

Received: 31.10.2016
Accepted: 24.07.2017
Published: 31.12.2017

Komórki macierzyste raka płuca – udział w patogenezie i progresji nowotworu

Lung cancer stem cells – the role in pathogenesis and progressive growth of cancer

Agata Raniszewska¹, Joanna Domagała-Kulawik²

¹Katedra i Zakład Patomorfologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Rak płuca zajmuje pierwsze miejsce wśród przyczyn zgonów na nowotwory złośliwe w Polsce i na świecie. W większości przypadków wysoki stopień zaawansowania choroby w chwili rozpoznania uniemożliwia wdrożenie leczenia przyczynowego lub czyni je nieskutecznym. Pewnym przełomem w osiągnięciu długotrwałego przeżycia okazała się w ciągu ostatnich lat immunoterapia. Podstawą rozwoju tego typu leczenia stało się poznanie oddziaływania między komórkami gospodarza a komórkami nowotworowymi. Coraz większe znaczenie w świecie medycyny zyskuje poznanie znaczenia komórek macierzystych nowotworu (CSCs – cancer stem cells). Biologiczna heterogenność raka płuca może być wynikiem obecności niewielkiego odsetka CSCs. CSCs powstają w wyniku mutacji genetycznych w zwykłych komórkach macierzystych organizmu, komórkach progenitorowych lub komórkach zróżnicowanych. Są zdolne do samoodnowy, różnicowania i inicjacji zmian nowotworowych. Uważa się, że CSC warunkują nieograniczony wzrost nowotworów oraz ich różnorodność morfologiczną. Ich zdolność do odnowy jest przyczyną nawrotów choroby, nawet po długich okresach remisji. CSCs, podobnie jak zwykłe komórki macierzyste, funkcjonują w otoczeniu innych komórek organizmu tzw. „niszy”, skąd czerpią sygnały do różnicowania i proliferacji. Identyfikację CSCs umożliwia ich izolowanie na podstawie ekspresji swoistych markerów (CD133, CD44, CD90, ALDH, Ep-CAM). Istotną cechą CSCs jest oporność na radioterapię i chemioterapię; prawdopodobnie jest przyczyną niepowodzeń terapeutycznych u chorych na raka płuca. CSCs przypisuje się także cechy pozwalające na wyciszenie odpowiedzi układu odpornościowego głównie przez syntezę cząsteczek immunosupresyjnych i rekrutację innych molekuł, które mają właściwości immunosupresyjne. Rola CSCs w odpowiedzi układu odporności w przebiegu nowotworu nie jest jednak jednoznacznie wyjaśniona. W artykule przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy dotyczący biologii CSCs raka płuca ze szczególnym uwzględnieniem gruczolowego raka płuca.

Słowa kluczowe:

nowotworowe komórki macierzyste • rak płuca • onkogeneza • komórki inicjujące guz

Summary

Lung cancer is the main cause of cancer death worldwide. Rapid accurate diagnosis, recognition of risk factors and improvement of treatment efficacy represent the main challenges. An advanced stage of the disease at the time of diagnosis, observed in the majority of cases, makes the introduction of radical treatment impossible or ineffective. Immunotherapy was a breakthrough in achieving long-term survival in recent years. The reason for developing this type of treatment is to know the interaction between the host cells and tumor cells. Cancer stem cells theory is increasingly gaining greater significance in the world. The biological heterogeneity of lung cancer may be due to the presence of a small percentage of cancer stem cells (CSCs).

	CSCs are the results of genetic and epigenetic changes in normal stem cells, progenitor cells or differentiated cells. CSCs are functionally defined by their unlimited self-renewal capacity, multiple differentiation and their ability to imitate tumors. It is believed that CSCs determine unrestricted growth of tumors and their different morphology. Their ability to self-renew can be the cause of relapses even after long periods of remission. CSCs reside in niches, where they receive signals for differentiation and proliferation process. The identification of CSCs is based on the presence of specific molecules (CD133, CD44, CD90, ALDH, EpCAM). An important feature of CSCs is their resistance to conventional cancer treatment: radio therapy and chemotherapy. Presumably, CSCs are responsible for the synthesis of immunosuppressive particles, and recruiting other molecules, which have immunosuppressive properties. The paper presents the current state of knowledge on CSCs in lung cancer detailing adenocarcinoma.
Keywords:	cancer stem cells • lung cancer • oncogenesis • tumor initiating cells
GICID:	01.3001.0010.7750
DOI:	10.5604/01.3001.0010.7750
Word count:	7673
Tables:	2
Figures:	3
References:	102

Adres autorki: prof. dr hab. n. med. Joanna Domagała-Kulawik, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. S. Banacha 1a, 02-097 Warszawa; e-mail: domagalakulawik@gmail.com

Wykaz skrótów: **ADC** – gruczolowy rak płuca (adenocarcinoma), **APC** – komórki prezentujące antygen (antigen presenting cells), **ALDH** – dehydrogenaza aldehydowa (aldehyde dehydrogenase), **ALK** – gen kinazy chłoniaka anaplastycznego (anaplastic lymphoma kinase), **CD** – antygen różnicowania komórkowego (cluster of differentiation), **CSCs** – nowotworowe komórki macierzyste (cancer stem cells), **CTCs** – krążące nowotworowe komórki macierzyste (circulating tumor cells), **CTLA-4** – białko pojawiające się na powierzchni limfocytów T aktywowanych w wyniku kontaktu z antygenem i działające hamująco na dalszą odpowiedź limfocytu (cytotoxic T cell antigen 4), **DRP** – drobno-komórkowy rak płuca, **EGFR** – gen receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor), **EMT** – przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (epithelial-mesenchymal transition), **EpCAM** – antygen cząsteczki adhezyjnej komórek nabłonkowych (epithelial cell adhesion molecule), **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor), **HIF** – czynnik transkrypcyjny aktywowany niskim poziomem tlenu w środowisku komórkowym (hypoxia-inducible factor), **NOS** – nieokreślony niedrobnokomórkowy rak płuca, **NDRP** – niedrobnokomórkowy rak płuca, **Oct-4** – czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla pluripotencjalnych komórek macierzystych (octamer-binding transcription factor – 3/4), **PD-1** – białko na powierzchni limfocytów, które po połączeniu z ligandem powoduje zahamowania ich aktywności (programmed cell death protein 1), **Sox-2** – czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla pluripotencjalnych komórek macierzystych, **SLUG** – czynnik transkrypcyjny zaangażowany w przejście epithelialno-mezenchymalne oraz w mechanizmy antyapoptotyczne komórek, **SNAIL** – czynnik transkrypcyjny, będący głównym regulatorem przejścia epithelialno-mezenchymatycznego (snail family zinc finger 1), **SP** – boczna populacja komórek (side population), **SQCLC** – rak płaskonabłonkowy płuca (squamous cell carcinoma), **TAM** – makrofagi towarzyszące guzowi (tumor associated macrophages), **TIC** – komórki inicjujące guz (tumor initiating cells), **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor), **TTF₁** – czynnik transkrypcyjny tarczycy (thyroid transcription factor 1), **Treg** – limfocyty T regulatorowe, **WHO** – światowa organizacja zdrowia (World Health Organization), **Wnt** – białka biorące udział w regulacji embriogenezy i w wielu procesach w dorosłych komórkach (Wingless-type).

WSTĘP

Rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów złośliwych w Polsce i na świecie, zachoro-

walność osiąga ogółem 1 800 000 nowych przypadków rocznie [79]. Liczba zgonów z powodu nowotworów złośliwych płuca w Polsce w 2011 r. wyniosła około 22 000, z czego ponad 16 000 u mężczyzn a 6 100 u kobiet

Tabela 1. Zasady rozpoznawania podtypu raka niedrobnokomórkowego wg klasyfikacji WHO 2015 [85]

Typ reakcji		MATERIAŁ	
TTF1	p40	tkanka	Cytologia/ mała biopsja
+	-/+	ADC	NDRP ze wskazaniem ADC
-	+ (rozlane)	SQCLC	NDRP ze wskazaniem SQCLC
-	+ (ogniskowe, <10% komórek)	LC	NOS
-	-	LC	NOS

SQCLC – rak płaskonabłonkowy, ADC – rak gruczołowy, NDRP – rak niedrobnokomórkowy, LC – rak wielkokomórkowy, NOS – nieodróżniony

wyprzedzając częstość zgonów związanych z rakiem piersi [90]. Wzrost zachorowalności u kobiet obserwuje się również w innych krajach Europy. Zachorowalność i umieralność na raka płuca jest silnie skorelowana z wiekiem. Powszechnie znany jest związek występowania raka płuca z paleniem papierosów. Około 85% nowotworów płuca jest spowodowana paleniem papierosów, jednak obserwuje się wzrost zachorowań u osób niepalących [85,90].

