

Vloga matičnih celic pri napredovanju in zdravljenju glioma

The role of stem cells in glioma progression and therapy

Mateja Obrez,¹ Helena Motaln,¹ Urška Tajnšek,¹ Tamara Lah Turnšek^{1,2}

¹ Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

² Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 98a, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

prof. dr. Tamara Lah Turnšek, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, tel: +386 5 92 32 703, fax: +386 1 21 42 870, e-mail: tamara.lah@nib.si

Ključne besede:

glioblastoma multiformae, tumorske matične celice, mezenhimske matične celice, mikrookolje tumorja, celična terapija

Key words:

glioblastoma multiformae, tumour stem cells, mesenchymal stem cells, tumour micro-environment, cell therapy

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013; 82: 113–22

Prispelo: 23. okt. 2012,
Sprejeto: 12. nov. 2012

Izvleček

Izvor tumorjev in stohastično naravo procesa karcinogeneze najbolje opisuje hierarhični model, ki predvideva obstoj tumorskih matičnih celic (TMC). Slednje predstavljajo populacijo celic z neomejenim samoobnovitvenim potencialom, ki so se sposobne diferencirati v vrste celic vseh treh zarodnih linij in so manj občutljive na večino protirakavih učinkovin. Zato predstavljajo glavni vir za razvoj in rast tumorja, zaradi svoje odpornosti na kemoterapijo pa so vzrok za ponovitev bolezni. Za uspešno zdravljenje možganskega tumorja glioma in njegove najbolj maligne oblike, glioblastoma multiformae (GBM), bi zato bilo potrebno odstraniti prav vse TMC. Žal slednjega zaradi prehitre infiltrativne vrsti subpopulacije GBM celic z visoko izraženimi geni za gibljivost (migratom) v okolno zdravo možgansko tkivo, ni možno doseči s trenutno uporabljanimi načini zdravljenja (npr. kirurškim izrezom).

Poleg TMC, ki so ključne za razvoj in razrast tumorja, tkivo tumorja vsebuje še hematopoetske matične celice, endotelne predniške celice in mezenhimske matične celice (MMC). Delovanje teh drugih vrst matičnih celic, kjer je bila celicam MMC že dokazana protitumorska aktivnost v GBM, pa je odvisno od tumorskega mikrookolja. Žal mehanizmi in delovanje MMC med modulacijo rasti tumorja preko parakrinih in neposrednih interakcij z GBM (matičnimi) celicami še niso znani. Kljub temu pa matične celice, s poudarkom na MMC, predstavljajo nove nosilce npr. za ciljni vnos terapevtske učinkovine v tumor, ki bi lahko izboljšali učinkovitost trenutnih protitumorskih terapij. Razvoj celičnih zdravil veliko obeta, saj so MMC, poleg svojih imunomodulacijskih lastnosti, sposobne tudi usmerjenega gibanja v GBM in tam učinkovati, o čemer razpravlja ta prispevek.

Abstract

The concepts of tumour origin and stochastic nature of carcinogenesis are being challenged today by hierarchical models that predict the existence of cancer stem cells (CSCs), which are postulated as unique cell population capable of infinite self renewal, multilineage differentiation and having a higher resistance to conventional cancer therapy—thus facilitating malignant growth and therapy resistance. Accordingly, successful treatment of adult brain tumour—glioma and its most malignant stage—glioblastoma multiforme (GBM), would require the elimination of CSCs to avoid tumour relapse. Yet, with available therapy (i.e. surgery) in GBMs this cannot be achieved, due to infiltrative growth of a subpopulation of GBM cells with highly expressed migratory genes (migratome) into the normal brain tissue.

Besides CSCs – a proven prerequisite for tumour development and progression, tumour bulk mass also comprises haematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells (MSCs). The role of these other types of stem cell was shown to largely depend on the tumour microenvironment, where their contradictory anti-tumour action was evidenced. Yet, the exact mechanisms and MSC's role in cell-mediated modulation of tumour behaviour via paracrine and direct interactions with GBM (stem) cells still remain unknown. Nevertheless these stem cells, particularly MSCs, may represent novel therapeutic vectors for enhanced target-site delivery of chemotherapeutics, which are urgently needed to improve efficiency of current glioma treatment. So far, cell therapy using MSCs appears promising, due to MSC's selective tumour tropism and their immuno-modulatory potential regarding treatment of GBM, which will be discussed in this review.

Predstavljeno delo je delno podprto s strani Agencije Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost, program P1-0245, s strani ERA-NET-INREMOS: projekt SYSTHER – (#3211-06-000539) in s strani INTERREG Slovenija-Italija: projekt GLIOMA (CB134) (2008–2011).

The work presented here was partially supported by the Slovenian Research Agency Programme P1-0245, by the ERA-NET Action of INREMOS project SYSTHER (# 3211-06-000539) and INTERREG Slovenia -Italy: Project GLIOMA (CB134).

Uvod

Kljub znanstvenemu napredku in pospešenemu prenosu raziskovalnih izsledkov v klinično prakso rak ostaja bolezen z dolgoročno grožnjo ponovljivosti obolenja. Ob tem nam razvoj celične biologije in vpeljava pristopov, ki vključujejo sodobne vidike genomike, transkriptomike, proteomike in drugih »-omik« (izraz, ki označuje uporabo orodij sistemske biologije) razkrivajo potek procesov, ki so nam bili pred komaj desetimi leti nepredstavljeni. Kljub povišani pojavnosti raka beležimo znižanje smrtnosti in porast preživetja rakavih bolnikov. Žal to ne drži za najbolj maligno obliko možganskega raka – gliom, oziroma za njegovo najbolj maligno stopnjo glioblastoma multiformae (GBM), pri kateri se je preživetje bolnikov po diagnozi v zadnjih petih letih izboljšalo le z 10 na 14 mesecev kljub uvajanju nekaterih ciljnih oblik zdravljenja.¹

