

Komórki macierzyste raka nerki

Anna M. Czarnecka, Cezary Szczylik

8.1. Występowanie i charakterystyka komórek macierzystych raka nerki

Coraz częściej wskazuje się, że nowotwór rozwija się z małej subpopulacji komórek nowotworowych znanych jako komórki macierzyste nowotworu (KMN, ang. *cancer stem cells* – CSC). Są one odpowiedzialne nie tylko za rozwój guza pierwotnego, lecz także za wznowę i progresję choroby, rozwój przerzutów, oporność na radioterapię i chemioterapię lub terapie celowane oraz kolejne nawroty choroby po leczeniu [1, 2]. Istnienie KMN dotychczas udowodniono w różnych typach nowotworów, w tym w raku nerki (ang. *renal cell carcinoma* – RCC) i jego podtypie – raku jasnokomórkowym nerki (ang. *clear cell renal – cell carcinoma* – ccRCC), gdzie liczbę tych komórek oszacowano na 0,5 do ponad 5,0% całkowitej liczby komórek nowotworowych w guzie [3–5].

Zdolność do samoodnowy – w wyniku symetrycznych bądź niesymetrycznych podziałów, oporność na leki, zdolność do wielokierunkowego różnicowania, zdolność do aktywacji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego to główne cechy populacji macierzystych komórek nowotworowych. Komórki macierzyste nowotworu podobnie jak normalne komórki macierzyste charakteryzuje aktywacja takich szlaków przekazywania sygnału, jak Wnt [6], SHH, Notch czy Polycomb group (PcG) [7, 8]. Analiza cyklu komórkowego wykazała, że KMN w znacznym odsetku znajdują się w fazie G (0) w stosunku do całkowitej populacji komórek guza ccRCC [4].

Komórki macierzyste nowotworu są identyfikowane w laboratoriach biologii komórki poprzez izolację metodą cytometrii przepływowej (ang. *fluorescence-activated cell sorting* – FACS) i izolacji komórek w sorterach kroplowych lub poprzez sortowanie komórek z wykorzystaniem kolumny magnetycznej [9]. Cytometria przepływowa pozwala na szybką ocenę charakterystyki komórek – na podstawie markerów powierzchniowych – w stosunkowo krótkim czasie, uwzględniając także relatywną ocenę wielkości i ziarnistości komórek. Pozostaje ona główną metodą badawczą pozwalającą fenotypować różne populacje komórek guza, w tym komórki macierzyste. Potencjalne KMN uzyskane po sortowaniu na podstawie panelu markerów powierzchniowych celem weryfikacji ich potencjału tworzenia guzów wszczepiane są myszom bezgrasiczym (ang. *severe combined immunodeficiency* – SCID) [3, 10]. W RCC wskazywano dotychczas liczne markery powierzchniowe jako specyficzne dla komórek macierzystych tego nowotworu, w tym: CD105 [3, 11],

CD133 [5, 12], dehydrogenazę aldehydową 1 (ang. *aldehyde dehydrogenase 1* – ALDH1) [13, 14], CD44 [13], CXCR4 [15] (tabela 8.1) [14–29]. W guzach Wilmsa (WT) biomarkerem komórek KMN ma być białko NCAM [10, 30].

Komórki ccRCC-KMNs zostały wyizolowane na podstawie wcześniej wybranych markerów powierzchniowych (m.in. CD105), a równocześnie inne grupy badawcze izolowały komórki z uwzględnieniem właściwości fizjologicznych komórek. Pierwsza cecha odróżnia tzw. populację boczną (ang. *side population* – SP) i jest to oporność na barwienie przy wykorzystaniu barwników fluorescencyjnych wiążących DNA, takich jak np. Hoechst 33342, lub mitochondria, jak rodamina 123. Cecha ta pozwala na identyfikację tych komórek metodą FACS na podstawie ich niskiej fluorescencji, gdyż barwniki te są wypompowywane z komórek o typie macierzystych [31]. W badaniach nad rakiem nerki wykorzystano barwniki Hoechst 33342 [4, 32, 33] oraz rodaminę 123 [20]. Dodatkowo w ostatnim czasie indukowana promieniowaniem synchrotronowym spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (SR-FTIR) oraz chemometria z analizą głównych składowych (PCA) i liniową analizą dyskryminacyjną (LDA) zostały wykorzystane do opisu biochemicznych różnic między RCC-KMN a pozostałymi komórkami guza. Miara drgań torsyjnych łańcuchów lipidów błonowych wokół wiązań fosfodiesterowych stanowi wyróżnik KMN w RCC [34].

Coraz więcej danych wskazuje, że populacje KMN są bardziej odporne na konwencjonalne terapie onkologiczne niż pozostałe komórki guza, a w związku z tym to one mają odpowiadać za nawroty i progresję choroby. Komórki te są odporne na chemioterapię i radioterapię [35, 36]. Wydaje się, że ukierunkowanie leczenia na tę małą populację komórek może być uzasadnione nowym podejściem do leczenia choroby przerzutowej, w tym ccRCC. Eliminacja KMN znosi zdolność guza do propagacji i przerzutowania, co powoduje degradację guza z minimalnym uszkodzeniem otaczającej tkanki prawidłowej [37]. Zaproponowano, aby specyficzne markery powierzchniowe i szlaki sygnałowe zostały celami terapeutycznymi. Dotychczas w projektach przedklinicznych nadrodziny białek ABC, hedgehog, białek antyapoptotycznych, naprawy DNA, ścieżki Wnt, β -kateniny, EGFR i Notch są wybierane na nowe cele lekowe terapii przeciwko KMN [38]. Białka docelowe, których hamowanie przyniosło obiecujące wyniki, to AKT, NF κ B, Oct4, mTOR, Sox2 i c-myc. Dodatkowo wykazano, że niektóre komórki efektorowe układu odpornościowego, w tym naturalni zabójcy (NK) i limfocyty T $\gamma\delta$ i CD8+, są w stanie skutecznie rozpoznać populacje KMN i niszczyć je w mechanizmie cytotoksyczności. Inne podejścia w ramach immunoterapii to zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko specyficznym markerom powierzchniowym KMN, kanałom błonowym z grupy transporterów ABC i cząsteczkom adhezyjnym jak, L1CAM. Doświadczenia wykazały, iż zastosowanie szczepionki DNA nakierowane na antygeny KMN (np. Dnajb8) jest również skutecznym podejściem w leczeniu [32]. Zaproponowano także, że identyfikacja induktorów różnicowania KMN może prowadzić do rozwoju skutecznych strategii eliminacji KMN i kontroli choroby przerzutowej [25]. Żróźnicowanie KMN uzyskiwano *in vitro* przez inkubację komórek z białkiem morfogenetycznym kości, interleukinami lub mikroRNA. Innym potencjalnym celem terapeutycznym, choć jeszcze niescharakteryzowanym, jest nisza KMN. Przerwanie interakcji

