

# Aktualne poglądy na patogenezę i biologię przerzutowych guzów kostniakomięsaka

## Current Concepts on Pathogenesis and Biology of Metastatic Osteosarcoma Tumors

Sławomir Poletajew<sup>(A,E,F)</sup>, Łukasz Fus<sup>(E,F)</sup>, Aleksander Wasiutyński<sup>(A,E)</sup>

Katedra Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska  
Department of Pathology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

### STRESZCZENIE

Kostniakomięsak jest najczęstszym nowotworem złośliwym w praktyce ortopedycznej. Pomimo zaawansowanych technik operacyjnych oraz prób zastosowania chemioterapii adjuwantowej, pięcioletnie przeżycia u chorych z kostniakomięsakiem wciąż pozostają na poziomie 60-70%. Główną przyczyną niepowodzeń terapii są przerzuty nowotworu.

Poszerzenie wiedzy z zakresu patogenyzy i biologii guzów przerzutowych kostniakomięsaka stanowi kluczowy element na drodze do polepszenia wyników leczenia, to jest na drodze do określenia potencjalnych celów terapeutycznych. Ostatnie publikacje wnoszą nowe pomysły w tej dziedzinie. Niniejsze opracowanie nakreśla najistotniejsze zagadnienia, które mogą mieć wpływ na sposób leczenia chorych na kostniakomięsaka w najbliższej przyszłości.

W kilku podrozdziałach dyskutujemy (1) model rozsiewu komórek kostniakomięsaka ze szczególnym uwzględnieniem białek biorących udział w lizie macierzy pozakomórkowej; (2) mechanizmy chroniące krążące komórki kostniakomięsaka przed zaprogramowaną śmiercią; (3) związek pomiędzy angiogenezą i jej patogenezą, a potencjałem kostniakomięsaka do dawania przerzutów; (4) rolę cytokin w progresji choroby oraz preferencyjnym powstawaniu przerzutów w płucach; (5) przykład mechanizmu oporności na leczenie – pompy komórkowej glikoproteiny P; ostatecznie zastanawiamy się nad (6) możliwością udziału nowotworowych komórek macierzystych w progresji kostniakomięsaka.

**Słowa kluczowe:** kostniakomięsak, nowotwory kości, przerzuty, neowaskularyzacja, nowotworowe komórki macierzyste

### SUMMARY

Osteosarcoma (OS) remains the most common malignancy among orthopaedic neoplasms. Despite advanced surgical techniques and attempts to use second-line chemotherapy, 5 year overall survival in OS patients is still reported to be as low as 60-70%. Progression to metastatic disease is the main cause of treatment failures.

Broadening current knowledge on the pathogenesis and biology of metastatic OS tumors is a key element in improving treatment results, i.e. identifying potential therapeutic targets. Recent studies have brought new concepts into this field. This paper outlines the most important issues which may influence treatment methods in the near future.

In a few sections, we discuss (1) a model of OS dissemination with special regard to proteins mediating the lysis of the extracellular matrix; (2) the mechanisms protecting circulating OS cells from programmed death; (3) the relationship between angiogenesis, its pathogenesis, and OS metastatic potential; (4) the role of cytokines in OS progression and site-specific metastasis formation; (5) an example of treatment resistance mechanism – the P glycoprotein efflux pump; and, finally, we theorize on (6) whether cancer stem cells may play a role in OS progression.

**Key words:** osteosarcoma, bone neoplasms, neoplasm metastasis, neovascularization, neoplastic stem cells

## WSTĘP

Kostniakomięsak (osteosarcoma, OS) jest najczęstszym pierwotnym nowotworem kości, zarówno u dzieci, jak i u dorosłych. Duży potencjał do dawania przerzutów jest cechą charakterystyczną OS. Pomimo leczenia chirurgicznego i intensywnej chemioterapii, obecność przerzutów stwierdza się u 25-30% chorych, co stanowi główną przyczynę zgonów w tej grupie [1]. Ogniska wtórne rozwijają się głównie w płucach (u 80% chorych z przerzutami) oraz w kościach (u 15% chorych z przerzutami). Mikroskopowy rozsiew komórek nowotworowych prawdopodobnie ma miejsce już w momencie rozpoznania choroby, czego poparciem są ostatnie doniesienia dowodzące obecności licznych komórek OS w szpiku kostnym nowo zdiagnozowanych pacjentów [2].

Zrozumienie patogenezы i biologii guzów przerzutowych OS może prowadzić do wyznaczenia nowych pomysłów w zakresie terapii. Bazując na aktualnej wiedzy z dziedzin nauk podstawowych możliwe jest myślenie o kolejnych krokach w terapii celowanej. Jednocześnie wciąż pozostaje wiele pytań, na które odpowiedzi nie znamy.

