

NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZyste W RAKACH PŁASKONABŁONKOWYCH GŁOWY I SZYI

dr med. Tomasz Szafarowski, dr med. Mirosław Szczepański*,
prof. dr hab. med. Antoni Krzeski

ASSESSMENT OF CANCER STEM CELLS AND ANGIOGENESIS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK

Despite significant progress in oncology, squamous cell carcinomas of the head and neck remain a significant therapeutic problem and effectiveness of treatment has been remaining for the last 40 years. Studies on the initiation of carcinogenesis has led to the formulation of the two main theories describing the development of cancer – stochastic theory and the hierarchical theory. Hierarchical theories of cancer formation assumes the existence of dominating cell population in the tumor, known as cancer stem cells (CSC) or tumor-initiating cells (TIC). Cancer stem cells are isolated based on the expression of specific markers. In head and neck squamous cell carcinoma numerous publications relate to the expression of CD44, CD24, CD133 and ALDH1A1 on tumor cells. It seems that the CSC may be relevant in clinical practice.

(Mag. ORL, 2017, 61, XVI, 9–22)

Key words:

head and neck squamous cell carcinoma, cancer stem cells, tumor markers, tumorigenesis

Klinika Otorinolaryngologii
Wydział Lekarsko-Dentystyczny WUM
Kierownik Kliniki: prof. Antoni Krzeski
Szpital Czerniakowski
00-731 Warszawa, ul. Stępińska 19/25

*Autor korespondencyjny:
Mirosław Szczepański
e-mail:mszczepanski@wum.edu.pl

Nowotwory głowy i szyi zalicza się do jednej grupy ze względu na ich zbliżoną patogenezę oraz podobieństwo obrazu patomorfologicznego i przebiegu klinicznego. Ponad 90% złośliwych nowotworów występujących w obszarze głowy i szyi to nowotwory pochodzenia nabłonkowego – raki płaskonabłonkowe (ang. *head and neck squamous cell carcinoma* – HNSCC) wywodzące się z anatomicznych okolic górnej części układu pokarmowego i oddechowego, czyli z jamy ustnej, gardła, krtani, jamy nosa, gruczołów ślinowych, ucha, tarczycy lub zatok przynosowych. Większość nowotworów tej grupy cechuje się głównie miejscowo-regionalnym wzrostem oraz względnie małym ryzykiem przerzutów odległych. Niepowodzenie ich leczenia wiąże się najczęściej z wystąpieniem miejscowej wznowy lub wznowy w obrębie regionalnych węzłów chłonnych szyi (Kordek i in. 2007). Zniekształcenia anatomiczne oraz dysfunkcje czynnościowe spowodowane zarówno samą chorobą, jak i jej leczeniem pociągają za sobą negatywne skutki psychologiczne i społeczne oraz znacznie pogarszają jakość życia chorych (De Graeff i in. 2000, Howren i in. 2013).

Z danych epidemiologicznych wynika, że zachorowalność na nowotwory płaskonabłonkowe głowy i szyi wykazuje stałą tendencję wzrostową. Raki te stanowią 6–10% wszystkich nowotworów złośliwych oraz są przyczyną 5% zgonów z powodu chorób nowotworowych. Rocznie w Polsce notuje się około 6 tysięcy nowych zachorowań, a na całym świecie ponad 600 tysięcy (2015, <http://globocan.iarc.fr>). W naszym kraju najczęstszym nowotworem płaskonabłonkowym głowy i szyi u obu płci jest rak krtani, a następnymi z kolei są: u mężczyzn raki dna jamy ustnej oraz migdałka, a u kobiet raki migdałka i guzy ślinianek przyusznych.

Pomimo znacznego postępu w dziedzinie onkologii HNSCC nadal stanowią istotny problem terapeutyczny, a efektywność ich leczenia

pozostaje na poziomie sprzed 40 lat (Carvalho i in. 2005). Naturalny przebieg kliniczny oraz rokowanie w poszczególnych przypadkach zależy między innymi od umiejscowienia guza, stopnia zaawansowania klinicznego, statusu regionalnych węzłów chłonnych głowy i szyi oraz stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (Kordek i in. 2007). W Polsce 5-letnie przeżycie chorych na nowotwór krtani w ciągu ostatnich 15 lat pozostawało na poziomie 50,6% w przypadku mężczyzn, a w przypadku kobiet nieznacznie wzrosło: z 60,4% do 62,7%. Na świecie średnie 5-letnie przeżycie dla chorych obojga płci wynosi 55% (<http://globocan.iarc.fr>). Najgorsze wyniki leczenia wiążą się z rakiem gardła dolnego. Nawet gdy jest on rozpoznany w niskim stopniu zaawansowania, 5-letnie przeżycie dotyczy tylko około 30% chorych.

Współczesne możliwości wczesnej diagnostyki oraz leczenia nowotworów głowy i szyi są ograniczone z powodu niewyjaśnionej patogenezy tych raków. Pomimo postępu wiedzy medycznej i licznych badań poświęconych biologii nowotworów oraz molekularnemu podłożu kancerogenezy nie udało się ustalić jednoznacznej przyczyny procesu nowotworzenia. Wśród wielu czynników inicjujących ten proces palenie tytoniu oraz nadmierne spożywanie alkoholu występuje w udowodnionym związku przyczynowym z częstością występowania HNSCC (Blot i in. 1988). W nowotworach ustnej części gardła obserwuje się występowanie onkogennych typów HPV 16 i 18. W badaniach zauważalny jest znaczny wzrost liczby chorych na HNSCC, u których potwierdzono obecność HPV. Rosnąca częstość zachorowań na nowotwory o wirusowej etiopatogenezie wiąże się między innymi ze zmianą zachowań seksualnych (Castellsague i in. 2016).

Przełomowym odkryciem w badaniach nad nowotworami było wyizolowanie w 1997 roku przez J.E. Dicka i D. Bonneta nowotworowych komórek macierzystych (ang. *cancer stem cells* – CSC). Identyfikacja tych komórek stała się podstawą do opracowania nowych teorii rozwoju choroby nowotworowej, w których uwzględniono złożoność procesów kancerogenezy oraz zróżnicowanie stopnia wrażliwości komórek na leczenie. Poznanie molekularnego podłoża kancerogenezy z uwzględnieniem znaczenia w tym procesie CSC być może pozwoli zrozumieć, dlaczego powszechnie stosowane leczenie przeciwnowotworowe jest niewystarczająco skuteczne. Wyjaśnienie mechanizmów nowotworzenia, przerzutowania oraz oporności na wdrożone schematy terapeutyczne to bez wątpienia jeden z priorytetów współczesnej onkologii (Bonnet i Dick 1997).

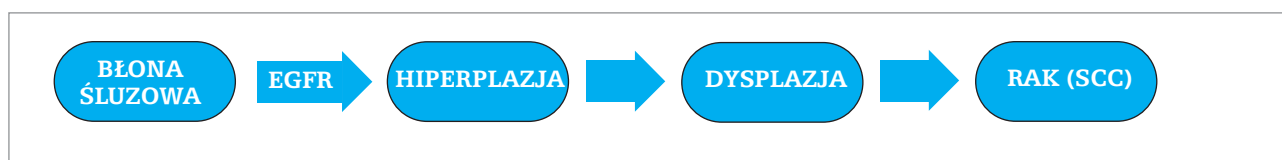
MODELE KANCEROGENEZY

Badania nad inicjacją kancerogenezy, promocją oraz progresją nowotworzenia, a także nad powstaniem wznowy doprowadziły do sformułowania dwóch głównych teorii opisujących rozwój choroby nowotworowej – teorii stochastycznej oraz teorii hierarchicznej (Major i in. 2013).

Stochastyczna teoria rozwoju choroby nowotworowej

Już na początku ery zapoczątkowanej przez wielkich patologów eksperymentalnych XIX wieku zauważono, że wiele nowotworów wykazuje zróżnicowanie morfologiczne. J.P. Müller oraz R. Virchow zaobserwowali pod mikroskopem wyjątkową różnorodność morfologiczną komórek nowotworowych w obrębie guza. Zjawisko to określono terminem: heterogenność guza, a tłumaczono w dwojaki sposób. Według pierwszej koncepcji podczas podziału komórek nowotworowych dochodzi do akumulacji losowych mutacji, które powodują zróżnicowanie genetyczne komórek. Nabyte mutacje dają pewnej grupie komórek nowotworowych w guzie przewagę konkurencyjną nad innymi komórkami, nieposiadającymi tej mutacji. Dzieląc się dalej, komórki te tworzą tzw. klon komórek bardzo podobnych pod względem morfologicznym. Według drugiej koncepcji heterogenność nowotworu może być wynikiem zróżnicowanego mikrośrodowiska komórek w obrębie guza (Dick 2008).