Tabela 8.1. Komórki dotychczas scharakteryzowane jako macierzyste RCC, ze szczególnym uwzględnieniem komórek ekspresujących CD105 lub CD133

Marker powierzchniowy	Ekspresja genów macierzystości Sox, Oct, Nanog, Bmi-1	Ekspresja markerów przejścia epitelialno (E)-mezenchymalnego (M)	Tworzenie sfer lub kolonii	Tworzenie guzów u myszy	Badana linia komórkowa lub tkanka	Podtyp RCC	Piśmiennictwo
-	+	E↓ M↑	+ TNF-α	-	ACHN, 786-0	pRCC ccRCC	[16]
ALDH1	+	-	-	+	Caki-2, ACHN	pRCC pRCC	[17]
ALDH1	-	NS	+	+	ACHN	pRCC	[14]
ALDH1	+	NB	+	+	ACHN, Caki-2	pRCC	[17]
CD24, CD44	+	M↑	+	-	ACHN, Caki-1	pRCC ccRCC	[18]
CD24, CD133, CTCR2	+	+	+	NB	guzy pierwotne	ccRCC	[19]
CD24, CD44	populacja boczna	-	+	+	786-0	ccRCC	[20]
CD24, CD44, CD133(-), CD105(-)	+	B-c↑	+	+	SK-RC-42	RCC	[21]
CD44, CD133, CXCR4	NS β-keratyna	M↑	+	-	786-0, A-704	ccRCC RCC	[22]
CD44, CD49f, ALDH1, CD24↓	+	E↓ M↑+/-	- ROS	+	Caki-1	ccRCC	[23]

Tabela 8.1. Cd.

Marker powierzchniowy	Ekspresja genów macierzystości Sox, Oct, Nanog, Bmi-1	Ekspresja markerów przejścia epitelialno (E)-mezenchymalnego (M)	Tworzenie sfer lub kolonii	Tworzenie guzów u myszy	Badana linia komórkowa lub tkanka	Podtyp RCC	Piśmiennictwo
CD44, CD105, CD133, CD90	+	NB	NB	NB	guz pierwotny (nerfektomia)	ccRCC, pRCC, chRCC	[24]
CD105	+	E↑	+	+	guz pierwotny, RCC6, RCC7, ACHN	pRCC, ccRCC	[25, 26]
CXCR4, CD105↓, CD133(-)S	+	-	+	+	RCC-26, RCC-53	RCC	[14]
CD133, CD105(-)	+	E↓	+	+	guzy z ksenograftów	RCC	[27]
CD133, CXCR4	NB	NB	+	+	guzy pierwotne i przerzutowe	RCC	[28]
DCLK1↑, ALDH1	+	M↑	-	-	Caki-2	pRCC	[29]

NB – nie badano, ↓ – spadek, niska ekspresja, ↑ – wzrost, wysoka ekspresja. Markery mezenchymalne (M) – wimentyna, N-kadheryna, fibronektyna, Snail, Fox-2, Slug, ZEB1

Markery epitelialne (E) – E-kadheryna, cytokeratyna, β-katenina. ALDH1 – dehydrogenaza aldehydowa

KMN z ich niszą – otoczeniem – może prowadzić do deregulacji funkcji i zmniejszenia tempa podziałów KMN. Nisza guza zbudowana jest z komórek położonych w bezpośrednim sąsiedztwie KMN, które regulują ich stan funkcjonalny przez przekazywanie i indukowanie sygnałów, współdziałając z autonomicznymi mechanizmami regulacyjnymi KMN dzięki cytokinom, hormonom i czynnikom wzrostu. Najważniejszą rolą niszy guza jest utrzymanie równowagi między stanem spoczynku a proliferacją KMN oraz między procesem samoodnowy KMN a ich różnicowaniem [38].

8.2. Komórki macierzyste mogą być celem terapii

Pierwsze leki przeciwnowotworowe skierowane przeciwko KMN były badane w ostrej białaczce limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukemia* – ALL) [39] i kolejno w glejakach [40]. Nowsze prace badały zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) przeciwko komórkom macierzystym raka jelita grubego. Wykazano, że podanie NLPZ efektywnie eliminuje KMN z krypt jelitowych i hamuje przekazywanie sygnału w ścieżce Wnt [41]. W modelu raka piersi tranilast (INN, Rizaben – Kissei Pharmaceuticals, Japan) był badany jako lek w nowym wskazaniu. Udowodniono, że zmniejsza on liczbę mammosfer – struktur tworzonych przez KMN raka piersi, zmniejsza ilość tworzonych kolonii (test formowania kolonii), zmniejsza ekspresję wybranych markerów powierzchniowych i proliferację KMN [42]. Tylko kilka badań klinicznych testuje leki nakierowane na komórki macierzyste (ClinicalTrials.gov). W badaniu II fazy testowany jest resveratrol (3,5,4'-trihydroksy-trans-stilben) – inhibitor ścieżki Wnt – w raku jelita grubego. Inne leki to vismodegib (Erivedge, GDC-0449) oraz BMS-833923 (XL139), inhibitory Hedgehog testowane w wielu wskazaniach [43]. Obecnie toczy się tylko dziesięć badań klinicznych nakierowanych przede wszystkim na KMN, a tylko jedno w ccRCC. Badaniu poddawany był inhibitor ścieżki sygnałowej Notch RO4929097 (NCT01141569) [44]. Obecnie prowadzone badania II/III fazy prowadzone w RCC, obejmujące inhibitory kinazy tyrozynowych i inhibitory PD-1, nie analizują KMN [45–49].