## ROZSIEW KOMÓREK OS

Proces formowania przerzutów przez długi czas był tematem sporów. Dziś znamy już co najmniej dwie historyczne teorie tłumaczące ten proces. Pierwsza, zaproponowana przez Stephena Pageta, znana jest jako koncepcja ‘ziarna i żyznej ziemi’. Zgodnie z tą koncepcją, do krążenia układowego uwalniana jest duża ilość komórek nowotworowych, ale tylko mała ich część natrafia na środowisko, w którym może się osiedlić i rozpocząć proliferację [3]. Druga teoria, zaproponowana przez Jamesa Ewinga, zakłada mechaniczne więzienie komórek nowotworowych w drobnych łożyskach naczyń [4].

Obecnie wiadomo, że proces przerzutowania rozpoczyna się już wówczas, gdy pojedyncze komórki nowotworowe odłączają się od guza pierwotnego dzięki lizie otaczającej macierzy międzykomórkowej. Wśród substancji litycznych główną rolę odgrywają metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 [5,6]. W komórkach OS wykazano zwiększoną ekspresję genów kodujących metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9, aktywator metaloproteinaz (MT1-MMP) oraz ich inhibitory (TIMP1, TIMP2, RECK) [7,8]. Podwyższony poziom MMP-2 i MMP-9 w guzach utożsamiany jest z dużym potencjałem do naciekania tkanek i tworzenia przerzutów, jak również z gorszym rokowaniem chorych [5,7]. Co więcej, trawiąc mikrośrodowisko, MMP uwalniają także czynnik wzrostu TGF- $\beta$  oraz umożliwiają tworzenie nowych naczyń krwiono-

## BACKGROUND

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant neoplasm of bone, in both children and adults. A high potential to metastasize is a characteristic feature of OS. Despite surgical treatment and intensive chemotherapy, metastases are seen in 25-30% of patients and are the cause of death [1]. Secondary tumors typically occur in the lungs (in 80% of metastatic patients) and in bones (in 15% of metastatic patients). It is postulated that microscopic dissemination of neoplastic cells is usually present at the time of diagnosis, a claim supported by recent studies showing the presence of numerous OS cells in bone marrow in newly diagnosed patients [2].

Understanding the pathogenesis and biology of metastatic OS tumors leads to novel treatment concepts. Basing on current knowledge in basic science, we may think about the next steps in targeted therapy. However, there are still many questions to be answered.

## DISSEMINATION OF OS CELLS

The process of metastasis formation was subject to debate over many years. Today we know at least two historical theories explaining its mechanism. The first one, proposed by Stephen Paget, is known as ‘seed and soil’ hypothesis. According to Paget, many neoplastic cells are released into circulation, but only a fraction of them are able to find an appropriate microenvironment where they can settle and proliferate [3]. The second theory, proposed by James Ewing, supposes that neoplastic cells become mechanically stuck in capillary vessels [4].

At present, it is known that the metastatic process starts at the moment when single cells separate from a primary tumor due to lysis of the surrounding extracellular matrix. Among lytic agents, the metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 play the leading role [5,6]. The genes coding for MMP-2 and MMP-9, their activator (MT1-MMP) and inhibitors (TIMP1, TIMP2, RECK) are overexpressed in the majority of OS cells [7,8]. The elevated concentration of MMP-2 and MMP-9 in the tumor is believed to represent a high potential to invade adjacent tissues and form distant metastases, and be associated with worse clinical prognosis [5,7]. Moreover, lysis of the extracellular matrix activates transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and promotes angiogenesis. Worse overall survival and disease free survival in patients with strong expression of MT1-MMP and poor expression

śnych. Krótsze przeżycie całkowite oraz przeżycie wolne od choroby u pacjentów, u których wykazano silną ekspresję MT1MMP i słabą ekspresję TIMP-2 oraz RECK, wskazuje na rolę zarówno aktywatorów, jak i inhibitorów procesu trawienia macierzy międzykomórkowej [7,9,10]. Brak wydziałania MMP-9 przez linie komórkowe OS oraz ekspresja tego enzymu w komórkach nowotworowych pobranych podczas biopsji pozwala zakładać, że metaloproteinazy mogą być również wytwarzane przez komórki mikrośrodowiska guza lub, że komórki zrębu stymulują komórki nowotworowe do ich syntezy [5]. Ponieważ próby wykorzystania tych enzymów jako wskaźników prognostycznych nie dały jednoznacznych wyników, niezbędna jest kontynuacja badań nad rolą metaloproteinaz w patogenezie OS [9].