W 1976 roku P.C. Nowell zaproponował tzw. stochastyczny, klonalny model kancerogenezy. Zgodnie z tym modelem nowotwór powstaje z pojedynczej komórki, która w ciągu swojego życia akumuluje mutacje i staje się komórką nowotworową, wykazującą zdolność do niekontrolowanych podziałów. Wszystkie komórki guza są identyczne (homogenne) i dysponują takim samym potencjałem rozwojowym, dlatego każda z nich jest zdolna do indukowania progresji nowotworu. Niejednorodność funkcjonalna wynika z losowych (stochastycznych) czynników, wpływających na zachowanie poszczególnych komórek guza. Mogą to być czynniki wewnętrzne np. zmienione stężenia czynników transkrypcyjnych lub zaburzenia szlaków sygnałowych, lub nabyte, do których autor zaliczył między innymi czynniki gospodarza, mikrośrodowiska, a także odpowiedź immunologiczną. Zaproponowany przez Nowella model bazuje na założeniu, że nowotwór jest chorobą proliferacyjną, i uzasadnia powstawanie nowotworu w konsekwencji zmian przednowotworowych (stopniowa progresja od metaplastji poprzez dysplazję do nowotworu) (Nowell 1976, Monroe i in. 2011) (**ryc. 1**).



Ryc. 1. Genetyczny model klonalnej progresji nowotworów głowy i szyi – teoria stochastyczna (wg Nowell 1976 – w modyfikacji własnej)

Klonalny model kancerogenezy nie wyjaśnia jednak innych podstawowych cech nowotworu, między innymi heterogenności komórek guza pod względem fenotypu, zdolności proliferacji, potencjału różnicowania oraz oporności na zastosowaną terapię. Nie uwzględnia także faktu, że nie wszystkie komórki guza posiadają potencjał nowotworzenia oraz przerzutowania (Ricci-Vitiani i in. 2009). Mimo wskazanych niedostatków model ten stał się podstawą współcześnie stosowanych metod leczenia nowotworów, których głównym celem jest niszczenie szybko dzielących się, proliferujących lub zróżnicowanych komórek guza. Ze względu jednak na często występującą oporność na leczenie oraz znaczne zróżnicowanie cech nowotworów nie zaprzestano poszukiwań bardziej satysfakcjonujących interpretacji molekularnego podłoża nowotworzenia (Zhang i in. 2010).

Hierarchiczna teoria rozwoju choroby nowotworowej

– nowotworowe komórki macierzyste

Istnienie nowotworowych komórek macierzystych podejrzewano od początków XIX wieku. W stuleciu tym powstało wiele prac wskazujących na skomplikowaną strukturę nowotworów oraz ich histopatologiczne zróżnicowanie.

W 1855 roku R. Virchow opisał histologiczne podobieństwo potworka do tkanek rozwijającego się płodu oraz zasugerował możliwość związku między tymi dwiema różnymi tkankami (Ribatti 2012). W 1961 roku C. Southam i A. Brunswick wykazali, że komórki pobrane od chorych na nowotwór złośliwy, a następnie wszczepione tym samym chorym pod skórę tylko w niewielkim stopniu formowały nowe ogniska nowotworu (Southam 1961). W 1985 roku dokonano odkrycia potwierdzającego istnienie komórek nowotworowych o cechach komórek macierzystych. A.W. Hamburger i S.E. Salmon wykazali, że nie wszystkie komórki wyizolowane z guzów litych mają tę samą zdolność do proliferacji oraz nowotworzenia. Tylko jedna na 1000 komórek guza nowotworowego jest zdolna do tworzenia guza (Hamburger i Salmon 1977). Większość badań nad obecnością CSC przeprowadzono na nowo-

tworach układu krwiotwórczego. Obecność CSC *in vivo* po raz pierwszy potwierdził w 1994 roku J.E. Dick u chorego na ostrą białaczkę szpikową (ang. *acute myeloid leukemia* – AML) (Lapidot i in. 1994). Niedługo potem wykazano, że tylko niewielka liczba komórek w masie nowotworowej jest fenotypowo podobna do komórek macierzystych, a przeszczepiona do myszy z upośledzoną odpornością immunologiczną (ang. *non-obese diabetic mice with severe combined immunodeficiency disease*, NOD/SCID – myszy z cukrzycą niepowodującą otyłości, z ostrym, złożonym upośledzeniem odporności) subpopulacja komórek o fenotypie CD34^{hi}/CD38^{low} odtwarza identyczną morfologicznie postać AML (Bonnet i Dick 1997). Od tego czasu powstały liczne publikacje, których autorzy wykazywali obecność CSC w różnych typach nowotworów. W 2003 roku Al-Hajj i współpracownicy zidentyfikowali i wyizolowali, z wykorzystaniem antygenów powierzchniowych CD44⁺/CD24⁻, nowotworowe komórki macierzyste w raku sutka, potwierdzając tym samym występowanie CSC w guzach litych. W swojej pracy udowodnili, że subpopulacja komórek raka piersi o fenotypie CD44⁺/CD24⁻ była w stanie odtwarzać heterogeny typ nowotworu. Wykazali również, że niewielka liczba (100) komórek o fenotypie CD44⁺/CD24⁻ ma właściwości odtwarzania guza w warunkach doświadczalnych *in vivo*, a nawet wielokrotnie pasażowane komórki zachowują fenotyp CD44⁺/CD24⁻ (Al-Hajj i in. 2003). W kolejnych latach występowanie CSC potwierdzono w innych guzach litych: w guzie mózgu, prostaty, jelita grubego, trzustki i raku płuca (Singh i in. 2004, Collins i in. 2005, Dalerba i in. 2007, Ho i in. 2007, Li i in. 2007,). Obecność CSC w rakach głowy i szyi po raz pierwszy opisali w 2007 roku M.E. Prince i współpracownicy którzy przy użyciu cytofluorometrii przepływową (ang. *fluorescence activated cell sorting* – FACS) wyizolowali nowotworowe komórki macierzyste, wykorzystując obecność na ich powierzchni cząsteczek CD44⁺. Wyizolowane z głównej masy guza, a następnie przeszczepione komórki o fenotypie CD44⁺ w modelu doświadczalnym wykazywały potencjał formowania guza oraz odtwarzania zróżnicowanej postaci nowotworu (Prince i in. 2007).

lub komórek nowotworowych, które w wyniku gromadzonych mutacji nabywają cech CSC (Krivtsov i in. 2006).

Jak zauważono powyżej, w modelu hierarchicznym CSC stanowią niewielką pulę komórek (< 10%) w całej masie guza nowotworowego. Ich obecność wyjaśnia wątpliwe dotychczas aspekty molekularnego podłoża nowotworzenia. Uważa się, że istnienie nowotworowych komórek macierzystych może być przyczyną nieskuteczności dotychczasowych metod leczenia nowotworów. Stosowane obecnie konwencjonalne terapie, obejmujące chirurgię, radioterapię, chemioterapię oraz immunoterapię, ukierunkowane są na niszczenie szybko dzielących się, proliferujących lub zróżnicowanych komórek guza. Działania te prowadzą do redukcji masy nowotworu, jednak z reguły są nieefektywne, ponieważ komórki CSC rzadko ulegają podziałom, w czym można upatrywać przyczyn nawrotu choroby. Poza tym udowodniono, że CSC, podobnie jak somatyczne komórki macierzyste, są bardziej odporne na działanie chemio- i radioterapii niż pozostałe komórki guza (Gunthert i in. 1991, Monroe i in. 2011), a także dzielą się asymetrycznie. Asymetryczny podział nowotworowej komórki macierzystej polega na tym, że wytwarza ona komórkę zróżnicowaną oraz jedną niezróżnicowaną komórkę macierzystą, co umożliwia utrzymanie liczby CSC na stałym poziomie. Należy zauważyć, że w prawidłowych warunkach somatyczne komórki macierzyste rzadko ulegają podziałom (Jaenisch i Young 2008) (ryc. 2).

METODY IDENTYFIKACJI NOWOTWOROWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Nowotworowe komórki macierzyste izoluje się na podstawie ekspresji określonych markerów. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu identyfikację cząsteczek białkowych występujących na powierzchni komórek należących do grupy CD (ang. *cluster of differentiation* – CD). Innymi metodami są: oznaczanie aktywności enzymów komórkowych, np. dehydrogenazy aldehydowej ALDH1A1, uzyskiwanie populacji pobocznej (ang. *side population* – SP) oraz wykorzystywanie zdolności CSC do tworzenia kolonii komórkowych w hodowlach *in vitro*. Dotychczas nie znaleziono jednego, uniwersalnego markera, którego obecność pozwalałaby zidentyfikować CSC. Dla każdego nowotworu charakterystyczne są inne markery, na podstawie których izoluje się CSC z masy guza (Alison i in. 2010). Subpopulacja komórek wyizolowana *in vitro* z wykorzystaniem wymienionych metod jest następnie przeszczepiana do my-

sich modeli z upośledzoną odpornością w celu udowodnienia *in vivo* cech nowotworowych komórek macierzystych, czyli zdolności do nowotworzenia (ang. *tumorigenicity*) oraz zdolności do samoodnowy (ang. *self-renewing*).