Uwzględniając różny przebieg kliniczny, biologię oraz sposób leczenia wyodrębnia się dwa główne typy histologiczne raka płuca: niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP) oraz drobnokomórkowy rak płuca (DRP). Według nowej klasyfikacji histopatologicznej raka płuca, opracowanej przez WHO w 2015 r. do grupy NDRP zalicza się: raka płaskonabłonkowego (SQCLC – squamous cell carcinoma), raka gruczołowego (ADC – adenocarcinoma) oraz podtyp NOS (not otherwise specified) charakteryzujący się brakiem mikroskopowych cech różnicowania płaskonabłonkowego lub gruczołowego [24]. W ocenie histopatologicznej w oparciu o zwykłe barwienie hematoksyliną i eozyną nie zawsze możliwe jest dokładne określenie podtypu NDRP. W nowych wytycznych eksperci WHO podkreślają konieczność stosowania diagnostyki immunochemicznej, która ma ułatwić rozpoznanie. Decydującym kryterium jest ocena obecności markerów TTF₁ (thyroid transcription factor) i białka p40 lub p63 w komórkach nowotworowych. Różnicowanie podtypu NDRP na podstawie obecności TTF₁ i p40/p63 przedstawia tabela 1.

Ponadto zaleca się barwienie mucykarminem potwierdzające utkanie nowotworowe wytwarzające śluz. Dodatni wynik takiej reakcji świadczy o ADC. Zgodnie z zaleceniami ekspertów badanie immunohistoche-

miczne powinno poprzedzać dalszą kwalifikację do diagnostyki genetycznej. Wykazanie lub wykluczenie zmian w genach *EGFR* i *ALK* umożliwia wdrożenie terapii ukierunkowanej w zaawansowanym NDRP, który nie może być poddany leczeniu chirurgicznemu lub radykalnej radio – i chemioterapii. Zazwyczaj dotyczy to stadium IIIB i IV według klasyfikacji TNM stosowanej do oceny zaawansowania raka płuca. Oznaczenie mutacji *EGFR* należy wykonać u chorych z utkaniem NDRP innym niż płaskonabłonkowe. Również jeśli ustalenie typu NDRP nie jest możliwe (podtyp NOS). Badanie w kierunku rearanżacji *ALK* powinno być przeprowadzone u osób z rozpoznaniem ADC. Potwierdzenie obecności danej mutacji jest głównym kryterium kwalifikacji chorych na NDRP do terapii ukierunkowanych molekularnie z wykorzystaniem inhibitorów kinazy tyrozynowej [24,53].

Zachorowalność na ADC wykazuje tendencję wzrostową, w Polsce stanowi 30-40% rozpoznań mikroskopowych raka płuca i rośnie, najprawdopodobniej w wyniku powszechnego stosowania filtrów w papierosach. Zwraca się uwagę na charakterystykę osób chorujących na ten podtyp raka płuca – w grupie dominują osoby niepalące lub o niewielkiej ekspozycji na dym tytoniowy, częściej kobiety, nierzadko w wieku 30-40 lat [52,79].

Największym problemem w raku płuca nadal pozostaje zbyt późne rozpoznanie. Większość przypadków jest rozpoznawana w zaawansowanym stadium. Podstawowym sposobem leczenia NDRP jest zabieg operacyjny, a w DRP – chemioterapia. Całkowite wyleczenie osiąga się zaledwie u około 15% chorych. Ponad 60% osób nie kwalifikuje się do leczenia przyczynowo-operacyjnego w chwili rozpoznania [85]. Rak płuca należy do nowotworów litych o skąpej charakterystyce antygenowej. Mimo to pewnym przełomem w osiągnięciu długotrwałego przeżycia

okazała się w ciągu ostatnich lat immunoterapia. Podstawą rozwoju tego typu leczenia jest poznanie oddziaływania między komórkami gospodarza a komórkami nowotworowymi. Coraz większe znaczenie w medycynie zyskuje obecność komórek macierzystych nowotworu (CSCs – cancer stem cells). Liczne wyniki badań wskazują, że są przyczyną nawrotów choroby i przerzutowania. Przypuszcza się również, że ich obecność może się przyczyniać do wystąpienia zjawiska heterogenności w obrębie guza.

Celem opracowania jest charakterystyka CSCs występujących w raku płuca (ze szczególnym uwzględnieniem ADC) oraz przedstawienie ich roli w odpowiedzi układu odporności w przebiegu choroby na podstawie aktualnego stanu wiedzy.

Nowotworowe komórki macierzyste (inicjujące guz)

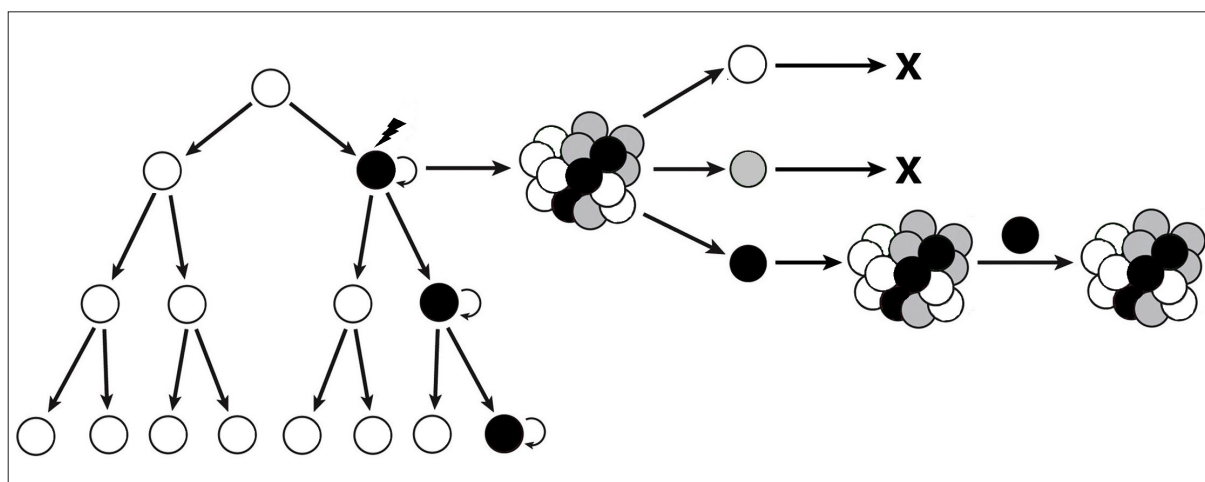
Komórki macierzyste nowotworu zidentyfikowano po raz pierwszy w 1990 r. w przebiegu ostrej białaczki szpikowej. Od tego czasu przeprowadzono liczne badania, które potwierdziły obecność CSCs w nowotworach: jajnika, piersi, jelita, mózgu, trzustki, wątroby i płuca [16,22,59,67].

Pochodzenie CSCs nie jest jeszcze dokładnie wyjaśnione. Jedna teoria sugeruje, że powstają w wyniku zmian genetycznych w zwykłych komórkach macierzystych lub bardziej zróżnicowanych komórkach progenitorowych. Teoria opiera się na zbliżonym fenotypie zwykłych komórek macierzystych i CSCs. Ponadto, CSCs tak jak zwykłe komórki macierzyste wykazują zdolność do podziału. CSCs dają początek dwóm populacjom komórek: zdolnych do inicjacji i samoodnowy nowotworu oraz takim, które ulegają jedynie różnicowaniu. Druga teoria zakłada, że CSCs wywodzą się z dojrzałych komórek somatycznych, które pod wpływem zmian genetycznych i epigenetycznych uległy procesowi nieodwracalnej przemiany zróżnicowanej komórki w inny typ komórki

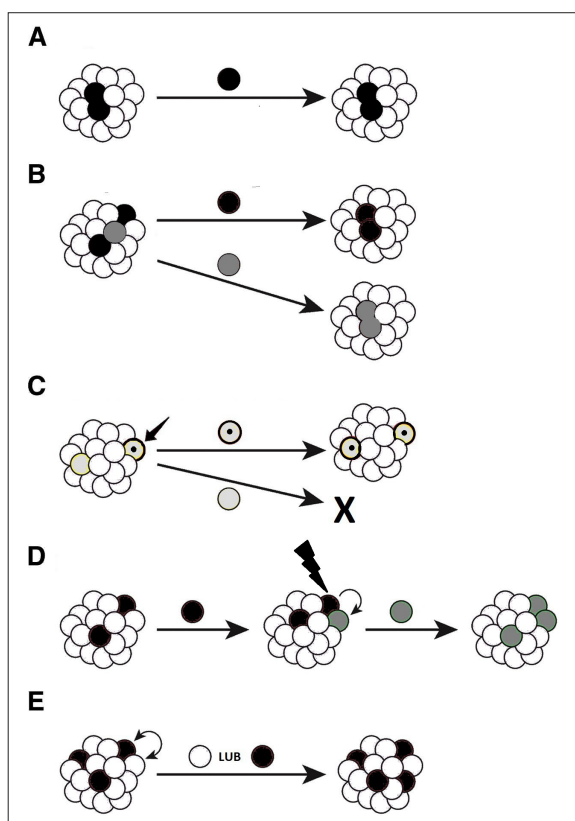
zróżnicowanej (transdifferentiation). Ta sama teoria przyjmuje jednocześnie założenie, że CSCs mogą powstać w wyniku procesu, w którym zróżnicowana komórka powraca do stanu niezróżnicowanej (dedifferentiation) (ryc. 1) [98,101].