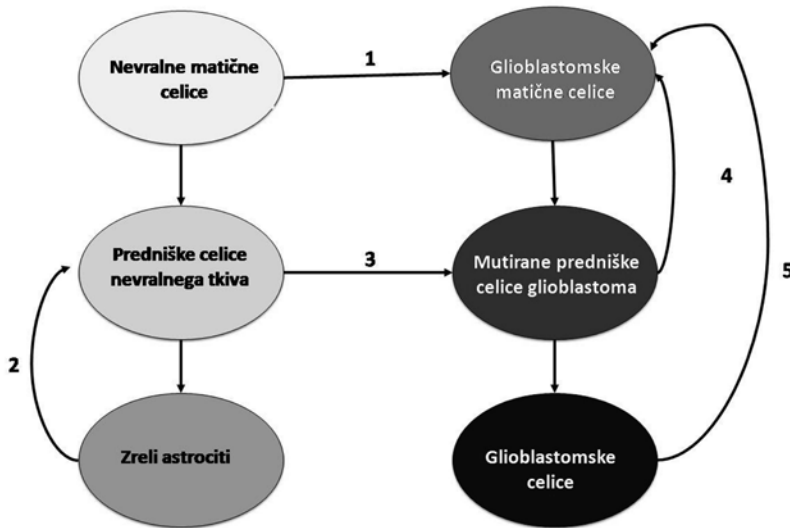
Diagnostika gliomov že desetletja temelji na analizi morfološkega izgleda tumorskih celic, na podlagi katere se po določitvi izvora celic (astrociti, oligodendrogialne celice, ependimalne celice) in upoštevanju agresivnosti tumorja (prisotnost nekroze, jedrnih polimorfizmov, mitoz) označi stopnja tumorja.² Med gliomi ločimo astrocitom (stopnja I in II po lestvici WHO), anaplastični astrocitom (stopnja III po lestvici WHO) in glioblastoma multiformae (GBM; stopnja IV po lestvici WHO).³ Medtem ko se pri mlajših bolnikih GBM razvija preko maligne preobrazbe tumorjev nižje stopnje astrocitnega ali oligodendrogialnega izvora (sekundarni GBM), se pri starejših bolezen pojavi *de novo* (primarni GBM). Bioinformatična analiza izražanja genov/molekularnih označevalcev v teh dveh heterogenih skupinah razkrije, da je možno ti dve skupini tumorjev dodatno razvrstiti v pronevralni, nevralni, klasični in mezenhimski podtip. Na osnovi izražanja genov v GBM se poleg določanja števila kopij genov, vsebnosti mikroRNA in metilacijskih vzorcev izpopolnjuje atlas genoma rakavih celic (TCGA), ki že omogoča izvedbo integriranih analiz na več ravneh, ki bodo prispevale k boljšemu razumevanju razvoja GBM.⁴

Vzrok različnih podtipov GBM je najverjetneje različen celični izvor. Teorijo o

razvoju raka iz t. i. matičnih celic so prvič razvili že v 19. stoletju na osnovi podobnosti med razvojem zarodkov in rakavih tvorb, pri čemer naj bi rakavo tkivo nastalo iz majhne populacije embrionalnih celic, ki so ostale 'pozabljene' v odraslih tkivih. Šele pred dobrim desetletjem so se pojavile moderne razlage razvoja tumorjev iz tkivnih matičnih celic, ki se preobrazijo v tumorske matične celice (TMC).⁵ Splošno velja, da je razvoj in rast tumorja zelo kompleksen proces, ki ga uravnavajo številni geni, onkogeni in tumorski supresorji. V procesu iniciacije tumorja se ti geni nepovratno spremenijo, zaradi česar pride do nekontroliranega podvajevanja celic in kasneje do aktiviranja genov za njihovo giblivosť.⁶ Iniciacija tumorja se lahko prične že v zgodnjem življenjskem obdobju, a dejanska razrast sledi šele več let kasneje, ko se ob vse večji verjetnosti vpliva tumorskih promotorjev in zaradi staranja tkiv spremenijo pogoji, potrebni za razvoj bolezni. To se kaže v eksponentni porasti incidence raka pri ljudeh med 50. in 55. letom.^{7,8}

Rast tumorja poteka hkrati z ustvarjanjem razlik med subpopulacijami tumorskih celic, ki jih povzročata tumorsko mikrookolje. Slednje v začetni fazi rasti deluje zavirajoče, vendar se med napredovanjem tumorja spremeni v okolje, ki podpira tumorsko rast in omogoči njegovo invazijo in metastaziranje. To celično in strukturno okolje tumorja se začne spreminjati in preoblikovati med rastjo tumorske mase. V tem procesu igrajo ključno vlogo interakcije med subpopulacijami tumorskih celic in celicami normalnega tkiva.⁹ Šele s poznavanjem lastnosti tumorskih celic, medcelične komunikacije in dejavnosti mikrookolja, tj. celic tumorske strome in zunajceličnega matriksa, bo možno razumeti razvoj in rast GBM.⁶

Po razkritju vloge stromalnih celic v tumorju je prišlo do razvoja novih terapevtskih pristopov za ciljno zdravljenje raka, ki ne stremijo le k uničenju TMC, temveč tudi k protirakavi modulaciji samih stromalnih celic. K tem prištevamo znotraj tumorja celice imunskega sistema, fibroblaste in endotelijske celice, ki lahko izvirajo iz infiltriranih predniških in normalnih matičnih celic: hematopoetskih in mezenhimskih matičnih celic (MMC). Zaradi svojih specifičnih la-



Slika 1: Izvor tumorskih matičnih celic. Prikazane so možne poti nastanka glioblastomskih matičnih celic. Nastanejo lahko s preoblikovanjem nevalnih matičnih celic (1). Zreli astrociti se lahko de-diferencirajo v predniške celice nevralnega tkiva(2), te pa se lahko preoblikujejo v mutirane predniške celice (3) in naprej v glioblastomske matične celice (4). Tudi maligne glioblastomske celice se lahko po še neznanem mehanizmu de-diferencirajo v glioblastomske matične celice (5).

stnosti, ki jih bomo opisali v nadaljevanju, so MMC primerne za razvoj celičnih nosilcev zdravil (vektorjev). Z vnosom genetsko modificiranih celic MMC bi bilo namreč možno prodreti v osrčje tumorja in uničiti tumorske (matične) celice ter preprečiti ponoven pojav GBM.

