

Homa A., Król M., Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This article aims at the presentation of the role of stem cells originated from tumor in canine mammary cancer. Cancer stem cells represent a small sub-population, thought to be responsible for induction, progression, metastasis and recurrence of a tumor. These cells are also of a high resistance to standard chemotherapy and radiation. This review presents the role and significance of cancer stem cells, basing on the latest literature on human breast cancer, and their possible role in canine mammary cancer development and pathogenesis.

**Keywords:** mammary cancer stem cells, drug resistance, combined therapy.

Jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów u suk jest nowotwór gruczołu sutkowego. Czynniki mającymi wpływ na częstotliwość jego występowania są m.in. wczesna sterylizacja, wiek, rasa, hormonalna suplementacja oraz otyłość (1, 2, 3, 4). Szacuje się, że u około 205 na 100 tys. suk rocznie dochodzi do rozwoju zmian nowotworowych w obrębie gruczołu sutkowego, z czego prawie 50% to zmiany złośliwe (5, 6).

Operacyjne usunięcie guza należy do standardowej metody leczenia w onkologii weterynaryjnej. Odstępuje się jednak od niej w przypadku rozległych zmian uniemożliwiających ich wycięcie. U takich pacjentów, jak również u tych, u których doszło już do przerzutów zasadne wydaje się wykorzystanie chemioterapii, jak również terapii hormonalnej oraz lekami spowalniającymi proces angiogenezy.

Ostatnie badania nad rakiem piersi u kobiet pokazują, że do wachlarza możliwości niedługo będzie można dodać leki celujące w nowotworowe komórki macierzyste.

Komórki macierzyste mają zdolność do samoodnowy oraz różnicowania w każdy

# Nowotworowe komórki macierzyste

Agata Homa, Magdalena Król

z Katedry Fizjologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

rodzaj komórki organizmu. To, co niewątpliwie jest ich zaletą w zdrowym organizmie, w przypadku procesu nowotworzenia stanowi duże wyzwanie w walce z nimi dla klinicystów. Uważa się, że nowotworowe komórki macierzyste odpowiedzialne są zarówno za indukcję nowotworu, jak również za jego progresję, przerzutowość i, niestety, nawrót choroby. Stąd warto przyrzeć się uważniej badaniom ostatnich lat i podjąć próbę opracowania skutecznej terapii nowotworowej guza sutka u suk.

Badania Bruce i Van der Gaag przeprowadzone w 1963 r. (7) jako pierwsze wykazały, że jedynie 1–4% mysich komórek chłoniaka po wszczepieniu myszom inicjuje u nich powstanie nowotworu. Na potwierdzenie tego u ludzi trzeba było czekać ponad 30 lat, aż do 1997 r., w którym ukazała się praca Bonnet i Dicka (8) na liniach komórek ludzkich. Dowodzi ona, że jedynie komórki wykazujące antygeny różnicowania CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> inicjowały rozwój białaczki szpikowej u myszy. Od tego momentu naukowcy starali się wykazać obecność nowotworowych komórek macierzystych nie tylko w nowotworach układu krwiotwórczego, ale również w guzach litych. Pierwszą pracą, która wykazała ich obecność w raku piersi u kobiet, były badania Al-Hajj i wsp. z 2003 r. (9). Poprzez wszczepienie myszom ludzkich komórek raka piersi wykazano, że jedynie niewielka grupa komórek jest w stanie zainicjować u nich powstanie nowotworu. Implantacja zaledwie 100 komórek wykazujących fenotyp CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/Lineage<sup>-</sup> powodowała rozwój nowotworu, podczas gdy wszczepienie nawet kilkuset tysięcy komórek o innym fenotypie nie powodowało zmian nowotworowych w gruczole sutkowym myszy (9).

Dotychczas poznano i wyizolowano nowotworowe komórki macierzyste z kostniakomięsaka (10, 11), glejaka (12) oraz gruczolakoraka płuc u psów (13). Niewiele więcej prac dotyczy raka sutka u suk, do tej pory ukazały się zaledwie trzy opracowania na ten temat (14, 15, 16). Ferletta i wsp. (14) wykazali obecność nowotworowych komórek macierzystych w linii CMT-U229 pochodzącej z mieszanego atypowego łagodnego guza sutka u suk. Komórki te wykazywały fenotyp CD10low/CD34<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD24low oraz CD49f<sup>+</sup>, co wskazywałoby na obecność tych samych markerów powierzchniowych co w nowotworowych komórkach o cechach macierzystych w raku piersi u ludzi. Ponadto dodatkowo wyznakowane komórki Sca1 oraz CD133 tej samej linii komórkowej tworzyły sferoidy będące potwierdzeniem cech macierzystych. Komórki te wykazywały ekspresję Sox2 oraz Oct-4 będące czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za samoodnawialność i pluripotencjalność komórek macierzystych. Tym samym dowiedziano, że komórki te wykazują cechy pozwalające na nazwanie ich macierzystymi. W pracy Pang i wsp. (15) stwierdzili, że komórki pochodzące z linii komórkowej raka sutka u suk REM134 również formowały sferoidy oraz przejawiały zwiększoną ekspresję Oct-4 i Nanog. Poprzez podawanie doksorubicyny oraz rosnących dawek promieniowania wykazano, że komórki te są bardziej lekooporne w porównaniu z dojrzałymi komórkami nowotworowymi. Co więcej, posiadając mezenchymalny fenotyp, ich inwazyjność wzrasta, a tym samym również możliwość migracji i tworzenia przerzutów. Michishita i wsp. (16) oprócz wyznakowania komórek CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> pochodzących z czterech linii komórek raka