Nowym rodzajem terapii celowanej przeciwko ccRCC-KMN może być hamowanie receptorów CXCL12/CXCR4. Kilku antagonistów CXCL12/CXCR4 jest obecnie testowanych w badaniach I fazy w guzach litych, w tym ccRCC. Ekspresja CXCR4 i aktywacja zależnej ścieżki sygnałowej może być obniżona poprzez hamowanie białek PI3K/mTOR, EGF i bezpośrednio antagonistą CXCR4 [50]. Cykliczne peptydy będące antagonistami CXCR4 testowano w modelu mysim ccRCC. Trzy spośród testowanych peptydów były efektywnymi inhibitorami migracji, aktywacji białek ERK1/2, napływu jonów wapnia do komórki i wzrostu guza z linii ccRCC SN12C u myszy C57/BL [51]. Obniżenie ekspresji CXCR4 przez małe interferujące RNA (siRNA) lub związek drobnocząsteczkowy AMD3100 (Plerixafor, Mozobil) zmniejsza zdolność tworzenia sfer, przeżywalność komórek CXCR4(+), a zwiększa podatność na leczenie TKI (sunitynib, sorafenib, pazopanib). Na podstawie tych wstępnych badań zasugerowano, że nowe badania kliniczne powinny obejmować blokery CXCR4 w połączeniu ze standardowym leczeniem RCC [15]. Badanie fazy II w RCC (NCT01391130) oceniło efektywność peptydowego inhibitora CXCR4 LY2410924 (Eli Lilly & Co) w połączeniu sunitynibem [51].

Nowe terapie skierowane przeciwko ccRCC-KMN zyskują w ostatnich latach na znaczeniu, gdyż badania przedkliniczne wskazują na wysoką potencjalną efektywność terapii wielolekowych. Zastosowanie leków celowanych skierowanych na ścieżki sygnałowe związane z chemioopornością, adhezją i migracją komórek czy ucieczką nowotworu spod nadzoru immunologicznego może w przyszłości prowadzić do wydłużenia czasu przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival* – PFS) i przeżycia całkowitego (ang. *overall survival* – OS) chorych z ccRCC. Nowe opracowywane związki – potencjalne leki – wymagają jednak przeprowadzenia badań klinicznych, oceny przez FDA/EMEA/AOTM i ich zastosowanie w praktyce klinicznej jest wciąż odległe [36, 52].

8.3. Inne kliniczne zastosowania badań nad komórkami macierzystymi raka nerki

Po pierwszych odkryciach komórek macierzystych raka nerki przeprowadzono badania nad znaczeniem predykcyjnym i prognostycznym obecności tych komórek u chorych z ccRCC. Oceniano wykrywalność markerów ccRCC-KMN w preparatach histologicznych uzyskiwanych podczas diagnostyki choroby. Jako pierwsza badana była glikoproteina towarzysząca receptorowi TGF- β – CD105 (in. endoglina) – pierwszy opisany marker KMN RCC [3]. Endoglina i aktywowana przez nią ścieżka sygnałowa odgrywają ważną rolę w progresji nowotworu, wpływając na angiogenezę, migrację i zdolność do przerzutowania komórek nowotworowych. Co istotne, CD105 występuje na powierzchni KMN, ale także na błonie komórek śródbłonkowych nowotworowych naczyń krwionośnych [53]. Obecność i poziom ekspresji CD105 został oceniony w preparatach ccRCC i opisano statystycznie silniejszą ekspresję u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby ($p = 0,025$). Opisano korelację wysokiej ekspresji CD105 z krótkim przeżyciem wolnym od progresji ($p = 0,010$) i przeżyciem swoistym dla raka (HR 1,74, $p < 0,001$) [54]. W analizie 168 przypadków ccRCC ekspresja CD105 była odwrotnie skorelowana ze stopniem zaawansowania z TNM ($p = 0,008$) i atypią jądrową ($p = 0,01$). Odnotowano brak związku ekspresji CD105 z płcią, wiekiem pacjentów i wielkością guza [55].

Najpowszechniej badanym w klinikach markerem komórek macierzystych – lub też progenitorowych – ccRCC jest transbłonowa glikoproteina wiążąca cholesterol CD133 (in. prominina 1, PROM1) [3, 12]. U 140 przebadanych pacjentów z ccRCC wysoki poziom ekspresji CD133 był w guzach obserwowany w wypadkach ccRCC o zróżnicowanych komórkach i bez choroby przerzutowej. Wysoki poziom ekspresji CD133 był opisywany u pacjentów bez choroby przerzutowej w momencie rozpoznania lub badania i w guzach, które nie zawierały elementów tkanki mięsakowatego. Taka obserwacja doprowadziła badaczy do wniosku, iż ekspresja CD133 może być korzystnym czynnikiem prognostycznym [56]. W kolejnym badaniu wykazano, że nadekspresja CD133 koreluje z dłuższym przeżyciem całkowitym pacjentów z ccRCC, co z kolei pozwoliło na postawienie hipotezy, iż poziom ekspresji CD133 może być wykorzystywany jako marker do oceny ryzyka zgonu z powodu ccRCC. Niska ekspresja CD133 została wskazana jako niezależny czynnik predykcyjny – krótkiego przeżycia specyficznego dla choroby – ccRCC (ang. *disease specific survival* – DSS) o PFS [57]. Analiza prze-

życia szacowana metodą Kaplana-Meiera u 240 pacjentów z ccRCC wykazała, iż pacjenci o niekorzystnym rokowaniu to osoby, których guzy nerki wykazywały wysoką ekspresję CXCR4 ($p = 0,0199$) i niską CD133 ($p = 0,151$). Poziom ekspresji markerów oceniano zarówno na poziomie białka (metodą immunoblotingu) oraz mRNA (metodą qPCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA) [58]. W kolejnym badaniu analizowano 61 przypadków RCC. Metodą immunohistochemii (IHC) oceniono poziom białka CD133 w błonie komórek i HIF-1 α w jądrze. Poziom ekspresji CD133 korelował z stopniem zaawansowania choroby nowotworowej i rozwojem choroby przerzutowej oraz ilością HIF-1 α w jądrze komórek [59]. W kolejnym badaniu oceniano przydatność oznaczania poziomu mRNA genu dla CD133 w surowicy pacjentów z ccRCC. Na podstawie obecności CD133 mRNA ryzyko wznowy ccRCC można szacować z czułością 75,0% i specyficznością 61,8%. Pacjenci o wysokim poziomie CD133 mRNA mają istotnie wyższe ryzyko wznowy ($p = 0,019$) [60]. Ocena immunohistochemiczna CD133 i CD44 u 110 pacjentów z ccRCC udowodniła iż wysoka ekspresja CD44 jest predyktorem dużej liczby przerzutów synchronicznych, a ekspresja CD133 koreluje ze stopniem zaawansowania nowotworu. Przeżycie całkowite pacjentów, których guzy były CD133/CD44-dodatnie CD44, jest krótsze od OS pacjentów z guzami bez oznaczalnego lub niskim poziomem CD133 i CD44 [61].