Izvor raka

Rak je bolezen, ki se razvije v kompleksnem večstopenjskem procesu karcinogeneze. Prvi korak (iniciacija) vključuje kopičenje poškodb v celicah zaradi različnih zunanjih in notranjih dejavnikov. Sledita mu promocija s pospešenim nekontroliranim podvajanjem poškodovanih celic in invazivna razrast tumorja po telesu. Med karcinogenezo rakave celice pridobijo specifične lastnosti, kot so: neobčutljivost na rastne zaviralce, sprememba celičnega cikla in neomejen podvojitveni potencial, odpornost na apoptozo, sposobnost tvorbe novih žil (angiogeneza), in kar je najpomembnejše, sposobnost prodiranja v okolna in oddaljena tkiva.¹⁰ Za razumevanje nastanka in razvoja raka je potrebno poznati tudi delovanje normalnih celic znotraj tumorske mase, t. i. tumorsko stromo. Te celice lahko pomagajo tumorskim celicam pridobiti maligne lastnosti s posredno parakrino ali neposredno kontaktno komunikacijo in izmenjavo signalnih molekul. S tem ustvarjajo ugodno mikrookolje za rast tumorske mase in metastaziranje tumorja po telesu.¹¹

Ob tem se pojavi vprašanje, katere celice so prva tarča teh poškodb? V tem prispevku se bomo osredotočili na celice, ki so potrebne za razvoj in rast tumorja, tj. na tumor iniciacijske celice (TIC), imenovane tudi tumorske matične celice (TMC), ki sicer niso nujno prva tarča poškodb. Dediferenciacija TIC v aktivno deleče se maligne rakave celice je odvisna od različnih genetskih mutacij in od njihove sposobnosti prilagajanja tumorskemu mikrookolju. Splošno priznani hierarhični model razvoja raka razlaga razvoj neoplazije na istem ali drugem mestu v telesu z obstojem majhne populacije TMC, kar podpirajo različni *in vivo* poskusi ortotopskega vbrižgavanja TMC v živalske modele.¹²

TMC lahko nastanejo iz različnih vrst celic znotraj obolelega tkiva.¹ Slika 1 prikazuje to na primeru nastanka GBM matične celice. Med razvojem tumorja TMC pridobijo gibljivost (migracijski fenotip), s čimer lahko povzročijo razvoj tumorja na oddaljenem mestu (metastaze),¹³ lahko pa so gibljive že njihove izvirne celice.¹⁴ Prehod iz negibljive v gibljivo obliko naj bi tudi pri TMC potekal z epitelno mezenhimsko preobrazbo (EMP). Na ta vidik gibljivosti in invazije TMC se v veliki meri usmerjajo raziskave pri GBM. Za GBM so značilne močno invazivne TMC, ki pa ne metastazirajo izven lobanjskega prostora. Zaradi odpornosti TMC na kemo- in radioterapijo¹⁵ pa te predstavljajo tudi glavno tarčo za ciljno zdravljenje raka. Trditev, da je rak zgolj bolezen (tumorskih) matičnih celic,¹ nadgrajujejo raziskave, ki dokazujejo, da se fenotip TMC v celoti izrazi le ob specifični interakciji s tumorskim mikrookoljem (hipoksija, modulacija TMC s presnovki stromalnih celic itd.) v t. i. nišah tumorskih matičnih celic.¹³

Glioblastom

Celični izvor gliomske matične celice

Danes najširše priznana teorija o nastanku TMC pravi, da heterogenost znotraj tumorja ni zgolj posledica naključnih mutacij in evolucije posameznih klonov celic, temveč rezultat medcelične komunikacije in hierarhičnih odnosov znotraj tumorske mase, katerega vrh zasedajo TMC.^{16,1} Tudi

TMC se lahko dalje z dodatnimi mutacijami in epigenetskimi modifikacijami dediferencirajo v različne tipe TMC, ki so lahko celo bolj agresivni kot njihove predhodnice. V tumorski masi se tako lahko vzpostavi dominanten odnos ali pa pride le do sobivanja različnih vrst TMC.¹²

Glede na genetske analize humanih tumorjev obstaja šest genetsko različnih podtipov GBM, ki naj bi izvirali iz različnih vrst TMC oz. v primeru GBM iz različnih tipov gliomskih matičnih celic (GMC).^{1,17} Ta ideja izhaja iz klasičnega modela o razvoju glioma, ki je izvor glioma razlagal z maligno preobrazbo astrocitov.² Če to idejo nadgradimo z obstojem GMC, katerih vir so nevralne matične celice (NMC), dobimo osnovo za razvoj različnih genotipov GBM. Znano je, da v normalnih pogojih iz NMC nastajajo glialni in nevralni tipi celic, v primeru mutacij pa bi se iz NMC lahko razvile različne genetsko opredeljene vrste GMC. Po drugi strani pa se lahko heterogene GMC razvijejo tudi iz poškodovanih tkivnih celic po združitvi s tkivnimi MMC in po malignizaciji, ki ji sledi, s čimer pridobijo matične lastnosti.^{18,12} Večina objav govori v prid hipotezi¹⁹ o razvoju stabilnih GMC iz različnih podvrst celic znotraj gliomskih tkivnih niš šele po medsebojnem delovanju s stromalnimi celicami.²⁰

Matične lastnosti GMC se v veliki meri prekrivajo z lastnostmi NMC. Oboje izražajo določene skupne molekularne označevalce, med katere sodijo Nestin, SOX3, MSH1, CD15, Integrin6, A2B5, L1CAM idr., ki vsi sodelujejo predvsem pri zaviranju diferenciacije celic.¹⁷ Že desetletje se za izolacijo in identifikacijo GMC uporablja površinski celični epitop CD133, imenovan prominin-1, ki ga sicer izražajo tudi drugi tipi matičnih celic.²¹ Dokazano kombinacija različnih označevalcev, npr. CD133 skupaj z nestinom, ki se izraža kar v 80–90 % vseh GBM²² in SOX2 ali MSI-1, korelira z naraščajočo invazivnostjo GBM in slabšim preživetjem bolnikov.^{23,2,25} *In vitro* dokazi potrjujejo tudi spreminjanje CD133 negativnih celic v CD133 pozitivne celice,^{26,27} torej nastanek matičnih celic iz predhodno že diferenciranih celic,²⁸ ki lahko nato tvorijo tumor *in vivo*. Za razvoj terapij, usmerjenih proti GMC, pa bi bilo

potrebno odkriti nove, povsem specifične molekularne označevalce za GMC.