Jednym z mechanizmów obronnych organizmu człowieka przed nowotworami jest zjawisko aikonis – zaprogramowanej śmierci komórki na skutek utraty kontaktu ze swoim mikrośrodowiskiem. W ten sposób wszystkie potencjalne komórki przerzutowe odrywające się od guza pierwotnego powinny zostać uśmiercone. Kluczowe w tym procesie są sygnały odbierane przez komórkę za pomocą powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych i receptorów. Jednym z białek przekazujących sygnał z receptora (np. CD44) do efektora zlokalizowanego wewnątrzkomórkowo (np. szlaki przekazywania mTOR, AKT, MAPK) jest ezryna, zlokalizowana pomiędzy błoną komórkową a cytoskieletem. Za jej pośrednictwem sygnały przenoszone przez receptory czynników wzrostu oraz cząsteczki adhezyjne zostają wzmocnione oraz ułatwiona jest komunikacja komórki z mikrośrodowiskiem [11,12]. W komórkach OS ekspresja ezryny jest zwiększona, co wiąże się z zahamowaniem procesu anoikis i ułatwieniem adhezji do heterotopowej macierzy komórkowej, co w konsekwencji prowadzi do powstania przerzutów. W mysich modelach OS, zahamowanie ezryny znacząco ogranicza potencjał do dawania przerzutów i zdolność do przeżycia komórek przerzutowych w płucach [13]. Mimo, iż zmiany w ekspresji ezryny nie wpływają na proliferację komórek ani wzrost guza, jej wysokie stężenie związane jest z bardziej agresywnym fenotypem OS i pięciokrotnie wyższym ryzykiem powstawania ognisk przerzutowych w płucach [14,15]

## UNACZYNIENIE GUZÓW OS

Neoangiogeneza i neowaskularyzacja są procesami niezbędnymi w procesie formowania przerzutów. Nowotwór o rozmiarze powyżej 2 mm<sup>3</sup> nie jest zdolny do dalszego rozrostu bez wytworzenia nowych naczyń zaopatrujących go w krew. Proces neoangiogenezy jest ściśle związany z wystąpieniem niedotle-

of TIMP2 or RECK highlights the role of activators as well as inhibitors of extracellular matrix lysis [7,9, 10]. The lack of MMP-9 production in OS cell lines and the lack of MMP-9 gene expression in biopsy specimens of OS tumors suggest that metalloproteinases may also be produced by microenvironmental cells or the synthesis of MMP-9 is the effect of tumor cell stimulation by stromal cells [5]. Since attempts to use metalloproteinases as prognostic factors have not revealed unequivocal results, there is a need to continue studies on the role of these enzymes in the pathogenesis of OS [9].

Programmed death of cells which results from the loss of contact with microenvironment is called aikonis and is a type of defensive response to neoplasms in humans. This mechanism should kill all potential metastatic OS cells at the time of dissemination. Signals that cells receive thanks to adhesive molecules and membrane receptors play a key role in the process. One of the proteins transferring the signal from the receptor (eg. CD44) into the intracellular effector (eg. mTOR, AKT, MAPK pathways) is called ezrin and is located between the cell membrane and the cytoskeleton. Ezrin intensifies signals transferred by growth factor receptors and adhesive molecules, as well as facilitating communication between the cell and the microenvironment [11,12]. In OS cells, ezrin is overexpressed and so may inhibit the process of aikonis and facilitate adhesion to the heterotopic cellular matrix, consequently leading to metastasis formation. The inhibition of ezrin in mouse OS models considerably inhibited the potential to metastasize and depressed the ability of metastatic OS cells in the lungs to survive [13]. Despite the fact that changes in ezrin expression have no effect on cell proliferation and tumor growth, high concentrations of ezrin are associated with more aggressive OS phenotypes and fivefold higher risk of pulmonary metastasis [14,15].

## VASCULARIZATION OF OS TUMORS

Neoangiogenesis and neovascularization are necessary steps in the process of metastasis formation. Tumors greater than 2 mm<sup>3</sup> are not able to proliferate without new blood vessels. The process of neoangiogenesis is closely linked to hypoxia in the tumor microenvironment [16,17]. In the setting of insufficient

nienia w mikrośrodkowisku guza [16,17]. W warunkach niedostatecznej podaży tlenu uaktywniony zostaje czynnik HIF (Hypoxia Induced Factor), co prowadzi do transkrypcji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), transportera glukozy Glut-1, erytropoetyny (EPO), enzymów szlaku glikolizy beztlenowej i innych. W prawidłowych komórkach HIF kodowany jest przez gen HIF-1a, podczas, gdy w komórkach OS HIF kodowany jest także przez gen HIF-2 [18]. Ekspresja czynników HIF podtrzymuje zdolność komórek OS do proliferacji i migracji w niekorzystnych warunkach *in vitro* [18]. Dowiedziono, że pacjenci, u których poziom HIF-1a jest podwyższony (32-79% chorych na OS) odznaczają się krótszym przeżyciem oraz wyższym ryzykiem wystąpienia przerzutów [19,20].