Standardowym badaniem markerem KMN jest ALDH1 [13, 14]. Przeprowadzono badanie na 95 pacjentach, porównując tkanki guza ccRCC i kontrolnych tkanek zdrowych. Dehydrogenaza aldehydowa 1 i drugi marker – nestyna – były nadekspresjonowane w guzach ($p < 0,05$). Ekspresja nestyny była ujemnie skorelowana ze stopniem klinicznego zaawansowania ($p < 0,05$), ale nie ze złośliwością w skali Fuhrman. Ekspresja ALDH korelowała ze złośliwością histologiczną ($p < 0,05$), ale nie ze stopniem klinicznego zaawansowania ($p > 0,05$) [62]. W badaniu kolejnych 95 przypadków ccRCC nadekspresja ALDH1A1 była istotnie skorelowana z wysokim stopniem zaawansowania klinicznego ($p = 0,001$), szybkim nawrotem choroby ($p = 0,001$), wielkością guza ($p = 0,001$) i naciekiem naczyń krwionośnych ($p = 0,023$). Analiza Kaplana-Meiera wykazała, że nadekspresja ALDH1A1 jest związana z krótszym PFS i OS ($p = 0,003$ i $p = 0,008$) [63].

Nowo wskazanym markerem KMN RCC jest białko CXCR4 (ang. *chemokine C-X-C motif receptor 4*) – receptor chemokinowy o motywie CXC, należący do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Za pośrednictwem receptora CXCR4 do komórki nowotworowej przekazywany jest sygnał, który powoduje migrację komórek nowotworowych (przyspiesza powstawanie przerzutów) oraz ich oporność na apoptozę (oporność na chemioterapię) [64]. Polimorfizmy genu CXCR4 oceniono u 322 pacjentów RCC i wykazano, że pacjenci obciążeni polimorfizmami CXCR4 rs2228014CT i TT mają statystycznie krótszy czas przeżycia ($p = 0,002$) [65]. W kolejnym badaniu analiza metodą Kaplana-Meiera wykazała, iż gorsze rokowanie mają pacjenci z wysokim poziomem CXCR4 w guzie nerki ($p = 0,0199$) [58]. Wysoka ekspresja CXCR4 koreluje także z szybkim rozwojem choroby przerzutowej u pacjentów z miejscowo zaawansowanym ccRCC [66], a także występowaniem objawów ogólnych choroby i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych [67]. Podobnie wykazano, że nadekspresja CXCR4 w guzie koreluje z wielkością guza (pT) ($p = 0,039$), odróżnicowaniem komórek ($p = 0,0005$) i ni-

skim poziomem hemoglobiny ($p = 0,039$) [68] oraz krótszym OS ($p = 0,017$) i DSS ($p = 0,022$) [69]. Wykazano także, że ekspresja CXCR4 jest czynnikiem predykcyjnym dla leczenia interferonem α (IFN- α) ($p = 0,003$) [66]. Brak ekspresji lub niska ekspresja CXCR4 jest markerem predykcyjnym dobrej odpowiedzi na leczenie sunitynibem [70].

Dodatkowe markery KMN – c-MYC, LIN28, SOX2, KLF4, OCT4 i NANOG, były oceniane w grupie 30 pacjentów z RCC, jednak nie zaobserwowano żadnych korelacji z charakterystyką patologiczną guza lub przebiegiem klinicznym choroby [72]. Prognostyczne i predykcyjne znaczenie biomarkerów w diagnostyce i terapii RCC staje się coraz bardziej istotne, szczególnie ze względu na dostępność wielu opcji terapeutycznych (znaczenie dla wyboru leku), ale również z powodu niezadowolających wyników leczenia w PFS i OS (nowe cele terapeutyczne). Wszystkie badania komórek macierzystych RCC wskazują, że pojedynczy marker nie jest wystarczający do identyfikacji KMN w RCC i w związku z tym powinno się poszukiwać nowych i bardziej specyficznych markerów KMN. Wydaje się prawdopodobne, że nowe biomarkery molekularne komórek macierzystych będą stopniowo wprowadzane do praktyki klinicznej [54, 72–74].

8.4. Wnioski

Nowotworowe komórki macierzyste są specyficzną populacją komórek nowotworowych wykazujących właściwości komórek macierzystych somatycznych (dorosłych) obejmujących zdolność do: samoodnowy, wielokierunkowego różnicowania, odnowy i oporności wielolekowej. Nowotworowe i normalne (embryonalne i somatyczne) komórki macierzyste mają wiele cech wspólnych. Na poziomie molekularnym jest to związane z ekspresją genów charakterystycznych dla komórek macierzystych. Szlaki sygnałowe aktywne w komórkach macierzystych to: szlak Wnt/ β -katenina, szlak Notch i szlak Hedgehog. W komórkach macierzystych nadekspresjonowane są także czynniki transkrypcyjne Sox-2, Oct-4, Musashi, nestyna i Nanog. Szlaki te mają wpływ na przerzutowanie i samoodnowę komórek nowotworowych. Mają one znaczenie w proliferacji komórek nowotworowych, waskularyzacji guza i promowaniu rozwoju przerzutów. Aktywacja tych szlaków przyczynia się również do oporności nowotworów na leczenie cytostatykami [75]. Nowotworowe komórki macierzyste mogą być identyfikowane przez: populację boczną, ekspresję specyficznych markerów powierzchniowych oraz aktywację szlaków przekazywania sygnału lub czynników transkrypcyjnych [76, 77]. Obecnie istnieje coraz więcej dowodów, że komórki macierzyste raka odgrywają kluczową rolę w leczeniu raka, jego lekooporności, nawrotach i progresji. Leczenie raka nie jest obecnie nakierowane na usuwanie komórek nowotworowych macierzystych, które – choć stanowią jedynie małą część masy nowotworu – odpowiadają za nawroty lub progresję choroby [78].