CSCs mogą dać początek wszystkim typom komórek ogólnej populacji nowotworowej, dlatego często są określane jako komórki inicjujące guz (tumor initiating cells – TIC). Uważa się, że warunkują nieograniczony wzrost nowotworów oraz ich różnorodność morfologiczną. CSCs wykazują znaczną zdolność do onkogenezy. Wywołują utworzenie guza nowotworowego u myszy laboratoryjnych z obniżoną odpornością. Testy ksenotransplantacji komórek o określonym fenotypie i analiza wzrostu guza to złoty standard w identyfikacji CSCs. Najczęściej są poprzedzone testem selekcji odpowiednich klonów CSCs. Ludzkie komórki nowotworowe otrzymane z biopsji guza są hodowane i namnażane *in vitro* w małym zagęszczeniu. Do uzyskanych kolonii dodaje się odpowiednie przeciwciała (zwykle przeciw markerowi powierzchniowemu CD (cluster of differentiation). Pozytywne komórki są kolejno kilkakrotnie pasażowane i namnażane. Tak wyselekcjonowana populacja CSCs jest wszczepiana myszom laboratoryjnym z upośledzoną odpowiedzią układu odporności. Dzięki temu możliwa jest ocena inicjacji guza bez możliwości odrzucenia przeszczepu [3]. Możliwość inicjacji guza została potwierdzona w domniemanych CSCs raka płuca [21,37,50,95]. Zdolność CSCs do samoodnowy jest przyczyną nawrotów choroby nawet po długich okresach remisji (ryc. 2) [31,80].

Po raz pierwszy prawidłowe komórki macierzyste zdrowego płuca wykazujące zdolność do samoodnowy i różnicowania zostały opisane ponad 30 lat temu [12]. Od tego czasu wiedza na temat zwykłych komórek macierzystych płuca uległa poszerzeniu. Przyczyniła się do tego zwiększona zapadalność na choroby płuc i w związku z tym chęć zgłębienia wiedzy na temat pato-



Ryc. 1. Powstawanie CSCs; kolor czarny – mutacje w komórce progenitorowej indukują powstanie CSCs, szary – zróżnicowana komórka guza. Białe – komórki, które nie uległy zmianom genetycznym/epigenetycznym (wg [86] zmodyfikowano)



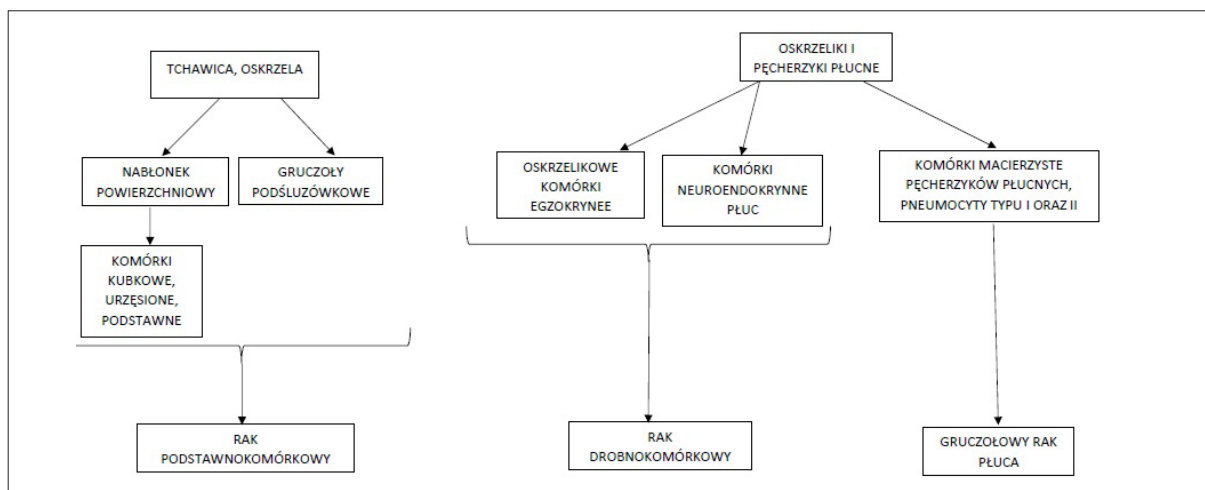
Ryc. 2. CSCs dając początek wszystkim typom komórek nowotworu warunkują heterogenność guza (wg [86] zmodyfikowano); A – w guzie może być obecna jedna pula CSCs indukująca jego powstanie (kolor czarny), pozostałe komórki (kolor biały) nie mogą indukować guza, B – w masie guza mogą istnieć różne pule CSCs, każda niezależnie jest zdolna do rozprzestrzeniania nowotworu; C – CSCs w fazie „uśpienia” (kolor jasnoszary) po aktywacji w wyniku zmian genetycznych/epigenetycznych (kolor jasnoszary z czarnym środkiem) mogą powodować odległe wznowy, nawet wiele lat po leczeniu, D – w przypadku progresji nowotworu w wyniku zmian genetycznych/epigenetycznych może powstać odrębna CSCs o nowych właściwościach (kolor szary), E – fenotyp CSCs jest niestabilny, odwrócenie fenotypu może być indukowane przez zmiany w samej komórce lub mikrootoczeniu guza

genezy i rozwoju tych chorób. Określenie pochodzenia zwykłych komórek macierzystych płuca stanowi duże wyzwanie. Prawdopodobnie wywodzą się z tkanek organizmu, które charakteryzują się szybkim tempem proliferacji. Według niektórych badaczy w zdrowym płucu można wyróżnić następujące typy zwykłych komórek macierzystych w zależności od miejsca ich powstawania [74]:

- podstawne komórki macierzyste tchawicy,
- dystalne komórki macierzyste pęcherzyków płucnych,
- komórki macierzyste neuroendokrynne.

Szacuje się, że frakcja komórek proliferujących nabłonka płuca to zaledwie 0,06-1,3% wszystkich komórek nabłonka. Podobny odsetek stanowią komórki proliferujące nabłonka tchawicy i oskrzelików. W przypadku działania czynników zewnętrznych, takich jak dym papierosowy czy obecność patogenu liczba komórek proliferujących zwiększa się. Umożliwia to sprawna naprawę uszkodzonej tkanki. Potencjalnym źródłem CSCs w nowotworze płuca mogą być zwykłe komórki macierzyste tchawicy, pęcherzyków płucnych czy komórki macierzyste neuroendokrynne. Uważa się, że komórki macierzyste pęcherzyków płucnych mogą transformować do CSCs, które inicjują ADC. Na rycinie 3 przedstawiono potencjalne miejsca powstawania komórek inicjujących dany podtyp raka płuca.

Na podtrzymanie liczby CSCs bezpośrednio wpływa specjalne mikrośrodowisko nazywane „niszą”. Składa się m.in. z komórek mezenchymalnych, sieci naczyń krwionośnych i komórek układu odpornościowego. CSCs otrzymują od niszy odpowiednie sygnały dzięki czemu mogą utrzymywać swoje właściwości. W środowisku niszy CSC może ulegać podziałowi, w wyniku którego powstają dwie nowotworowe komórki macierzyste lub jedna komórka macierzysta i jedna nieodróżniona. To uwolnione w mikrośrodowisku związki sygnałowe decydują, którą drogę podziału wybierze komórka. W wyniku podziałów CSCs w niszy istnieją dwie populacje komó-



Ryc. 3. Komórki mogące dawać początek CSCs oraz możliwe miejsca inicjacji guza w zależności od podtypu raka płuca (wg [31] zmodyfikowano)

rek: zdolne do samoodnowy i różnicujące się [9]. Otczenie podtrzymujące populację zwykłych komórek macierzystych w raku płuca zostało w pewnym stopniu zdefiniowane i opisane. Wiadomo, że jest umiejscowione w obrębie nabłonka powierzchniowego i gruczołowego dróg oddechowych [26,81]. Niestety, dane na temat niszy podtrzymującej CSCs w raku płuca są skąpe. Poznanie tych interakcji mogłoby mieć znaczącą rolę w dokładnym zrozumieniu oddziaływań między komórkami nowotworu a organizmem gospodarza.

Mikrośrodowisko może wpływać również na przemianę komórek nabłonka w komórki mezenchymy (EMT – epithelial-mesenchymal transition). W czasie tego procesu komórki tracą adhezyjność, zmienia się ich polaryzacja i stają się odporne na procesy apoptotyczne. Takie komórki są zdolne do uwolnienia z pierwotnego guza i do inwazyjnego wzrostu. Po migracji do okolic innych narządów zmienione komórki wchodzi w fazę „uśpienia”. Po pewnym czasie ulegają procesowi odwrotnemu do EMT i odzyskują właściwości komórek nabłonka. Wtedy mają zdolność do indukowania wzrostu guza i kolonizacji. Sugeruje się więc związek między procesem EMT a nabywaniem przez komórki somatyczne właściwości charakterystycznych dla komórek macierzystych. Na powierzchni CSCs pojawiają się charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych czynniki transkrypcyjne (SNAIL, SLUG, TWIST) oraz antygeny (wimentyna i N-kadheryna). Przemawia za tym to, że uległy EMT i mogą indukować powstawanie przerzutów. Wymienione cząsteczki są obecne jedynie u pewnego odsetka całej populacji CSCs. Możliwe zatem, że w niszy istnieje określona hierarchia i tylko niektóre CSCs mogą indukować proces tworzenia przerzutów [35]. Udział procesu EMT w kancerogenezie został opisany w wielu nowotworach m.in. skóry, jajnika, prostaty, jelita grubego, trzustki, wątroby [14,38,45]. Wiadomo, że komórki nabłonkowe płuc i komórki nowotworowe płuca podlegają EMT. Proces ten odgrywa też znaczną rolę podczas uszkodzeń dróg oddechowych spowodowanych działaniem czynników zewnętrznych oraz we włóknieniu płuc [33]. W raku płuca proces EMT jest prawdopodobnie skutkiem oddziaływania między mikrośrodowiskiem nowotworu a komórkami guza. Proces EMT jest indukowany przez mediatory uwalniane z niszy: TGF- β , Wnt, Notch, HGF, HIF, Hedgehog [35,36]. Wiadomo, że szlaki sygnałowe regulowane przez Wnt, Hedgehog i Notch prowadzą do inicjacji guza [23,27,49]. Szlak Wnt wzmacnia proliferację komórek nowotworowych oraz ich oporność na związki farmakologiczne. Szlaki Hedgehog i Notch odpowiadają za samoodnawianie się CSCs. Ekspresja molekuł zaangażowanych w EMT koreluje ze stopniem zaawansowania NDRP [49]. Opisano również związek z wysoką ekspresją komórek z fenotypem komórek mezenchymalnych, które prawdopodobnie uległy EMT a opornością na działanie inhibitorów EGFR i niepowodzeniem terapii celowanej w NDRP [17].