Markery powierzchniowe

Ponieważ do tej pory brak jednego, uniwersalnego markera identyfikującego CSC, w dostępnym piśmiennictwie przedstawiane są liczne badania, których celem była analiza jednocześnie kilku potencjalnych markerów CSC.

Glikoproteina CD44

CD44 to wielofunkcyjna glikoproteina, stanowiąca jedną z pięciu grup białek adhezyjnych, reprezentująca typ I białek błonowych. Jej występowanie stwierdzono na kilku typach komórek mezenchymalnych i zarodkowych. CD44 po raz pierwszy została opisana w 1980 r. jako antygen powierzchniowy limfocytów T oraz granulocytów. Będąc jednocześnie receptorem powierzchniowym, CD44 odgrywa kluczową rolę w interakcjach komórki ze składnikami macierzy pozakomórkowej (fibronektyną, glikanami, hialuronianami i kolagenem) (Zoller 2011).

Dzięki interakcji z kwasem hialuronowym CD44 pośredniczy w pobudzaniu procesów adhezji, agregacji, migracji i proliferacji komórkowej oraz w angiogenezie. Receptory adhezyjne (zwane także komórkowymi cząsteczkami adhezyjnymi, ang. *cell adhesion molecules* – CAM), do których należy CD44, odgrywają istotną rolę w morfogenezie, utrzymywaniu integralności oraz migracji komórek nabłonka. Każda z wymienionych właściwości biologicznych CD44 ma istotne znaczenie dla fizjologii komórki, jednak w warunkach nowotworzenia obecność CD44 na powierzchni komórek znacznie ułatwia, a wręcz umożliwia ekspansję nowotworową. Zaburzenia ekspresji oraz właściwego funkcjonowania cząsteczek adhezyjnych powodują zmianę wykształconych połączeń międzykomórkowych oraz dezorganizację cytoszkieletu. Ma to wpływ na zdolność komórek nowotworowych do odrywania się od masy guza, a tym samym zwiększa jego zdolność do inwazyjności (Ohene-Abuakwa i Pignatelli 2000).

Inne funkcje przypisywane cząsteczkom CD44 to pośredniczenie w oddziaływaniach między komórkami oraz udział w aktywacji limfocytów T, uwalnianiu cytokin i ruchu komórek (Wang i in. 2009). Przyjmuje się także, że CD44 może ułatwiać degradację macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez regulację aktywności proteaz, zwłaszcza metaloproteinaz, których działanie wykorzystywane jest w stanach zapalnych,

gojeniu się ran, a także w czasie angiogenezy i penetracji tkanek przez komórki nowotworowe (Nikiel 2006). Wykazano, że ekspresja białek CD44 zwiększa zdolność komórek guza do tworzenia przerzutów (Manten-Horst i in. 1995).

Ekspresję CD44 stwierdzono na wielu komórkach, między innymi na komórkach nabłonkowych, limfocytach, fibroblastach oraz komórkach glejowych. Brak ekspresji CD44 opisano natomiast na powierzchni hepatocytów, płytek krwi oraz komórek skóry właściwej (Manten-Horst i in. 1995). CD44 występuje w postaci wielu izoform, których obecność jest wynikiem alternatywnego składowania mRNA (ang. *alternative splicing*). Najczęściej występuje w postaci standardowej (CD44s), jednak w wyniku alternatywnego składowania mRNA mogą powstawać izoformy różniące się budową domeny zewnątrzkomórkowej. Wariant niezawierający regulowanych w tym procesie eksonów jest nazywany standardowym, natomiast poszczególne izoformy nazywa się wariantami (CD44v). U człowieka opisuje się izoformy v1–v10.

W badaniach prezentowanych w dostępnym piśmiennictwie odnotowano znaczne różnice, jeśli chodzi o korelację ekspresji CD44 z rokowaniem w zależności od lokalizacji nowotworu w obrębie głowy i szyi. Niektóre doniesienia wskazują na istotną wartość prognostyczną CD44 w rakach głowy i szyi, zwłaszcza w rakach jamy ustnej, w których niższa ekspresja CD44 koreluje z większą zdolnością do powstawania wznovy oraz tworzenia przerzutów (Wang i in. 2009).

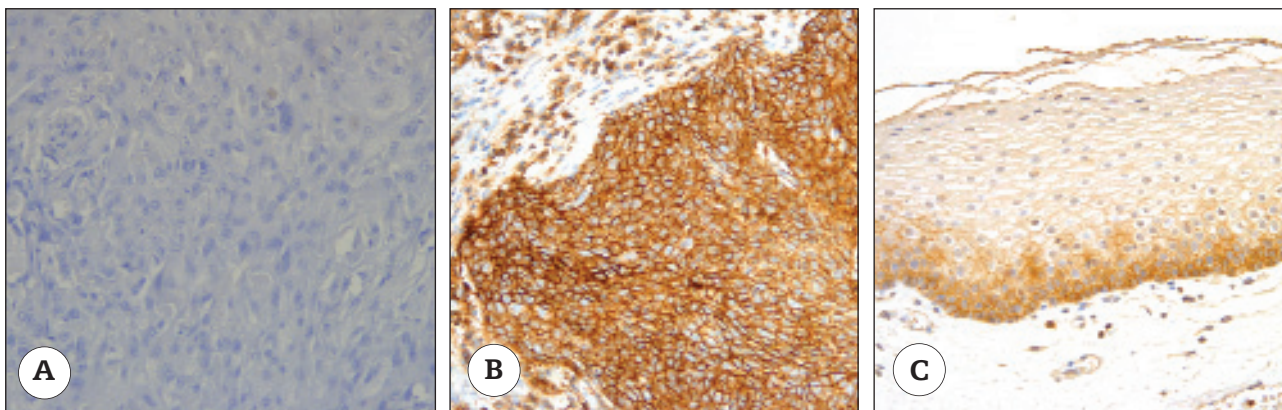
Chen i współpracownicy w swojej metaanalizie oceniającej znaczenie ekspresji CD44 w HNSCC nie wykazali istotnego związku pomiędzy czynnikami kliniczno-patologicznymi (TNM) a ekspresją CD44 w rakach jamy ustnej. Zaobserwowali natomiast, że większa ekspresja CD44 wiąże się z dłuższym okresem życia do wy-

stąpienia wznovy. W odniesieniu do raka krtani autorzy wykazali, że wyższa ekspresja CD44 koreluje z większym zaawansowaniem guza wg klasyfikacji TNM, niższym jego zróżnicowaniem oraz krótszym okresem przeżycia. Wskazali jednocześnie, że CD44 jest istotnym czynnikiem prognostycznym w grupie nowotworów o tej lokalizacji (Chen i in. 2014). Przedstawione obserwacje znajdują potwierdzenie w badaniach własnych, w których wykazaliśmy większą ekspresję CD44 w guzach o wyższym stopniu zaawansowania TNM (Szafarowski 2016).

Reasumując, można stwierdzić, że nasilenie ekspresji CD44 ma różną wartość prognostyczną w HNSCC w zależności od lokalizacji nowotworu, jednak wciąż brak wytłumaczenia, dlaczego tak się dzieje. Przedstawione fakty wskazują na CD44 jako czynnik o potencjalnej wartości diagnostycznej, ale ze względu na dość znaczne rozbieżności danych z piśmiennictwa konieczne są dalsze badania w celu ustalenia roli CD44 jako biomarkera CSC oraz w celu wyjaśnienia znaczenia tych komórek w kancerogenezie. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji CD44 przedstawiono na **rycinie 3**.

Glikoproteina CD24

CD24 jest powierzchniową glikoproteiną zakotwiczoną przez glikozylofosfatydyloinozytol na powierzchni komórek nowotworowych. Funkcjonuje w interakcjach komórka–komórka i komórka–macierz, jednak wiele funkcji tego białka pozostaje nieznane (Lee i in. 2010). CD24 po raz pierwszy wykryto u myszy jako ciepłostabilny antygen, który następnie wykorzystywano jako marker różnicowania się komórek układu krwiotwórczego i nerwowego. Sugeruje się, że obecność CD24 sprzyja powstawaniu przerzutów. CD24 jest ligandem P-selektyny – receptora adhezji występującego na aktywowanych komór-



Ryc. 3. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji CD44: (A) kontrola izotypowa w HNSCC, (B) ekspresja CD44 w HNSCC w guzie T4, (C) ekspresja CD44 w kontrolnej błonie śluzowej; (x200)

kach śródbłonna i płytkach krwi. Takie współdziałanie ułatwia przedostawanie się komórek nowotworowych do krwiobiegu podczas przerzutowania (Aigner i in. 1998). Ekspresję CD24 opisano w raku jajnika, piersi, prostaty, pęcherza moczowego, nerek, raku drobnokomórkowym płuc oraz w innych ludzkich nowotworach (Allegra i Trapasso 2012). Związek CD24 ze zdolnością do przerzutowania podkreśla rolę tego markera jako czynnika prognostycznego oraz markera CSC. W badaniach nad rakiem piersi udowodniono obecność CD24 wraz z CD44 na powierzchni macierzystych komórek nowotworowych. Jednoczesne wykorzystanie CD24 i CD44 do identyfikacji CSC w innych nowotworach wzbudziło duże zainteresowanie (Al-Hajj i in. 2003, Lee i in. 2010). W badaniach własnych potwierdziliśmy związek pomiędzy ekspresją CD24 a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych szyi (Szafarowski 2016). Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji CD24 przedstawiono na **rycinie 4**.