Intensywna angiogeneza i proliferacja, wynikające z niedotlenienia, prowadzą do powstania agresywnego fenotypu OS. Sieć nowopowstałych naczyń jest jednak chaotyczna i wysoce nieefektywna. Ostatecznie dysproporcja między ilością dostarczanego tlenu a potrzebami metabolicznymi proliferujących komórek utrzymuje się, zaś komórki OS adaptują się do przewlekłego niedotlenienia [21].

Ekspresję VEGF zależną od HIF-1a stwierdza się u 50-80% pacjentów z OS. VEGF stymuluje komórki śródbłonka do proliferacji, migracji i tworzenia nowych naczyń. Istnieje wiele kontrowersji dotyczących związku VEGF z obrazem klinicznym lub patologicznym OS. Korelacja między stężeniem VEGF w surowicy i ekspresją w guzie a przeżywalnością pacjentów nie została potwierdzona ze względu na sprzeczne doniesienia [18,19,22-24].

W guzach, w których ekspresja VEGF (a w szczególności izoforma VEGF165) jest na wysokim poziomie, zaobserwowano dużą średnią gęstość naczyń (MVD – medium vascular density). W efekcie całkowita powierzchnia śródbłonka jest relatywnie duża, co zwiększa ryzyko szybkiego oderwania się komórek nowotworowych od guza do krwioobiegu. W tych warunkach częściej stwierdza się obecność przerzutów w płucach, a całkowite przeżycie chorych jest krótsze [22-24]. Uważa się jednak, że VEGF jest tylko jednym z wielu czynników regulujących tworzenie naczyń. Co więcej, VEGF nie ma wpływu na początkowe etapy kancerogenezy w OS, gdyż guzy mniejsze niż 2mm<sup>3</sup> nie są zależne od neowaskularyzacji [16,25].

Stopień ukrwienia guza OS jest istotny z kilku powodów. Wpływa on na dynamikę wzrostu, ryzyko powstania przerzutów, jak również na skuteczność chemioterapii. Pomimo to, próby wykorzystania średniej gęstości naczyń (MVD) jako czynnika prognostycznego w OS wciąż są tematem sporów. Istnieją doniesienia ukazujące ujemną korelację pomiędzy MVD a przeżyciem całkowitym lub wolnym od cho-

oxygen supply, a Hypoxia Induced Factor (HIF) is activated and promotes the transcription of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), glucose transporter Glut-1, erythropoietin (EPO), anaerobic glycolysis enzymes, and others. In normal cells HIF is coded for by the HIF-1a gene, while in OS cells HIF is coded for also by the HIF-2 gene [18]. Expression of hypoxia induced factors sustains the ability of OS cells to proliferate and migrate under unfavorable conditions *in vitro* [18]. It has been proved that patients with elevated HIF-1a levels (32-79% of OS patients) are characterized by worse prognosis in terms of overall survival and risk of metastases [19,20].

Intensive proliferation and angiogenesis, resulting from hypoxia, lead to the development of an aggressive phenotype of OS. However, the network of new blood vessels is chaotic and highly ineffective. The disproportion between oxygen supply and the metabolic needs of proliferating cells ultimately continues to occur and OS cells adapt to chronic hypoxia [21].

HIF-1a-dependent expression of VEGF is present in 50-80% of OS patients. The Vascular Endothelial Growth Factor stimulates endothelial proliferation, migration and neovascularization. There are numerous controversies regarding the influence of VEGF expression on the clinical and pathological presentation of OS. However, the correlation between patient's survival and the serum concentration of VEGF as well as its expression in the tumor has not been conclusively confirmed, with recent studies furnishing unequivocal evidence [18,19,22-24].

In tumors with high VEGF expression (especially of VEGF 165 isoform), high medium vascular density (MVD) is observed. Consequently, the total surface area of the epithelium is relatively large, increasing the risk of rapid neoplastic cell migration into the circulatory system. In this setting, the incidence of pulmonary metastases is higher and patients are characterized by shorter overall survival [22-24]. However, it is postulated that VEGF is only one of many factors regulating neovascularization and neoangiogenesis. What is more, VEGF has no influence on the initial events in OS carcinogenesis, as tumors of less than 2 mm<sup>3</sup> are not neovascularization-dependent [16,25].

OS vascularization is important for several reasons. It regulates the dynamics of tumor growth, it has an effect on the risk of progression to metastatic OS, as well as on the effectiveness of chemotherapy. Despite these facts, the use of MVD as a prognostic factor in OS patients remains controversial. Some authors have demonstrated a negative correlation between MVD and overall or disease free survival [22,

roby [22,26]. Z drugiej jednak strony, inni badacze wykazali brak związku pomiędzy MVD a obrazem klinicznym OS [19,27,28]. Wreszcie Kreuter i wsp. opublikowali badanie, którego wyniki zaprzeczają obu wyżej wymienionym poglądom. Badacze zaobserwowali dłuższe przeżycie i wyższy odsetek odpowiedzi na chemioterapię u chorych ze wzmożoną angiogenezą mierzoną poprzez MVD [29]. Na podstawie aktualnych danych możemy przypuszczać, że wysoka MVD ma negatywny wpływ na przebieg naturalny OS, podczas, gdy u chorych poddanych chemioterapii prowadzi do hiperperfuzji guza i lepszej penetracji leków.