Jak już wspomniano, CSCs mogą indukować powstawanie przerzutów. Jest to zjawisko złożone, które nie

zależy jedynie od EMT. Komórki niszy i CSCs mogą podlegać mutacjom wywołanym przez potencjalne onkogeny. Mutacje onkogenne stymulują mikrośrodowisko niszy do proliferacji znajdujących się w niej komórek, w tym CSCs. CSCs z mutacjami onkogennymi stają się niezależne od pierwotnego środowiska i uzyskują zdolność do zasiedlania nowego. Prowadzi to do powstawania przerzutów nowotworowych i postępu choroby nowotworowej [13]. Część CSCs, która odłączyła się od niszy i dostała się do krążenia wchodzi w skład populacji komórek nazywanych w literaturze „circulating tumor cells” (CTCs). W przypadku NDRP zaobserwowano obecność mutacji genu *EGFR* w CTCs. Efektem stosowania inhibitorów kinaz tyrozynowych jest zmniejszenie odsetka CTCs [56]. Dane na temat tych komórek są jednak bardzo skąpe. Wiąże się do przede wszystkim z trudnością w identyfikacji tych komórek. Liczba CTCs jest skorelowana ze stopniem zaawansowania NDRP, najwięcej ich wykrywa się w IV stadium choroby. CTCs uważane są również za nowy czynnik predykcyjny w NDRP. Ich zwiększony odsetek jest związany z gorszą odpowiedzią na chemioterapię i krótszym czasem przeżycia [44].

W procesy proliferacji i samoodnowy CSCs są zaangażowane czynniki transkrypcyjne: Sox2, Nanog i Oct-4 syntetyzowane przez niezróżnicowane komórki. Zmieniają ekspresję genów docelowych, które warunkują zdolność komórki do proliferacji i samoodnowy. Mogą indukować przemianę zróżnicowanej komórki somatycznej w komórkę pluripotencjalną [39]. Nadekspresja Sox2 została opisana we wszystkich podtypach raka płuca. Badania *in vitro* przeprowadzone na populacji bocznej (SP – side population), zawierającej CSCs, wyodrębnionej z ogólnej populacji komórek ADC wykazały podwyższoną ekspresję Sox2. Ekspresja tego białka koreluje ze stopniem zaawansowania ADC [15]. Na rozwój ADC mają wpływ czynniki transkrypcyjne: Nanog i Oct-4. Poza tym, że podtrzymują komórki w stanie pluripotencjalnym i zwiększają ich proliferację mogą wpływać na zwiększenie agresywności ADC. Prawdopodobnie nadekspresja Oct-4 i Nanog przyczynia się do wzmoczonego EMT [6].

Istotną cechą CSCs jest oporność na radioterapię i chemioterapię, prawdopodobnie przyczynia się do niepowodzeń terapeutycznych u chorych na NDRP. Chemio – i radioterapia mogą zwalczać jedynie zróżnicowane komórki nowotworowe. Doprowadza to do redukcji masy guza, ale nie pozbywania się komórek, które inicjują jego powstanie. Procesy odpowiedzialne za niewrażliwość CSCs na konwencjonalne metody leczenia są stosunkowo słabo poznane. Wykazano, że CSCs wytworzyły kilka mechanizmów, które mogą prowadzić do ich oporności na apoptozę. Zaobserwowano, że CSCs wyróżniają się szybką aktywacją mechanizmów naprawiających uszkodzone DNA, co powodowało ich oporność na radioterapię [51]. Innym poznany mechanizm jest nadekspresja białek antyapoptotycznych (np. surwiwiny) w CSCs oraz zwiększona aktywność białek o zdolności aktywnego transportu związków poza komórkę. Niepodatność na

apoptozę może być również zależna od autokrynnego wydzielania IL-4 [25]. CSCs cechuje ponadto podwyższona aktywność dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). Doprowadza to do zwiększonej pojemności detoksykacji wewnątrzkomórkowej m.in. wolnych rodników i cytostatyków [21].

MARKERY CSCs

CSCs są bardzo często izolowane na podstawie ekspresji określonych markerów na ich powierzchni. Najczęściej są to cząsteczki występujące na/w komórkach należące do grupy CD (cluster of differentiation). Do najczęściej ocenianych markerów należą: CD133, CD44, CD90, ALDH, EpCAM.

- CD133 – to transbłonowa glikoproteina, która jest najczęściej opisywanym markerem CSCs w nowotworach litych. Jej obecność wykazano w populacji CSCs NDRP i DRP [84,89]. Komórki o fenotypie CD133+ mogą tworzyć homogeną populację, a następnie namnażać i różnicować się w dojrzałe komórki o fenotypie charakterystycznym dla komórek raka płuca. Udowodniono, że obecność komórek CD133+ warunkuje niewrażliwość na chemioterapię. Niektórzy autorzy podważają jednak rolę białka CD133 jako markera CSCs w raku płuca [70,77].

- CD44 – to integralne białko błonowe, które jest głównym receptorem hialuronianu. Wykazano, że ta molekula uczestniczy w pobudzaniu procesów adhezji, agregacji i proliferacji komórek. Przyjmuje się, że CD44 występuje na prawidłowych i nowotworowych komórkach macierzystych. Wzmoczoną aktywność tego białka zaobserwowano w aktywowanych pneumocytach typu 2, komórkach które uległy EMT oraz komórkach linii NDRP [50,88]. Komórki o fenotypie CD44+ są zdolne do formowania masy guza *in vivo* (model myszy z obniżoną odpornością) oraz wykazują nadekspresję genów Oct-4, Nanog i Sox2 [100]. Wang i wsp. rozszerzyli badania nad populacją komórek potencjalnie macierzystych o fenotypie CD44+ pochodzących z tkanek nowotworu płuca [88]. Dodatkowo zbadali ekspresję molekuly CD90 na tychże komórkach. Udowodnili, że komórki CD44+CD90+ cechują się morfologią charakterystyczną dla mezenchymalnych komórek macierzystych, opornością na promieniowanie rentgenowskie oraz podwyższoną ekspresją Oct-4, Nanog i genów związanych z EMT (wimentyną i N-kadheryną).

- ALDH – jak wcześniej wspomniano CSCs charakteryzują się podwyższonym stężeniem enzymu dehydrogenazy aldehydowej, co powoduje ich oporność na apoptozę. Wiadomo, że ALDH katalizuje reakcje utleniania retinolu do kwasu retinowego we wczesnym stadium różnicowania komórek macierzystych [44]. Potwierdza to słuszność traktowania ALDH jako potencjalnego markera CSCs. Wyizolowane z linii komórkowych raka płuca CSCs wykazują nadekspresję ALDH [42].

- EpCAM – antygen cząsteczki adhezyjnej komórek nabłonkowych, to marker charakterystyczny dla komó-

rek nabłonkowych, jego zwiększona ekspresja jest obserwowana w większości komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego [42]. Obecność EpCAM została potwierdzona na komórkach raka płuca. Prawdopodobnie ma istotne znaczenie w kancerogenezie gruczołowego raka płuca [66]. Cząsteczka EpCAM jest uznawana za potencjalny marker CTCs. Opisano występowanie komórek potencjalnie macierzystych we krwi obwodowej pacjentów chorych na raka płuca o fenotypie EpCAM+ CD133+ [56]. Ich obecność potwierdziliśmy również w badaniach własnych [76]. Niektórzy autorzy zwracają uwagę, że antygeny nabłonkowe, takie jak EpCAM mogą zanikać podczas procesu EMT. To zjawisko może być przyczyną fałszywie zaniżonego wyniku na obecność CTCs we krwi obwodowej [92].

- MUC-1 – to glikoproteina o właściwościach antygenowych występująca na powierzchni komórek guzów nabłonkowych, zwłaszcza gruczołowych. Wykazano jej zwiększoną ekspresję oraz właściwości immunosupresyjne w gruczołowym raku płuca [32]. Ta molekula ma również działanie proangiogenne, zwiększa migrację komórek guza oraz nasila jego oporność na apoptozę [57]. Obecność MUC-1 wykazano na potencjalnych CSCs wykazujących podwyższoną ekspresję Oct-4 i wysoką aktywność proliferacyjną [46]. Nadekspresja MUC-1 została też opisana w populacji CSCs o fenotypie CD44+/24+ wyizolowanych z linii komórkowych ADC [75]. Wyniki tych badań sugerują, że MUC-1 może być potencjalnym dodatkowym markerem CSCs w gruczołowym raku płuca.