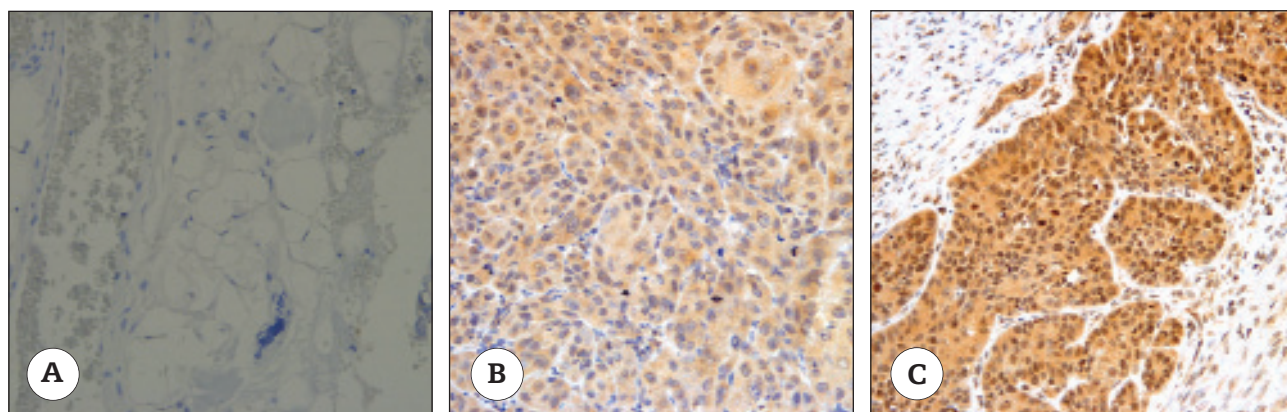
Glikoproteina CD133

CD133 (prominina-1) jest markerem powierzchniowym wykorzystywanym do identyfikacji komórek macierzystych (SC) oraz nowotworowych komórek macierzystych (CSC). Jest to glikoproteina zbudowana z pięciu domen przezłonowych, należąca do rodziny prominin. Powszechnie występuje w mikrokosmkach i rzęskach (Corbeil i in. 2001). Sugeruje się, że może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu odpowiedniego składu lipidowego błony komórkowej, jednak pełny zakres jej funkcji wciąż nie jest jednoznacznie wyjaśniony (Roper i in. 2000). Glikoproteina CD133 po raz pierwszy została opisana na powierzchni ludzkich komórek macierzystych układu hematopoetycznego w 1997 roku (Miraglia i in. 1997). Ze względu na występowanie na powierzchni komórek układu hematopoetycznego

znalazła zastosowanie jako marker somatycznych komórek macierzystych. Kolejne badania wykazały jej występowanie na powierzchni SC w różnych narządach i tkankach, między innymi w tkance nerwowej, na powierzchni śródbłonna naczyń, w komórkach nabłonka prostaty, na powierzchni komórek progenitorowych (Peichev i in. 2000, Uchida i in. 2000). Singh z zespołem jako pierwsi użyli CD133 jako markera CSC w nowotworach ośrodkowego układu nerwowego. W kolejnych badaniach zaobserwowano występowanie CD133 na powierzchni komórek mających cechy CSC w białaczce, raku wątroby i raku prostaty (Yin i in. 1997, Singh i in. 2004, Collins i in. 2005, Suetsugu i in. 2006). W przypadku HNSCC komórki o fenotypie CD133hi wykazywały większy potencjał proliferacyjny (ang. *clonogenicity*), większą zdolność do tworzenia klonów w hodowli *in vitro* oraz większy potencjał formowania guza (ang. *tumorigenicity*) w modelu doświadczalnym myszy z upośledzoną odpornością w porównaniu z populacją CD133low (Wei i in. 2009). Dostępne wyniki badań eksperymentalnych dowodzą, że CD133 jest jednym z markerów komórek macierzystych raka krtani (Zhou i in. 2007).

Udowodniono ponadto, że ekspresja CD133 jest wartościowym czynnikiem prognostycznym w raku jelita grubego oraz że większa ekspresja CD133 w raku jelita grubego i odbytnicy wiąże się z gorszym rokowaniem, większym zaawansowaniem nowotworu oraz występowaniem przerzutów (Chen i in. 2013).

Mechanizm, w jakim CD133 bierze udział w rozwoju guza oraz powstawaniu przerzutów, nie jest dostatecznie poznany (Canis i in. 2012). W badaniach własnych Canis i współpracownicy wykazali, że komórki o fenotypie CD133(+) mają 1000-krotnie większy potencjał tworzenia guza u myszy z upośledzoną odpornością (SCID) niż



Ryc.4. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji CD24: (A) kontrola izotypowa w HNSCC, (B) ekspresja CD24 w guzie (NO) w HNSCC, (C) ekspresja CD24 w guzie (N+) w HNSCC; (x200)

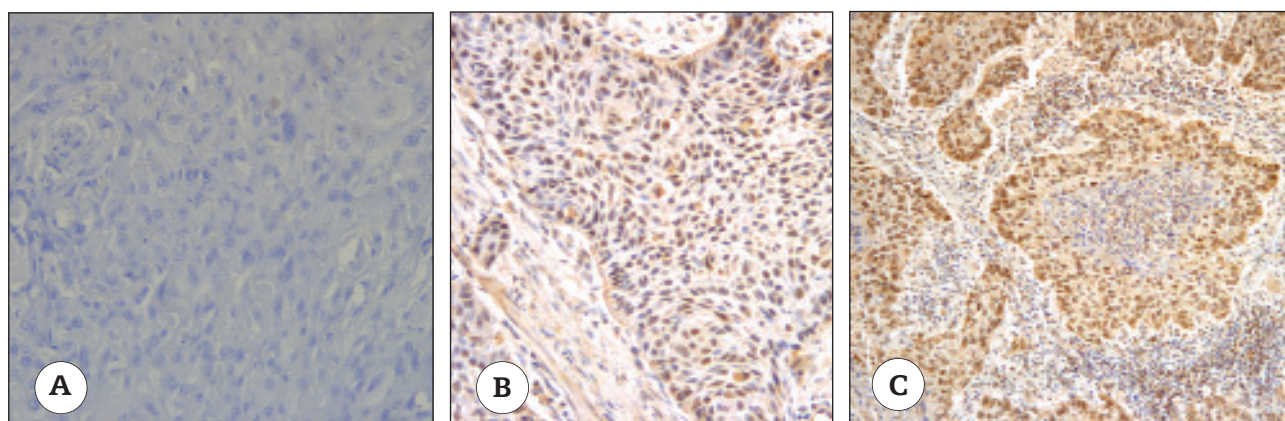
CD133(-) (Canis i in. 2013). Podobne wyniki uzyskali Wei i współpracownicy (Wei i in. 2014), jednak niewiele jest prac oceniających kliniczne znaczenie ekspresji CD133 w HNSCC. Ravindran i Devaraj wykazali istotną zależność pomiędzy nasiloną ekspresją CD133 a wyższym stopniem zaawansowania raków jamy ustnej (Ravindran i Devaraj 2012). Cytowani Canis z zespołem w przypadku raków głowy i szyi zaobserwowali gorsze rokowanie w grupie chorych z nasiloną ekspresją CD133 (Canis i in. 2012). W kilku badaniach wykazano, że ekspresja CD133 związana jest z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych szyi, co potwierdzono także w badaniach własnych (Szafarowski 2016). Yu i współpracownicy analizując 83 przypadki raka krtani, opisali korelację między ekspresją CD133 a stopniem złośliwości histologicznej, zaawansowaniem pTNM i występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych. Wykazali także, że zarówno całkowity czas przeżycia (OS), jak i czas do pierwszej wznowy w przypadku chorych z ekspresją CD133 były znacznie krótsze niż w grupie chorych CD133-ujemnych. Wyniki ich badań sugerują, że ekspresja CD133 może być ważnym czynnikiem rokowniczym w rakach krtani (Yu i in. 2014). Z kolei Lu i współpracownicy opisali korelację pomiędzy ekspresją CD133 a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych w rakach nagłośni (Lu i in. 2011).

