances cancer cell sensitivity to vinblastine. *Anticancer Drugs*, 2006; 17: 181-187
- [14] Brock I., Hipfner D.R., Nielsen B.S., Jensen P.B., Deeley R.G., Cole S.P., Sehested M.: Sequential coexpression of the multidrug resistance genes MRP and mdr1 and their products in VP-16 (etoposide)-selected H69 small cell lung cancer cells. *Cancer Res.*, 1995; 55: 459-462
- [15] Broxterman H.J., Lankelma J., Hoekman K.: Resistance to cytotoxic and anti-angiogenic anticancer agents: similarities and differences. *Drug Resist. Updat.*, 2003; 6: 111-127
- [16] Cance W.G., Harris J.E., Iacocca M.V., Roche E., Yang X., Chang J., Simkins S., Xu L.: Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.*, 2000; 6: 2417-2423
- [17] Cheng C., Yaffe M.B., Sharp P.A.: A positive feedback loop couples Ras activation and CD44 alternative splicing. *Genes Dev.*, 2006; 20: 1715-1720
- [18] Choi J., Choi K., Benveniste E.N., Rho S.B., Hong Y.S., Lee J.H., Kim J., Park K.: Bcl-2 promotes invasion and lung metastasis by inducing matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res.*, 2005; 65: 5554-5560
- [19] Cicek M., Fukuyama R., Welch D.R., Sizemore N., Casey G.: Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor-κB activity. *Cancer Res.*, 2005; 65: 3586-3595
- [20] Colone M., Calcabrini A., Toccaceli L., Bozzuto G., Stringaro A., Gentile M., Cianfriglia M., Ciervo A., Caraglia M., Budillon A., Meo G., Arancia G., Molinari A.: The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion? *J. Invest. Dermatol.*, 2008; 128: 957-971
- [21] Cox G., Steward W.P., O'Byrne K.J.: The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax*, 1999; 54: 169-179
- [22] D'Alessio S., Margheri F., Pucci M., Del Rosso A., Monia B., Bologna M., Leonetti C., Scarsella M., Zupi G., Fibbi G., Del Rosso M.: Antisense oligodeoxynucleotides for urokinase-plasminogen activator receptor have anti-invasive and anti-proliferative effects in vitro and inhibit spontaneous metastases of human melanoma in mice. *Int. J. Cancer*, 2004; 110: 125-133
- [23] Damiano J.S., Cress A.E., Hazlehurst L.A., Shtil A.A., Dalton W.S.: Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 1999; 93: 1658-1667
- [24] de Kant E., Heide I., Thiede C., Herrmann R., Rochlitz C.F.: MDR1 expression correlates with mutant p53 expression in colorectal cancer metastases. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1996; 122: 671-675
- [25] Ding X.W., Wu J.H., Jiang C.P.: ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.*, 2010; 86: 631-637
- [26] Dittmer J.: The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol. Cancer*, 2003; 2: 29
- [27] Dong Z., Radinsky R., Fan D., Tsan R., Bucana C.D., Wilmanns C., Fidler I.J.: Organ-specific modulation of steady-state mdm gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1994; 86: 913-920
- [28] Dozmorov M.G., Kyker K.D., Saban R., Knowlton N., Dozmorov I., Centola M.B., Hurst R.E.: Analysis of the interaction of extracellular matrix and phenotype of bladder cancer cells. *BMC Cancer*, 2006; 6: 12
- [29] Duensing S., Brevis Nunez F., Meyer N., Anastassiou G., Nasarek A., Grosse J., Buer J., Probst M., Ganser A., Alzpodien J.: Exposure to vinblastine modulates beta 1 integrin expression and in vitro binding to extracellular matrix molecules in a human renal carcinoma cell line. *Invasion Metastasis*, 1996; 16: 65-72
- [30] Eccles S.A.: Cell biology of lymphatic metastasis. The potential role of c-erbB oncogene signalling. *Recent Results Cancer Res.*, 2000; 157: 41-54
- [31] Fidler I.J.: Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1999; 43, Suppl.: S3-S10
- [32] Fidler I.J.: Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 1991; 10: 229-243
- [33] Fidler I.J.: The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev.*, 2003; 3: 453-458
- [34] Fischer K.R., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S.T., Choi