Wszystkie wymienione markery mogą być identyfikowane metodą cytometrii przepływowej. Technika ta pozwala na jednoczesne wykonanie analizy ilościowej i jakościowej dowolnej populacji komórek. Ponadto możliwe jest wykonanie oceny ekspresji wielu antygenów znajdujących się na powierzchni i wewnątrz pojedynczej komórki w krótkim czasie. Dzięki precyzyjnej selekcji otrzymanych wyników można nie tylko dokonać pozytywnej bądź negatywnej selekcji wybranych komórek, ale także oddzielić je od pozostałych, otrzymując w ten sposób jednorodną populację. Zaletą tej techniki jest również możliwość eliminacji zanieczyszczeń, takich jak: martwe i uszkodzone komórki lub krążące mRNA, które mogłyby prowadzić do otrzymania fałszywie pozytywnych wyników. Metoda jest dobrze skorelowana z metodą immunocytochemiczną. Cytometria przepływowa jest szczególnie przydatna podczas analizy funkcjonalnej ALDH. Umożliwia ocenę aktywności enzymu w CSCs [58].

Inną metodą stosowaną do izolowania CSCs jest uzyskiwanie populacji bocznej (SP – side population). W tej technice wykorzystuje się podwyższoną ekspresję białek – transporterów w CSCs. Nadekspresja tych białek (m.in. glikoproteiny P) umożliwia wypompowywanie fluorescencyjnych związków poza obręb CSCs. Taka populacja komórek wykazuje niewielką fluorescencję po wzbudzeniu światłem lasera. Dla odróżnienia związki fluorescen-

Tabela 2. Główne markery definiujące CSCs raka płuca. opis w tekście

Marker	Znaczenie biologiczne	Potwierdzona funkcjonalność w modelach ksenotransplantacyjnych
CD133	Glikoproteina występująca w błonie plazmatycznej	[21]
CD44	Glikoproteina występująca na powierzchni komórek, łącząca się z hialuronianem	[50]
CD90	Białko zakotwiczone w glikozylofosfatidyloinozytolu	[95]
ALDH	Enzym dehydrogenaza aldehydowa katalizujący reakcje detoksyfikujące we wczesnym etapie różnicowania CSCs, wysoka ekspresja ALDH utrudnia eradykację guza	[37]
EpCAM	Glikozylowane białko błonowe, zaangażowane w szlak sygnałowy Wnt stymulujący proliferację komórek	brak
MUC-1	Glikoproteina występująca na powierzchni guzów gruczołowych, charakteryzująca się działaniem immunosupresyjnym i proangiogennym	brak

cyjne efektywnie wnikają do komórek niebędących CSCs o niskiej ekspresji białkowych transporterów. Skutkuje to wysokimi wartościami fluorescencji po wzbudzeniu światłem lasera takiej populacji komórek [4].

CSCs A ODPOWIEDŹ UKŁADU ODPORNOŚCI W PRZEBIEGU NOWOTWORU

Reakcje zachodzące między komórkami układu odporności a komórkami nowotworowymi są złożone i dynamiczne [18]. Poznanie tych oddziaływań stanowi obecnie podstawę rozwoju nowoczesnych terapii przeciwko komórkom nowotworowym. Rak płuca należy do guzów litych o skąpej i heterogennej charakterystyce antygenowej. Odpowiedź przeciwnowotworowa jest modyfikowana przez środowisko płuc, w którym niejednokrotnie toczą się złożone procesy patologiczne wywołane czynnikami zewnętrznymi, do których w szczególności należy dym papierosowy [2]. Rola CSC w odpowiedzi układu odporności w przebiegu nowotworu nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Proces, w ciągu którego układ odpornościowy wykrywa i oddziałuje na komórki nowotworowe można podzielić na 3 fazy: fazę eliminacji komórek, równowagi oraz fazę ucieczki. W fazie eliminacji komórki nowotworowe mogą być usuwane przez mechanizmy odpowiedzi swoistej i nieswoistej. Niestety, pewna populacja komórek nowotworowych wymyka się spod nadzoru układu odpornościowego i bezpośrednio przechodzi w fazę równowagi (latencji), która może trwać nawet kilka lat. Przypuszcza się, że w czasie trwania tej fazy CSCs mogą podlegać zmianom genetycznym i epigenetycznym, które mogą warunkować ich nowe właściwości [71]. CSCs przypisuje się także cechy pozwalające na wyciszenie odpowiedzi układu odpornościowego głównie poprzez syntezę cząsteczek immunosupresyjnych i rekrutację innych molekuł, które mają właściwości immunosupresyjne [64].

Zmiany genetyczne w CSCs mogą doprowadzić do stanu immunotolerancji przez inhibicję procesu prezentacji antygeny limfocytom. CSCs mogą wpływać na redukcję ekspresji cząsteczek MHC I i MHC II oraz na blokowanie komórek prezentujących antygen (APC – antygen presenting cells) [13]. Mechanizm nadzoru immunologicznego w raku płuca jest procesem złożonym i ulega osłabieniu w trakcie przebiegu choroby. Mają na to wpływ nie tylko czynniki zewnętrzne, ale również wiek chorego czy leczenie immunosupresyjne, CSCs mogą łatwo przechodzić w fazę ucieczki.

Jak wcześniej wspomniano CSCs zasiedlają specjalne mikrośrodowisko nazywane niszą. Dużo uwagi poświęca się obecnie roli komórek zapalnych i syntetyzowanych przez nie przekazników w niszy. Otoczenie guza charakteryzuje się przewlekłym stanem zapalnym, co przyczynia się do aktywacji CSCs, stymulacji proliferacji komórek i tworzenia przerzutów [60,65].

W środowisku toczącego się guza występują dwie populacje makrofagów: M1 i M2, które różnią się funkcjonalnie. Makrofagi M1 pełnią funkcje immunostymulujące a M2 – immunosupresyjne. Makrofagi, zwłaszcza M2 tworzą pulę komórek zwanych TAM – makrofagi towarzyszące guzowi (TAM – tumor associated macrophages). TAM mogą stanowić nawet 50% masy guza [30]. Ich liczba koreluje ze złym rokowaniem chorych na raka płuca [54]. W interakcji z komórkami nowotworowymi TAM prowadzą do angiogenezy, sprzyjają inicjacji guza. Ponadto indukują wytwarzanie cytokin, chemokin i proteaz, które promują proliferację i rozprzestrzenianie się CSCs.

Wydaje się, że CSCs tworzą wspólnie z komórkami układu odporności sieć komórek zdolnych do współpracy i komunikacji. W literaturze anglojęzycznej oddziaływania między tymi komórkami są określane

jako „cross-talk” [102]. Coraz więcej jest dowodów na rolę TAM w bezpośrednim „cross-talk” z CSCs. Prawdopodobnie TAM indukują zmiany genetyczne w CSCs oraz utrzymanie ich zdolności do samoodnowy i proliferacji, co prowadzi do rozwoju masy guza [93]. Znany jest również wpływ CSCs na TAM. CSCs rekrutują TAM do niszy oraz wpływają na polaryzację makrofagów w kierunku M2 [65]. Podkreśla to znaczenie środowiska nowotworowego w modyfikacji odpowiedzi gospodarza. Istnieją przesłanki, że populacja TAM wpływa na podwyższenie aktywności czynników transkrypcyjnych: Sox, Oct-4 i Nanog, które warunkują utrzymanie się CSCs w stanie proliferacji i samoodnowy [99].

TAM odgrywają ponadto ważną rolę w procesie tworzenia przerzutów na każdym z jego etapów. Ułatwiają utratę kontaktu i oderwanie się CTCs od guza pierwotnego, migrację komórek, przenikanie do naczyń i wędrówkę w krwiobiegu lub układzie limfatycznym, przenikanie komórek nowotworowych przez ściany naczyń oraz dalszą proliferację w nowym miejscu osiedlenia [63]. Funkcja TAM wiąże się też z przebiegiem EMT. TAM promują proces EMT przez parakrynnie wydzielanie substancji, takich jak: TGF- β_1 oraz HIF (hypoxia inducible factor). Te czynniki wpływają dodatkowo na proces angiogenezy [1].

Przegląd aktualnego piśmiennictwa wskazuje, że TAM i CTCs mogą ulegać wzajemnej fuzji tworząc komórki hybrydową. Taka komórka charakteryzuje się ekspresją markerów charakterystycznych dla komórki nowotworowej i leukocyta [20,47]. Powyższe obserwacje wymagają jednak dalszych badań nad rolą TAM w ucieczce CSCs spod nadzoru układu odporności.