W piśmiennictwie dostępne są także wyniki badań Chiou i współpracowników w których większa ekspresja CD133 korelowała z większym zaawansowaniem guza oraz gorszym rokowaniem u chorych na raka jamy ustnej (Chiou i in. 2008). Udział CD133 w patomechanizmie tworzenia przerzutów pozostaje nieznany. Z badań Yu i współpracowników wynika, że w guzach z ekspresją CD133 dochodzi do zmniejszenia ekspresji genu KAI1/CD82 (ang. *metastasis suppressor protein*),

który jest genem supresji przerzutów (Yu i in. 2014), a ponadto aktywacja kinazy białkowej Src umożliwia przemianę nabłonkowo-mezenchymalną (ang. *epithelial-mesenchymal transition* – EMT) a tym samym powstanie przerzutów. Na podstawie swoich badań Chen z zespołem stwierdzili, że CD133 może stanowić substrat dla kinazy Src, a poprzez domenę wewnątrzkomórkową może wpływać na polaryzację komórki oraz inicjację procesu EMT (Chen i in. 2011). Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji CD133 przedstawiono na **rycynie 5**.

Dehydrogenaza aldehydowa (ALDH)

Dehydrogenaza aldehydowa (ALDH) jest wewnątrzkomórkowym enzymem występującym w wielu komórkach organizmu ludzkiego. Największą ekspresję ALDH obserwuje się w hepatocytach. Rolą ALDH jest utrzymanie homeostazy komórkowej oraz ochrona przed szkodliwym działaniem aldehydów. Jest to główny enzym katalizujący reakcję utleniania aldehydów, związków powstających w wyniku metabolizmu alkoholi, a także amin biogennych, leków i ksenobiotyków. Do tej pory opisano fizjologiczne występowanie 19 ludzkich izoform ALDH, między innymi w wątrobie, nerkach, erytrocytach i płucach. Cechują się one znaczną swoistością wobec różnych substratów oraz różnią się lokalizacją komórkową i narządową (Pors i Moreb 2014). Jedną z izoform ALDH jest ALDH1. Jej rola biochemiczna to przede wszystkim udział w konwersji aldehydu octowego (karcynogenu) do kwasu octowego, udział w utlenianiu retinolu do kwasu retinowego – niezbędnego do prawidłowego rozwoju tkanek, szczególnie nabłonków, oraz zapewnianie homeostazy organizmu. Podkreśla się także rolę kwasu retinowego w embriogenezie (Duester 2000). Retinoidy, zarówno syntetyczne, jak i naturalne pochodne witaminy A,



Ryc. 5. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji CD133: (A) kontrola izotypowa w HNSCC (x200), (B) ekspresja CD133 w guzie (N0) w HNSCC (x200), (C) ekspresja CD133 w guzie (N+) w HNSCC (x100)

wpływają na różnicowanie oraz rozwój HNSCC. Przedmiotem badań była także ocena ich zdolności do chemoprewencji w rozwoju HNSCC (Lippman i in. 1993). Poprzez udział w procesie metabolizowania retinolu ALDH1 bierze udział w regulacji odpowiedzi metabolicznej na dietę wysokotłuszczową. Uważa się także, że poprzez regulację sygnałów kwasu retinowego odpowiada za regulowanie samoodnowy i różnicowania normalnych komórek macierzystych oraz CSC (Visus i in. 2011).

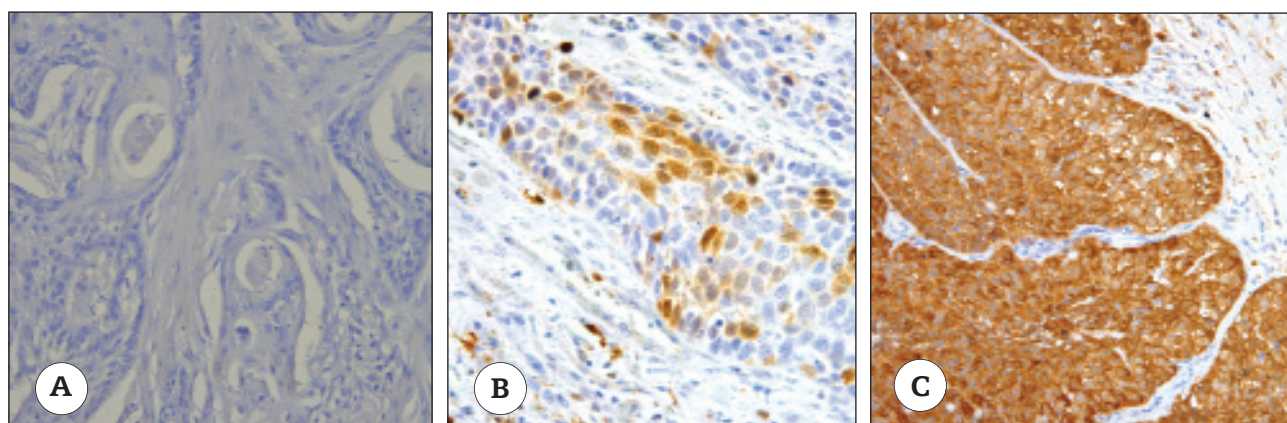
W izoformie ALDH1 wyróżnia się trzy podgrupy: izoformy ALDH1A1, ALDH1A2 oraz ALDH1A3. W większości badań z użyciem ALDH jako markera nowotworowych komórek macierzystych wykorzystywano izoenzym ALDH1A1 (Pors i Moreb 2014).

W związku z funkcją, jaką pełni ALDH1A1 w metabolizmie alkoholu, odgrywa ona istotną rolę w oporności na chemioterapeutyki generujące toksyczne aldehydy, np. cyklofosamid. Wykazano, że aktywność enzymatyczna ALDH1A1 w nowotworowych komórkach macierzystych raka jelita grubego jest większa niż w pozostałych komórkach. Wydaje się, że jest to główna przyczyna oporności na leczenie cyklofosamidem. Udowodniono, że inhibicja aktywności enzymu *in vitro* uwrażliwia komórki rakowe na cyklofosamid (Dylla i in. 2008).

Ginestier i współpracownicy jako pierwsi wykazali, że ALDH1 może być markerem zarówno somatycznych, jak i nowotworowych komórek macierzystych. W ich badaniach komórki wyzolowane z wykorzystaniem ekspresji ALDH1 tworzyły guz w modelach zwierzęcych. Autorzy ci wykazali także, że w raku sutka ekspresja ALDH1 jest istotnym czynnikiem rokowniczym wystąpienia przerzutów oraz wiąże się z gorszym rokowaniem (Ginestier i in. 2007). W wielu publikacjach potwierdzono w odniesieniu do różnych typów nowotworów, że ALDH1 jest wartościo-

wym markerem do izolacji CSC (Huang i in. 2009). Chen z zespołem jako pierwsi udowodnili, że komórki wyodrębnione z HNSCC, wykazujące ekspresję ALDH mają większy potencjał nowotworzenia oraz są bardziej odporne na radioterapię w porównaniu z komórkami niewykazujących ekspresji ALDH (Chen i in. 2009). Prince i współpracownicy przedstawili badania, w których komórki wykazujące dużą ekspresję ALDH odtwarzały strukturę guza w 24 na 25 przypadków myszy z upośledzoną odpornością po ksenoprzeszczepie, podczas gdy komórki z małą ekspresją ALDH wykazały takie działanie tylko w 3 spośród 36 przeszczepów. Podobne wyniki otrzymali Krishnamurthy i współpracownicy (Krishnamurthy i in. 2010). Clay i współpracownicy wykazali, że niewielka liczba komórek guza o dużej ekspresji ALDH może odtwarzać nowotwór po transplantacji do organizmu myszy z upośledzoną odpornością. W badaniach tych autorów komórki o fenotypie dużej ekspresji ALDH wykazywały większą swoistość w izolacji CSC niż antygen powierzchniowy CD44 (Clay i in. 2010). Visus z zespołem jako pierwsi udowodnili potencjalną możliwość immunoterapii ukierunkowanej na CSC. Autorzy ci wytworzyli w warunkach *in vitro* limfocyty T CD8+, które wykazywały zdolność do eliminowania nowotworowych komórek macierzystych z dużą ekspresją ALDH1A1 w rakach głowy i szyi, piersi, trzustki, a ponadto hamowały wzrost guza oraz wydłużały czas przeżycia w modelach doświadczalnych. Wyniki ich badań sugerują, że macierzyste komórki nowotworowe wykazujące ekspresję ALDH1A1 mogą być celem immunoterapii z wykorzystaniem limfocytów T.