Tkivne niše matičnih celic

Tkivna niša matičnih celic predstavlja okolje, v katerem se nahajajo matične celice. Med stromalnimi in matičnim celicami znotraj niše poteka prenos metabolitov in medcelična komunikacija, ki preprečuje diferenciacijo matičnih celic. Primera normalnih niš MC sta kostni mozeg s hematopoetskimi matičnimi celicami in MMC ter subventrikularno območje možganov, kjer se nahajajo NMC. Nišo poleg strukturnih zunajceličnih elementov sestavljajo še fibroblasti, endotelijske in imunokompetentne celice. Znotraj GBM tkiva se GMC niše oblikujejo ob žilah v hipoksičnih območjih,²⁹ ki omogočajo vzdrževanje matičnih lastnosti GMC. V hipoksičnih pogojih se v GMC poveča izražanje AKT kinaze, poviša anaerobna glikoliza (imenovana Warbourgov učinek)¹⁹ in antiapoptotska aktivnost. Tukaj z asimetričnimi delitvami GMC proizvajajo predniške celice, ki imajo večjo potrebo po kisiku.¹ Zato je lahko, a ne izključno, njihova nadaljnja rast odvisna od *de novo* angiogeneze.²⁶

Hipoksija vpliva na lastnosti in delovanje TMC znotraj tumorjev ter izražanje njihovih molekularnih označevalcev.³⁰ *In vivo* pri GBM hipoksične regije sovpadajo s povišanim izražanjem CD133, Nestin, Olig-2, MSH-1 in SOX-2.³¹ Predvideva se, da hipoksija preko mitohondrijev aktivira promotorje genov Hif, ki so ključni za kontrolirano izražanje CD133 v GMC. Tako se Hif α , ki ga izražajo CD133- GMC, izrazi le v močno hipoksičnih pogojih (pod 1 % kisika), medtem ko do izražanja Hif 2α pri CD133+GMC pride že pri višjih parcialnih tlakih kisika (2–5 %). Aktivnost GMC v tumorju je tako dejansko odvisna od mikrookolja, pri čemer Hif 2α stabilizira proliferacijo GMC, medtem ko Hif α uravnava njihovo invazijo.³¹

Gibljivost in invazivnost gliomskih matičnih celic

Rast tumorja je povezana s ponavljajočim se spreminjanjem fenotipa tumorskih celic iz hitro delečih se celic, ki povečajo maso neoplastičnega tkiva, v migracijske

celice, ki so odgovorne za širjenje tumorja. Tumorske celice se lahko med pridobivanjem migracijskih sposobnosti tudi dediferencirajo in pridobijo lastnosti matičnih celic – postanejo podobne GMC.^{32,33} Molekularni dogodki, ki botrujejo procesom spreminjanja fenotipa tumorskih celic, se nanašajo na epiteljsko-mezenhimsko preobrazbo (EMP) in obratno mezenhimsko-epiteljsko preobrazbo (MEP) tumorskih celic.¹⁴ Oba procesa se izmenjujeta med razvojem tkiv in organov in se najverjetneje odvijata tudi med spreminjanjem migracijsko-invazivnih lastnosti tumorskih (GMC) celic.^{12,14} Tako bi CD133+GMC lahko z EMP pridobile sposobnost migracije. Ko dosežejo izbrano mesto v možganskem parenhimu, pa bi jim MEP omogočil ugnjezdjenje in pretvorbo nazaj v stacionarne deleče se celice. Žal natančen mehanizem EMP/MEP pri GMC še ni znan. Vse več publikacij kaže na hipotetični model, ki opisuje CD133 pozitivne celice kot neinvazivno populacijo GMC s potencialom za reverzibilno preklapljanje med stacionarnim CD133(+) in invazivnim CD133(-) fenotipom.¹

Pri načrtovanju protiinvazivne terapije je potrebno upoštevati nabor označevalcev migrirajočih celic, na katerega vpliva tudi zunajcelični matriks (ZCM). Med preobrazbo iz stacionarnega v migracijski fenotip se celicam spremeni morfologija in/ali vklopi t. i. degradom,³⁴ ki vključuje npr. aktivacijo proteaz, potrebnih za preoblikovanje ZCM v gliomu.³⁵ Migracija je lahko odvisna od proteaz (mezenhimski tip) ali pa tudi ne (ameboidni tip gibanja), vendar je v obeh primerih odvisna od sposobnosti celic, da spremenijo svojo obliko. Ta sprememba se najverjetneje tudi pri celicah GBM zgodi med procesom, podobnim EMP.³⁶

In vitro in *in vivo* so za invazijo GBM pomembne proteaze,^{37,38} ki so v določenih tipih tumorja dober napovednik preživetja bolnikov.^{22,39} Njihova proteolizna aktivnost in invazija je povezana z vzorcem razgradnje kolagena I, ki se razlikuje med NMC in CD133+GMC, kjer izražanje CD133 obratno korelira z aktivnostjo proteaze katepsina B.²⁴ GMC so torej manj invazivne od predniških celic in šele z izgubo izražanja CD133 in aktiviranjem proteoliznih genov pridobijo invazijski potencial. Če povzamemo, rast

tumorja omogočajo genetski in epigenetski mehanizmi, ki GMC omogočajo pridobitev tumorigenih lastnosti.

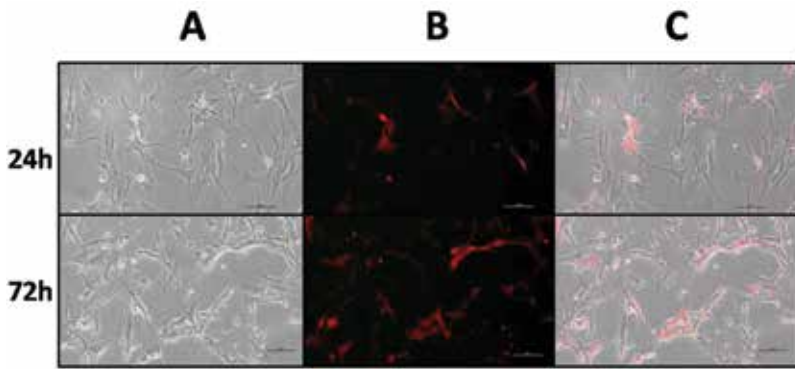
Mezenhimske matične celice (MMC)