Obecnie komórki macierzyste raka zostały wyizolowane z różnych rodzajów nowotworów, w tym jelita grubego [79] i nowotworów piersi [81]. W przypadku raka nerki populację komórek macierzystych opisano w guzach Wilmsa (WT) [30] i raka jasnokomórkowego [3, 81]. Analiza panelu NCI-60 zbioru linii komórkowych nowotworów (National Cancer Institute, USA), który obejmuje również RCC, wykazała, że nadmierna ekspresja białek CD15, CD24, CD44, CD133,

CD166, CD326 i PgP, a także duża aktywność dehydrogenazy aldehydowej (EC 1.2.1.3) mogą być traktowane jako sygnatura KMN [82]. Dotychczas CD105 [3, 11], CD133 [5, 12], ALDH1 [13, 14], CD44 [13] i CXCR4 [15] zostały opisane jako markery ccRCC-KMN [5, 11, 81]. Komórki CD105+ pierwotnie opisane jako populacja komórek wzbogacona w komórki inicjujące rozwój guza wykazują cechy komórek macierzystych, w tym zdolność do wielokierunkowego różnicowania, potencjał onkogenny, wzrost w hodowlach 3D oraz ekspresję nestyny, Nanog, Musashi, i OCT4 oraz zdolność tworzenia guzów u myszy bezgranicznych [3, 81]. Komórki CD105+ ekspresyjnie także CD44, CD90, CD146, CD73 oraz CD29, wimentynę i Pax2, ale nie CD24, CD133 czy CK [3]. Komórki CD133+ wyizolowane z guzów RCC opisano jako komórki progenitorowe, które mogą różnicować się w komórki endotelialne naczyń krwionośnych [12]. Komórki CD133+ wykazują także ekspresję białek CD73, CD44, CD29 i HLA-1, ale nie CD14, CD34, CD45, CD90, CD117 czy KDR [12, 83].

Dotychczas opublikowane prace stanowią dopiero pierwszy etap badania nad rozwojem raka nerki i różnicami pomiędzy komórkami macierzystymi uważanymi za prawidłowe i nowotworowymi komórkami macierzystymi raka nerki. Badacze analizowali przede wszystkim profile ekspresji markerów powierzchniowych. Prowadząc takie badanie, można stawiać za cel identyfikację cząsteczek docelowych dla nowych leków. Stosowanie sygnatur komórek macierzystych jako celów w leczeniu może zaowocować nowymi interwencjami terapeutycznymi. Koncepcja nowotworu jako choroby komórek macierzystych niesie potencjał dramatycznej zmiany punktu widzenia choroby nowotworowej i możliwości terapeutycznych [78].

Obecnie prowadzone badania nad proliferacją nowotworowych komórek macierzystych oraz zidentyfikowanie nowych specyficznych markerów komórek macierzystych RCC może doprowadzić do opracowania nowych leków [76, 77]. Dalsze poznanie mechanizmów decydujących o wzroście komórek macierzystych nowotworu oraz szlaków sygnałowych ich samoodnowy może się przyczynić do rozwoju nowych metod terapeutycznych [76, 77]. Interwencje terapeutyczne skierowane przeciwko endoglinie (CD105) lub promininie (CD133) wydają się omijać niektóre mechanizmy oporności, jakie mogą powstać podczas zastosowania leków antyangiogennych, takich jak sunitynib, sorafenib, czy aksytynib. Ważne funkcje, jakie wydają się pełnić szlaki przekazywania sygnału od CD105, CD133 czy CXCR4 w procesie rozwoju i progresji nowotworów, w tym RCC, skłaniają naukowców do poszukiwania nowych związków hamujących przekazywanie sygnału za pośrednictwem tych receptorów [53, 64]. Nowe leki można także projektować tak, aby nakierować lek na konkretny receptor powierzchniowy ccRCC – KMN (przeciwciała monoklonalne), ale także jako chemocuczulacz pozwalający przezwyciężyć oporność na chemioterapię (małocząsteczkowe związki, np. inhibitory transporterów lekowych ABC) [38]. W ostatnim czasie wskazywano, że interleukina 15 (IL-15) jest cząsteczką wpływającą na różnicowanie komórek macierzystych raka nerki i utratę ich właściwości macierzystości, w związku z czym mogłaby być wykorzystana jako lek [25, 26]. Wykazano, że KMN RCC są wrażliwe na działanie inhibitorów kinaz, takich jak sunitynib czy aksytynib [84], oraz że inhibitory te (ale nie bewacizumab) hamują różnicowanie KMN RCC w komórki naczyń i angiogenezę zależną od tych komórek [85]. Jednocześnie

hipoksja, do której dochodzi w guzie po zastosowaniu sunitynibu, a najpewniej także innych inhibitorów kinaz tyrozynowych, zwiększa liczbę KMN. Ich liczba wzrasta w perinekrotycznych obszarach guza, a w warunkach niedotlenienia komórki te dodatkowo stają się mniej wrażliwe na działanie leku [28]. Wydaje się, że dokładna identyfikacja populacji KMN i ich roli w guzach litych ułatwi dokładniejszą charakterystykę podtypów RCC i może ostatecznie przyczynić się do bardziej spersonalizowanych i skutecznych terapii. Szybki postęp w zrozumieniu biologii nowotworów wymaga jednak współpracy między wieloma instytucjami, w tym współpracy chirurgów, patologów, biologów molekularnych i lekarzy onkologów klinicznych [38, 86].

Podziękowania

Praca była przygotowana w ramach projektu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej TEAM/2010-6/8.