Przytoczone badania potwierdzają znaczenie ALDH1A1 jako markera CSC (Visus i in. 2011), ale ocena prognostycznej przydatności ekspresji ALDH1 w nowotworach wciąż jest nie-



Ryc. 6. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji ALDH1A1: (A) kontrola izotypowa w HNSCC, (B) ekspresja ALDH1A1 w guzie T1, (C) ekspresja ALDH1A1 w guzie T4 (x200)

jednoznaczna i wymaga wyjaśnienia (Zhou i Sun 2014). W niektórych publikacjach wykazano, że nadekspresja ALDH1A1 wiąże się z gorszym rokowaniem u chorych na raka sutka, płuc, trzustki i prostaty (Tomita i in. 2016). Z metaanalizy przeprowadzonej przez Liu i współpracowników wynika, że zwiększona ekspresja ALDH1A1 koreluje z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych, niższym zróżnicowaniem guza, wielkością guza oraz ze złą prognozą u chorych na raka sutka (Liu i in. 2014). Z drugiej strony inni autorzy wykazali, że ekspresja ALDH1 wiąże się z lepszym rokowaniem w raku jajnika oraz w niedrobnokomórkowym raku płuc (Chang i in. 2009, Dimou i in. 2012).

Zależność pomiędzy ekspresją ALDH1A1 a czynnikami klinicznymi i histopatologicznymi oraz rokowaniem u chorych na HNSCC wciąż jest przedmiotem badań (Zhou i Sun 2014). Koukourakis i wsp. wykazali, że występowanie ekspresji ALDH1A1 w miejscowo zaawansowanych HNSCC wiąże się z lepszym rokowaniem (Koukourakis i in. 2012). Większość publikacji wskazuje jednak na negatywną rolę ALDH1A1 w rozwoju HNSCC (Szafarowski 2016). Analiza wyników badań własnych potwierdziła, że występowanie ekspresji ALDH1A1 w rakach głowy i szyi jest niezależnym czynnikiem rokowniczym pięciokrotnie zmniejszającym szansę przeżycia (Szafarowski 2016).

Podsumowaniu ocen wykorzystania ALDH1A1 jako markera CSC w HNSCC jest poświęcona metaanaliza dokonana przez Zhou i współpracowników. Jest to pierwsza metaanaliza dotycząca wykorzystania ALDH1A1 jako markera CSC w rakach głowy i szyi. Jej wyniki dowodzą, że ekspresja ALDH1A1 istotnie koreluje z mniejszym zróżnicowaniem guza, obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, z gorszym całkowitym pięcioletnim okresem przeżywalności (OS) oraz czasem wystąpienia pierwszej wznowy. Autorzy analizy sugerują, że badanie ekspresji ALDH1 może posłużyć do wyróżnienia chorych obarczonych ryzykiem niepowodzenia leczenia (Zhuo i in. 2015). Reprezentatywne obrazy mikroskopowe ekspresji ALDH1A1 przedstawiono na **rycinie 6**.

Metody *in vitro*

Populacja poboczna

Identyfikacja populacji pobocznej jest jedną z metod umożliwiających wyodrębnienie populacji nowotworowych komórek macierzystych w warunkach *in vitro*. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność nowotworowych komórek macierzystych do aktywnego transportu związków

poza komórkę, co jest możliwe dzięki zwiększonej ekspresji białek będących transporterami błonowymi z grupy ABC (ang. *binding cassette*, ATP – białka oporności wielolekowej). Barwniki fluorescencyjne, które są naturalnymi substratami dla tych białek, takie jak Hoechst 33342 lub DyeCycle Violet, nie gromadzą się w komórce, lecz są aktywnie transportowane na zewnątrz. W związku z tym po wzbudzeniu w świetle lasera populacja CSC wykazuje niewielką fluorescencję. W pozostałych komórkach, o małej aktywności błonowych białek ABC, barwniki DyeCycle Violet aktywnie wnikają do wnętrza, co powoduje powstanie wysokich wartości fluorescencji (Monroe i in. 2011).

Klonowanie z pojedynczej komórki – test selekcji klonów

Metoda klonowania z pojedynczej komórki (ang. *single cell cloning*) polega na uzyskiwaniu klonów z pojedynczych komórek nowotworowych, zróżnicowanych pod względem morfologicznym. Na podstawie badań wykazano, że w warunkach *in vitro* nowotworowe komórki macierzyste umieszczone w specjalnym środowisku pozbawionym surowicy po dodaniu czynników wzrostu mają zdolność do tworzenia wielokomórkowych klonów w postaci trójwymiarowych sfer (ang. *tumor sphere formation*). W takich warunkach większość komórek nowotworowych ulega apoptozie.

W HNSCC wyodrębnione w ten sposób populacje komórek cechowały się dużą ekspresją CD44 oraz CD133, czyli markerów typowych dla CSC. Uzyskane w ten sposób CSC w przypadku raków jamy ustnej cechowały się znacznym potencjałem tworzenia guza w modelach doświadczalnych (Singh i in. 2004, Okamoto i in. 2009, Zhang i in. 2010).

Metody *in vivo*

Test onkogenezy u myszy

W celu identyfikacji CSC wykorzystuje się także testy *in vivo* przeprowadzane na myszach z zespołem znacznego niedoboru odporności (ang. *severe combined immunodeficiency* – SCID). Test onkogenezy u myszy poprzedzony jest testem selekcji klonów *in vitro* (opisanym powyżej). Do uzyskanych klonów dodaje się przeciwciała, np. anty-CD44. Komórki pozytywne są wielokrotnie pasażowane, a następnie namnażane. Wyselekcjonowane w ten sposób kolonie komórkowe są poddawane ksenotransplantacji, czyli wszczepieniu do innego organizmu niż dawca, np. myszy NOD/SCID. Taki schemat postępowania diagnostycznego umożliwia dokładną ocenę klinicznej roli CSC w nowotworzeniu.

IMPLIKACJE KLINICZNE

Hipoteza zakładająca, że brak skuteczności powszechnie stosowanego leczenia przeciwnowotworowego wynika z istnienia nowotworowych komórek macierzystych wydaje się bardzo interesująca. Prowadzone badania molekularne mają na celu poznanie tych cech nowotworu, które pozwolą określić dynamikę wzrostu miejscowego oraz mechanizm tworzenia przerzutów, a tym samym umożliwią wyodrębnienie grupy chorych najbardziej zagrożonych niepowodzeniem leczenia. Badania oceniające kliniczne znaczenie teorii uwzględniającej istnienie CSC są oparte na ekspresji markerów powierzchniowych oraz ekspresji ALDH. Wytypowanie biomarkera identyfikującego CSC jest obecnie jednym z celów onkologii (Qian i in. 2014). Pomimo licznych badań, jak dotąd nie ustalono jednoznacznego stanowiska w kwestii roli CSC w HNSCC. Chociaż nie wszyscy naukowcy są przekonani o dominującej roli CSC w nowotworzeniu, w piśmiennictwie można znaleźć na ten temat liczne publikacje.

Wiele publikacji odnosi się do ekspresji CD44, CD24, ALDH1A1 oraz CD133 w komórkach nowotworowych w przypadkach nowotworów płaskonabłonkowych głowy i szyi (Stuelten i in. 2010). Z analizy dostępnego piśmiennictwa wynika, że glikoproteina CD44 jest najczęściej badanym oraz wydaje się najistotniejszym markerem nowotworowych komórek macierzystych w HNSCC (Koukourakis i in. 2012). Analiza przeprowadzonych badań pozwala na stwierdzenie, że komórki obdarzone fenotypem CD44+/CD24+ oraz CD133+ wykazują oporność na stosowaną chemioterapię, a komórki o dużej ekspresji ALDH1A1 wykazują zdolność do samoodnowy i duży potencjał nowotworzenia (Ginestier i in. 2007, Zhang i in. 2010).

W analizowanym piśmiennictwie zwraca uwagę fakt znacznie nasilonej ekspresji markerów macierzystych komórek nowotworowych. W hierarchicznej koncepcji nowotworzenia dominuje pogląd, że CSC stanowią niewielką pulę komórek w całej masie guza. Tymczasem w niektórych publikacjach podano, że nawet ponad 90% komórek raka wykazuje ekspresję np. glikoproteiny CD133, co zaobserwowano również w naszych badaniach (Oliveira i in. 2014, Szafarowski 2016). Warto się zatem zastanowić, czy stosowane markery rzeczywiście pozwalają na izolację CSC. Lu i współpracownicy uważają, że ekspresja CD133 nie jest swoista dla CSC ze względu na zbyt dużą liczbę pozytywnie wybarwionych komórek w masie guza (70–85%) (Lu i in. 2011). Xu i współpracownicy sądzą, że także ekspresja ALDH1A1 nie

może być markerem CSC, gdyż występuje w ponad 1/4 komórek (Xu i in. 2012). Tak nasilona ekspresja badanych markerów być może sugeruje ich ograniczoną czułość w identyfikacji nowotworowych komórek macierzystych. Należy pamiętać, że badane biomarkery są także, a może przede wszystkim białkami, które odgrywają istotną rolę w metabolizmie i biologii komórek nowotworowych. W środowisku guza w czasie jego szybkiego wzrostu dochodzi do hipoksji, która najprawdopodobniej nasila ekspresję badanych białek. Istnieje także hipoteza sugerująca, że oporność na leczenie wynika z nadmiernej aktywności badanych markerów, będącej efektem ich nadekspresji, a nie z obecności oraz nadmiernej aktywności samych CSC (Koukourakis i in. 2012, Xu i in. 2012).