sutka u suk użyli dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), jako markera komórek macierzystych. Komórki ADLH<sup>+</sup> formowały sferoidy, a wszczepione w ilości 1000 myszom o obniżonej odporności w odróżnieniu do ALDH<sup>-</sup> powodowały rozwój nowotworu. Obecność zarówno ALDH<sup>+</sup>, jak i ALDH<sup>-</sup> w powstałych guzach wskazuje na macierzysty charakter komórek ALDH<sup>+</sup>.

Niestety, nadal niewiele wiadomo o lekach, które celowałyby w nowotworowe komórki macierzyste w leczeniu guza sutka u suk. Jak dotąd nie ukazały się żadne prace na ten temat. W tym artykule przedstawione zostaną dotychczasowe próby podjęte w leczeniu raka piersi u kobiet, wierząc, że onkologia weterynaryjna w przyszłości będzie mogła czerpać informacje i inspirować z tych badań.

Skuteczna terapia nowotworowa zakłada całkowitą eliminację komórek rakowych z organizmu. Niestety, nowotworowe komórki macierzyste wykazują lekooporność zarówno na chemioterapię, jak i radioterapię. Dzieje się tak dzięki licznym mechanizmom obronnym powodującym u nich zwiększoną możliwość do ukrycia się przed działaniem podanych leków, jak również poprzez naprawę własnego DNA i niepoddawanie się procesowi apoptozy. Jedną z cech odróżniających je od dojrzałych komórek nowotworowych jest zwiększona ilość pomp błonowych-transporterów ABC (ATP-binding cassette transporters) na ich powierzchni. Za pomocą aktywnego transportu powodują one usunięcie z komórki leków cytostatycznych, a tym samym uniknięcie efektu ich działania. W nowotworowych komórkach macierzystych raka piersi do najlepiej poznanych transporterów ABC możemy zaliczyć białka ABCG2 zdolne do transportu dokсорubicyny, mikoksantronu, topotekanu, metotreksatu i inhibitorów kinazy tyrozynowej oraz ABCB5 $\beta$ , które również zwiększają oporność na działanie dokсорubicyny (17). Nowotworowe komórki macierzyste posiadają także wydajne mechanizmy wykrywania i naprawy uszkodzeń swojego DNA. Komórki organizmu cały czas poddawane są czynnikiem endo- i egzogennym inicjującym uszkodzenia genomu, jednak wynik biologiczny tego uszkodzenia zależy od swoistego wzoru odpowiedzi poszczególnych komórek. Nowotworowe komórki macierzyste poddane np. chemioterapii oraz radioterapii włączają ochronę integralności swojego genomu poprzez aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Badania Maugeri-Sacca i wsp. (18) wskazują na szczególną rolę kinaz ATR, ATM oraz Chk1 w powyższej wymienionych komórkach w raku piersi. ATR odpowiada za uszkodzenie podwójnej nici DNA oraz przerwanie struktur chromatyny, natomiast rolę ATM jest zatrzymanie widełek