Piśmiennictwo

1. Szaryńska M., Kmiec Z. Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2011; 5: 47-56.
2. Wieczorek K., Niewiarowska J. Nowotworowe komórki macierzyste. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012; 66: 629-636.
3. Bussolati B., Bruno S., Grange C., Ferrando U., Camussi G. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J* 2008; 22: 3696-3705.
4. Oates J.E., Grey B.R., Adlra S.K., Samuel J.D., Hart C.A., Ramani V.A., Brown M.D., Clarke N.W. Hoechst 33342 side population identification is a conserved and unified mechanism in urological cancers. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 1515-1522.
5. Czarnecka A.M., Solarek W. The activity of tyrosine kinase inhibitors on clear cell renal cell carcinoma tumor initiating cells in hypoxic microenvironment. *BJU International* 2012; 110 (Suppl S2): 1-20.
6. Vermeulen L.E., De Sousa M.F., van der Heijden M., Cameron K., de Jong J.H., Borovski T., Tuynman J.B., Todaro M., Merz C., Rodermond H., Sprick M.R., Kemper K., Richel D.J., Stassi G., Medema J.P. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 468-476.
7. Metsuyanım S., Pode-Shakked N., Schmidt-Ott K.M., Keshet G., Rechavi G., Blumental D., Dekel B. Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes. *Stem Cells* 2008; 26: 1808-1817.
8. Pergoł P., Nowak-Stepniowska A., Drela K., Padzik-Graczyk A. Znaczenie komórek macierzystych w inicjacji i rozwoju nowotworów. *Postepy Biochem* 2013; 59: 45-52.
9. Baran J. Nowa epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometrach i ich zastosowanie. *Postepy Biol Komorki* 2008; 35: 3-15.
10. Pode-Shakked N., Shukrun R., Mark-Danieli M., Tsvetkov P., Bahar S., Pri-Chen S., Goldstein R.S., Rom-Gross E., Mor Y., Fridman E., Meir K., Simon A., Magister M., Kaminski N., Goldmacher V.S., Harari-Steinberg O., Dekel B. The isolation and characterization of renal cancer initiating cells from human Wilms' tumour xenografts unveils new therapeutic targets. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 18-37.
11. Czarnecka A., Matak D., Solarek W., Khan M., Szczylik C. Hypoxia response regulates clear cell renal cell carcinoma tumor initiating cells. *BJU International* 2013; 112 (Suppl. S3): 1-17.
12. Bruno S., Bussolati B., Grange C., Collino F., Graziano M.E., Ferrando U., Camussi G. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2006; 169: 2223-2235.
13. Debeb B.G., Zhang X., Krishnamurthy S., Gao H., Cohen E., Li L., Rodriguez A.A., Landis M.D., Lucci A., Ueno N.T., Robertson F., Xu W., Lacerda L., Buchholz T.A., Cristofanilli M., Reuben J.M., Lewis M.T., Woodward W.A. Characterizing cancer cells with cancer stem cell-like features in 293T human embryonic kidney cells. *Mol Cancer* 2010; 9: 180.
14. Ueda K., Ogasawara S., Akiba J., Nakayama M., Todoroki K., Ueda K., Sanada S., Suekane S., Noguchi M., Matsuoka K., Yano H. Aldehyde dehydrogenase 1 identifies cells with cancer stem cell-like properties in a human renal cell carcinoma cell line. *PLoS One* 2013; 8: e75463.
15. Gassenmaier M., Chen D., Buchner A., Henkel L., Schiemann M., Mack B., Schendel D.J., Zimmermann W., Pohla H. CXCR4 chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 2013; 31: 1467-1476.
16. Zhang L., Jiao M., Wu K., Li L., Zhu G., Wang X., He D., Wu D. TNF-alpha induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7: 4951-4958.

17. Wang L, Park P, La Marca F, Than K.D., Lin C.Y. BMP-2 inhibits tumor-initiating ability in human renal cancer stem cells and induces bone formation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141: 1013-1024.
18. Lichner Z., Saleh C., Subramaniam V, Seivwright A., Prud'homme G.J., Yousef G.M. miR-17 inhibition enhances the formation of kidney cancer spheres with stem cell/ tumor initiating cell properties. *Oncotarget* 2015; 6: 5567-5581.
19. Galleggiante V, Rutigliano M., Sallustio F, Ribatti D., Dittono P., Bettocchi C., Selvaggi F.P., Lucarelli G., Battaglia M. CTR2 identifies a population of cancer cells with stem cell-like features in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2014; 192: 1831-1841.
20. Lu J., Cui Y., Zhu J., He J., Zhou G., Yue Z. Biological characteristics of Rh123 stem-like cells in a side population of 786-O renal carcinoma cells. *Oncol Lett* 2013; 5: 1903-1908.
21. Zhong Y, Guan K, Zhou C., Wang D., Ma W., Zhang Y, Li C., Zhang S. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2010; 299: 150-160.
22. Lin Y, Yang Z., Xu A., Dong P, Huang Y, Liu H., Li F., Wang H., Xu Q., Wang Y, Sun D., Zou X., Zou X., Wang Y., Zhang D., Liu H., Wu X., Zhang M., Fu Y, Cai Z., Liu C., Wu S. PIK3R1 negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition and stem-like phenotype of renal cancer cells through the AKT/GSK3beta/CTNNB1 signaling pathway. *Sci Rep* 2015; 5: 8997.
23. Mahalingaiah P.K., Ponnusamy L, Singh K.P. Chronic oxidative stress leads to malignant transformation along with acquisition of stem cell characteristics, and epithelial to mesenchymal transition in human renal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2015; 230: 1916-1928.
24. Abbasi M.R., Heidari-Keshel S., Zahed R., Behrouzi G., Roozafzoon R, Aghazadeh S., Aghajanzpour L, Bashtar M., Khoshzaban A. Isolation and characterization of CD133 positive stem cell from human kidney with renal cell carcinoma. *J Cell Sci Ther* 2015; 6: 200; doi: 10.4172/2157-7013.1000200.
25. Azzi S., Bruno S., Giron-Michel J, Clay D., Devocelle A., Croce M., Ferrini S., Chouaib S., Vazquez A., Charpentier B., Camussi G., Azzarone B., Eid P. Differentiation therapy: targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1884-1898.
26. Azzi S., Gallerne C., Romei C., Le Coz V, Gangemi R, Khawam K, Devocelle A., Gu Y., Bruno S., Ferrini S., Chouaib S., Eid P., Azzarone B., Giron-Michel J. Human renal normal, tumoral, and cancer stem cells express membrane-bound interleukin-15 isoforms displaying different functions. *Neoplasia* 2015; 17: 509-517.
27. Hasmim M., Bruno S., Azzi S., Gallerne C., Michel J.G., Chiabotto G., Lecoz V, Romei C., Spaggiari G.M., Pezzolo A., Pistoia V, Angevin E., Gad S., Ferlicot S., Messai Y, Kieda C., Clay D., Sabatini F., Escudier B., Camussi G., Eid P., Azzarone B., Chouaib S. Isolation and characterization of renal cancer stem cells from patient-derived xenografts. *Oncotarget* 2016; 7: 15507-15524.
28. Varna M., Gapihan G., Feugeas J.P., Ratajczak P., Tan S., Ferreira I., Leboeuf C., Setterblad N., Duval A., Verine J, Germain S., Mongiat-Artus P., Janin A., Bousquet G. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 916-924.
29. Weygant N., Qu D., May R., Tierney R.M., Berry W.L., Zhao L, Agarwal S., Chandrakasan P., Chinthalapally H.R., Murphy N.T., Li J.D., Sureban S.M., Schlosser M.J., Tomasek J.J., Houchen C.W. DCLK1 is a broadly dysregulated target against epithelial-mesenchymal transition, focal adhesion, and stemness in clear cell renal carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6: 2193-2205.
30. Pode-Shakked N., Metsuyanin S., Rom-Gross E., Mor Y., Fridman E., Goldstein I., Amariglio N., Rechavi G., Keshet G., Dekel B. Developmental tumorigenesis: NCAM as a putative marker for the malignant renal stem/progenitor cell population. *J Cell Mol Med* 2009; 13(8B): 1792-1808.
31. Kozłowski M., Gajewska M., Motyl T. Identyfikacja i molekularne cechy komórek macierzystych gruczołu sutkowego. *Postepy Biol Komorki* 2009; 37: 107-120.
32. Nishizawa, S., Hirohashi Y., Torigoe T, Takahashi A., Tamura Y, Mori T, Kanaseki T, Kamiguchi K, Asanuma H, Morita R., Sokolovskaya A., Matsuzaki J, Yamada R, Fujii R, Kampinga H.H., Kondo T, Hasegawa T, Hara I., Sato N. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res* 2012; 72: 2844-2854.
33. Huang B, Fu S.J., Fan W.Z., Wang Z.H., Chen Z.B., Guo S.J., Chen J.X., Qiu S.P. PKC ϵ inhibits isolation and stemness of side population cells via the suppression of ABCB1 transporter and PI3K/Akt, MAPK/ERK signaling in renal cell carcinoma cell line 769P. *Cancer Lett* 2016; 376: 148-154.
34. Hughes C., Liew M., Sachdeva A., Bassan P., Dumas P., Hart C.A., Brown M.D., Clarke N.W., Gardner P. SR-FTIR spectroscopy of renal epithelial carcinoma side population cells displaying stem cell-like characteristics. *Analyst* 2010; 135: 3133-3141.
35. Buczek M., Escudier B., Bartnik E., Szczylik C., Czarnecka A. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: From the patient's bed to molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1845: 31-41.
36. Vaz A.P., Ponnusamy M.P., Batra S.K. Cancer stem cells and therapeutic targets: an emerging field for cancer treatment. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3: 113-120.