Najważniejszymi komórkami układu odporności odgrywającymi znaczną rolę w procesie zabijania komórek nowotworowych są cytotoksyczne limfocyty T. W opisywaniu odpowiedzi immunologicznej w nowotworze płuca dużo uwagi poświęca się cząsteczkom kostymulującym/koinhibującym (immune checkpoints) znajdującym się na powierzchni limfocytów T. Ich ligandy znajdują się na powierzchni APC i komórek nowotworowych. Połączenie wymienionych cząsteczek i ligandów decyduje o dalszych losach limfocyta. Sygnałem aktywującym limfocyty T efektorowe jest połączenie ich cząsteczki CD28 z cząsteczkami CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2) na powierzchni APC lub komórek nowotworowych. Jednak, jeśli partnerem dla CD80 i CD86 jest – zamiast CD28 – antygen CTLA-4 (cytotoxic T cell antigen 4), to dochodzi do anergii i apoptozy limfocyta. Ponadto połączenie CTLA-4 na dziewiczym limfocycie T z cząsteczkami CD80 (B7-1) i CD86 (B7-2) na APC sprzyja różnicowaniu limfocytów w kierunku limfocytów regulatorowych (Treg) odpowiedzialnych za stan immunotolerancji [20]. Jak z tego wynika, w środowisku guza nowotworowego może istnieć przewaga sygnałów hamujących funkcję limfocytów T efektorowych, co doprowadza do ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego [11].

Komórki prezentujące i nowotworowe dysponują również cząsteczkami PD-L1 (B7-H1) i PD-L2 (B7-DC) (programmed cell death protein ligand 1 and 2), których połączenie z PD-1 (programmed cell death protein 1) na powierzchni limfocytów powoduje zahamowanie ich aktywności. PD-1 ulega ekspresji na aktywowanych limfocytach, komórkach NK i monocytach. Natomiast ligand PDL-1 na komórkach dendrytycznych i makrofagach oraz na komórkach niehematopoetycznych (np. nabłonkowych), a także w nadmiarze na komórkach guza. W przypadku NDRP PDL-1 ulega nadekspresji u ponad 50% pacjentów i jest związany ze złym rokowaniem [71]. PDL-2 może być obecny na komórkach dendrytycznych, makrofagach i limfocytach B. Interakcja PD-1 z PDL-1 ma silne właściwości immunosupresyjne przez hamowanie wydzielania cytokin oraz hamowanie aktywności cytoliptycznej limfocytów [73].

Wydaje się, że CSCs modulują układ odporności przez parakrynnie wydzielanie czynników immunosupresyjnych lub bezpośrednio oddziaływanie na inne komórki. Schatton i wsp. wykazali, że CSCs hamują aktywację limfocytów T w czerniaku poprzez oddziaływanie PD-1 (obecny na limfocytach T) z PDL-1 (obecny na populacji CSCs) [73]. Ekspresję PDL-1 na CSCs opisano również w nowotworze głowy i szyi [48]. Brak jest jednak danych o obecności PDL-1 na CSCs w raku płuca. Wiedza na ten temat umożliwiłaby dokładniejsze zrozumienie interakcji między CSCs a komórkami gospodarza.

Istotną rolę w procesie nowotworzenia pełni również populacja komórek układu odporności określana jako MDSCs (myeloid derived suppressor cells). Jest to heterogenna grupa niedojrzałych komórek szpikowych (makrofagów, komórek dendrytycznych i granulocytów) [62]. W raku płuca ich rekrutacja występuje w stanach patologicznych przez wydzielanie odpowiednich cytokin przez mikrośrodowisko guza [43]. MDSCs wykazują działanie proangiogenne, indukują wytwarzanie metaloproteaz i przyczyniają się do powstawania nisz premetastatycznych ułatwiających zasiedlanie komórek nowotworowych [62]. Doniesienia z ostatnich lat wskazują, że MDSCs wpływają na ekspresję onkogenów w CSCs oraz indukują ich proliferację. MDSCs mogą regulować CSCs przez wydzielanie cytokin prozapalnych: IL-1, -6, -8 w niszy. Te interleukiny przyczyniają się do aktywacji szlaku STAT3/NF- κ B, który na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego stymuluje syntezę innych cytokin przyczyniających się do samoodnowy CSCs, szczególnie podkreśla się tu rolę IL-6 [4,59,60]. Funkcja MDSCs w raku płuca wiąże się również z EMT. MDSCs aktywują czynniki transkrypcyjne (SNAIL, TWIST, SLUG) warunkujące przebieg EMT, tworzenie przerzutów i późniejszy wzrost guza. Znany jest też wpływ MDSCs na dojrzałe komórki układu odporności. Hamują aktywację limfocytów T, różnicowanie komórek dendrytycznych i promują rozwój limfocytów T regulatorowych (Tregs) [43].

Istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej w przebiegu raka płuca pełnią limfocyty Tregs [19]. Są

zdolne do hamowania aktywności limfocytów T, komórek dendrytycznych i komórek NK. Limfocyty Tregs stanowią niewielką grupę limfocytów CD4⁺ (około 2-5%). Zazwyczaj są identyfikowane na podstawie ekspresji konkretnych antygenów. Definiuje się je jako komórki CD4⁺/CD25⁺ z wysoką ekspresją CD25. Charakteryzują się obecnością molekuł: Foxp3, GITR (glucocorticoid-induced TNF-receptor), CD357, CTLA4, LAG3 (lymphocyte-activation gene 3). Do pełnej aktywacji limfocytów Tregs wymagane jest aktywne białko Foxp3 [87]. Mikrootoczenie nowotworowe jest bogate w cytokiny IL-10 i TGF- β , które indukują dojrzewanie Tregs i ekspresję Foxp3 [61]. Wielu autorów podkreśla rolę cząsteczki CTLA-4 na komórkach Tregs, której działaniem jest negatywna regulacja odpowiedzi immunologicznej. U chorych na raka płuca jest zwiększona liczba krążących limfocytów CTLA-4⁺ [94].

Wiele danych wskazuje, że limfocyty Tregs promują rozwój CSCs. Charakteryzujące się ekspresją Foxp3 Tregs pod wpływem IL-1 β , -2, -21, -23 są zdolne do wydzielania IL-17. Wydzielana przez Tregs Foxp3⁺ IL-17 w warunkach hipoksji może się przyczyniać do indukcji CSCs. Potwierdzono, że w nowotworze jelita grubego limfocyty Tregs Foxp3⁺ indukują powstawanie potencjalnych CSCs z ekspresją charakterystycznych dla nich markerów: CD133, CD44, EpCAM, ALDH [82,91]. Brak jest jednoznacznych danych o aktywacji CSCs przez Tregs w innych nowotworach. Więcej uwagi poświęca się pośredniemu wpływowi Tregs na rozwój CSCs. Wiadomo, że limfocyty Tregs przez IL-10 mogą indukować polaryzację makrofagów w kierunku M2, co przyczynia się do rozwoju CSCs [83]. Wykazano też, że limfocyty Tregs CD25⁺ w NDRP stymulują wydzielanie TGF- β ₁. To jeden z głównych czynników promujących proces EMT – podstawowy w regulacji CSCs [91].

Jedną z cząsteczek o potencjalnym działaniu immunosupresorowym obecnych na CSCs jest CD200 opisywana również jako antygen OX2. Należy do rodziny immunoglobulin, ma charakter glikoproteiny transbłonowej. Obecność antygeny CD200 stwierdza się na tymocytach, limfocytach B i T, komórkach dendrytycznych, komór-

kach kłębuszków nerkowych i śródbłónka naczyń. Natomiast ekspresja receptora CD200R jest ograniczona do komórek linii mieloidalnej oraz niektórych populacji limfocytów T [92]. Wynikiem interakcji antygeny CD200 z receptorem CD200R jest upośledzenie funkcjonowania układu odporności. Przejawia się to m.in. w zwiększonym wytwarzaniu IL-10, zmniejszonym wytwarzaniu cytokin przez Th1 (należą tu: IL-2, -3, IFN- γ), zmniejszonym wytwarzaniu cytokin indukowanych przez makrofagi M1 (należą tu: TNF- α , IFN- α , IL-17) [29]. Ekspresję CD200 opisano na liniach komórkowych niektórych nowotworów litych (czerniaka, raka głowy i szyi, raka jajnika, raka nerki) oraz nowotworów hematologicznych (szpiczaka mnogiego, przewlekłej białaczki limfocytarnej, przewlekłej białaczki szpikowej) [27,51]. Nie potwierdzono jednak obecności tej molekuly na komórkach nowotworu płuca. Niektóre doniesienia wskazują, że ekspresja CD200 jest wspólną cechą CSCs i jest to związane z progresją guza [40]. Cząsteczce CD200 przypisuje się również zdolność do hamowania odpowiedzi przeciwnowotworowej [28]. Opisano domniemaną populację CSCs z koekspresją CD200, CD133 i CD44 [41]. Ich obecność była wykładnikiem złego rokowania, charakteryzowały się ponadto zwiększoną żywotnością w porównaniu do pozostałych komórek masy guza. Na tych samych liniach komórkowych analizowano obecność molekuł o właściwościach immunosupresyjnych. Co ważne, ekspresja CD200 była 14-krotnie większa niż cząsteczek, takich jak CTLA-4 czy Foxp3.