replikacyjnych. Obie kinazy podobnie jak Chk1 pełnią swoją rolę w punktach kontrolnych faz G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> oraz S cyklu komórkowego. Nowotworowe komórki macierzyste dodatkowo podczas próby naprawy swojego DNA poprzez włączenie szlaku NHEJ powodują powstanie kolejnych mutacji, a tym samym uzjadliwienie danej komórki i jej jeszcze większą lekooporność (18). Warto dodać, że komórki te należą do wolno proliferujących, o wydłużonej fazie S i G<sub>2</sub> cyklu komórkowego, co jest kolejnym czynnikiem powodującym oporność na chemioterapię, ponieważ leki cytostatyczne celują głównie w komórki szybko dzielące. Pośrednio uczestniczy w tym mikrośrodowisko, w którym znajdują się nowotworowe komórki macierzyste, czyli tzw. hipoksja. Obniżone stężenie tlenu powoduje zatrzymanie komórki w fazie G<sub>0</sub>, czyli fazy spoczynku, a przez to zahamowany zostaje jej podział. Dodatkowo wpływa na fenotyp komórek nowotworowych poprzez szlak HIF, powodując nabycie przez nie cech nowotworowych komórek macierzystych. Podtrzymuje również funkcjonowanie już istniejących w obrębie guza (19). W obrębie niszy występują również liczne komórki procesu zapalnego, fibroblasty, komórki śródbłonne i mezenchymalne komórki macierzyste, które za pomocą pętli cytokin regulują zdolność do samoodnowy nowotworowych komórek macierzystych (20). Dużą część badań nad nowotworowymi komórkami macierzystymi stanowią badania nad kluczowymi dla ich funkcjonowania szlakami sygnałowymi. W przypadku raka piersi wymienić należy tutaj szlak Wnt (21), Notch (22) i Hedgehog (23) szeroko opisane w literaturze. Badania Woodward i wsp. (24) wskazują na szczególnie udział szlaku Wnt/ $\beta$ -kateniny w zwiększonej oporności komórek na radioterapię.

Nie ulega wątpliwości, że wiedza o mechanizmie warunkującym lekooporność nowotworowych komórek macierzystych jest kluczowa w próbach stworzenia terapii celującej w te komórki.

Do powszechnie stosowanych leków cytostatycznych w leczeniu zarówno raka piersi u kobiet, jak i guza sutka u suk należą dokсорubicyna, cyklofosfamid, docetaksel, paklitaksel, gemcytabina oraz 5-fluorouracyl (25). Redukcja wielkości guza poprzez stosowanie standardowej terapii chemioterapeutykami niewątpliwie powoduje poprawienie jakości życia pacjenta. Co więcej następuje zmniejszenie różnorodności komórek w obrębie guza, a tym samym puli bardziej zróżnicowanych komórek nowotworowych mogących nabywać właściwości komórek macierzystych. Niemniej jednak niewyeliminowanie populacji nowotworowych macierzystych skutkuje po pewnym

czasie zwiększonym ryzykiem przerzutów oraz nawrotem choroby (26, 27).

Dotychczas sądzono, że leki cytostatyczne stosowane w chemioterapii pozostają obojętne dla nowotworowych komórek macierzystych raka piersi. Okazuje się jednak, że nie tylko nie pomagają one w ich usunięciu, ale dodatkowo mogą wykazywać działanie wspomagające ich rozwój. Badania Bholi i wsp. (28) wykazały pobudzający wpływ paklitakselu na proliferację nowotworowych komórek macierzystych poprzez szlak TGF- $\beta$  w leczeniu potrójnie negatywnego raka piersi. Szlak TGF- $\beta$  pobudza również EMT (epithelial-mesenchymal transition) – proces przejścia komórek z fenotypu epitelialnego w mezenchymalny powodującego większą ruchliwość komórek i możliwość przerzutowania (29).

Spośród dotychczas podjętych prób obiecująco przedstawia się praca Zhu i wsp. (30) opisująca wyraźnie redukujący wpływ fosfosulindaku (Oxt-328) na nowotworowe komórki macierzyste raka piersi. Oxt-328 jest supresorem szlaku Wnt/ $\beta$ -kateniny, jak również blokuje przejście epitelialno-mezenchymalne komórek. W badaniach *in vitro* obserwowano zmniejszoną ilość tworzonych sferoidów oraz zmniejszoną ekspresję genów, takich jak Oct-4, Bmi-1, Sox-2, Nanog, nestin, Notch-1, ABCG2 i c-Myc, które odpowiadają za podtrzymywanie cech macierzystych komórki. Podanie Oxt-328 w dawce 100 mg/kg m.c. myszom o obniżonej odporności przez 7 dni przed implantacją komórek raka piersi aż w 50% zmniejszyło wystąpienie guza w badanej grupie. Natomiast leczenie fosfolindakiem w dawce 150 mg/kg m.c./dzień w 45-dniowych już powstałych guzach o wielkości 50 mm<sup>3</sup> skutkowało zmniejszeniem ich aż o 83%. Ponadto w guzach tych wykazano mniejszą ekspresję markerów dla EMT oraz  $\beta$ -kateniny. To jednoznacznie wskazuje na efektywne hamowanie rozwoju nowotworowych komórek macierzystych raka piersi przez fosfosulindak (30).