Osnovne lastnosti MMC

MMC, imenovane tudi tkivne matične celice, so prisotne v vseh tkivih.⁴⁰ Določa jih sočasna prisotnost številnih molekularnih označevalcev in značilne fenotipske lastnosti,⁴¹ da so (1) sposobne pritrditve na plastično podlago, (2) da izražajo več kot 95 % specifičnih mezenhimskih označevalcev in ne izražajo hematopoetskih in endoteljskih označevalcev ter (3) imajo sposobnost *in vitro* diferenciacije v osteoblaste, adipocite in hondroblaste.⁴¹ Največ MMC je možno izolirati iz aspiratov kostnega mozga, maščobnega tkiva, popkovine (Whartonove žolice) in amnijske membrane, medtem ko je število celic izoliranih iz sveže popkovične krvi, močno odvisno od postopka izolacije.⁴² MMC so fenotipsko zelo heterogene celice, saj se njihov fenotip razlikuje glede na uporabljeno tkivo in starost osebkov.⁴³

MMC v mikrookolju tumorja

Poleg heterogenosti tumorskih celic in TMC⁴⁴ naletimo v celični stromi ali parenhimu tumorja tudi na zelo heterogene populacije drugih vrst matičnih celic, med drugim tudi MMC, ki v tumor migrirajo iz kostnega mozga. Slednje so gibljive in sposobne usmerjene migracije vzdolž citokinskega gradienta do posameznih tumorskih celic. Njihova natančna vloga v tumorskih tkivnih nišah je predmet številnih raziskav. Komunikacija strome s tumorskimi celicami se v tumorju odvija parakrino preko citokinov, rastnih dejavnikov in njihovih receptorjev ter zunajceličnih proteaz⁹ ali pa neposredno preko presledkovnih stikov in eksosomov.⁴⁵ Stroma predstavlja potencialno novo terapevtsko tarčo, saj so celice strome tumorja manj odporne na protitumorske učinkovine; uničenje ustrezno modulirane strome pa bi tako preprečilo tudi rast tumorja. Na samo stromo močno vplivajo MMC, ki iz kostnega mozga in krvi⁴⁶ pridejo v tumor, kjer ko-



Slika 2: Neposredno so-gojenje MMC in GBM celic. Slika prikazuje ko-kulture MMC in GBM celične linije U87-MG (transfecirane z rdeče fluorescirajočim plazmidom) v razmerju celic 1:1. (A) slika s fazno-kontrastnim mikroskopom; (B) slika s fluorescentnim mikroskopom, na kateri vidimo le fluorescirajoče U87-MG celice; (C) prekrivanje slik A in B. Vse slike so posnete pod 100X povečavo, merilo na sliki je enako 100 μm . Iz slike je razvidna sprememba načina gibanja in sposobnost proliferacije obeh vrst celic po 24 urnem in 72 urnem so-gojenju.

municirajo s tumorskimi celicami predvsem preko kemokinov.^{47,48} Ker je vloga MMC v tumorju odvisna od vrste tumorja, hipoksije in drugih stromalnih celic ter zunajceličnega matriksa, potekajo intenzivne raziskave vpliva biološko aktivnih molekul, ki jih izločajo tako stromalne kot tumorske celice, na fenotip tumorskih celic.^{42,49}

Da pridejo v glioblastom, morajo MMC iz kostnega mozga in periferne krvi prečkati krvno-možgansko prepreko.⁵⁰ V GBM okolju se predvidoma spremenijo v t. i. glioblastomske MMC (gbMMC). Čeprav slednje v GBM še niso bile dokazane, potekajo intenzivni poskusi njihove izolacije in karakterizacije. Za razjasnitev komunikacije med MMC in tumorskimi celicami tudi v našem laboratoriju izvajamo *in vitro* študije neposrednih (direktnih) in posrednih sokultur tumorskih celic (U87-MG) in MMC. S posrednim sogojenjem celic U87-MG in MMC smo dokazali, da MMC zavirajo rast in invazijo U87-MG, ki v stiku z MMC postanejo senescentne, medtem ko se samim MMC poveča delitveni potencial.⁵¹ Natančna analiza izražanja genov in izločenih citokinov celic MMC in U87-MG v sokulturi je potrdila regulacijsko vlogo citokina CCL2/MCP-1 pri znižanju invazije celic U87-MG.⁵¹

Nasprotno pa se MMC in U87-MG v direktni sokulturi povežejo v funkcionalni in strukturni sincicij, ki spremeni sposobnost gibanja in razmnoževanja obeh vrst celic⁵² (Slika 2). V sinciciju se celice GBM lahko transdiferencirajo v druge tipe celic, kar dokazujejo rezultati fuzije tumorskih celic in MMC.⁵³ Ravno zato je direktno in posredno medcelično komunikacijo potrebno upoštevati pri razvoju novih protitumorskih terapij, ki temeljijo na MMC. Ob tem seveda najboljše tarče predstavljajo mediatorji

signalnih poti, ki se aktivirajo ob neposrednem stiku celice MMC z GBM. Analiza celotnega transkriptoma v modelu MMC/GBM direktnih sokultur je razkrila povečano izražanje bradikininskega receptorja (BDKRB1). Ker je dokazano, da kinini z aktiviranjem receptorjev BDKRB1 in BDKRB2 uravnavajo vsebnost kalcija in senzibilizacijo nevronov⁵⁴ je možno, da s tem celice MMC povzročajo tudi apoptozo in diferenciacijo tumorskih celic v nevrnalne celice.^{55,56} Verjamemo torej, da je s pristopom sistemske biologije možno odkriti še ostale spremenjene signalne poti in razložiti potek fenotipskih sprememb znotraj heterogenih tumorskih kompleksov upoštevajoč različne vrste celic, ki tumor sestavljajo in prispevajo k njegovim lastnostim.