- H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J., Schwabe R.F., Vahdat L.T., Altorki N.K., Mittal V., Gao D.: Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 2015; 527: 472-476
- [35] Funato T., Kozawa K., Fujimaki S., Miura T., Kaku M.: Increased sensitivity to cisplatin in gastric cancer by antisense inhibition of the *her-2/neu* (*c-erbB-2*) gene. *Chemotherapy*, 2001; 47: 297-303
- [36] Futaki S., Hayashi Y., Yamashita M., Yagi K., Bono H., Hayashizaki Y., Okazaki Y., Sekiguchi K.: Molecular basis of constitutive production of basement membrane components. Gene expression profiles of Engelbreth-Holm-Swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 50691-50701
- [37] Guo H., Zucker S., Gordon M.K., Toole B.P., Biswas C.: Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 24-27
- [38] Guo Y.S., Jin G.F., Houston C.W., Thompson J.C., Townsend C.M.Jr.: Insulin-like growth factor-I promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells. *J. Cell. Physiol.*, 1998; 175: 141-148
- [39] Harbeck N., Alt U., Berger U., Krüger A., Thomssen C., Jänicke F., Höfler H., Kates R.E., Schmitt M.: Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7: 2757-2764
- [40] Harisi R., Dudás J., Pogány G., Timár F., Oláh J.N., Szendroi M., Jeney A.: Repopulation of osteosarcoma cells after treatment with doxorubicin in the presence of extracellular matrix biopolymers. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2006; 58: 334-342
- [41] Harisi R., Dudás J., Timár F., Pogány G., Paku S., Timár J., Kovalszky I., Szendroi M., Jeney A.: Antiproliferative and antimigratory effects of doxorubicin in human osteosarcoma cells exposed to extracellular matrix. *Anticancer Res.*, 2005; 25: 805-813
- [42] Harisi R., Dudás J., Timár F., Pogány G., Timár J., Kovalszky I., Szendroi M., Jeney A.: Invasive growth and topoisomerase-switch induced by tumorous extracellular matrix in osteosarcoma cell culture. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 959-967
- [43] Harrington K.J., Syrigos K.N.: The role of E-cadherin-catenin complex: more than an intercellular glue? *Ann. Surg. Oncol.*, 2000; 7: 783-788
- [44] Hiscox S., Jordan N.J., Morgan L., Green T.P., Nicholson R.I.: Src kinase promotes adhesion-independent activation of FAK and enhances cellular migration in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2007; 24: 157-167
- [45] Hiscox S., Morgan L., Barrow D., Dutkowskil C., Wakeling A., Nicholson R.I.: Tamoxifen resistance in breast cancer cells is accompanied by an enhanced motile and invasive phenotype: inhibition by gefitinib (*Iressa*, ZD1839). *Clin. Exp. Metastasis*, 2004; 21: 201-212
- [46] Huang C., Park C.C., Hilsenbeck S.G., Ward R., Rimawi M.F., Wang Y.C., Shou J., Bissell M.J., Osborne C.K., Schiff R.: $\beta 1$ integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res.*, 2011; 13: R84
- [47] Iizuka N., Hirose K., Noma T., Hazama S., Tangoku A., Hayashi H., Abe T., Yamamoto K., Oka M.: The nm23-H1 gene as a predictor of sensitivity to chemotherapeutic agents in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 1999; 81: 469-475
- [48] Kanda R., Kawahara A., Watari K., Murakami Y., Sonoda K., Mameda M., Fujita H., Kage M., Uramoto H., Costa C., Kuwano M., Ono M.: Erlotinib resistance in lung cancer cells mediated by integrin $\beta 1$ /Src/Akt-driven bypass signaling. *Cancer Res.*, 2013; 73: 6243-6253
- [49] Karroum A., Mirshahi P., Benabbou N., Faussat A.M., Soria J., Therwath A., Mirshahi M., Hatmi M.: Matrix metalloproteinase-9 is required for tubular network formation and migration of resistant breast cancer cells MCF-7 through PKC and ERK1/2 signalling pathways. *Cancer Lett.*, 2010; 295: 242-251
- [50] Kars M.D., Işeri O.D., Gündüz U.: Drug resistant breast cancer cells overexpress ETS1 gene. *Biomed. Pharmacother.*, 2010; 64: 458-462
- [51] Kerbel R.S.: Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 505-515
- [52] Kimbro K.S., Simons J.W.: Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 2006; 13: 739-749
- [53] Knez L., Sodja E., Kern I., Košnik M., Cufer T.: Predictive value of multidrug resistance proteins, topoisomerases II and ERCC1 in small cell lung cancer: a systematic review. *Lung Cancer*, 2011; 72: 271-279
- [54] Kouniavsky G., Khaikin M., Zvibel I., Zippel D., Brill S., Halpern Z., Papa M.: Stromal extracellular matrix reduces chemotherapy-induced apoptosis in colon cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis*, 2002; 19: 55-60
- [55] Krishnamachary B., Berg-Dixon S., Kelly B., Agani F., Feldser D., Ferreira G., Iyer N., LaRusch J., Pak B., Taghavi P., Semenza G.L.: Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.*, 2003; 63: 1138-1143
- [56] Lee J.T. Jr, Steelman L.S., McCubrey J.A.: Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 8397-8404
- [57] Li C., Teng R.H., Tsai Y.C., Ke H.S., Huang J.Y., Chen C.C., Kao Y.L., Kuo C.C., Bell W.R., Shieh B.: H-Ras oncogene counteracts the growth-inhibitory effect of genistein in T24 bladder carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, 2005; 92: 80-88
- [58] Li G., Bush J.A., Ho V.C.: p53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 114: 514-519
- [59] Li Q.Q., Wang W.J., Xu J.D., Cao X.X., Chen Q., Yang J.M., Xu Z.D.: Up-regulation of CD147 and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells. *Cancer Sci.*, 2007; 98: 1767-1774
- [60] Liang Y., Meleady P., Cleary I., McDonnell S., Connolly L., Clynes M.: Selection with mephalan or paclitaxel (Taxol) yields variants with different patterns of multidrug resistance, integrin expression and in vitro invasiveness. *Eur. J. Cancer*, 2001; 37: 1041-1052
- [61] Liang Y., O'Driscoll L., McDonnell S., Doolan P., Oglesby I., Duffy K., O'Connor R., Clynes M.: Enhanced in vitro invasiveness and drug resistance with altered gene expression patterns in a human lung carcinoma cell line after pulse selection with anticancer drugs. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 484-493
- [62] Lin Y., Bai L., Chen W., Xu S.: The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2010; 14: 45-55
- [63] Liu B., Staren E., Iwamura T., Appert H., Howard J.: Effects of Taxotere on invasive potential and multidrug resistance phenotype in pancreatic carcinoma cell line SUIT-2. *World J. Gastroenterol.*, 2001; 7: 143-148
- [64] Lizuka N., Miyamoto K., Tangoku A., Hayashi H., Hazama S., Yoshino S., Yoshimura K., Hirose K., Yoshida H., Oka M.: Downregulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na⁺, K⁺-ATPase. *Br. J. Cancer*, 2000; 83: 1209-1215
- [65] Loe D.W., Deeley R.G., Cole S.P.: Characterization of vincristine transport by the M_r 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.*, 1998; 58: 5130-5136
- [66] Lu L.S., Chen L., Ding W.X., Li K., Wu J.J.: Elevated expression of both MDR1 and MMP-2 genes in metastasized lymph node of