37. Shukrun R, Pode Shakked N., Dekel B. Targeted therapy aimed at cancer stem cells: Wilms' tumor as an example. *Pediatr Nephrol* 2014; 29: 815-823.
38. Sternberg C.N., Hawkins R.E., Wagstaff J., Salman P., Mardiak J., Barrios C.H., Zarba J.J., Gladkov O.A., Lee E., Szczylik C., McCann L., Rubin S.D., Chen M., Davis I.D. A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: final overall survival results and safety update. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1287-1296.
39. Bomken S., Fiser K., Heidenreich O., Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer* 2010; 103: 439-445.
40. Nakano I., Chiocia E.A. Finding drugs against CD133+ glioma subpopulations. *J Neurosurg* 2011; 114: 648.
41. Qiu W., Wang X., Leibowitz B., Liu H., Barker N., Okada H., Oue N., Yasui W., Clevers H., Schoen R.E., Yu J., Zhang L. Chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs eliminates oncogenic intestinal stem cells via SMAC-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 20027-20032.
42. Prud'homme G.J., Glinka Y., Toulina A., Ace O., Subramaniam V., Jothy S. Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. *PLoS One* 2011; 5(11): e13831.
43. Lin T.L., Matsui W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Oncotargets Ther* 2012; 5: 47-58.
44. Escudie B., Eisen T., Stadler W.M., Szczylik C., Oudard S., Siebels M., Negrier S., Chevreau C., Solska E., Desai A.A., Rolland F., Demkow T., Hutson T.E., Gore M., Freeman S., Schwartz B., Shan M., Simantov R., Bukowski R.M.; TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 125-134.
45. Morrison R., Schleicher S.M., Sun Y., Niermann K.J., Kim S., Spratt D.E., Chung C.H., Lu B. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011; 2011: 941876.
46. Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P., Michaelson M.D., Bukowski R.M., Rixe O., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Kim S.T., Chen I., Bycott P.W., Baum C.M., Figlin R.A. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 115-124.
47. Sternberg C.N., Davis I.D., Mardiak J., Szczylik C., Lee E., Wagstaff J., Barrios C.H., Salman P., Gladkov O.A., Kavina A., Zarbá J.J., Chen M., McCann L., Pandite L., Roychowdhury D.F., Hawkins R.E. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1061-1068.
48. Rini B.J., Escudier B., Tomczak P., Kaprin A., Szczylik C., Hutson T.E., Michaelson M.D., Gorbunova V.A., Gore M.E., Rusakov I.G., Negrier S., Ou Y.C., Castellano D., Lim H.Y., Uemura H., Tarazi J., Cella D., Chen C., Rosbrook B., Kim S., Motzer R.J. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011; 378: 1931-1939.
49. Motzer R.J., Nosov D., Eisen T., Bondarenko I., Lesovoy V., Lipatov O., Tomczak P., Lyulko O., Alyasova A., Harza M., Kogan M., Alekseev B.Y., Sternberg C.N., Szczylik C., Cella D., Ivanescu C., Krivoslik A., Strahs A., Esteves B., Berkenblit A., Hutson T.E. Tivozanib versus sorafenib as initial targeted therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma: results from a phase III trial. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3791-3799.
50. Reckamp K.L., Strieter R.M., Figlin R.A. Chemokines as therapeutic targets in renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 887-893.
51. Portella L., Vitale R., De Luca S., D'Alterio C., Ieranò C., Napolitano M., Riccio A., Polimeno M.N., Monfregola L., Barbieri A., Luciano A., Ciarmiello A., Arra C., Castello G., Amodeo P., Scala S. Preclinical development of a novel class of CXCR4 antagonist impairing solid tumors growth and metastases. *PLoS One* 2013; 8: e74548.
52. Botchkina G. Colon cancer stem cells – from basic to clinical application. *Cancer Lett* 2013; 338: 127-140.
53. Jarosz M., Szala S. Endoglin jako cel terapii przeciwnowotworowej. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2013; 67: 79-89.
54. Dubinski W., Gabril M., Iakovlev V.V., Scorilas A., Youssef Y.M., Faragalla H., Kovacs K., Rotondo F., Mehtas S., Arsanious A., Plotkin A., Girgis A.H., Streutker C.J., Yousef G.M. Assessment of the prognostic significance of endoglin (CD105) in clear cell renal cell carcinoma using automated image analysis. *Hum Pathol* 2012; 43: 1037-1043.
55. Sandlund J., Hedberg Y., Bergh A., Grankvist K., Ljungberg B., Rasmuson T. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 2006; 97: 706-710.
56. Kim K., Ihm H., Ro J.Y., Cho Y.M. High-level expression of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis. *Oncol Lett* 2011; 2: 1095-1100.
57. Costa W.H., Rocha R.M., Cunha I.W., Fonseca F.P., Guimaraes G.C., Zequi Sde C. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. *World J Urol* 2012; 30: 553-558.
58. D'Alterio C., Cindolo L., Portella L., Polimeno M., Consales C., Riccio A., Cioffi M., Franco R., Chiodini P., Carteni G., Mirone V., Longo N., Marra L., Perdonà S., Claudio L., Mascolo M., Staibano S., Falsaperla M.,