### MIGRACJA KOMÓREK OS

Przerzuty u pacjentów z OS rozwijają się preferencyjnie w płucach. Mechanizm tej preferencji pozostaje nieznan. Wciąż wzrasta jednak liczba prac ukazujących podobieństwo tego procesu do zjawiska migracji i sortowania komórek układu odpornościowego.

Produkcja cytokin przez komórki umożliwia ich interakcje ze stosownymi receptorami. Na podstawie tego faktu zaproponowano hipotezę, wedle której w komórkach OS dochodzi do ekspresji receptorów łączących się ze swoistymi ligandami na powierzchni komórek w płucach. Niniejszy mechanizm został zbadany i potwierdzony dla cytokiny CXCL12 (zwaną również SDF-1) i jej receptora CXCR4. Cytokina CXCL12 jest produkowana przez komórki zrębu płuc, preferencyjnego miejsca docelowego dla krążących komórek OS. Komórki nowotworowe posiadające na powierzchni receptor CXCR4 krążą w ustroju do momentu natrafienia na odpowiednie środowisko, w którym duże stężenie CXCL12 doprowadzi do aktywacji receptora i interakcji z ligandem, a tym samym umożliwi osiadanie komórek OS w płucach. Przerzutowy guz jest finalnym efektem sekwencji zdarzeń [30-32]. CXCR4 ulega ekspresji w ok. 33% komórek guza pierwotnego, natomiast w przerzutach ekspresja ta jest dwukrotnie wyższa i koreluje z poziomem ekspresji VEGF [24]. W badaniach *in vitro* komórki OS pod wpływem CXCL12 wykazują większą zdolność nie tylko do migracji i adhezji do macierzy międzykomórkowej, ale również do proliferacji i inwazji, co wyraża się zwiększonym wydzielaniem MMP9. Zablokowanie CXCR4 na komórkach linii OS przed wszczepieniem ich do myszy zmniejszyło liczbę ognisk przerzutowych w płucach o 50-100% [31,32].

Warto podkreślić, że wnioski płynące z badań nad rolą cytokin w progresji nowotworów są relatywnie często niejednorodne. Może to być wynikiem powszechności występowania cytokin w organizmie, złożoności ich funkcji oraz roli mikrośrodowiska gu-

26]. On the other hand, there are studies reporting no relationship between MVD and the clinical presentation of OS [19,27,28]. Finally, the results of a study by Kreuter et al. deny both points of view. The authors observed higher survival and superior response rates to chemotherapy in patients with increased angiogenesis as measured by MVD [29]. Based on current evidence, we may suppose that high MVD has a negative effect on the natural history of OS, while in patients exposed to systemic chemotherapy, it leads to hyperperfusion of the tumor and better penetration of chemotherapy agents.

### MIGRATION OF OS CELLS

Lungs are the preferential site of OS metastases. The mechanism underlying this preference remains unknown. However, the number of studies showing similarity of this process to the process of migration and selection of immune cells is still rising.

Cytokines produced by cells mediate the interaction between the cytokine-ligand and its receptor. A hypothesis that circulating OS cells express receptors which interact with specific cytokine-ligands on lung cells has been proposed. This mechanism has been investigated and confirmed for the cytokine CXCL12 (called also SDF-1) and its receptor, CXCR4. CXCL12 is produced by lung stroma cells, the preferred destination of circulating OS cells. Neoplastic cells bearing the membrane CXCR4 receptor circulate in the blood until they find an adequate microenvironment with a high concentration of the CXCL12 cytokine. In such a microenvironment, the CXCR4 receptor is activated, resulting in interaction with the ligand, and OS cells settle in the lungs. The metastatic tumor is the final effect of this process [30-32]. CXCR4 is expressed by a third of primary OS tumor cells and two-thirds of metastatic OS tumor cells. The level of expression correlates with the expression of VEGF [24]. *In vitro* studies have documented that, under the influence of CXCL12, OS cells are characterized by improved ability to migrate and adhere to the intercellular matrix as well as to proliferate and invade adjacent tissues (increased production of MMP9). The number of pulmonary metastases was reduced by 50-100% when the CXCR4 receptor in an OS cell line was blocked before implantation into mice [31,32].

Conclusions coming from reports on the role of cytokines in tumor progression are relatively often contradictory. It may result from the common presence of cytokines in the body, the complexity of their functions and the role of tumor microenvironment in cytokine production, which is not definitely

za w ich wytwarzaniu, która nie jest ostatecznie wyjaśniona. Niektórzy autorzy przypisują ekspresję CXCR4 jedynie komórkom zapalnym, zaś faktyczna rola innych chemokin (CCR7, CCR10 i innych) w patogenezie OS jest kontrowersyjna [33,34].