invasive ductal breast cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2012; 16: 2037-2043

[67] Marieb E.A., Zoltan-Jones A., Li R., Misra S., Ghatak S., Cao J., Zucker S., Toole B.P.: Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res.*, 2004; 64: 1229-1232

[68] Meng Q., Mason J.M., Porti D., Goldberg I.D., Rosen E.M., Fan S.: Hepatocyte growth factor decreases sensitivity to chemotherapeutic agents and stimulates cell adhesion, invasion, and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 274: 772-779

[69] Miletto-González K.E., Chen S., Muthukumar N., Saglimbeni G.N., Wu X., Yang J., Apolito K., Shih W.J., Hait W.N., Rodríguez-Rodríguez L.: The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res.*, 2005; 65: 6660-6667

[70] Misra S., Ghatak S., Toole B.P.: Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20310-20315

[71] Misra S., Ghatak S., Zoltan-Jones A., Toole B.P.: Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 25285-25288

[72] Misra S., Obeid L.M., Hannun Y.A., Minamisawa S., Berger F.G., Markwald R.R., Toole B.P., Ghatak S.: Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 14335-14344

[73] Mogi M., Yang J., Lambert J.F., Colvin G.A., Shiojima I., Skurk C., Summer R., Fine A., Quesenberry P.J., Walsh K.: Akt signaling regulates side population cell phenotype via Bcrp1 translocation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 39068-39075