Zdravljenje z nosilci MMC

Zaradi napredka raziskav na področju biologije matičnih celic danes zdravljenje z MMC dojemamo kot stvarno možnost v klinični praksi in si od nje veliko obetamo. Zdravljenje raka s celično terapijo bo najverjetneje uspešnejše od zdravljenj, ki temeljijo na rekombinantnih proteinih (biološka terapija) in kemičnih spojinah (kemoterapija), saj slednjih ni mogoče ciljno vnesti v tumor, kot to omogočajo MMC z usmerjenim gibanjem celo do posameznih GBM celic.^{47,63} Zdravljenje na osnovi MMC nosilcev ima prednosti celo pred antiangiogenimi učinkovinami, ki v GBM ne delujejo, ker povzročajo številne stranske učinke, saj se je izkazalo, da ob sicer uspešno zmanjšanem ožiljenju celo pospešijo gibljivost in prodiranje GBM celic iz nastalih hipoksičnih predelov v zdravo možganovino.^{57,19}

Varnost zdravljenja z MMC

Čeprav literatura navaja možnosti zdravljenja tudi z drugimi vrstami MC, zaradi etične oporečnosti izolacije in visokega *in vivo* malignega potenciala npr. humane embrionalne matične celice (EMC) in inducirane pluripotentne celice (iPS) niso tako primerne za uporabo v klinični praksi⁵⁸ kot alogene MMC, ki zaradi imunske inertnosti v veliki meri preživijo presaditev. Zato razvoj novih zdravljenj na osnovi mo-

dificiranih celic poteka predvsem z MMC različnega izvora (kostni mozeg, maščobno tkivo itd.). Za uspešno klinično uporabo je slednje potrebno namnožiti *in vitro*, pri čemer je njihova rast odvisna od ravnih faktorjev, citokinov in hipoksije, ki pospešuje tudi njihovo razmnoževanje tumorjih.^{59,60} Z namnoženimi avtolognimi MMC se pri presaditvi izognemo imunski zavrnitvi in za razliko od uporabe EMC tudi možnemu *de novo* nastanku tumorjev.

Pri razvoju protirakavih terapij je tako na prvem mestu varnost uporabe MMC⁶¹,

ki se, kot dokazujejo nedavne študije, med namnoževanjem *in vitro* maligno ne preobrazijo.⁶² Nativne normalne MMC bi zato lahko za razliko od nesmrtnih klonov uporabljali brez tveganja za bolnika.⁶³ Varnost bolnikov je potrebno potrditi tudi z uporabo MMC v *in vivo* mikro-okolju tumorja, kjer pa ni izključena fuzija tumorske celice in MMC in transdiferenciacija celic, ki bi lahko povzročila nastanek TMC in ponoven razvoj tumorja.

Tabela 1: MMC kot terapevtski vektorji pri terapiji raka.

Učinkovina		Glavne značilnosti učinkovine	Slabosti vnosa učinkovin brez MMC	Prednosti vnosa učinkovin z MMC
Interlevkini	IL-2, IL-7, IL-12, IL-18 (Tudi kombinacija interlevkinov z IFN- γ ali CX3CL1.)	Direkten proti-tumorski odziv ali pozitivna regulacija vnetnega odziva in imunskega odgovora preko aktivacije citotoksičnih limfocitov in NK celic. Zavrtlo metastaziranje v bezgavke in druge organe, \uparrow apoptoza, \uparrow infiltracija limfocitov.		
Interferoni	IFN- α , IFN- β	Interferoni povišajo imunski odziv na različne infekcije, prav tako povišajo imunski odziv na tumorske celice. Povzročijo: \downarrow delitev tumorskih celic, \uparrow apoptoza, \downarrow prekrvavitev tumorja.		
Predzdravila	CD, HSV-TK, GCV, CPT-11	Samo predzdravilo je za telo neškodljivo, vendar pa njegov metabolit predstavlja toksično komponento za selektivno uničenje tumorskih celic. MMC izločajo pred-zdravilo in selektivno uničujejo okoliške hitro deleče se tumorske celice.	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Toksičnost ob sistemskem doziranju. ▶ Stranski učinki. 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Dostava učinkovine na mesto tumorja in selektivno delovanje na tumorske celice. ▶ MSC celice, ki izločajo TRAIL, so odporne na s TRAIL posredovano apoptozo.
Onkolitični virusi	CRA δ	Naravni ali gensko spremenjeni virusi, ki okužijo neoplastične celice ne pa normalnih. MMC uporabimo kot gostiteljske celice za replikacijo, transport in lokalno sproščanje OV.	Zaradi delovanja imunskega sistema je sistemsko doziranje OV velikokrat neučinkovito, deluje tudi na druge celice (krvni obtok).	
Antiangiogene učinkovine	TSP	Antiangiogene učinkovine zmanjšajo premer žilja in s tem tudi pretok ter povečajo sloj pericitov okoli kapilar. S tem prekinemo oskrbo tumorskih celic s krvjo. S tem se doseže normalizacija strukture in funkcije krvnega žilja ter zmanjšanje tumorja. MMC, ki pridejo v tumor, so podobne tumorskim pericitam. Lahko jih tudi spremenimo tako, da izražajo antiangiogene učinkovine.		
Pro-apoptotski proteini	TRAIL	Indukcije apoptoze zaradi aktivacije kaspaz, kar v končni fazi vodi v propad rakave celice, medtem ko je zdravim celicam prizaneseno.		
Antagonisti ravnih faktorjev	NK4	Zaviranje ravnih faktorjev, ki spodbujajo rast tumorja in angiogenezo.		

Okrajšave: MMC – mezenhimske matične celice, \uparrow – povišano, \downarrow – znižano, IL – interlevkin, IFN – interferon, CX3CL1 – T-celični kemoatraktant, CD – citozin deaminaza, HSV- TK – herpes simpleks virus timidin kinaza, GCV – ganciklovir, CPT-11 – kamptotecin-11 (irinotekan), CRA δ – pogojno replicirajoči onkolizni adenovirusi, OV- onkolitični virusi; TSP – trombospondin, TRAIL – apoptozo inducirajoči ligand, soroden TNF, NK4 – antagonist HGF, HGF – hepatocitni rastni faktor

* Tabela našteva agense ki se uporabljajo v zdravljenju raka, njihove glavne značilnosti ter slabosti sistemskega vnosa in prednosti vnosa z MMC.