Nowotworowe komórki macierzyste stanowią wyzwanie dla onkologii weterynaryjnej XXI wieku. Patrząc jednak na tempo rozwoju wiedzy na ten temat oraz stopień zaawansowania badań nad terapią kombinowaną w medycynie, można liczyć, że i w weterynarii już niedługo będzie można obserwować ich pierwsze próby.

## Piśmiennictwo

- Schneider R., Dorn C.R., Taylor D.O.: Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 1969, 43, 1249–1261.
- Schneider R.: Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 1970, 26, 419–426.
- Rutteman G.R.: Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 1990, 4, 3–40.
- Sonnenschein E.G., Glickman L.T., Goldschmidt L.T.: Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 1991, 133, 694–703.

5. Dobson J.M., Samuel S., Milstein H.: Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J. Small. Anim. Pract.*, 2002, **43**, 240–246.
6. Dorn C.R., Taylor D.O.N., Schneider R.: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1968, **40**, 307–318.
7. Bruce W.R., Van Der Gaag H.: A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature* 1963, **199**, 79–80.
8. Bonnet D., Dick J.E.: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997, **3**, 730–737.
9. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, **100**, 3983–3988.
10. Wilson H., Huelsmeyer M., Chun R., Young K.M., Friedrichs K.: Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet. J.* 2008, **175**, 69–75.
11. Pang L.Y., Gatenby E.L., Kamida A.; Whitelaw B.A.; Hupp T.R., Argyle D.J.: Global gene expression analysis of canine osteosarcoma stem cells reveals a novel role for COX-2 in tumour initiation. *PLoS One* 2014, **9**, e83144.
12. Stoica G., Lungu G., Martini-Stoica H., Waghela S., Levine J., Smith R. III: Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma. *Vet. Pathol.* 2009, **46**, 391–406.
13. Nemoto Y., Maruo T., Sato T., Deguchi T., Ito T., Sugiyama H.: Identification of cancer stem cells derived from a canine lung adenocarcinoma cell line. *Vet. Pathol.* 2011, **48**, 1029–1034.
14. Ferletta M., Grawe J., Hellmen E.: Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. *Int. J. Dev. Biol.* 2011, **55**, 791–799.
15. Pang, L.Y., Cervantes-Arias, A., Else, R.W.; Argyle, D.J.: Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo-Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers (Basel)* 2011, **3**, 1744–1762.
16. Michishita M., Akiyoshi R., Suemizu H., Nakagawa T., Sasaki N., Takemitsu H., Arai T.: Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines *Vet. J.* 2012, **193**, 508–513.
17. Moitra K., Lou H., Dean M.: Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011, **89**, 491–502.
18. Maugeri-Sacca M., Bartucci M., De Maria R.: DNA damage repair pathways in cancer stem cells. *Mol. Cancer Ther.* 2012, **11**, 1627–1636.
19. Lathia J.M., Heddlestone J.M., Venere M., Rich J.N.: Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment. *Cell. Stem. Cell.* 2011, **8**, 482–485.
20. Liu S., Wicha M.S.: Targeting breast cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* 2010, **28**, 4006–4012.
21. Valkenburg K.C., Graveel C.R., Zylstra-Diegel C.R., Zhong Z., Williams B.O.: Wnt/beta-catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* 2011, **3**, 2050–2079.
22. Harrison H., Farnie G., Howell S.J., Rock R.E., Stylianou S., Brennan K.R., Bundred N.J., Clarke R.B.: Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res.* 2010, **70**, 709–718.
23. Liu S., Dontu G., Mantle I.D., Patel S., Ahn N.S., Jackson K.W., Suri P., Wicha M.S.: Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* 2006, **66**, 6063–6071.
24. Chen M.S., Woodward W.A., Behbod F., Peddibhotla S., Alfaro M.P., Buchholz T.A., Rosen J.M.: WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 618–623.
25. Sleeckx N, de Rooster H, Veldhuis Kroeze E.J., Van Ginneken C., Van Brantegem L.: Canine mammary tumours, an overview. *Reprod. Domest. Anim.* 2011, **46**, 1112–11131.
26. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R.A.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008, **133**, 704–715.
27. Polyak K., Weinberg R.A.: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 2009, **9**, 265–273.
28. Bholra N.E., Balko J.M., Dugger T.C., Kuba M.G., Sánchez V., Sanders M., Stanford J., Cook R.S., Arteaga C.L.: TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2013, **123**, 1348–1358.
29. Barcellos-Hoff M.H., Akhurst R.J.: Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late. *Breast. Cancer Res.* 2009, **11**, 202.
30. Zhu C., Cheng K.W., Ouyang N., Huang L., Sun Y., Constantinides P.P.: Phosphosulindac (OXT-328) selectively targets breast cancer stem cells in vitro and in human breast cancer xenografts. *Stem Cells* 2012, **30**, 2065–2075.