Ekspresja markerów CSC w zmianach przednowotworowych

Obecnie nie dysponujemy markerem, który umożliwiłby ocenę ryzyka progresji zmian przednowotworowych do raka inwazyjnego w obrębie głowy i szyi. Jedynie histopatologiczna ocena stopnia dysplazji może wiarygodnie odzwierciedlać nasilenie zmian. Obiecujące wydaje się wykorzystanie glikoproteiny CD133 oraz ALDH1A1 jako markerów ryzyka progresji zmian łagodnych i dysplazji w obrębie nabłonka jamy ustnej i gardła w kierunku nowotworu złośliwego.

W dostępnym piśmiennictwie prezentowane są prace sugerujące narastanie nasilenia ekspresji CD133 oraz ALDH1A1 począwszy od prawidłowej błony śluzowej poprzez dysplazję do nowotworu złośliwego (Ravindran i Deva-raj 2012, Abdulmajeed, Dalley i Sarah 2013, Liu i in. 2013, Sun i in. 2013). Liu i współpracownicy jako pierwsi ocenili CD133 i ALDH1A1, uznając ich ekspresję za marker progresji zmian łagodnych w kierunku zmian złośliwych. Autorzy ci sugerują, że większa ekspresja ALDH1A1 i CD133 wiąże się z odpowiednio cztero- i dwukrotnie większym ryzykiem przemiany nowotworowej leukoplakii jamy ustnej (Liu i in. 2013). Podobne wyniki przedstawiali w swoich pracach Visus z zespołem co sugeruje istotną rolę ALDH1A1 w progresji zmian przednowotworowych (Visus i in. 2011, Liu i in. 2013). Oliveira i współpracownicy zaobserwowali brak ekspresji CD133 w prawidłowej błonie śluzowej, natomiast większą ekspresję (do 60%) w rakach języka (Oliveira i in. 2014), a Sun i współpracownicy wykazali wzrost nasilenia ekspresji CD133 wraz z progresją zmiany (Sun i in. 2013). Dane te sugerują niezwykle prawdopodobny udział ALDH1A1 oraz CD133 w patogenezie raka jamy ustnej. Wstępne

dane z piśmiennictwa oraz wyniki badań własnych sugerują znaczenie ALDH1A1 oraz CD133 jako potencjalnych biomarkerów do wczesnego wykrywania leukoplakii jamy ustnej o dużym potencjale zezłośliwienia. Liu i współpracownicy sugerują, że łączne zastosowanie tych dwóch markerów mogłoby być użyte w celu wyodrębnienia chorych z grupy podwyższonego ryzyka (Liu i in. 2013). Niewątpliwie konieczne są dalsze badania mające na celu ustalenie czułości oraz swoistości badanych biomarkerów.

Wydaje się, że CSC mogą mieć znaczenie w praktyce klinicznej. Być może w przyszłości rutynowe przeprowadzenie proponowanych oznaczeń pozwoli na wyłonienie chorych zagrożonych niepowodzeniem leczenia, a tym samym przesądzi o konieczności wdrożenia ich w przypadku dogłębnej diagnostyki i umożliwi włączenie zindywidualizowanej terapii. ●

PIŚMIENNICTWO

- Abdulmajeed A.A., Dalley A.J., Farah C.S. (2013) Putative cancer stem cell marker expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.*, 42, 755-760.
- Aigner S., Ramos C.L., Hafezi-Moghadam A., Lawrence M.B., Friederichs J., Altevogt P., Ley K. (1998) CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb J.*, 12, 1241-1251.
- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J. i Clarke M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983-3988.
- Aliuson M.R., Islam S. i Wright N.A. (2010) Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J. Cell Sci.* 123, 2357-2368.
- Allegra E. i Trapasso S. (2012) Cancer stem cells in head and neck cancer. *Onco. Targets Ther.* 5, 375-383.
- Blot W.J., McLaughlin J.K., Winn D.M., Austin D.F., Greenberg R.S., Preston-Martin S., Bernstein L., Schoenberg J.B., Stemhagen A. i Fraumeni J.F., JR. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 48, 3282-3287.
- Bonnet D. i Dick J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730-737.
- Canis M., Lechner A., Mack B., Zengel P., Laubender R.P., Koehler U., Heissmeyer V. i Gires O. (2012) CD133 is a predictor of poor survival in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Biomark.* 12, 97-105.
- Canis M., Lechner A., Mack B., Zengel P., Laubender R.P., Koehler U., Heissmeyer V. i Gires O. (2013) CD133 induces tumour-initiating properties in HEK293 cells. *Tumour Biol.* 34, 437-443.
- Carvalho A.L., Nishimoto I.N., Califano J.A. i Kowalski L.P. (2005) Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int. J. Cancer* 114, 806-816.
- Castellsague X., Alemany L., Quer M., Halc G., Quiros B., Tus S., Clavero O., Alos L., Biegner T., Szafarowski T., Alejo M., Holzinger D. i in. (2016) HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 108.
- Chang B., Liu G., Xue F., Rosen D.G., Xiao L., Wang X., Liu J. (2009) ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod. Pathol.* 22, 817-823.
- Chen J., Zhou J., Lu, J., Xiong H., Shi X. i Gong L. (2014) Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 14, 15.
- Chen S., Song X., Chen Z., Li X., Li M., Liu H. i Li, J. (2013) CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 8, e56380.
- Chen Y.C., Chen Y.W., Hsu H.S., Tseng L.M., Huang P.I., Lu K.H., Chen D.T., Tai L.K., Yung M.C., Chang S.C., Ku H.H., Chiou S.H. i Lo W.L. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 307-313.
- Chen Y.S., Wu M.J., Huang C.Y., Lin S. C., Chuang T.H., Yu C.C. i Lo J.F. (2011) CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One*, 6, e28053.
- Chiou S.H., Yu C.C., Huang C.Y., Lin, S.C., Liu C.J., Tsai T.H., Chou S.H., Chien C.S., Ku H.H. i Lo, J.F. (2008) Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14, 4085-4095.
- Clay M.R., Tabor M., Owen J.H., Carey T.E., Bradford C.R., Wolf G.T., Wicha M.S. i Prince M.E. (2010) Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 32, 1195-1201.
- Collins A.T., Berry P.A., Hyde C., Stower M.J. i Maitland N.J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65, 10946-10951.
- Corbeil D., Roper K., Fargeas C.A., Joester A. i Huttner W.B. (2001) Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2, 82-91.
- Dalerba P., Dylla S.J., Park I.K., Liu R., Wang X., Cho, R.W., Hoey T., Gurney A., Huang E.H., Simone D.M., Shelton A.A., Parmiani G., Castelli C. i Clarke M.F. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10158-10163.
- De Graeff A., De Leeuw J.R., Ros W.J., Hordijk G.J., Blijham G.H., Winnubst J.A. (2000) Long-term quality of life of patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 110, 98-106.
- Dick J.E. (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Dimou A., Neumeister V., Agarwal S., Anagnostou V., Syrigos K. i Rimm D.L. (2012) Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Am. J. Pathol.* 181, 1436-1442.
- Duyster G. (2000) Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315-4324.
- Dylla S.J., Bevilgia L., Park I.K., Chartier C., Raval J., Ngan L., Pickell K., Aguilar J., Lazetic S., Smith-Berdan S., Clarke M.F., Hoey T., Lewicki J. i Gurney A.L. (2008) Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One.* 3, e2428.
- Ginstier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C.G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M.S., Dontu, G. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555-567.
- Gunthert U., Hofmann M., Rudy, W., Reber S., Zoller M., Haussman I., Matzku S., Wenzel A., Ponta H., Herrlich P. (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13-24.