PODSUMOWANIE

Poznanie biologii komórek macierzystych (progenitorowych, inicjujących guz) jest jednym z największych wyzwań w naukach podstawowych oraz onkologii klinicznej. Z przedstawionych kierunków i wyników badań wynika, że komórki te są w istotny sposób związane z rozwojem guzów litych, których przykładem jest rak płuca. Gruczołowy rak płuca występujący coraz częściej jest obecnie dokładnie rozpoznawany, także w zakresie zmian molekularnych. Identyfikacja CSCs w tym typie raka z zastosowaniem markerów omówionych wyżej może się przyczynić do wyznaczenia nowych kierunków terapii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adams D.L., Martin S.S., Alpaugh R.K., Charpentier M., Tsai S., Bergan R.C., Ogden I.M., Catalona W., Chumsri S., Tang C., Cristofanilli M.: Circulating giant macrophages as a potential marker of solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014; 111: 3514-3519
- [2] Aguirre-Ghiso J.A.: Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer*, 2007; 7: 834-846
- [3] Alison M.R., Islam S., Wright N.A.: Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J. Cell Sci.*, 2010; 123: 2357-2368
- [4] Alison M.R., Lim S.M., Nicholson L.J.: Cancer stem cells: problems for therapy? *J. Pathol.*, 2011; 223: 147-161
- [5] Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A.: Human CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 89-98
- [6] Bao S., Wu Q., Li Z., Sathornsumetee S., Wang H., McLendon R.E., Hjelmeland A.B., Rich J.N.: Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.*, 2008; 68: 6043-6048
- [7] Basak S.K., Veena M.S., Oh S., Huang G., Srivatsan E., Huang M., Sharma S., Batra R.K.: The malignant pleural effusion as a model to investigate intratumoral heterogeneity in lung cancer. *PLoS One*, 2009; 4: e5884
- [8] Borovski T., De Sousa E., Melo F., Vermeulen L., Medema J.P.: Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.*, 2011; 71: 634-639

- [9] Borthwick D.W., Shahbazian M., Krantz Q.T., Dorin J.R., Randell S.H.: Evidence for stem-cell niches in the tracheal epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2001; 24: 662-670
- [10] Bourguignon L.Y., Peyrollier K., Xia W., Gilad E.: Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 17635-17651
- [11] Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q., Hwu W.J., Topalian S.L., Hwu P., Drake C.G., Camacho L.H., Kauh J., Odunsi K., Pitot H.C., Hamid O., Bhatia S., Martins R., Eaton K. i wsp.: Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012; 366: 2455-2465
- [12] Brower M., Carney D.N., Oie H.K., Gazdar A.F., Minna J.D.: Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res.*, 1986; 46: 798-806
- [13] Cabarcas S.M., Mathews L.A., Farrar W.L.: The cancer stem cell niche – there goes the neighborhood? *Int. J. Cancer*, 2011; 129: 2315-2327
- [14] Chapman H.A.: Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 2011; 73: 413-435
- [15] Chiou S.H., Wang M.L., Chou Y.T., Chen C.J., Hong C.F., Hsieh W.J., Chang H.T., Chen Y.S., Lin T.W., Hsu H.S., Wu C.W.: Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res.*, 2010; 70: 10433-10444
- [16] Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.: Cancer stem cells – Perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.*, 2006; 66: 9339-9344
- [17] Clarke M.F., Fuller M.: Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 2006; 124: 1111-1115
- [18] Domagała-Kulawik J., Osińska I.: Immune alterations in lung cancer – the new therapeutic approach. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2014; 82: 286-299
- [19] Domagała-Kulawik J., Osińska I., Hoser G.: Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.*, 2014; 3: 15-22
- [20] Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., Roche P.C., Lu J., Zhu G., Tamada K., Lennon V.A., Celis E., Chen L.: Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.*, 2002; 8: 793-800
- [21] Eramo A., Lotti F., Sette G., Pillozzi E., Biffoni M., Di Virgilio A., Conticello C., Ruco L., Peschle C., De Maria R.: Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell. Death. Differ.*, 2008; 15: 504-514
- [22] Eramo A., Ricci-Vitiani L., Zeuner A., Pallini R., Lotti F., Sette G., Pillozzi E., Larocca L.M., Peschle C., De Maria R.: Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell. Death. Differ.*, 2006; 13: 1238-1241
- [23] Evangelista M., Tian H., de Sauvage F.J.: The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer. Res.*, 2006; 12: 5924-5928
- [24] Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F.: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, 2015; 136: E359-E386
- [25] Francipane M.G., Alea M.P., Lombardo Y., Todaro M., Medema J.P., Stassi G.: Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 4022-4025
- [26] Giangreco A., Reynolds S.D., Stripp B.R.: Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am. J. Pathol.*, 2002; 161: 173-182
- [27] Giles R.H., van Es J.H., Clevers H.: Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1653: 1-24
- [28] Gorczynski R.M., Chen Z., Hu J., Kai Y., Lei J.: Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumour cells in C57BL/6 mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001; 126: 220-229
- [29] Gorczynski R.M., Chen Z., Kai Y., Wong S., Lee L.: Induction of tolerance-inducing antigen-presenting cells in bone marrow cultures in vitro using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation*, 2004; 77: 1138-1144
- [30] Hanahan D., Coussens L.M.: Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012; 21: 309-322
- [31] Hardavella G., George R., Sethi T.: Lung cancer stem cells – characteristics, phenotype. *Transl. Lung Cancer Res.*, 2016; 5: 272-279
- [32] Hikita S.T., Kosik K.S., Clegg D.O., Bamdad C.: MUC1* mediates the growth of human pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2008; 3: e3312
- [33] Hill R.P., Marie-Egyptienne D.T., Hedley D.W.: Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. *Semin. Radiat. Oncol.*, 2009; 19: 106-111
- [34] Ho S.B., Niehans G.A., Lyftogt C., Yan P.S., Cherwitz D.L., Gum E.T., Dahiya R., Kim Y.S.: Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, 1993; 53: 641-651
- [35] Hugo H., Ackland M.L., Blick T., Lawrence M.G., Clements J.A., Williams E.D., Thompson E.W.: Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 213: 374-383
- [36] Hung J.J., Yang M.H., Hsu H.S., Hsu W.H., Liu J.S., Wu K.J.: Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 α , TWIST1 and SNAIL expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*, 2009; 64: 1082-1089
- [37] Jiang F., Qiu Q., Khanna A., Todd N.W., Deepak J., Xing L., Wang H., Liu Z., Su Y., Stass S.A., Katz R.L.: Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol. Cancer Res.*, 2009; 7: 330-338
- [38] Kabashima A., Higuchi H., Takaishi H., Matsuzaki Y., Suzuki S., Izumiya M., Iizuka H., Sakai G., Hozawa S., Azuma T., Hibi T.: Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF- β -mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Int. J. Cancer*, 2009; 124: 2771-2779
- [39] Karachaliou N., Rosell R., Viteri S.: The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Transl. Lung Cancer*, 2013; 2: 172-179
- [40] Kawasaki B.T., Farrar W.L.: Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. *Trends Immunol.* 2008; 29: 464-468
- [41] Kawasaki B.T., Mistree T., Hurt E.M., Kalathur M., Farrar W.L.: Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 364: 778-782
- [42] Kim Y., Kim H.S., Cui Z.Y., Lee H.S., Ahn J.S., Park C.K., Park K., Ahn M.J.: Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer. Res.*, 2009; 29: 1817-1822
- [43] Korkaya H., Liu S., Wicha M.S.: Regulation of cancer stem cells by cytokine networks: Attacking cancer's inflammatory roots. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 6125-6129
- [44] Krebs M.G., Sloane R., Priest L., Lancashire L., Hou J.M., Greystoke A., Ward T.H., Ferraldeschi R., Hughes A., Clack G., Ranson M., Dive C., Blackhall F.H.: Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2011; 29: 1556-1563
- [45] Lahsnig C., Mikula M., Petz M., Zulehner G., Schneller D., van Zijl F., Huber H., Csizsar A., Beug H., Mikulits W.: ILE1 requires oncogenic Ras for the epithelial to mesenchymal transition of hepatocytes and liver carcinoma progression. *Oncogene*, 2009; 28: 638-650
- [46] Laprus I., Adamek M., Kozielski J.: The need of lung cancer

screening: new evidence, new expectations. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2011; 79: 419-427

[47] Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P.: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996; 271: 1734-1736

[48] Lee Y., Sunwoo J.: PD-L1 is preferentially expressed on CD44+ tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Immunother. Cancer*, 2014; 2: P270

[49] Leong K.G., Karsan A.: Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, 2006; 107: 2223-2233

[50] Leung E.L., Fiscus R.R., Tung J.W., Tin V.P., Cheng L.C., Sihoe A.D., Fink L.M., Ma Y., Wong M.P.: Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*, 2010; 5: e14062

[51] Li L., Bhatia R.: Stem cell quiescence. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 4936-4941

[52] Li N., Qu B., Shao K., Chen Z., Tan F., Tan X., Li B., Wang J., He J.: Smoking cause specific lung cancer – evidence from non-smoking lung adenocarcinoma. *J. Cancer Therapy*, 2012; 3: 435-441

[53] Lindeman N.I., Cagle P.T., Beasley M.B., Chitale D.A., Dacic S., Giaccone G., Jenkins R.B., Kwiatkowski D.J., Saldivar J.S., Squire J., Thunnissen E., Ladanyi M.: Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors. *J. Thorac. Oncol.*, 2013; 8: 823-859

[54] Liu R., Wang X., Chen G.Y., Dalerba P., Gurney A., Hoey T., Sherlock G., Lewicki J., Shedden K., Clarke M.F.: The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N. Engl. J. Med.*, 2007; 356: 217-226

[55] Lu H., Clauser K.R., Tam W.L., Fröse J., Ye X., Eaton E.N., Reinhardt F., Donnenberg V.S., Bhargava R., Carr S.A., Weinberg R.A.: A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nat. Cell Biol.*, 2014; 16: 1105-1117