** Reference so podane v Shah (2012)⁶³

Zdravljenje z nemodificiranimi MMC

Precej predkliničnih raziskav je bilo opravljenih na presaditvi nemodificiranih MMC v različne modele tumorjev pri laboratorijskih živalih. Te so potrdile različen odziv tumorjev na injicirane MMC, kar potrjuje hipotezo, da vlogo MMC določa vrsta tumorja oz. je odvisna od njegovega mikrookolja. Tako MMC dokazano zavirajo rast celic GBM,⁴⁹ Kaposijevega sarkoma⁶⁴ in karcinoma debelega črevesa, medtem ko imajo nasproten učinek na celice melanoma A375⁴⁹ ter na celice tumorja dojke, pljuč in prostate.⁶⁵ Videti je torej, da so tumorsko specifične pro- in antitumorogene lastnosti MMC najverjetneje ključno odvisne od celičnega izvora tumorja in sestave njegove strome.^{47,48}

Zdravljenje z genetsko modificiranimi MMC

Kljub vsemu pa večina dejstev govori v prid uporabi MMC v vlogi nosilca za ciljni vnos proti-tumorske učinkovine,⁶⁶ kar bi bilo izjemno uporabno za zdravljenje invazivnih in infiltrativnih tumorjev, kot so maligni gliomi in pljučne metastaze. MMC je za to vlogo potrebno prej genetsko modificirati za nastanek in lokalno sproščanje specifičnih protitumorskih učinkovin.⁶⁷ Za to lahko uporabimo različne pristope,⁶³ katerih končni učinek je izražanje transgena in lokalno inducirano izločanje zelene terapevtske molekule npr. interleukina, interferona, kemične učinkovine, antiangiogenega dejavnika ali onkoliznega virusa (glej Tabelo 1) ob neposrednem stiku MMC s tumorsko celico.⁶⁸

Z genetsko modificiranimi MMC je možno, razen na tumorske celice, učinkovati tudi na druge celice tumorske strome. Dokazano je, da retrovirusno modificirane MMC (*angl.* 'mesenkillers') poleg tumorskih celic ciljno zavirajo tudi rast tumorskih fibroblastov (TF),⁴⁷ derivatov endogenih stromalnih MMC⁴¹ v modelu melanoma in glioma miši in podgan. Ta terapevtski pristop, ki vključuje virusno modifikacijo MMC, je bil kasneje nadgrajen za invazivne vrste raka z uporabo t. i. pogojno delečih se adenovirusov CRAds (*angl.* 'conditionally replicating

adenovirus'). V tem primeru imajo virusno modificirane MMC le vlogo vmesnega nosilca,⁶⁹ ki služi zgolj za namnoževanje virusov CRAds in njihovi ciljni dostavi na mesto tumorja, zaradi česar je virusni učinek delovanja v tumorju mnogo večji, kot če le viruse neposredno vbrizgavamo.^{47,63}

Pri zdravljenju glioma bi z uporabo genetsko modificiranih matičnih celic (pred ali po klasičnem zdravljenju) lahko izboljšali neučinkovitost klasičnega zdravljenja pri odstranjevanju tumorskih celic, posamezno infiltriranih globoko v normalen možganski parenhim. Injicirane MMC so namreč sposobne usmerjeno potovati k GBM, celo do posameznih celic GBM,^{70,71} kamor bi tako lahko ciljno dostavile 'citotoksično' učinkovino in s tem povzročile odmiranje le tumorske celice, prizanesle pa celicam normalnega možganskega tkiva,⁷¹ česar ni moč doseči z uveljavljenim načinom zdravljenja.

Zaključek

Kljub vidnemu uspehu predkliničnih raziskav o učinkovitosti in varnosti nosilcev MMC bo za prenos izsledkov v klinično uporabo potrebno odgovoriti na še kar nekaj vprašanj. Pri uvedbi celičnega zdravljenja bo potrebno upoštevati tako težnjo celic MMC po povečanju protitumorogene strome tumorja kot tudi njihovo imunosupresivno in protirakavo vlogo. Ker je potreba po novih načinih zdravljenja raka v klinični praksi velika, verjamemo, da bodo rezultati raziskav na MMC kmalu preverjeni še s kliničnimi študijami. V teku so že najmanj 4 klinične študije za zdravljenje tumorjev z uporabo matičnih celic.⁶³ Pri zdravljenju možganskih tumorjev z MMC pa bo za izboljšanje učinka zdravljenja potrebno natančno opredeliti in optimizirati še način identifikacije ustrezne tarče. Pri tem naj poudarimo, da so te tarče tumorske matične celice (TMC), ki so tudi predmet intenzivnih raziskav, kot smo jih povzeli v prvem delu tega prispevka. Menimo, da bo mogoče le z dobrim poznavanjem in nadaljnimi raziskavami vloge tako nemodificiranih kot modificiranih MMC tudi za najbolj usodno in odporno vrsto možganskih tumorjev – glioblastomov, razviti učinkovito zdravljenje.