## OPORNOŚĆ NA LECZENIE

Wobec wysokiego odsetka nawrotów choroby po zastosowanym leczeniu chirurgicznym i chemioterapii, wielu badaczy pojęło trud wyjaśnienia mechanizmów lekooporności w OS. Wśród różnych czynników odporności na chemioterapię, najlepiej opisana została funkcja glikoproteiny P (Pgp), będącej ATP-zależną pompą komórkową kodowaną przez gen MDR1, która jest zdolna do usuwania doksorubicyny z wnętrza komórek [35].

Pgp ulega ekspresji w około 30% komórek OS, dwukrotnie częściej w ogniskach przerzutowych niż w guzie pierwotnym. Pomimo sprzecznych doniesień przyjęto teorię zakładającą, że nadekspresja Pgp wiąże się ze zwiększonym ryzykiem progresji OS i krótszym przeżyciem chorych [36,37,38]. Pgp pełni podstawową funkcję w oporności na chemioterapię, jednak jej obecność na komórkach OS nie koreluje z histologiczną odpowiedzią na leczenie. Tłumaczy się to tym, iż rozmiar martwicy guza po zastosowanej terapii neoadjuwantowej odzwierciedla skuteczność wszystkich zastosowanych leków, także tych, które działają niezależnie od obecności Pgp [37-39].

Wciąż kontrowersyjny pozostaje wpływ Pgp na fenotyp komórek OS. Gorlick i wsp. dowodzą, że chorzy, u których stwierdza się ekspresję Pgp charakteryzują się gorszym rokowaniem w porównaniu z chorymi, u których nie stwierdza się ekspresji tego białka. Wyjaśnieniem tego faktu jest większa inwazyjność komórek OS oraz duży potencjał do dawania przerzutów [39]. Z drugiej strony, Scotland i wsp. dowodzą, że nadekspresja Pgp wiąże się z mniejszą inwazyjnością, obniżoną zdolnością do adhezji komórek i mniejszą liczbą przerzutów [40].

## NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Nowotworowe komórki macierzyste (cancer stem cells, CSC) mogą odgrywać kluczową rolę w inicjacji rozwoju guza, jego wzroście oraz zdolności do dawania przerzutów i nawrotów. CSC są populacją komórek opisaną po raz pierwszy u chorych z ostrą białaczką szpikową. CSC zachowują się podobnie do prawidłowych komórek macierzystych i progenitorowych, są więc zdolne do samoodnowy, pluripotenne (zdolne do podziałów dających komórki budujące dowolny organ, z wyłączeniem łożyska), odporne na

understood. Some authors attribute the expression of CXCR4 only to inflammatory cells, while the importance of other cytokines (CCR7, CCR10 and others) for pathogenesis of OS is controversial [33,34].

## TREATMENT RESISTANCE

A high recurrence rate of OS after surgery and chemotherapy has prompted many investigators to study the mechanisms of drug resistance in OS patients. Among many potential factors, the role of P-glycoprotein (Pgp) has been widely described. Pgp, the multidrug-resistance product of the gene MDR1, is a transmembrane adenosine triphosphatase-dependent efflux pump, which is able to pump doxorubicin out of the neoplastic cell [35].

Pgp is expressed in 30% of OS cells, twice as often in metastases than in primary tumors. The theory that overexpression of Pgp is associated with higher risk of OS progression and shorter survival is accepted despite some controversies [36,37,38]. Pgp function is a major element of chemotherapy resistance. However, the presence of Pgp in OS cells does not correlate with histological response to treatment. This has been attributed to the fact that the extent of tumor necrosis after neoadjuvant chemotherapy reflects the effectiveness of all chemotherapy agents, including those which act independently of Pgp [37-39].

The effect of Pgp expression on the phenotype of OS cells is still controversial. Gorlick et al. believe that Pgp-positive patients have worse prognosis compared to Pgp-negative patients because of a more aggressive phenotype, characterized by invasiveness and a strong potential to metastasize [39]. On the other hand, Scotland et al. showed that Pgp overexpression is associated with less invasiveness, worse OS cell adhesion and lower incidence of metastases [40].

## CANCER STEM CELLS

Cancer stem cells (CSC) may play a key role in the initiation of tumor development, growth, and the tumor's ability to metastasize and recur. CSCs are a cell population first described in patients with acute myeloid leukemia. CSCs behave similarly to normal stem cells: they have the ability to self-renew, are pluripotent (capable of giving rise to any cell type of an organ, excluding the placenta), their mitotic index is reduced and they are resistant to apoptosis. Genetically, CSCs are also similar to normal stem cells:

apoptozę, zaś ich indeks mitotyczny jest niski. Również od strony genetycznej CSC są podobne do prawidłowych komórek macierzystych, charakteryzując się ekspresją czynników transkrypcyjnych Nanog i Oct3/4 oraz białek szlaków WNT i Notch. CSC mogą powstawać zarówno z komórek macierzystych, które przechodzą transformację nowotworową, jak również z komórek zróżnicowanych i progenitorowych, które w wyniku mutacji odzyskują zdolność do samoodnowy [41,42].