[74] Molinari A., Stringaro A., Gentile M., Colone M., Toccaceli L., Arancia G.: Invasive properties of multidrug resistant human melanoma cells. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 2005; 110: 135-141

[75] Nakamura Y., Sato H., Motokura T.: Development of multidrug resistance due to multiple factors including P-glycoprotein overexpression under K-selection after MYC and HRAS oncogene activation. *Int. J. Cancer*, 2006; 118: 2448-2454

[76] Narita T., Kimura N., Sato M., Matsuura N., Kannagi R.: Altered expression of integrins in adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 1998; 18: 257-262

[77] Noguchi K., Katayama K., Sugimoto Y.: Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmgenomics Pers. Med.*, 2014; 7: 53-64

[78] Nokihara H., Yano S., Nishioka Y., Hanibuchi M., Higasida T., Tsuruo T., Sone S.: A new quinoline derivative MS-209 reverses multidrug resistance and inhibits multiorgan metastases by P-glycoprotein-expressing human small cell lung cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2001; 92: 785-792

[79] Nollet F., Berx G., van Roy F.: The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.*, 1999; 2: 77-85

[80] Ohashi R., Takahashi F., Cui R., Yoshioka M., Gu T., Sasaki S., Tomimaga S., Nishio K., Tanabe K.K., Takahashi K.: Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett.*, 2007; 252: 225-234

[81] Osmak M., Nikšić D., Brozović A., Ristov A.A., Vrhovec I., Skrk J.: Drug resistant tumor cells have increased levels of tumor markers for invasion and metastasis. *Anticancer Res.*, 1999; 19: 3193-3197

[82] Osmak M., Svetič B., Gabrijelčić-Geiger D., Skrk J.: Drug-resistant human laryngeal carcinoma cells have increased levels of cathepsin B. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 481-483

[83] Osmak M., Vrhovec I., Skrk J.: Cisplatin resistant glioblastoma cells may have increased concentration of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J. Neurooncol.*, 1999; 42: 95-102

[84] Owens L.V., Xu L., Marston W.A., Yang X., Farber M.A., Iacocca M.V., Cance W.G., Keagy B.A.: Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in the vascular smooth muscle cells of intimal hyperplasia. *J. Vasc. Surg.*, 2001; 34: 344-349

[85] Pogány G., Timár F., Oláh J., Harisi R., Polony G., Paku S., Bocsi J., Jeney A., Laurie G.W.: Role of the basement membrane in tumor cell dormancy and cytotoxic resistance. *Oncology*, 2001; 60: 274-281

[86] Pozzatti R., Muschel R., Williams J., Padmanabhan R., Howard B., Liotta L., Khoury G.: Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. *Science*, 1986; 232: 223-227

[87] Pulkuri S.M., Gondi C.S., Lakka S.S., Jutla A., Estes N., Gujrati M., Rao J.S.: RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 36529-36540

[88] Qin H., Sun Y., Benveniste E.N.: The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 29130-29137

[89] Raguz S., Tamburo De Bella M., Tripuraneni G., Slade M.J., Higgins C.F., Coombes R.C., Yagüe E.: Activation of the MDR1 upstream promoter in breast carcinoma as a surrogate for metastatic invasion. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 2776-2783

[90] Ricca A., Biroccio A., Del Bufalo D., Mackay A.R., Santoni A., Cipitelli M.: bcl-2 over-expression enhances NF-κB activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7^{ADR} breast-cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2000; 86: 188-196

[91] Rintoul R.C., Sethi T.: Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clin. Sci.*, 2002; 102: 417-424

[92] Rintoul R.C., Sethi T.: The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.*, 2001; 2: 437-442

[93] Roger L., Gadea G., Roux P.: Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol. Cell.*, 2006; 98: 141-152

[94] Rovin J.D., Frierson H.F.Jr., Ledin W., Parsons J.T., Adams R.B.: Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *Prostate*, 2002; 53: 124-132

[95] Sampath J., Sun D., Kidd V.J., Grenet J., Gandhi A., Shapiro L.H., Wang Q., Zambetti G.P., Schuetz J.D.: Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 39359-39367

[96] Sau A., Pellizzari Tregno F., Valentino F., Federici G., Caccuri A.M.: Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010; 500: 116-122

[97] Savagner P.: The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann. Oncol.*, 2010; 21: vii89-vii92

[98] Schneider J., Gonzalez-Roces S., Pollán M., Lucas R., Tejerina A., Martin M., Alba A.: Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res.*, 2001; 3: 183-191