- Puglisi M., Martignoni G., Ficarra V., Castello G., Scala S. Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma. *Cell Cycle* 2010; 9: 4492-4500.
59. Rini B., Szczylik C., Tannir N.M., Koralewski P., Tomczak P., Deptala A., Dirix L.Y., Fishman M., Ramlau R., Ravaud A., Rogowski W., Kracht K., Sun Y.N., Bass M.B., Puhlmann M., Escudier B. AMG 386 in combination with sorafenib in patients with metastatic clear cell carcinoma of the kidney: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Cancer* 2012; 118: 6152-6161.
60. Feng G., Jiang F., Pan C., Pu C., Huang H., Li G. Quantification of peripheral blood CD133 mRNA in identifying metastasis and in predicting recurrence of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2014; 32: 44.e9-14.
61. Zhang Y., Sun B., Zhao X., Liu Z., Wang X., Yao X., Dong X., Chi J. Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2013; 108: 414-419.
62. Ozbek E., Calik G., Otuncdemir A., Aliskan T., Cakir S., Dursun M., Somay A. Stem cell markers aldehyde dehydrogenase type 1 and nestin expressions in renal cell cancer. *Arch Ital Urol Androl* 2012; 84: 7-11.
63. Wang K., Chen X., Zhan Y., Jiang W., Liu X., Wang X., Wu B. Increased expression of ALDH1A1 protein is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Med Oncol* 2013; 30: 574.
64. Gebura K., Bogunia-Kubik K. Kliniczne znaczenie receptora chemokinowego CXCR4. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2012; 66: 252-266.
65. Cai C., Wang L.H., Dong Q., Wu Z.J., Li M.Y., Sun Y.H. Association of CXCL12 and CXCR4 gene polymorphisms with the susceptibility and prognosis of renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* 2013; 82: 165-170.
66. Li X., Huang Y., Xia J., Chen N., Wei Q., Li X., Zhang P., Shen P.F., Wang J., Zeng H. CXCR4 expression in patients with high-risk locally advanced renal cell carcinoma can independently predict increased risk of disease progression and poor overall survival. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12: 3313-3318.
67. D'Alterio C., Consales C., Polimeno M., Franco R., Cindolo L., Portella L., Cioffi M., Calemma R., Marra L., Claudio L., Perdonà S., Pignata S., Facchini G., Carteni G., Longo N., Pucci L., Ottaiano A., Costantini S., Castello G., Scala S. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10: 772-781.
68. Wehler T.C., Graf C., Biesterfeld S., Brenner W., Schadt J., Gockel I., Berger M.R., Thüroff J.W., Galle P.R., Moehler M., Schimanski C.C. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma correlates with advanced disease. *J Oncol* 2008; 2008: 626340.
69. Li G., Badin G., Zhao A., Gentil-Perret A., Tostain J., Péoc'h M., Gigante M. Prognostic value of CXCR4 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2013; 28: 1217-1222.
70. D'Alterio C., Portella L., Ottaiano A., Rizzo M., Carteni G., Pignata S., Facchini G., Perдона S., Di Lorenzo G., Autorino R., Franco R., La Mura A., Nappi O., Castello G., Scala S. High CXCR4 expression correlates with sunitinib poor response in metastatic renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12: 693-702.
71. Liu Y., Zhang C., Fan J., Xiao L., Yin B., Zhou L., Xia S. Comprehensive analysis of clinical significance of stem-cell related factors in renal cell cancer. *World J Surg Oncol* 2011; 9: 121.
72. Oldenhuis C.N., Oosting S.F., Gietema J.A., de Vries E.G. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* 2008; 44: 946-953.
73. Muriel López C., Esteban E., Berros J.P., Pardo P., Astudillo A., Izquierdo M., Crespo G., Sanmamed M., Fonseca P.J., Martínez-Camblor P. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 2012; 10: 262-270.
74. Michaelson M.D., Stadler W.M. Predictive markers in advanced renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 2013; 40: 459-464.
75. Statkiewicz M., Mątecki M. Rola szlaku sygnowanego sonic hedgehog w nowotworzeniu: macierzyste komórki nowotworowe, oporność wielolekowa, angiogeneza. *Postepy Biol Komorki* 2012; 39: 531-553.
76. Styczynski J. Nowotworowe komórki macierzyste: koncepcja i markery. *Med Biol Sci* 2008; 22: 15-20.
77. Styczynski J. Nowotworowe komórki macierzyste: szlaki samoodnowy. *Med Biol Sci* 2008; 22: 21-24.
78. 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.
79. Navarro-Alvarez N., Kondo E., Kawamoto H., Hassan W., Yuasa T., Kubota Y., Seita M., Nakahara H., Hayashi T., Nishikawa Y., Hassan R.A., Javed S.M., Noguchi H., Matsumoto S., Nakaji S., Tanaka N., Kobayashi N., Soto-Gutierrez A. Isolation and propagation of a human CD133(-) colon tumor-derived cell line with tumorigenic and angiogenic properties. *Cell Transplant* 2010; 19: 865-877.
80. Oliveira L.R., Jeffrey S.S., Ribeiro-Silva A. Stem cells in human breast cancer. *Histol Histopathol* 2010; 25: 371-385.
81. Bussolati B., Brossa A., Camussi G. Resident stem cells and renal carcinoma. *Int J Nephrol* 2011; 2011: 286985.
82. Stuelten C.H., Mertins S.D., Busch J.I., Gowens M., Scudiero D.A., Burkett M.W., Hite K.M., Alley M., Hollingshead M., Shoemaker R.H., Niederhuber J.E. Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem Cells* 2010; 28: 649-660.

83. Bussolati B., Bruno S., Grange C., Buttiglieri S., Deregibus M.C., Cantino D., Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 2005; 166: 545-555.
84. Czarnecka A.M., Solarek W., Kornakiewicz A., Szczylik C. Tyrosine kinase inhibitors target cancer stem cells in renal cell cancer. *Oncol Rep* 2016; 35: 1433-1442.
85. Brossa, A., Grange C., Mancuso L., Annaratone L, Satolli M.A., Mazzone M., Camussi G., Bussolati B. Sunitinib but not VEGF blockade inhibits cancer stem cell endothelial differentiation. *Oncotarget* 2015; 6: 11295-11309.
86. Grotenhuis B.A., Wijnhoven B.P., van Lanschoot J.J. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors. *J Surg Oncol* 2012; 106: 209-215.