Ze względu na zdolność komórek OS do przetrwania, wzrostu i tworzenia przerzutów, pomimo stosowania intensywnej chemioterapii, zaproponowano udział CSC w patogenezie OS. Hipotezę potwierdzono, izolując z linii komórkowej OS grupę komórek spełniających kryteria CSC (m. in. ekspresja czynników transkrypcyjnych Nanog i Oct3/4), cechujących się ponadto większą opornością na chemioterapię [43,44,45]. Na podstawie tych doniesień możemy domniemać, iż nawroty OS mogą być efektem przeżycia małej grupy CSC odpornych na chemioterapię.

CSC w OS pochodzą prawdopodobnie z mezenchymalnych komórek macierzystych, które uległy transformacji nowotworowej (aneuploidia, delecja genu *Cdkn2*). Zjawisko odporności na chemioterapeutyki może wynikać z ekspresji genu *ABCG2*, którego produktem są pompy efflux usuwające chemioterapeutyki z wnętrza komórki [42].

## PODSUMOWANIE

Minione lata przyniosły wiele nowych koncepcji dotyczących patogenezy i biologii przerzutowych guzów kostniakomięsaka. Podczas, gdy część z nich jest już obszernie zbadana, udowodniona i zaakceptowana, inne wciąż pozostają w fazie intensywnych badań. Kombinacja wyników badań dotyczących różnych mechanizmów w procesie rozsiewu komórek nowotworowych i wzrostu guza uprawnia nas do kolejnych kroków w sposobie myślenia o nowotworach złośliwych i stanowi nieodzowny warunek dla poprawy wyników leczenia.

## PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

1. Kempf-Bielack B, Bielack SS, Jürgens H, et al. Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *J Clin Oncol.* 2005;23(3):559-68
2. Bruland ØS, Høifødt H, Hall KS, Smeland S, Fodstad Ø. Bone marrow micrometastases studied by an immunomagnetic isolation procedure in extremity localized non-metastatic osteosarcoma patients. *Cancer Treat Res.* 2009;152:509-15
3. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 1989;8(2):98-101
4. Ewing J: *Neoplastic Diseases. A Treatise on Tumors.* Philadelphia, PA, Saunders 1928
5. Bjørnland K, Flatmark K, Pettersen S, Aaasen AO, Fodstad O, Maelandsmo GM. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J Surg Res.* 2005;127(2):151-6
6. Korpi JT, Hagström J, Lehtonen N, et al. Expression of matrix metalloproteinases-2, -8, -13, -26, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 in human osteosarcoma. *Surg Oncol.* 2011;20(1):e18-22
7. Uchibori M, Nishida Y, Nagasaka T, Yamada Y, Nakanishi K, Ishiguro N. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Oncol.* 2006;28(1):33-42

they express the Nanog and Oct3/4 transcription factors and proteins of the Wnt and Notch pathways. CSCs derive from either transformed stem cells or mutated pluri- / unipotent cells capable of self-renewal [41,42].

OS cells are able to survive, grow and metastasize despite intensive chemotherapy, which has prompted investigators to propose that CSCs play a role in the pathogenesis of OS. The hypothesis was confirmed by isolation from an OS cell line of a population of cells which meet the criteria for CSC (i.e. expression of Nanog, Oct3/4) and which are characterized by greater resistance to chemotherapy [43,44,45]. Based on these studies, we may suppose that OS recurrences result from the survival of a small population of CSCs resistant to chemotherapy.

CSCs in OS probably originate from mesenchymal stem cells transformed as a consequence of aneuploidization and genomic loss of the *Cdkn2* gene [46]. Resistance to chemotherapy agents may result from the expression of the *ABCG2* gene, which codes for efflux pumps able to pump drugs out of the neoplastic cell [42].

## CONCLUSION

Past years have brought many new concepts regarding the pathogenesis and biology of metastatic osteosarcoma tumors. Some of them have been well studied, confirmed and widely accepted. Others are still under investigation. Combining the findings of studies concerning different mechanisms in the process of neoplastic cell dissemination and tumor growth prompts us to make new steps in our way of thinking about malignancy and is a prerequisite for improving treatment results.