- Hamburger A.W., Salmon S.E. (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Ho, M.M., Ng A.V., Lam S. i Hung J.Y. (2007) Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* 67, 4827-4833.
- Howren M.B., Christensen A.J., Karnell L.H. i Funk G.F. (2013) Psychological factors associated with head and neck cancer treatment and survivorship: evidence and opportunities for behavioral medicine. *J. Consult. Clin. Psychol.* 81, 299-317.
- <http://globocan.iarc.fr>. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No.10 (Internet) 2012 (Online).
- Huang E.H., Hynes M.J., Zhang T., Ginestier C., Dontu G., Appelman H., Fields J.Z., Wicha M.S. i Boman B.M. (2009) Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 3382-3389.
- Jaenisch R. i Young R. (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- Kordek R., Jassem J., Jezierski A., Kornafel J., Krzakowski M., Pawłęga J. (2007) *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy.* Gdańsk: Via Medica.
- Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Tsakmaki V., Danielidis V., Sivridis E. (2012) Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *Br. J. Cancer* 106, 846-853.
- Krajowy Rejestr Nowotworów (2015) <http://onkologia.org.pl/>
- Krishnamurthy S., Dong Z., Vodopyanov D., Imai A., Helman J.I., Prince M.E., Wicha M.S., Nor J.E. (2010) Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 70, 9969-9978.
- Krivtsov A.V., Twomey D., Feng Z., Stubbs M.C., Wang Y., Faber J., Levine J.E., Wang J., Hahn W.C., Gilliland D.G., Golub T.R., Armstrong S.A. (2006) Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson, B., Caligiuri M.A., Dick J.E. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-8.
- Lee H.J., Choe G., Jheon S., Sung S.W., Lee C.T., Chung J.H. (2010) CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forth coming (seventh) new TNM classification. *J. Thorac. Oncol.* 5, 649-657.
- Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F. i Simeone D.M. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 67, 1030-1037.
- Lippman S.M., Batsakis J.G., Toth B.B., Weber R.S., Lee J.J., Martin J.W., Hays G.L., Goepfert H., Hong, W.K. (1993) Comparison of low-dose isotretinoin with beta carotene to prevent oral carcinogenesis. *N. Engl. J. Med.* 328, 15-20.
- Liu W., Wu L., Shen X.M., Shi L.J., Zhang C.P., Xu L.Q., Zhou Z.T. (2013) Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. *Int. J. Cancer* 132, 868-874.
- Liu Y., Lv D.L., Duan J.J., Xu S.L., Zhang J.F., Yang X.J., Zhang X., Cui Y.H., Bian X.W. i Yu S.C. (2014) ALDH1A1 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 14, 444.
- Lu S., Tian J., Lv Z., Wang H., Bai, X., Liu W., Li J. i Xu W. (2011) The probable role of tumor stem cells for lymph node metastasis in supraglottic carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 17, 33-38.
- Major A.G., Pitty L.P., Farah C.S. (2013) Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int.* 2013, 319489.
- Manten-Horst, E., Danen E.H., Smit L., Snoek M., Le Poole I C., Van Muijen G.N., Pals S.T., Ruiters D.J. (1995) Expression of CD44 splice variants in human cutaneous melanoma and melanoma cell lines is related to tumor progression and metastatic potential. *Int. J. Cancer* 64, 182-188.
- Miraglia S., Godfrey W., Yin, A.H., Atkins K., Warnke R., Holden J.T., Bray, R.A., Waller E.K., Buck D.W. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021.
- Nikiel B., Jaworska M., Jarzab M., Maksymiuk B., Lange D. (2006) Expression of the selected adhesive molecules (cadherin E, CD44, LGAL3 and CA50) in papillary thyroid carcinoma. *Polish Journal of Endocrinology* 57.
- Monroe M.M., Anderson E.C., Clayburgh D.R., Wong M.H. (2011) Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Oncol.* 2011, 762780.
- Nowell P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Ohene-Abuakwa Y., Pignatelli M. (2000) Adhesion molecules in cancer biology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 465, 115-126.
- Okamoto A., Chikamatsu K., Sakakura K., Hatsushika K., Takahashi G., Masuyama K. (2009) Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral. Oncol.* 45, 633-639.
- Oliveira L.R., Castilho-Fernandes A., Oliveira-Costa J.P., Soares F.A., Zucoloto S., Ribeiro-Silva A. (2014) CD44+/CD133+ immunophenotype and matrix metalloproteinase-9: Influence on prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 36, 1718-1726.
- Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S. (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.
- Pors K., Moreb J.S. (2014) Aldehyde dehydrogenases in cancer: an opportunity for biomarker and drug development? *Drug Discov. Today* 19, 1953-1963.
- Price M.E., Sivanandan R., Kaczorowski A., Wolf G.T., Kaplan M.J., Dalerba P., Weissman I.L., Clarke M.F., Ailles L.E. (2007) Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 973-978.
- Qian X., Wagner S., Ma C., Coordes A., Gekeler J., Klussmann J. P., Hummel M., Kkaufmann A.M., Albers A.E. (2014) Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140(7), 1151-1158.
- Ravindran G., Devaraj H. (2012) Aberrant expression of CD133 and musashi-1 in preneoplastic and neoplastic human oral squamous epithelium and their correlation with clinicopathological factors. *Head Neck* 34, 1129-1135.
- Ribatti D. (2012) Cancer stem cells and tumor angiogenesis. *Cancer Lett.* 321, 13-17.
- Ricci-Vitiani L., Fabrizi E., Palio E., De Maria R. (2009) Colon cancer stem cells. *J. Mol. Med. (Berl.)* 87, 1097-1104.
- Roper K., Corbeil D., Huttner W.B. (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* 2, 582-592.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Southam C.B.A. (1961) Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer* 14, 461-463.

- Stuelten C.H., Mertins S.D., Bush J.I., Gowens, M., Scudiero D.A., Burkett M.W., Hite K.M., Alley M., Hollingshead M., Shoemaker R.H., Niederhuber J.E. (2010) Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem. Cells* 28, 649-660.
- Suetsugu A., Nagaki M., Aoki H., Motohashi T., Kunisada T. i Moriwiaki H. (2006) Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 820-824.
- Sun L., Feng J., Ma L., Liu W. i Zhou Z. (2013) CD133 expression in oral lichen planus correlated with the risk for progression to oral squamous cell carcinoma. *Ann. Diagn. Pathol.* 17, 486-489.
- Szafarowski T.M. (2016) Ocena występowania nowotworowych komórek macierzystych oraz procesów angiogenezy w nowotworach płaskonabłonkowych głowy i szyi. Praca doktorska. Warszawski Uniwersytet Medyczny.
- Tomita H., Tanaka K., Tanaka T., Hara A. (2016) Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 7(10), 11018-11038.
- Uchida N., Buck D.W., He D., Reitsma M.J., Masek M., Phan T. V., Tsukamoto A.S., Gage F.H., Weissman I.L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14720-14725.
- Visus C., Wang Y., Lozano-Leon A., Ferris R.L., Silver S., Szczepanski M.J., Brand R.E., Ferrone C.R., Whiteside T.L., Ferrone S., Deleo A.B., Wang X. (2011) Targeting ALDH (bright) human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8(+) T cells. *Clin. Cancer Res.* 17, 6174-6184.
- Wang S.J., Wong G., De Heer A.M., Xia W., Bourguignon L.Y. (2009) CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope* 119, 1518-1530.
- Wei X., Wang J., He J., Ma B. i Chen J. (2014) Biological characteristics of CD133(+) cancer stem cells derived from human laryngeal carcinoma cell line. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 2453-2462.
- Wei X.D., Zhou L., Cheng L., Tian J., Jiang J.J., Maccallum J. (2009) In vivo investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Head Neck* 31, 94-101.
- Wicha M.S., Liu S. i Dontu G. (2006) Cancer stem cells: an old idea a paradigm shift. *Cancer Res.* 66, 1883-1890; discussion 1895-1896.
- Xu J., Muller S., Nannapaneni S., Pan L., Wang Y., Peng X., Wang D., Tighiouart M., Chen Z., Saba N.F., Beitler J.J., Shin D.M., Chen Z.G. (2012) Comparison of quantum dot technology with conventional immunohistochemistry in examining aldehyde dehydrogenase 1A1 as a potential biomarker for lymph node metastasis of head and neck cancer. *Eur. J. Cancer* 48, 1682-1691.
- Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearney J., Buck D.W. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Yu L., Zhou L., Wu S., Gong X., Feng Z., Ma L., Zhu B., Yao N., Wang D., Dong H. (2014) Clinicopathological significance of cancer stem cells marked by CD133 and KAI1/CD82 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 12, 118.
- Zhang Q., Shi S., Yen Y., Brown J., Ta J.Q., Le A.D. (2010) A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.* 289, 151-160.
- Zhou C., Sun B. (2014) The prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in head and neck squamous cell carcinomas: a meta-analysis. *Oral Oncol.* 50, 1144-1148.
- Zhou L., Wei X., Cheng L., Tian, J., Jiang J.J. (2007) CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope* 117, 455-460.
- Zhou X., Chang A., Huang C., Yang L., Xiang Z., Zhou Y. (2015) Expression and clinical significance of microvessel density and its association with TWIST in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 1265-1270.
- Zoller M. (2011) CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254-267.