Literatura

1. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu H. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2010; 60: 166–193.
2. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology* 2007; 170 (5): 1445–1453.
3. WHO. ICD-O: International classification of diseases for oncology. 3rd ed. (Fritz A, Percy C, Jack A, et al., eds.). Geneva: World Health Organization; 2000: 39.
4. Verhaak RGW, Hoadley K, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17 (1): 98–110.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414 (6859): 105–111.
6. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674.
7. Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 2008; 452(7187): 553–563.
8. Cancer Research UK. CancerStats–Incidence 2009–UK. 2012: 1–8. Available at: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/>. Accessed August 17, 2012.
9. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews*. *Cancer* 2004; 4(11): 839–849.
10. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
11. Bednarz-Knoll N, Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical relevance and biology of circulating tumor cells. *Breast Cancer Research* 2011; 13 (6): 228.
12. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews*. *Cancer* 2008; 8(10): 755–768.
13. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews*. *Cancer* 2005; 5(November): 899–904.
14. Brabletz T. To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nature Reviews*. *Cancer* 2012; 12(6): 425–436.
15. Signore M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Letter*. 2011: 1–9.
16. Prestegarden L, Enger PØ. Cancer stem cells in the central nervous system—a critical review. *Cancer Research* 2010; 70(21): 8255–8258.
17. Zong H, Verhaak RGW, Canoll P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Reviews* 2012; 12 (4): 383–394.
18. Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1775(2): 283–297.
19. Bjerkvig R, Johansson M, Miletic H, Niclou SP. Cancer stem cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 2009; 19 (5): 279–284.
20. Piccirillo SGM, Combi R, Cajola L, et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution. *Oncogene* 2009; 28: 1807–1811.
21. du Potet E, Cameron L, Habib NA, Levicar N. Cancer stem cells in solid tumors. In: Appasani K, Appasani RK, eds. *Stem Cells & Regenerative Medicine: From Molecular Embryology to Tissue Engineering*. Springer Science+Business Media; 2011: 59–76.
22. Strojnik T, Kavalari R, Trinkhaus M, Lah TT. Cathepsin L in glioma progression: Comparison with cathepsin B. *Cancer Detection and Prevention* 2005; 29: 448–455.
23. Rebetz J, Tian D, Persson A, et al. Glial progenitor-like phenotype in low-grade glioma and enhanced CD133-expression and neuronal lineage differentiation potential in high-grade glioma. *PLoS One* 2008; 3 (4): e1936.
24. Ardebili SY, Zajc I, Gole B, et al. CD133/prominin1 is prognostic for GBM patient's survival, but inversely correlated with cysteine cathepsins' expression in glioblastoma derived spheroids. *Radiology and Oncology* 2011; 45 (2): 102–115.
25. Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, et al. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Laboratory Investigation* 2002; 82 (3): 345–351.
26. Sakariassen PØ, Prestegarden L, Wang J, et al. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *PNAS* 2006; 103 (44): 16466–16471.
27. Joo KM, Kim SY, Jin X, et al. Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Laboratory Investigation* 2008; 88(8): 808–815.
28. Yu S-C, Ping Y-F, Yi L, et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Letters* 2008; 265 (1): 124–134.
29. Heddleston JM, Li Z, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2010; 8(20): 3274–3284.
30. Li A, Walling J, Ahn S, et al. Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Research* 2009; 69 (5): 2091–2099.
31. Donovan L, Pilkington G. CD133, the holy grail of neuro-oncology or a promiscuous red-herring? *Cell Proliferation* 2012.
32. Borovski T, Vermeulen L, Sprick MR, Medema JP. One renegade cancer stem cell? *Cell Cycle* 2009; 8(6): 803–808.
33. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139 (5): 871–890.
34. López-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature Reviews*. *Cancer* 2007; 7 (10): 800–808.
35. Wolf K, Friedl P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology* 2011; 21 (12): 736–744.
36. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews*. *Cancer*. 2003; 3(5): 362–374.
37. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Reviews*. *Cancer* 2003; 3 (7): 489–501.
38. Levicar N, Nuttall RK, Lah TT, Nuttall RK. Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochirurgica* 2003; 145 (9): 825–838.

39. Gole B, Durán Alonso MB, Dolenc V, Lah TT. Post-translational regulation of cathepsin B, but not of other cysteine cathepsins, contributes to increased glioblastoma cell invasiveness in vitro. *Pathology Oncology Research* 2009; 15(4): 711–723.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317.
41. Dominici M, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation* 2009; 87 (9S): S36–S42.
42. Motaln H, Schichor C, Lah TT. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*. 2010; 116 (11): 2519–2530.
43. Rebelatto CK, Aguiar M, Moretão MP, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental Biology and Medicine* 2008; 233 (7): 901–913.
44. Bonavia R, Inda M-M, Cavenee WK, Furnari FB. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Research* 2011; 71 (12): 4055–4060.
45. Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *Fl1000 Biology Reports* 2011; 3 (July): 15.
46. Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S, et al. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circulation Research* 2009; 104 (10): 1225–1234.
47. Grisendi G, Bussolari R, Veronesi E, et al. Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers. *American Journal of Cancer Research* 2011; 1 (6): 787–805.
48. Ciavarella S, Dominici M, Dammacco F, Silvestris F. Mesenchymal stem cells: a new promise in anti-cancer therapy. *Stem Cells and Development* 2011; 20(1): 1–10.
49. Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanero V, Altaner C. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Molecular Cancer*. 2010; 9: 129.
50. Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, et al. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Research* 2010; 1334: 84–92.
51. Motaln H, Gruden K, Hren M, et al. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell Transplantation* 2012: 1–46.
52. Schichor C, Albrecht V, Korte B, et al. Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro. *Experimental Neurology* 2012; 234 (1): 208–219.
53. Kamijo M, Haraguchi T, Tonogi M, Yamane G. The function of connexin 43 on the differentiation of rat bone marrow cells in culture. *Biomedical Research* 2006; 27 (6): 289–295.
54. Martins AH, Alves JM, Trujillo C, et al. Kinin-B2 receptor expression and activity during differentiation of embryonic rat neurospheres *Cytometry, Part A* 2008; 73 (4): 361–368.
55. Martins AH, Alves JM, Perez D, et al. Kinin-B2 receptor mediated neuroprotection after NMDA excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-B1 receptor agonists. *PloS One* 2012; 7 (2): e30755.
56. Montiel-Eulefi E, Nery A, Rodrigues L, et al. Neural differentiation of rat aorta pericyte cells *Cytometry, Part A* 2012; 81 (1): 65–71.
57. Miletic H, Fischer Y, Litwak S, et al. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. *Molecular Therapy* 2007; 15 (7): 1373–1381.
58. DeMiguel MP, Fuentes-Julián S. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Reviews and Reports* 2010; 6: 633–649.
59. Sotiropoulou P, Perez S, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24 (2): 462–471.
60. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 358 (3): 948–953.
61. Momin EN, Vela G, Zaidi H, Quinones-Hinojosa A. The oncogenic potential of mesenchymal stem cells in treatment of cancer: directions for future research. *Current Immunology Reviews* 2010; 6(2): 137–148.
62. Torsvik A, Røslund GV, Svendsen A, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track–letter. *Cancer Research* 2010; 70 (15): 6393–6396.
63. Shah K. Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64 (8): 739–748.
64. Khakoo AY, Pati S, Anderson S, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of Experimental Medicine* 2006; 203 (5): 1235–1247.
65. Zhang Y, Ma B, Fan Q. Mechanisms of breast cancer bone metastasis. *Cancer Letters* 2010; 292 (1): 1–7.
66. Loebinger MR, Janes SM. Stem cells as vectors for antitumour therapy *Thorax* 2009; 65(4): 362–369.
67. Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy *PNAS*. 2009; 106 (12): 4822–4827.
68. Binello E, Germano IM. Stem cells as therapeutic vehicles for the treatment of high-grade gliomas *Neuro-oncology*. 2012; 14 (3): 256–265.
69. Stoff-Khalili M, Rivera A, Mathis JM, et al. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 2007; 105 (2): 157–167.
70. Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research* 2005; 65 (8): 3307–3318.
71. Bexell D, Scheduling S, Bengzon J. Toward brain tumor gene therapy using multipotent mesenchymal stromal cell vectors. *Molecular Therapy* 2010; 18 (6): 1067–1075.