[56] Maheswaran S., Sequist L.V., Nagrath S., Ulkus L., Brannigan B., Collura C.V., Inserra E., Diederichs S., Iafrate A.J., Bell D.W., Digumarthy S., Muzikansky A., Irimia D., Settleman J., Tompkins R.G. i wsp.: Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 366-377

[57] Mather J.P., Roberts P.E., Pan Z., Chen F., Hooley J., Young P., Xu X., Smith D.H., Easton A., Li P., Bonvini E., Koenig S., Moore P.A.: Isolation of cancer stem like cells from human adenosquamous carcinoma of the lung supports a monoclonal origin from a multipotential tissue stem cell. *PLoS One*, 2013; 8: e79456

[58] McClellan S., Slamecka J., Howze P., Thompson L., Finan M., Rocconi R., Owen L.: mRNA detection in living cells: a next generation cancer stem cell identification technique. *Methods*, 2015; 82: 47-54

[59] Miranda-Lorenzo I., Dorado J., Lonardo E., Alcalá S., Serrano A.G., Clausell-Tormos J., Cioffi M., Megias D., Zagorac S., Balic A., Hidalgo M., Erkan M., Kleeff J., Scarpa A., Sainz B.Jr. i wsp.: Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nat. Methods.*, 2014; 11: 1161-1169

[60] Murdoch C., Giannoudis A., Lewis C.E.: Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 2004; 104: 2224-2234

[61] Osińska I., Stelmaszczyk-Emmel A., Polubiec-Kownacka M., Dziedzic D., Domagała-Kulawik J.: CD4+/CD25(high)/FoxP3+/CD127 – regulatory T cells in bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients. *Hum. Immunol.*, 2016; 77: 912-915

[62] Panni R.Z., Sanford D.E., Belt B.A., Mitchem J.B., Worley L.A., Goetz B.D., Mukherjee P., Wang-Gillam A., Link D.C., Denardo D.G., Goedegebuure S.P., Linehan D.C.: Tumor-induced STAT3 activation in monocytic myeloid-derived suppressor cells enhances stemness and mesenchymal properties in human pancreatic cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2014; 63: 513-528

[63] Pawelek J.M., Chakraborty A.K.: The cancer cell-leukocyte fusion

theory and metastasis. *Adv. Cancer Res.*, 2008; 101: 397-444

[64] Plaks V., Kong N., Werb Z.: The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, 2015; 16: 225-238

[65] Quian B.Z., Pollard J.W.: Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010; 141: 39-51

[66] Ramirez J.M., Fehm T., Orsini M., Cayrefourcq L., Maudelonde T., Pantel K., Alix-Panabières C.: Prognostic relevance of viable circulating tumor cells detected by EPISPOT in metastatic breast cancer patients. *Clin. Chem.*, 2014; 60: 214-221

[67] Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007; 445: 111-115

[68] Rokavec M., Wu W., Luo J.L.: IL-6-mediated suppression of miR-200c directs constitutive activation of inflammatory signaling circuit driving transformation and tumorigenesis. *Mol. Cell*, 2012; 45: 777-789

[69] Sakaguchi S., Wing K., Yamaguchi T.: Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Tregs. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39: 2331-2336

[70] Salnikow A.V., Gladkich J., Moldenhauer G., Volm M., Mattern J., Herr I.: CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 2010; 126: 950-958

[71] Sceneay J., Smyth M.J., Möller A.: The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32: 449-464

[72] Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y., Yamaura K., Waaga-Gasser A.M., Gasser M., Zhan Q., Jordan S., Duncan L.M., Weishaupt C., Fuhlbrigge R.C., Kupper T.S., Sayegh M.H., Frank M.H.: Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008; 451: 345-349

[73] Schatton T., Schütte U., Frank N.Y., Zhan Q., Hoerning A., Robles S.C., Zhou J., Hodi F.S., Spagnoli G.C., Murphy G.F., Frank M.H.: Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res.*, 2010; 70: 697-708

[74] Schilders K.A., Eenjes E., van Riet S., Poot A.A., Stamatialis D., Truckenmüller R., Hiemstra P.S., Rottier R.J.: Regeneration of the lung: lung stem cells and the development of lung mimicking devices. *Respir. Res.*, 2016; 17: 44

[75] Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J.: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011; 331: 1565-1570

[76] Skirecki T., Hoser G., Kawiak J., Dziedzic D., Domagała-Kulawik J.: Flow cytometric analysis of CD133 – and EpCAM-positive cells in the peripheral blood of patients with lung cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2014; 62: 67-75

[77] Solis M.A., Chen Y.H., Wong T.Y., Bittencourt V.Z., Lin Y.C., Huang L.H.: Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem. Res. Int.* 2012; 2012: 346972

[78] Srivastava M.K., Andersson A., Zhu L., Harris-White M., Lee J.M., Dubinett S., Sharma S.: Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy*, 2012; 4: 291-304

[79] Stewart B., Wild C.P.: World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. 2014

[80] Tang D.G.: Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell. Res.*, 2012; 22: 457-472

[81] Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A.: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009; 139: 871-890

[82] Thomson S., Buck E., Petti F., Griffin G., Brown E., Ramnarine N., Iwata K.K., Gibson N., Haley J.D.: Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Res.*, 2005; 65: 9455-9462

- [83] Tiemessen M.M., Jagger A.L., Evans H.G., van Herwijnen M.J., John S., Taams L.S.: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19446-19451
- [84] Tirino V., Camerlingo R., Franco R., Malanga D., La Rocca A., Viglietto G., Rocco G., Pirozzi G.: The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2009; 36: 446-453
- [85] Travis W.D., Brambilla E., Nicholson A.G., Yatabe Y., Austin J.H., Beasley M.B., Chirieac L.R., Dacic S., Duhig E., Flieder D.B., Geisinger K., Hirsch F.R., Ishikawa Y., Kerr K.M., Noguchi M. i wsp.: The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J. Thorac. Oncol.*, 2015; 10: 1243-1260
- [86] Visvader J.E., Lindeman G.J.: Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 2012; 104: 717-728
- [87] Voo K.S., Wang Y.H., Santori F.R., Boggiano C., Wang Y.H., Arima K., Bover L., Hanabuchi S., Khalili J., Marinova E., Zheng B., Littman D.R., Liu Y.J.: Identification of IL-17 producing Foxp3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 4793-4798
- [88] Wang P., Gao Q., Suo Z., Munthe E., Solberg S., Ma L., Wang M., Westerdal N.A., Kvalheim G., Gaudernack G.: Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines. *PLoS One*, 2013; 8: e57020
- [89] Wang P., Suo Z., Wang M., Høifødt H.K., Fodstad O., Gaudernack G., Kvalheim G.: In vitro and in vivo properties of CD133 expressing cells in human lung cancer lines. *Exp. Hematol. Oncol.* 2013; 2: 16
- [90] Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2011 roku. Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa, 2013
- [91] Woo E.Y., Chu C.S., Goletz T.J., Schlienger K., Yeh H., Coukos G., Rubin S.C., Kaiser L.R., June C.H.: Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.*, 2001; 61: 4766-4772
- [92] Wright G.J., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., Puklavec M.J., Bigler M., Song Y., Jenmalm M., Gorman D., McClanahan T., Liu M.R., Brown M.H., Sedgwick J.D., Phillips J.H., Barclay A.N.: Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3034-3046
- [93] Yang J., Liao D., Chen C., Liu Y., Chuang T.H., Xiang R., Markowitz D., Reisfeld R.A., Luo Y.: Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem Cells*, 2013; 31: 248-258
- [94] Yang S., Wang B., Guan C., Wu B., Cai C., Wang M., Zhang B., Liu T., Yang P.: Foxp3⁺ IL-17⁺ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *J. Leukoc. Biol.*, 2011; 89: 85-91
- [95] Yang Z.F., Ho D.W., Ng M.N., Lau C.K., Yu W.C., Ngai P., Chu P.W., Lam C.T., Poon R.T., Fan S.T.: Significance of CD90⁺ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, 2008; 13: 153-166
- [96] Ye X.Z., Yu S.C., Bian X.W.: Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *J. Genet. Genomics*, 2010; 37: 423-430
- [97] Yonezawa S., Higashi M., Yamada N., Yokoyama S., Kitamoto S., Kitajima S., Goto M.: Mucins in human neoplasms: clinical pathology, gene expression and diagnostic application. *Pathol. Int.*, 2011; 61: 697-716
- [98] Yu Z., Pestell T.G., Lisanti M.P., Pestell R.G.: Cancer stem cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 2012; 44: 2144-2151
- [99] Zhang C.H., Guo F.L., Xu G.L., Jia W.D., Ge Y.S.: STAT3 activation mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatogastroenterology*, 2014; 61: 1082-1089
- [100] Zhang W.C., Shyh-Chang N., Yang H., Rai A., Umashankar S., Ma S., Soh B.S., Sun L.L., Tai B.C., Nga M.E., Bhakoo K.K., Jayapal S.R., Nichane M., Yu Q., Ahmed D.A. i wsp.: Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell*, 2012; 148: 259-272
- [101] Zhou J., Zhang Y.: Cancer stem cells: models, mechanisms and implications for improved treatment. *Cell Cycle*, 2008; 7: 1360-1370
- [102] Zhou W., Ke S.Q., Huang Z., Flavahan W., Fang X., Paul J., Wu L., Sloan A.E., McLendon R.E., Li X., Rich J.N., Bao S.: Perositin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat. Cell Biol.*, 2015; 17: 170-182

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.