[99] Scotto K.W.: Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, 2003; 22: 7496-7511

[100] Seguin L., Desgrosellier J.S., Weis S.M., Cheresch D.A.: Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.*, 2015; 25: 234-240

[101] Sethi G., Aggarwal B.B.: Role of NF-κB and NF-κB-regulated gene products in chemoresistance and radioresistance. *Curr. Cancer*

Ther. Rev., 2006; 2: 115-125

[102] Song S., Wientjes M.G., Gan Y., Au J.L.: Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 8658-8663

[103] Staroselsky A.N., Fan D., O'Brian C.A., Bucana C.D., Gupta K.P., Fidler I.J.: Site-dependent differences in response of the UV-2237 murine fibrosarcoma to systemic therapy with adriamycin. *Cancer Res.*, 1990; 50: 7775-7780

[104] Staroselsky A.N., Mahlin T., Savion N., Klein O., Nordenberg J., Donin N., Michowitz M., Leibovici J.: Metastatic potential and multidrug resistance correlation in the B16 melanoma system. *J. Exp. Ther. Oncol.*, 1996; 1: 251-259

[105] Stavrovskaya A.A.: Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry*, 2000; 65: 95-106

[106] Steeg P.S.: Perspectives on classic article: metastasis suppressor genes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004; 96: E4

[107] Vaupel P.: The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*, 2004; 9: 10-17

[108] Volm M., Mattern J., Koomägi R.: Association between nm23-H1 expression, proliferation and apoptosis in non-small cell lung carcinomas. *Clin. Exp. Metastasis*, 1998; 16: 595-602

[109] Wang L.S., Chow K.C., Lien Y.C., Kuo K.T., Li W.Y.: Prognostic significance of nm23-H1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2004; 26: 419-424

[110] Wang X., Wu X., Wang C., Zhang W., Ouyang Y., Yu Y., He Z.: Transcriptional suppression of breast cancer resistance protein (BCRP) by wild-type p53 through the NF- κ B pathway in MCF-7 cells. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 3392-3397

[111] Webb C.P., Vande Woude G.F.: Genes that regulate metastasis and angiogenesis. *J. Neurooncol.*, 2000; 50: 71-87

[112] Weinstein R.S., Jakate S.M., Dominguez J.M., Lebovitz M.D., Koukoulis G.K., Kuszak J.R., Klusens L.F., Grogan T.M., Saclarides T.J., Roninson I.B.: Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res.*, 1991; 51: 2720-2726

[113] Westermarck J., Kähäri V.M.: Regulation of matrix metallo-

proteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.*, 1999; 13: 781-792

[114] Xue C., Liang F., Mahmood R., Vuolo M., Wyckoff J., Qian H., Tsai K.L., Kim M., Locker J., Zhang Z.Y., Segall J.E.: ErbB3-dependent motility and intravasation in breast cancer metastasis. *Cancer Res.*, 2006; 66: 1418-1426

[115] Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A.: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004; 117: 927-939

[116] Yang J.M., O'Neill P., Jin W., Foty R., Medina D.J., Xu Z., Lomas M., Arndt G.M., Tang Y., Nakada M., Yan L., Hait W.N.: Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) confers resistance of breast cancer cells to Anoikis through inhibition of Bim. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 9719-9727

[117] Yang J.M., Xu Z., Wu H., Zhu H., Wu X., Hait W.N.: Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 2003; 1: 420-427

[118] Yoshida B.A., Sokoloff M.M., Welch D.R., Rinker-Schaeffer C.W.: Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 1717-1730

[119] Zheng X., Carstens J.L., Kim J., Scheible M., Kaye J., Sugimoto H., Wu C.C., Le Bleu V.S., Kalluri R.: Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, 2015; 527: 525-530

[120] Zöchbauer-Müller S., Filipits M., Rudas M., Brunner R., Krajnik G., Suchomel R., Schmid K., Pirker R.: P-glycoprotein and MRP1 expression in axillary lymph node metastases of breast cancer patients. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 119-124

[121] Zou W., Yang H., Hou X., Zhang W., Chen B., Xin X.: Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells. *Cancer Lett.*, 2007; 248: 211-218

[122] Zvibel I., Brill S., Halpern Z., Moskovitz S., Yayon A., Papa M.: Soluble and matrix-associated heparan sulfate proteoglycans increase expression of erb-B2 and erb-B3 in colon cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, 2001; 91: 316-321

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.