8. Kang HG, Kim HS, Kim KJ, et al. RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. *J Orthop Res.* 2007;25(5):696-702
9. Ferrari C, Benassi S, Ponticelli F, et al. Role of MMP-9 and its tissue inhibitor TIMP-1 in human osteosarcoma: findings in 42 patients followed for 1-16 years. *Acta Orthop Scand.* 2004;75(4):487-91
10. Xu J, Wu S, Shi X. Expression of matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in osteosarcoma. *J Orthop Res.* 2010;28(12):1621-5
11. Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;46(2):165-86
12. Wan X, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005;65(6):2406-11
13. Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med.* 2004;10(2):182-6
14. Di Cristofano C, Leopizzi M, Miraglia A, et al. Phosphorylated ezrin is located in the nucleus of the osteosarcoma cell. *Mod Pathol.* 2010;23(7):1012-20
15. Ogino W, Takeshima Y, Mori T, et al. High level of ezrin mRNA expression in an osteosarcoma biopsy sample with lung metastasis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(7):435-9
16. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(2):68-72
17. Kim JW, Gao P, Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):291-8
18. Knowles HJ, Schaefer KL, Dirksen U, Athanasou NA. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer.* 2010;10:372
19. Mizobuchi H, García-Castellano JM, Philip S, Healey JH, Gorlick R. Hypoxia markers in human osteosarcoma: an exploratory study. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(9):2052-9
20. Yang QC, Zeng BF, Dong Y, Shi ZM, Jiang ZM, Huang J. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome. *Jpn J Clin Oncol.* 2007;37(2):127-34
21. Szala S. Angiogenesis and immune suppression: yin and yang of tumor progression? *Postepy Hig Med Dosw.* 2009;63:598-612
22. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):572-7
23. Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, et al. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 1999;35(7):1089-93
24. Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, et al. CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis. *Mod Pathol.* 2006;19(5):738-45
25. Yin D, Jia T, Gong W, et al. VEGF blockade decelerates the growth of a murine experimental osteosarcoma. *Int J Oncol.* 2008;33(2):253-9
26. Wang D, Chen L, Gao F. Correlation of tumor microvessel density with prognosis in osteogenic sarcoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 1997;26(5):266-9
27. Mantadakis E, Kim G, Reisch J, et al. Lack of prognostic significance of intratumoral angiogenesis in nonmetastatic osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23(5):286-9
28. Ek ET, Ojaimi J, Kitagawa Y, Choong PF. Does the degree of intratumoural microvessel density and VEGF expression have prognostic significance in osteosarcoma? *Oncol Rep.* 2006;16(1):17-23
29. Kreuter M, Bieker R, Bielack SS, et al. Prognostic relevance of increased angiogenesis in osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8531-7
30. Ben-Baruch A. Site-specific metastasis formation: chemokines as regulators of tumor cell adhesion, motility and invasion. *Cell Adh Migr.* 2009;3(4):328-33
31. Kim SY, Lee CH, Midura BV, et al. Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25(3):201-11
32. Perissinotto E, Cavalloni G, Leone F, et al. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 Pt 1):490-7
33. von Luetlichau I, Segerer S, Wechselberger A, et al. A complex pattern of chemokine receptor expression is seen in osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2008;8:23
34. Laverdiere C, Hoang BH, Yang R, et al. Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2561-7
35. Baldini N, Scotlandi K, Serra M, et al. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J Orthop Res.* 1999;17(5):629-32
36. Ferrari S, Bertoni F, Zanella L, et al. Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer.* 2004;100(9):1936-42
37. Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, et al. Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. *J Clin Oncol.* 2003;21(3):536-42
38. Pakos EE, Ioannidis JP. The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. *Cancer.* 2003;98(3):581-9
39. Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, et al. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res.* 2003;9(15):5442-53
40. Scotlandi K, Manara MC, Serra M, et al. The expression of P-glycoprotein is causally related to a less aggressive phenotype in human osteosarcoma cells. *Oncogene.* 1999;18(3):739-46



41. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet.* 2008;49(2):193-9
42. Siclari VA, Qin L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *J Orthop Surg Res.* 2010;5:78
43. Wang L, Park P, Lin CY. Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(6):543-552
44. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia.* 2005;7(11):967-76
45. Lopes A, Neves SR, do Carmo A, Paiva AA, Botelho M, Gomes CM. Identification of cancer stem-like cells in osteosarcoma and their implications in response to chemotherapy. *BMC Proceedings* 2010, 4(Suppl 2):P41
46. Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, et al. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *J Pathol.* 2009;219(3):294-305

---

**Liczba słów/Word count:** 5549

**Tabele/Tables:** 0

**Ryciny/Figures:** 0

**Piśmiennictwo/References:** 46

*Adres do korespondencji / Address for correspondence*

*lek. Sławomir Poletajew, e-mail: slawomir.poletajew@wum.edu.pl*

*Katedra Anatomii Patologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa  
00-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, tel./fax: +48601433488*

*Otrzymano / Received*

*25.06.2011 r.*

*Zaakceptowano / Accepted*

*06.10.2011 r.*

